

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CARDIO NEFRO TORACICHE**

Ciclo XXX

Settore Concorsuale di afferenza: 06/D2

Settore Scientifico disciplinare: MED/14

**STUDIO DELL'EFFETTO IMMUNOMODULATORIO *IN VITRO*
DI NGAL SU PBMC DI PAZIENTI IN TRATTAMENTO
EMODIALITICO E IPERIMMUNI**

In vitro immunomodulatory effect of NGAL on PBMCs derived from
haemodialysis and hyperimmunized patients

Presentata da: **Dott.ssa Chiara Zannini**

Coordinatore Dottorato

Prof. Gaetano Domenico Gargiulo

Supervisore

Prof. Gaetano La Manna

Esame finale anno 2018

INDICE

ABSTRACT	1
CAPITOLO I: INSUFFICIENZA RENALE CRONICA	2
Insufficienza renale cronica.....	2
Pazienti dializzati iperimmuni	7
Attività regionale e locale.....	9
I linfociti T.....	13
I linfociti T regolatori	15
HLA-G	18
Neutrophil gelatinase-associated lipocalin .	20
CAPITOLO II: LE CELLULE STAMINALI	25
Introduzione: le cellule staminali	25
Cellule staminali adulte	26
Plasticità delle cellule staminali adulte.....	29
Cellule staminali mesenchimali	29
Capacità immunomodulatoria.....	31
Fonti alternative di MSC.....	33
Il tessuto adiposo.....	34
Applicazioni.....	37
Terapie cellulari e trapianti d'organo	39
SCOPO.....	42
MATERIALI E METODI	44
Arruolamento	44
Isolamento di cellule mononucleate.....	44
Coltura cellulare e trattamenti con NGAL ...	45
Saggio di proliferazione.....	45
Ciclo cellulare.....	46
Caratterizzazione immunofenotipica	46
Valutazione di HLA-G solubile.....	47
Isolamento di cellule mesenchimali da tessuto adiposo	48
Allestimento di colture di mesenchimali	48
Valutazione dell'espressione genica	48
Estrazione e quantificazione dell'RNA totale.....	49
Retrotrascrizione	50
Progettazione <i>primer</i>	51
Valutazione dell'efficienza dei <i>primer</i>	52
RealTime-PCR	52
Caratterizzazione immunofenotipica.....	54
Proliferazione cellulare	55
Valutazione della tossicità di NGAL	55
Allestimento di co-culture.....	56
RISULTATI	57
Casistica	57
Coltura cellulare e trattamenti con NGAL....	59
Proliferazione cellulare	60
Ciclo cellulare	61
Caratterizzazione immunofenotipica.....	62
Valutazione del rilascio di HLA-G solubile....	64
Isolamento di cellule mesenchimali da tessuto adiposo	65
Trattamento di ASC con NGAL	65
Valutazione dell'espressione genica tramite RealTime-PCR	67
Proliferazione cellulare	68
Caratterizzazione immunofenotipica.....	69
Valutazione della tossicità di NGAL	69
Allestimento di co-culture.....	70
Proliferazione cellulare post co-coltura.....	71
Ciclo cellulare post co-coltura.....	72
Caratterizzazione immunofenotipica post co-coltura	73
Valutazione dell'espressione genica post- co-culture tramite RealTime-PCR.....	75
CONCLUSIONI.....	79
BIBLIOGRAFIA	83

ABSTRACT

In recent years, an increasing number of patients waiting for a kidney transplant showed the presence of alloantibodies against HLA antigens and non-HLA. Evidence demonstrates the contribution of regulatory T lymphocyte cells (*Treg*) in modulating the immune response in different animal models and in clinical transplant, to suggest their potential use as markers of tolerance, rejection or prediction of organ transplant outcome. Recently, *Treg* has been shown to increase immunotolerance following MSCs infusion into experimental models of solid organ transplantation.

We have previously provided *in vitro* evidence that NGAL (*Neutrophil gelatinase-associated lipocalin*), a known biomarker of renal injury, is able to induce immune tolerance by upregulating HLA-G expression and expansion of *Treg* in normal subjects.

In this study, we evaluated the effect of NGAL on expansion of *Treg* and HLA-G expression in haemodialysis and hyperimmunized patients; then, we investigated the immunomodulatory effect of adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) on PBMCs derived from patients. We carried out isolation from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and immunophenotypic *in vitro* characterization of *Treg* after NGAL treatment and after co-culture with ASCs.

Our results demonstrated an immunomodulatory effect NGAL-mediated on lymphomonocyte population derived by non-hyperimmunized, as *Treg* population and HLA-G expression augmented, while this effect is inhibited in PBMCs derived from hyperimmunized patients. The immunomodulatory effect on PBMCs in these patients is re-established *in vitro* by co-culture with adipose-derived mesenchymal stem cells. ASCs could be a good future prospective for modulating immune system before or during kidney transplant in hyperimmunized patients, expanding access to transplants to these complex patients.

Negli ultimi anni è cresciuto l'interesse verso pazienti in attesa di un trapianto di rene identificati per la presenza elevata di alloanticorpi contro antigeni HLA e non-HLA, definiti iperimmuni. Recentemente, è stato dimostrato l'aumento dell'immunotolleranza ad opera della componente linfocitaria T regolatoria (*Treg*) dopo l'infusione di MSCs in modelli sperimentali di trapianto d'organo. Alcuni studi hanno infatti dimostrato il contributo di *Treg* nella modulazione della risposta immunitaria in diversi modelli animali e nel trapianto clinico, per suggerire il loro potenziale utilizzo come marcatori di tolleranza, rigetto o previsione dell'*outcome* del trapianto d'organo.

Un precedente studio ha dimostrato che NGAL (*Neutrophil gelatinase-associated lipocalin*), un noto *biomarker* di danno renale, è in grado di indurre *in vitro* immunotolleranza aumentando l'espressione di HLA-G e l'espansione di *Treg* in cellule linfo-monocitarie (PBMC) di soggetti sani.

In questo studio, si è valutato l'effetto di NGAL sull'espansione di *Treg* e l'espressione di HLA-G in pazienti con insufficienza renale cronica sottoposti ad emodialisi e iperimmuni, e si è approfondita la capacità immunomodulatoria di cellule staminali mesenchimali adulte derivate da tessuto adiposo (ASC) nei confronti di PBMC derivati da queste categorie di pazienti.

I nostri risultati hanno dimostrato un effetto immunomodulatorio mediato da NGAL sulla popolazione linfo-monocitaria derivata da pazienti in emodialisi non iperimmuni, in maniera dose dipendente, evidenziato dall'aumento della popolazione di *Treg* e dall'espressione di HLA-G, mentre questo effetto è risultato inibito in PBMC derivati da pazienti iperimmuni. L'immunomodulazione sui PBMC in quest'ultima categoria di pazienti è stata ristabilita *in vitro* in seguito all'allestimento di co-culture con cellule staminali mesenchimali derivate da tessuto adiposo. Le ASC potrebbero essere una buona prospettiva futura di terapia cellulare autologa per modulare il sistema immunitario, prima o durante il trapianto di rene, in pazienti iperimmuni, ampliando l'accesso ai trapianti d'organo a questi pazienti complessi.

CAPITOLO I: INSUFFICIENZA RENALE CRONICA

Insufficienza renale cronica

L'insufficienza renale cronica (*chronic kidney disease, CKD*) è una patologia caratterizzata dalla perdita progressiva e irreversibile della struttura e delle funzioni escretorie, endocrine e metaboliche dei reni.

Secondo le linee guida del *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI)* della National Kidney Foundation l'insufficienza renale cronica è definita tale quando la velocità di filtrazione glomerulare (*estimated Glomerular Filtration Rate, eGFR*) scende sotto i 60 ml/min/1,73 m² per un periodo di almeno tre mesi.¹

Il danno renale può essere accertato grazie alla presenza di albuminuria maggiore di 30 mg/g in almeno due campioni di urina su tre², mentre eGFR, che è considerato il “*gold standard*” per determinare la funzione renale nella pratica clinica è calcolato sulla base della *clearance* della creatinina³, un aminoacido che deriva dal metabolismo muscolare del creatinofosfato, mediante l'equazione di Cockcroft-Gault.

L'insufficienza renale cronica può essere suddivisa in 5 stadi a seconda del valore del eGFR⁴:

- Stadio 1: (eGFR >90 ml/min per 1,73 m²), in cui la funzione renale è normale, ma potrebbero comparire anomalie strutturali o alterazioni negli esami del sangue o delle urine.
- Stadio 2: (eGFR 60-89 ml/min per 1,73 m²), in cui si riscontra un danno renale e la funzione è lievemente ridotta.
- Stadio 3: (eGFR 30-59 ml/min per 1,73 m²), in cui è presente danno renale con funzione moderatamente ridotta.
- Stadio 4: (eGFR 15-29 ml/min per 1,73 m²), in cui il danno ha gravemente compromesso la funzione renale.
- Stadio 5: (eGFR >15 ml/min per 1,73 m²)⁵, quando il paziente è nella fase terminale dell'insufficienza renale (*End-Stage Renal Disease, ESRD*). In questa fase è necessario sottoporre il paziente ad un trattamento emodialitico sostitutivo, in quanto il livello della sua funzione renale non è compatibile con la vita³ ed è necessario porre particolare attenzione all'aumento di patologie cardiovascolari aterosclerotiche.⁶

La progressione della CKD dipende principalmente dalla patologia di base scatenante il danno renale, ma è favorita anche da: ipertensione arteriosa sistemica, danno renale da ipoperfusione o sostanze nefrotossiche, proteinuria, dislipidemia, iperfosforemia, ridotti livelli di ossido nitrico e fumo di sigaretta.

Le cause principali che comportano l'insorgenza dell'insufficienza renale cronica, soprattutto nei Paesi più sviluppati, sono il diabete e l'ipertensione, glomerulonefriti, patologie tubulo-interstiziali come la nefropatia da reflusso, il rene policistico e ostruzioni delle vie urinarie.³ Al contrario, nei Paesi in via di sviluppo questa patologia è dovuta all'insorgenza di infezioni per scarse condizioni igienico-sanitarie, acque contaminate e in seguito all'assunzione o abuso di erbe medicinali potenzialmente tossiche.⁷

Anche fattori genetici possono contribuire all'insorgenza della CKD, studi hanno infatti dimostrato che polimorfismi del gene della catena pesante 9 della miosina non muscolare (MYH9) e dell'apolipoproteina I (APOI) sono associati all'insorgenza di questa patologia nella popolazione africana.⁸⁻⁹

In genere i pazienti non manifestano i sintomi della malattia fino a che non raggiungono gli stadi più avanzati, questo perché i nefroni superstiti vanno incontro ad un'ipertrofia compensatoria che comporta un aumento della filtrazione e di eGFR dei nefroni residui. Con il progredire di questo stato, però, l'adattamento danneggia il rene stesso: i nefroni residui vanno incontro a sclerosi e lesioni tubulo-interstiziali che inducono un peggioramento della funzionalità renale e un'ulteriore perdita di nefroni.¹⁰

La fase terminale della CKD, definita anche "fase dialitica", è caratterizzata dalla comparsa della sindrome uremica, in cui il paziente mostra dei sintomi caratteristici dovuti alla riduzione della funzionalità renale e al conseguente accumulo di sostanze tossiche nel plasma.

Gli effetti sistemici dell'uremia terminale sono molteplici e spesso collegati tra di loro.

In questa fase i pazienti in genere mostrano sintomi quali astenia, dimagrimento, vomito, pallore, alito maleodorante e brina uremica. Conseguentemente a questa sindrome nei pazienti insorgono gravi manifestazioni ematologiche, cardiovascolari, endocrine, neurologiche ed ossee.

In primo luogo la compromissione della funzionalità renale comporta una riduzione della vitamina D e una resistenza al calcitriolo, a ciò, consegue un'ipocalcemia che induce un aumento della sintesi di ormone paratiroideo (PTH), definito come iperparatiroidismo secondario¹¹ e da uno squilibrio a carico degli ioni bivalenti. Questa condizione ha effetti tossici a livello

cardiovascolare e porta ad un aumento della morbilità e della mortalità nei pazienti con CKD, in particolare a seguito dell'aumentata deposizione di calcio a livello vascolare.

Inoltre, nelle fasi più avanzate della malattia, il rene non riuscendo ad eliminare il sodio in eccesso, porta all'insorgenza o alla complicazione di patologie cardiovascolari¹¹, come l'ipertensione arteriosa, che, a sua volta, porta ad un'ulteriore perdita di nefroni funzionanti con conseguente aggravamento dell'ipertensione stessa.

L'iperparatiroidismo secondario, l'anemia, l'ipertensione, il sovraccarico di fluidi e l'acidosi metabolica nel paziente uremico possono aggravare una preesistente condizione di insufficienza cardiaca o portare allo sviluppo della stessa, che determina un'elevata morbilità e mortalità cardiovascolare.¹²⁻¹³

Condizioni come il diabete mellito, l'obesità, l'ipertensione arteriosa primaria e l'inattività fisica, in associazione con CKD, rappresentano un ulteriore fattore di rischio per lo sviluppo di patologie cardiovascolari.

Durante la progressione della CKD è possibile anche riscontrare la presenza di alterazioni ossee, come osteite fibrosa, osteoporosi, dovute alla ridotta sintesi di vitamina D attiva ed a iperparatiroidismo secondario, oltre che il manifestarsi di calcificazioni in organi e arterie di medio e grosso calibro che ne aumentano la rigidità delle pareti.^{14,15}

Nei pazienti dializzati la calcificazione non riguarda esclusivamente la tonaca intima come nella patologia aterosclerotica classica, ma interessa anche la tonaca media. Ciò comporta una risposta al danno anche da parte delle cellule muscolari lisce, oltre che da parte delle cellule endoteliali. Conseguentemente si ha un maggior rilascio di fattori di crescita e citochine pro-infiammatorie che comportano l'attivazione del sistema immunitario.

La riduzione della funzione escretoria del rene comporta anche iperfosfatemia, ipomagnesemia e iperkaliemia, in genere però l'equilibrio dello ione potassio (K⁺) rimane intatto fino a che eGFR non scende sotto i 10 ml/min.¹¹

Dal punto di vista ematologico, la manifestazione principale della sindrome uremica è l'anemia, dovuta all'incapacità del rene di produrre una quantità sufficiente di eritropoietina (EPO), determinando una riduzione di reticolociti prodotti dal midollo. L'emolisi indotta dalla presenza nel sangue di tossine uremiche, in grado anche di inibire l'eritropoiesi stessa, è un altro fattore che contribuisce all'insorgenza e al peggioramento dell'anemia. A peggiorare il quadro spesso si aggiungono i deficit di ferro e folati che il paziente potrebbe presentare a causa di un inadeguato apporto con la dieta.¹⁶

I pazienti con uremia terminale mostrano anche una riduzione del numero di piastrine con prolungamento del tempo di sanguinamento (*uremic bleeding*). Ciò si verifica in quanto si sviluppa un'alterazione nella funzione del fattore VIII della coagulazione: le piastrine acquisiscono un'eccessiva capacità di adesione e aggregazione, che ostacola il loro normale funzionamento. Questa alterazione si manifesta con petecchie, porpora, aumento del rischio di sanguinamento dopo una ferita e ecchimosi.

Le complicanze neurologiche nel paziente uremico sono generalmente lievi, tuttavia quando eGFR scende sotto i 10-15 ml/min, può manifestarsi anche encefalopatia uremica, con conseguente difficoltà di concentrazione, confusione, letargia, euforia, depressione, apatia, insonnia, irritabilità e, se non trattata, coma.¹¹

Possono inoltre insorgere manifestazioni neuromuscolari e neurovegetative; tutti i pazienti con CKD sviluppano neuropatia uremica asintomatica che colpisce sia i nervi motori che quelli sensitivi e che interessa soprattutto i nervi periferici degli arti inferiori.

I pazienti uremici presentano alterazioni anche a livello del sistema immunitario, a carico sia dell'immunità umorale che dell'immunità cellulare.

A causa della ridotta funzionalità renale, l'immunosoppressione acquisita dai pazienti con CKD è dovuta principalmente:¹⁷

- all'accumulo di tossine uremiche a basso peso, come acido fenilacetico, omocisteina, composti della guanidina nel sangue, che inibiscono l'attivazione delle cellule del sistema immunitario e favoriscono l'apoptosi dei leucociti e la lisi dei fagociti (*oxidative burst*);
- allo stato di stress ossidativo cronico che porta ad un aumento dell'ossidazione delle proteine con conseguente riduzione dell'attività di enzimi, citochine ed anticorpi, contribuendo alla generazione di uno stato infiammatorio e di immunosoppressione;
- alla riduzione della produzione di eritropoietina che porta ad un aggravamento dello stato di stress ossidativo cronico e ad un aumento della concentrazione di tossine uremiche nel sangue.

In caso di sindrome uremica si può manifestare anche disbiosi intestinale che comporta un'alterazione della barriera intestinale; ciò favorisce la proliferazione di batteri patogeni, che, possono produrre tossine uremiche all'interno dell'intestino, riducendo la sintesi di acidi grassi a catena corta con funzione immunoregolatoria.¹⁷

A causa della ridotta funzionalità renale, nel siero dei pazienti si accumulano proteine di dimensioni <50 kDa, che in condizioni normali verrebbero filtrate dal glomerulo. Questo accumulo porta concentrazioni proteiche tali da avere effetti sul sistema immunitario tra cui la

soppressione dell'attività delle cellule B e dei granulociti, la formazione di fibrille di amiloide, l'attivazione di un *pathway* alternativo del complemento con funzione immunosoppressiva sui linfociti B.¹⁷ Inoltre, l'accumulo delle proteine che legano il retinolo può influenzare il rapporto tra linfociti T regolatori (*Treg*) e linfociti T helper 17 (T_{H17}), come viene riscontrato in patologie autoimmuni e infiammatorie.¹⁸

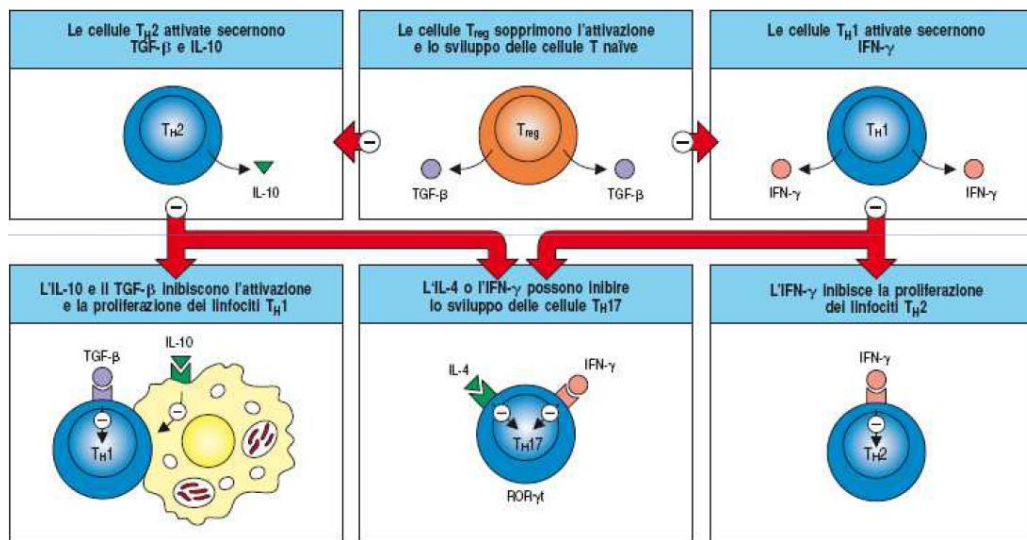


Figura 1: Meccanismi regolatori all'interno della popolazione linfocitaria

Poiché l'insufficienza renale cronica è una patologia progressiva irreversibile, il paziente deve scegliere insieme al nefrologo quale tipo di terapia attuare per sostituire la funzione renale. Le terapie sostitutive maggiormente eseguite sono l'emodialisi e la dialisi peritoneale per permettere la rimozione delle sostanze di rifiuto potenzialmente tossiche, anche se la terapia d'elezione per ottenere un'ottima ripresa della funzione renale a lungo termine rimane il trapianto di rene.

L'emodialisi rappresenta il processo dialitico più diffuso e, a differenza della dialisi peritoneale, deve essere svolto in ambulatori attrezzati e consente al paziente con insufficienza renale cronica di attendere il trapianto anche per numerosi anni, mantenendo una buona qualità di vita. Durante la dialisi si può verificare l'insorgenza di complicanze nei pazienti dializzati o l'aggravarsi di complicanze preesistenti tali da determinare una mortalità maggiore rispetto ai pazienti sottoposti a dialisi peritoneale.

Pazienti dializzati iperimmuni

Nell'ambito dei pazienti sottoposti a trattamento dialitico occorre prestare particolare attenzione a quelli definiti iperimmuni. A livello europeo circa il 2% dei pazienti è iperimmune, mentre in USA la percentuale è intorno al 14%.¹⁹

Un paziente viene definito iperimmune quando presenta per 3 misurazioni un pannello anticorpale (*Panel Reactive Antibody, PRA*) $\geq 80-85\%$, in base ai parametri europei o USA rispettivamente.¹⁹

Il PRA è un indice utilizzato per valutare la sensibilizzazione contro gli antigeni HLA (*Human Leucocyte Antigen*)²⁰, proteine localizzate sulla superficie cellulare che mediano l'interazione tra i leucociti e le cellule dell'organismo, attraverso la presentazione di peptidi antigenici al sistema immunitario. Quando queste proteine sono riconosciute come estranee dai leucociti possono scatenare reazioni immunitarie.

Gli antigeni HLA sono estremamente variabili tra gli individui, perciò hanno una notevole importanza nei trapianti: molecole HLA del donatore possono essere riconosciute come estranee dal sistema immunitario del ricevente. Più le molecole HLA del donatore e del ricevente sono simili, minore sarà il rischio di rigetto, di conseguenza valori di PRA elevati si associano ad una ripresa ritardata della funzionalità dell'organo trapiantato e a prognosi sfavorevole con l'insorgenza del rigetto acuto e la perdita dell'organo trapiantato.^{20,21}

La sensibilizzazione verso gli antigeni si crea quando il paziente viene esposto ad antigeni HLA *not-self*, ad esempio durante precedenti gravidanze, trasfusioni o trapianti e comporta una lunga permanenza in lista d'attesa per il trapianto renale, in quanto diventa molto difficile trovare un donatore compatibile, oltre che richiedere una maggiore immunosoppressione.²²

In alcuni casi anticorpi anti-HLA sono stati rilevati anche in soggetti che non sono mai venuti a contatto con eventi sensibilizzanti. Questi tipi di anticorpi sono chiamati "spontanei" e ne si trova un esempio in uno studio su una popolazione pediatrica di 23 bambini in attesa di trapianto che non hanno mai ricevuto trasfusioni, dove il 26% ha sviluppato anticorpi anti-HLA nel corso di 9 mesi. Ciò potrebbe essere dovuto a una *cross-sensibilizzazione* in seguito a infezioni come influenza, epatite C e al contatto con microorganismi, proteine ingerite o allergeni. In alcuni casi anche eventi pro-infiammatori come traumi o operazioni sono associati ad un aumento degli anticorpi anti-HLA.²³

La risposta immunitaria che si attiva nei riceventi d'organo coinvolge sia l'attivazione delle cellule B che T. L'attivazione dei linfociti B comporta la produzione di anticorpi contro le cellule

riconosciute come *not-self*, mentre i linfociti T attivati riescono a infiltrare l'organo trapiantato, identificato come estraneo, causandone la distruzione per mezzo di un effetto citotossico e infiammatorio.¹⁹

In alcuni casi gli anticorpi non sono rilevabili, ma le cellule di memoria possono comunque essere presenti e dare origine a una rapida risposta immunologica secondaria con rilascio di un'elevata quantità di IgG specifiche in seguito all'esposizione all'antigene.¹⁹

Poiché per alcuni pazienti iperimmuni diventa impossibile trovare un donatore compatibile, è di fondamentale interesse lo sviluppo di nuovi protocolli di desensibilizzazione che permettano di effettuare un trapianto anche con un *crossmatch* positivo, cioè anche se il paziente presenta anticorpi anti-HLA del suo potenziale donatore. Lo scopo di queste nuove tecniche è quello di mantenere, per le prime settimane o mesi, gli anticorpi donatore specifico (*donor-specific antibodies*, DSA) sotto la soglia che causa il rigetto dell'organo, infatti durante questo periodo il rene trapiantato sembra sviluppare un grado di resistenza al danno mediato da anticorpi. Questa condizione viene definita "*accomodation*" ed è probabilmente dovuta all'*up*-regolazione di geni protettivi.²¹

Una strategia di desensibilizzazione consiste nella somministrazione ad alte dosi di immunoglobuline, per via endovenosa (*IntraVenous ImmunoGlobulin*, IVIG), in grado di inibire la proliferazione delle cellule T, la sintesi delle citochine pro-infiammatorie e l'attivazione del complemento, inoltre, fa sì che le immunoglobuline somministrate interagiscano con i macrofagi e le cellule dendritiche sopprimendo la maturazione di quest'ultime *in vivo*.²⁴ Questo trattamento comporta anche un aumento della sintesi di citochine prodotte dai linfociti T *helper* 2 (T_{H2}), determinando un'*up*-regolazione del recettore FcγIIb presente sui linfociti B con funzioni immunomodulatorie.²⁴ Studi recenti hanno anche dimostrato un ruolo per IVIG nell'espansione della popolazione dei linfociti T regolatori FoxP3⁺, noti per le loro capacità immunomodulatorie.²⁵

Un'altra tecnica utilizzata per indurre una immunotolleranza verso l'organo trapiantato è la somministrazione di farmaci biotecnologici, il cui principio attivo è una sostanza biologicamente attiva, come proteine o acidi nucleici, prodotta da una sorgente biologica. A questa categoria di farmaci appartengono ormoni, enzimi, immunoglobuline e anticorpi monoclonali, che agiscono selettivamente sui specifici recettori cellulari. Il vantaggio dei farmaci biotecnologici rispetto a quelli tradizionali, ottenuti da molecole e reagenti chimici tramite reazioni di sintesi, è l'azione selettiva verso la cellula "bersaglio", risparmiando cellule sane. Ciò si traduce in un miglioramento della tollerabilità della terapia da parte del paziente e, di conseguenza, della sua qualità della vita. Un esempio di farmaco biotecnologico utilizzato nei protocolli di

desensibilizzazione è il Rituximab, un anticorpo monoclonale diretto contro il CD20, recettore di membrana espresso sui linfociti B e implicato nel controllo dell'attivazione del recettore delle cellule B (BCR).²⁴ Il Rituximab permette la deplezione dei linfociti B maturi CD20⁺ che potrebbero produrre anticorpi anti-HLA donatore specifico. In alcuni casi a questo trattamento viene aggiunta anche la somministrazione del Bortezomib, un inibitore del proteasoma capace di causare l'apoptosi delle plasmacellule ed in grado quindi di ridurre il numero di alloanticorpi prodotti nei pazienti iperimmuni.²⁶

Un'altra strategia di desensibilizzazione sfrutta la plasmaferesi per ottenere la riduzione degli anticorpi dal plasma; questa tecnica però determina la rimozione anche di altre proteine plasmatiche. È perciò possibile rendere la plasmaferesi più selettiva sfruttando i meccanismi base dell'immunoassorbimento con l'utilizzo di una colonna con alta affinità di legame per le IgG, permettendone la rimozione dal plasma.²⁶

I protocolli di desensibilizzazione spesso mostrano una bassa efficacia e permettono soltanto una breve-intermedia sopravvivenza del rene trapiantato.²¹

Oltre all'utilizzo di questi protocolli, è stato dimostrato che nei pazienti iperimmuni l'acido micofenolico è in grado di ridurre il valore del PRA, infatti esso ha inibisce la risposta dei linfociti T, che a loro volta mediano il rigetto cellulare acuto, oltre che bloccare la risposta dei linfociti B.²⁷

Attività regionale e locale ²⁸

La lista d'attesa per trapianto di rene dell'Emilia-Romagna è caratterizzata da un'età media elevata ($51,47 \pm 11,22$ anni) e da una notevole complessità clinica vista la presenza di numerosi pazienti candidati a ritrapianto e immunizzati.

Uno degli aspetti più qualificanti della lista regionale è rappresentato dai "programmi speciali", che prevedono una risposta complessa ed articolata alle altrettante complesse esigenze dei pazienti, occupandosi di trapianti combinati per le insufficienze multi-organo (rene/cuore, rene/fegato, rene/pancreas), della gestione delle urgenze e dei pazienti che attendono da più tempo o risultano di più difficile trapiantabilità (ritrapianti, immunizzati).

I tempi di attesa dei pazienti trapiantati nel 2016 (mediamente 2,54 anni) sono in diminuzione rispetto al passato, mentre risultano stabili i tempi medi di permanenza in lista (3,69 anni), con una mortalità riscontrata del 1,09%.

Presso il Policlinico S. Orsola si è confermato un elevato turnover di pazienti iscritti in lista di attesa per trapianto di rene, con 122 nuovi ingressi a fronte di 185 uscite, con età media degli iscritti di 51,2 anni in un range di 17-78 anni. Da evidenziare inoltre la differenza di età fra i pazienti

incidenti allocati alla dialisi peritoneale e quelli a emodialisi, essendo i primi più giovani di circa 7 anni in media, a conferma dell'utilizzo della dialisi peritoneale nei più giovani, cercando di avere un impatto minore sullo stile di vita.

Le cause di uscita di lista sono state principalmente per sopraggiunto trapianto, a cui sono seguite cause di non idoneità clinica in pazienti precedentemente in lista o non idoneità clinica iniziale, decesso, volontà del paziente, follow-up oncologico, miglioramento, iscrizione in altri Centri Trapianto o ripetuto rifiuto al trapianto.

Un significativo numero di pazienti iscritti in lista di attesa presso il Policlinico per trapianto di rene presenta situazioni cliniche ed immunologiche di particolare complessità, tra cui: 117 pazienti con 1 precedente trapianto di rene; 10 con 2 precedenti trapianti di rene; 88 pazienti immunizzati o con elevato numero di specificità anticorpali (PRA>50%) di cui 57 definibili iperimmuni (PRA>80%), caratterizzati anche da un tempo di attesa >10 anni ed inseriti nel Programma Nazionale Iperimmuni.

Le nefropatie che hanno condotto all' uremia terminale e quindi alla necessità di trattamento dialitico cronico sono, per quasi la metà dei casi, forme secondarie a patologie sistemiche, incluso le forme genericamente definite di nefroangiosclerosi, e per il 18,6% al diabete mellito.

La mortalità generale nei pazienti in trattamento dialitico è stata del 16,8% (calcolata come numero assoluto dei decessi rapportato al numero medio dei prevalenti nell'anno). Come sempre, la mortalità risulta più elevata in pazienti sottoposti a emodialisi che non in dialisi peritoneale, a seguito di vari fattori tra cui l'età media maggiore e il passaggio dei pazienti più comorbidi dalla peritoneale alla emodialisi.

Gli obiettivi del Policlinico S. Orsola per l'anno 2017 sono costituiti dal mantenimento di un'attività di trapianto da donatore deceduto in linea con i dati storici del Centro, dall'incremento dei trapianti da donatore vivente, anche ABO-incompatibili, a rischio clinico/immunologico e cross over, con lo sviluppo di programmi di informazione sul territorio regionale, dalla periodica rivalutazione dei pazienti con comorbidità note o da più tempo inseriti in lista e dal consolidamento dei programmi di trapianto combinato.

In Emilia-Romagna si svolgono le attività di trapianto di rene, rene-pancreas, cuore, fegato, polmone, intestino e multiviscerale, oltre a vari tipi di trapianti combinati. Storicamente il primo trapianto di rene da cadavere è stato eseguito a Bologna il 24/10/1967, mentre per il primo trapianto di rene da vivente, sempre a Bologna, si dovette aspettare il 26/01/1971.

Nel 2016 in regione sono stati evidenziati 234 donatori d'organo segnalati, 91 di età superiore ai 54 anni, 69 di età superiore ai 65 anni, di cui 34 ultrasettantacinquenni, che hanno permesso

l'esecuzione, in particolare, di 212 trapianti di rene (+38% rispetto al 2015) di cui 187 da donatore cadavere. L'attività di donazione in Emilia-Romagna ha evidenziato, nel 2016, un numero record di donatori a cuore battente raggiungendo valori che non si riscontravano dal 2005.

Dal 2016 è inoltre iniziata in Emilia-Romagna l'attività di donazione e trapianto di organi da donatore a cuore fermo (*Donation after Circulatory Death, DCD*), cioè da donatore la cui morte è stata accertata con criteri cardiologici e non neurologici, secondo il Decreto 11 aprile 2008 Aggiornamento del decreto 22 agosto 1994, n. 582 relativo al: "Regolamento recante le modalità per l'accertamento e la certificazione di morte".

L'attività di donazione e trapianto di organi da DCD è stata definita nel 1995 dai Criteri di Maastricht, ed è comune da alcuni anni in diversi Paesi come Australia, Belgio, Olanda, Gran Bretagna, Stati Uniti d'America, Francia e Spagna. In Italia le prime donazioni sono state effettuate a Pavia nel 2007.

La legislazione esistente in Italia prevede per questi potenziali donatori l'accertamento di morte mediante un tanatogramma della durata di almeno 20 minuti, che rende possibile il prelievo e il trapianto dei reni, più comunemente, e del fegato in alcune condizioni. Inoltre, l'iter previsto per il Policlinico S. Orsola di Bologna prevede che gli organi siano sottoposti ad esame istologico in estemporanea per valutarne l'idoneità.

Le procedure di prelievo e trapianto richiedono sicuramente un impegno clinico e organizzativo non indifferente a carico di varie categorie di professionisti (chirurghi, anestesisti-rianimatori, anatomopatologi, microbiologi, immuno-genetisti, coordinatori la donazione e il trapianto, medici di laboratorio, medici della direzione ospedaliera, personale paramedico, ecc.), che ha reso possibile l'implementazione di questa attività, in linea con l'aumento dell'attività di donazione nazionale.

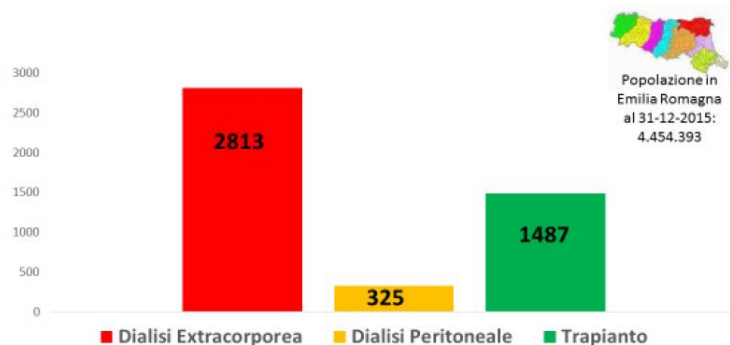


Figura 2: Popolazione (in numero assoluto) dei pazienti in trattamento sostitutivo della funzione renale in Emilia Romagna al 31-12-2015.

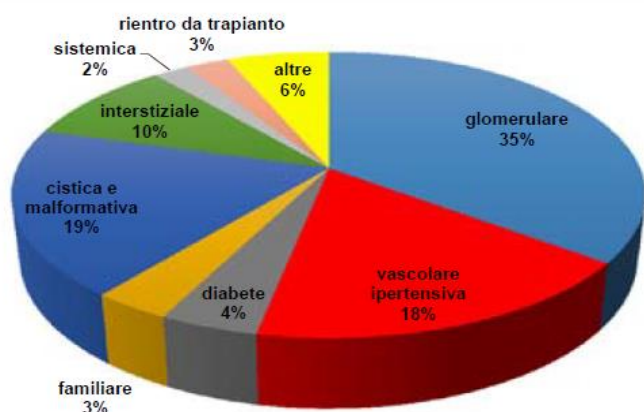


Figura 3: Distribuzione della nefropatia alla base dell'insufficienza renale; la nefropatia in assoluto più rappresentata è il rene policistico bilaterale (133 pazienti), la glomerulonefrite più frequente è quella a depositi mesangiali di IgA (75 pazienti).

In lista al 31-12-2016	802
Idonei	596
Sospesi	206
Residenti in Regione	396
Idonei	305
Sospesi	91
Residenti fuori Regione	406
Idonei	291
Sospesi	115
Entrati nel 2016	222
Residenti in Regione	117
Residenti fuori Regione	105
Usciti nel 2016	387
Trapianti in Regione (cadavere + vivente)*	212
Trapiantati fuori Regione	118
Deceduti	12
Non idonei	13
Altri motivi	32
Usciti nel 2016 residenti in Regione	180
Trapianti in Regione (cadavere + vivente)*	121
Trapiantati fuori Regione	45
Deceduti	1
Non idonei	3
Altri motivi	10
Pazienti trapiantati	212
Residenti in Regione	121
Residenti fuori Regione	91
TEMPI MEDI DI ATTESA DEGLI ISCRITTI IN LISTA AL 31.12.2016 (giorni)	1.335 3,66 anni
MORTALITA' IN LISTA DI ATTESA NEL 2016 (deceduti/[iscritti al 01.01.2016 + ingressi 2016]*100)	1,1%
TEMPI MEDI DI ATTESA DEI PAZIENTI TRAPIANTATI da cadavere nel 2016 (giorni)	1.012 2,77 anni

Figura 4: Dettaglio della situazione della lista d'attesa regionale per trapianto di rene, con indicazione del numero delle iscrizioni in lista, il numero degli idonei al trapianto ed il numero degli ingressi e delle uscite nel 2016, con le relative motivazioni.

I linfociti T

I linfociti T sono le cellule effettrici dell'immunità acquisita.

Il precursore di queste cellule è la cellula staminale emopoietica pluripotente del midollo osseo, che dà origine a una gerarchia di progenitori con un potenziale differenziativo sempre minore man mano che si scende lungo la cascata emopoietica. Mentre la maggior parte delle cellule emopoietiche si sviluppano nel midollo osseo, le cellule T completano la loro maturazione nel timo. Le cellule residenti nel timo non possiedono capacità di *self-renew*, quindi la timopoiesi dipende dal continuo reclutamento di precursori emopoietici dal midollo osseo.²⁹

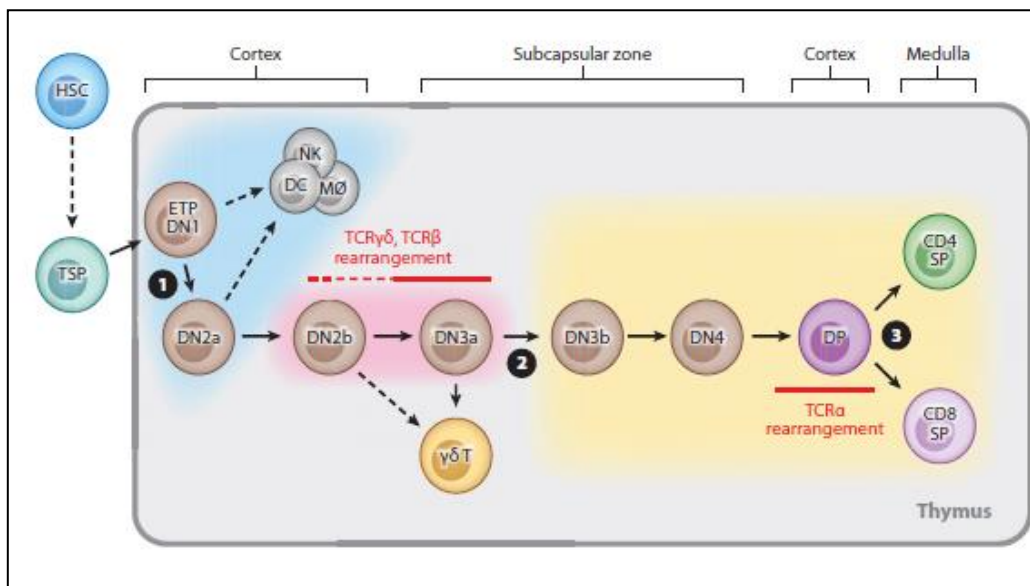


Figura 5: Stadi di maturazione dei linfociti T

Le cellule che dal midollo migrano verso il timo sono definite progenitori timici precoci (*earliest thymic progenitors*, ETP) e sono caratterizzate dalla mancanza di espressione di CD4 e CD8. Ogni linfocita T maturo possiede un solo tipo di co-recettore, che insieme al *T cell receptor* (TCR) permette il riconoscimento del complesso HLA-peptide antigenico espresso dalle cellule APC. Il legame tra TCR-co-recettore e HLA-peptide antigenico è il primo segnale necessario per l'attivazione del linfocita T. In particolare il CD4 riconosce le molecole HLA di classe II, mentre il CD8 quelle di classe I. I linfociti T CD4⁺ sono definiti *T helper* e secernono citochine, mentre le cellule T CD8⁺, detti citotossici, rilasciano granzimi e perforine che danneggiano la membrana plasmatica della cellula bersaglio uccidendola.³⁰

Le cellule indirizzate verso un fenotipo T, migrano attraverso il timo all'interno di nicchie stromali, guidate da fattori solubili e stimoli che provengono dal microambiente, costituito dalle cellule epiteliali timiche (TEC), dai macrofagi e dalle cellule dendritiche (DC).

La prima fase del differenziamento verso linfociti T maturi è definita stadio *Double Negative 1* (DN1) ed è costituito da un insieme di cellule eterogenee, chiamate timociti, che esprimono alti livelli di CD117. Queste cellule si trovano nella giunzione cortico-midollare del timo dove rimangono per circa 10 giorni. (Figura 5)

L'attivazione del *pathway Notch* inibisce la capacità differenziativa delle cellule in fase DN1 verso la linea mieloide e la formazione di linfociti B. Koch e colleghi hanno dimostrato infatti come la delezione di DLL4 nelle cellule epiteliali timiche comporti un blocco della maturazione verso la linea T, ciò si accompagna allo sviluppo di cellule B all'interno del timo.²⁹

In seguito all'attivazione del *pathway Notch*, le cellule DN1 lasciano la giunzione cortico-midollare e migrano in profondità nella zona corticale entrando nella fase di differenziamento successiva, definita *Double Negative 2* (DN2). Questo stadio è caratterizzato dal riarrangiamento dei loci γ , β , δ del *T cell receptor* (TCR); ciò porta al differenziamento delle cellule DN2 in linfociti T $\gamma\delta$ e T $\alpha\beta$.

Le cellule proseguono il loro differenziamento nella fase *Double Negative 3* (DN3) all'interno della zona sottocapsulare del timo dove completano il loro differenziamento in T $\gamma\delta$ o T $\alpha\beta$. Le cellule DN3 continuano il loro riarrangiamento dei loci γ , β , δ per esprimere le catene funzionali del TCR. Lo stadio successivo *Double Negative 4* (DN4), porta alla migrazione delle cellule nella zona midollare, durante questo spostamento si ha una *up*-regolazione dell'espressione di CD4 e CD8, che determina l'inizio dello stadio *Double Positive* (DP).

Le cellule DP vanno quindi incontro ad un processo di selezione positiva, per la capacità di riconoscere in modo efficace gli antigeni che vengono presentati loro e successivamente ad una selezione negativa, in cui vengono eliminate le cellule autoreattive che potrebbero scatenare reazioni autoimmuni. È stato stimato che circa il 95% dei timociti va incontro ad apoptosi durante le diverse fasi di selezione.

Le cellule DP che superano la selezione si spostano nella zona midollare del timo e maturano in timociti CD4⁺ (precursori dei linfociti *T helper*) o CD8⁺ (precursori dei linfociti T citotossici), che successivamente usciranno dal timo per migrare in periferia come linfociti T *naive*³⁰, cioè maturi dal punto di vista del recettore, ma che ancora non hanno mai incontrato l'antigene.

I linfociti T regolatori

I linfociti T regolatori (*Treg*) possiedono un ruolo indispensabile per il mantenimento della tolleranza immunologica, prevenendo o limitando l'attivazione del sistema immunitario contro gli antigeni *self*. Eventuali alterazioni tali da rendere questa popolazione incapace di svolgere le proprie funzioni comportano lo sviluppo di patologie autoimmuni e allergie.³¹

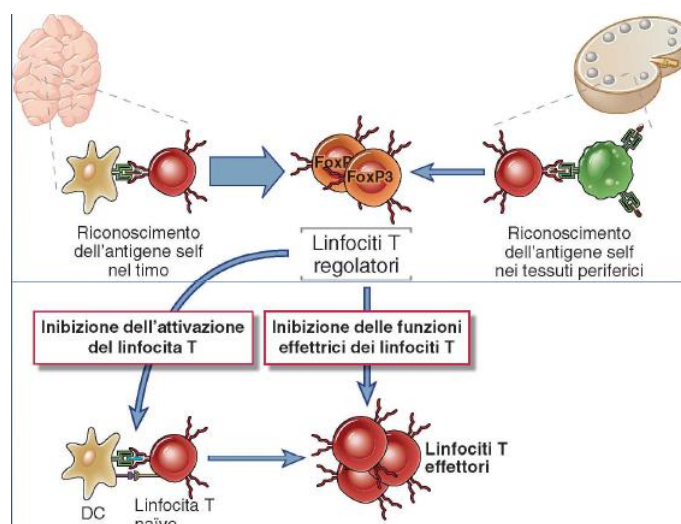


Figura 6: Funzioni dei linfociti T regolatori verso le sottopopolazioni T attivate

I *Treg* si sviluppano nel timo (*thymus derived Tregs* o *natural Treg*, *nTreg*), anche se una parte di essi, i *Treg* indotti (*induced Tregs*, *iTreg*), può svilupparsi in periferia durante gli stimoli prodotti dal sistema immunitario in una risposta adattativa.³²

I *nTreg* si sviluppano nella parte midollare del timo, intorno al corpuscolo di Hassal, grazie alla segnalazione mediata sia dall'interleuchina 2 (IL-2) che dal *transforming growth factor* β (TGF β). I segnali che derivano dal legame del TCR con il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) che espone antigeni *self*, sembrano fondamentali per il loro sviluppo. Una volta maturi i *Treg* escono dal timo e migrano nella periferia dove possono svolgere il loro ruolo immunomodulatorio.³²

Per permettere lo sviluppo, il mantenimento e la funzionalità dei *Treg* è necessaria la presenza di un fattore di trascrizione noto come *Forkhead box P3* (FoxP3). Pazienti con alterazione di FoxP3 sviluppano la sindrome IPEX (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*), caratterizzata dallo sviluppo di severe patologie autoimmuni fin dall'infanzia.³³

I linfociti T regolatori sono caratterizzati dalla presenza di particolari marker di superficie: CD4⁺, CD25⁺ (noto anche come IL-2R α), FoxP3⁺ e possiedono diversi meccanismi d'azione per mantenere l'immunosoppressione:³³

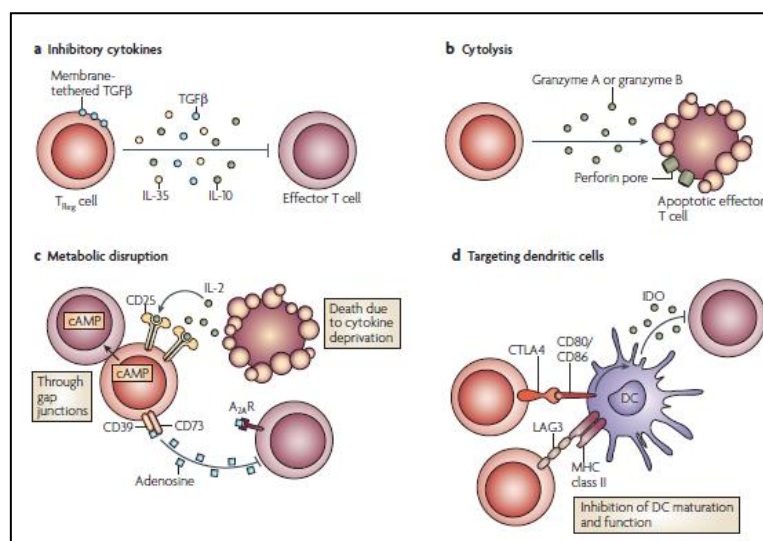


Figura 7: Meccanismi di soppressione immunologica utilizzati dai Treg

1. Soppressione dello stato infiammatorio mediante citochine inibitorie:

IL-10, che a sua volta è in grado di inibire il rilascio di altre citochine pro-infiammatorie, e TGF-β che regola l'espressione di FoxP3 e di conseguenza il differenziamento dei Treg. Asseman e colleghi hanno dimostrato che IL-10 prodotta dai Treg è fondamentale per prevenire l'insorgenza di coliti in topi con patologie infiammatorie a livello intestinale (IBD).³⁴ Inoltre, TGF-β legato alla membrana plasmatica dei Treg induce una soppressione immunologica in maniera dipendente dal contatto cellula-cellula. Un esempio di ciò si verifica quando i Treg riescono a controllare l'infiltrazione dei linfociti T CD8⁺ nelle isole pancreatiche ritardando la progressione del diabete.³³

Recentemente è stata individuata una nuova citochina, IL-35, prodotta dai Treg e necessaria per la loro attività di immunomodulazione. IL-35 è un eterodimero costituito dal gene 3 indotto dal virus Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus induced gene 3*, Ebi3, che normalmente si appaia con p28 per formare IL-27) e p35 (nota anche come IL12a che solitamente si trova associata a p40 per formare IL-12). Ebi3 e p35 sono significativamente up-regolate nei Treg che stanno mediando un'immunosoppressione.³³

2. Citolisi: i linfociti T regolatori possono limitare l'espansione dei linfociti T effettori tramite l'impiego di perforine o di granzimi. Il granzima entra nelle cellule bersaglio tramite i pori generati dalle perforine, poi attiva le caspasi intracellulari con lo scopo di indurre l'apoptosi.³³

Uno studio recente ha dimostrato che i linfociti Treg attivati possono indurre l'apoptosi dei linfociti T effettori tramite il pathway TRAIL-DR5 (*tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand-death receptor 5*).³³

3. **Invio di segnali di interruzione metabolica alle cellule T effettrici.** Uno di questi segnali è l'up-regolazione di AMP ciclico (cAMP) intracellulare, trasferito alle cellule bersaglio tramite *gap junction*. cAMP è in grado di inibire la proliferazione e di indurre l'espressione di IL-2. Si può anche verificare la sintesi di adenosina pericellulare mediante l'azione di CD73 e CD39. In questo modo viene inibita l'attività del recettore dell'adenosina 2A (A^{2A}R) che a sua volta blocca l'azione dei linfociti T effettori e contemporaneamente stimola la generazione di *Treg* tramite l'inibizione della sintesi di IL-6 (fondamentale per la proliferazione di linfociti *T helper 17*) e il rilascio di TGF- β .³³
4. **Modulazione della maturazione e funzione delle cellule dendritiche.** I *Treg* attivati stimolano le DC a produrre Indoleamina 2,3 diossigenasi (IDO) che ha una funzione immunosoppressiva, in quanto permette la conversione del triptofano, necessario per la proliferazione dei linfociti T, in chinurenine, un metabolita tossico per i linfociti T. Inoltre IDO, metabolizzando il triptofano, ne determina una riduzione dal microambiente, che porta di conseguenza ad un blocco del ciclo cellulare per le cellule T.³³ In aggiunta i prodotti di degradazione, tra cui la chinurenina, possono inviare alle cellule circostanti segnali che ne inibiscono la proliferazione. Alcuni studi dimostrano che i *Treg* possono ridurre la capacità delle DC di attivare i linfociti T effettori, mediante la riduzione dell'espressione di molecole co-stimolatorie delle DC, come il CD80 e CD86. Recenti studi mostrano che il *Lymphocyte activation gene 3* (LAG3, anche noto come CD223) può bloccare la maturazione delle cellule dendritiche. LAG3 lega con alta affinità le molecole di MHC di classe II espresse dalle DC immature. Ciò induce l'attivazione di un recettore noto come *immune receptor tyrosine based activation motif* (ITAM), che media un segnale inibitorio che comporta il blocco della maturazione delle DC e sopprime la loro capacità immunostimolanti.³³

Grazie alle loro proprietà immunomodulatorie, l'interesse verso i *Treg* negli ultimi anni è aumentato notevolmente soprattutto nell'ambito dei trapianti d'organo e delle malattie autoimmuni.

Uno dei primi studi che ha mostrato come i *Treg* possano essere utilizzati in terapia è stato eseguito su topo: gli autori hanno evidenziato come la somministrazione di linfociti T regolatori aumentasse la sopravvivenza d'organo in seguito al trapianto allogenico.³²

La problematica principale nell'utilizzo di *Treg* in terapia è l'isolamento di un numero sufficiente di cellule: i linfociti T regolatori sono una popolazione molto rara, pari a circa il 5-10% delle cellule CD4⁺ circolanti, e sarebbe necessario espandere in coltura questo tipo di cellule.

Attualmente sono in corso 8 trial clinici che si focalizzano sulla componente T regolatoria del sistema immunitario in riceventi di trapianto di rene. 5 di questi prevedono l'infusione di *Treg* autologhe espanse *ex vivo*.³⁵

Recentemente sono stati sviluppati nuovi protocolli che utilizzano alte dosi di IL-2 e anticorpi contro il CD3⁺ e CD28⁺, proprio con lo scopo di espandere *ex vivo* questa popolazione, da poter poi reinfondere e utilizzare come terapia cellulare. In alcuni casi vengono utilizzate anche le cellule APC per facilitare l'espansione di questo tipo di linfociti. I *Treg* espansi grazie all'utilizzo di questi protocolli hanno mostrato la capacità di mantenere le loro proprietà immunomodulatorie, in alcuni casi addirittura superiori a quelle di *Treg* isolati da sangue periferico.³²

HLA-G

HLA-G (*Human Leukocyte Antigen G*) è una molecola non classica che appartiene a HLA di classe I. La definizione "non classica" è stata attribuita in quanto differisce dalle altre molecole di classe I (A, B, C, che hanno la funzione di esporre peptidi antigenici all'interno della cellula, come quelli virali, sulla membrana plasmatica, in modo da attivare il sistema immunitario per distruggere la cellula infettata) sia nella struttura che nelle funzioni. HLA-G possiede pochissimi polimorfismi e presenta 8 varianti, inoltre, la sua espressione è ristretta soltanto ad alcuni tipi di tessuto come il trofoblasto, la regione midollare del timo, cornea, isole pancreatiche e precursori eritroidi e endoteliali.³⁶ HLA-G può essere iperespressa nel cancro, nei trapianti, patologie infiammatorie, sclerosi multipla e infezioni virali.³⁶

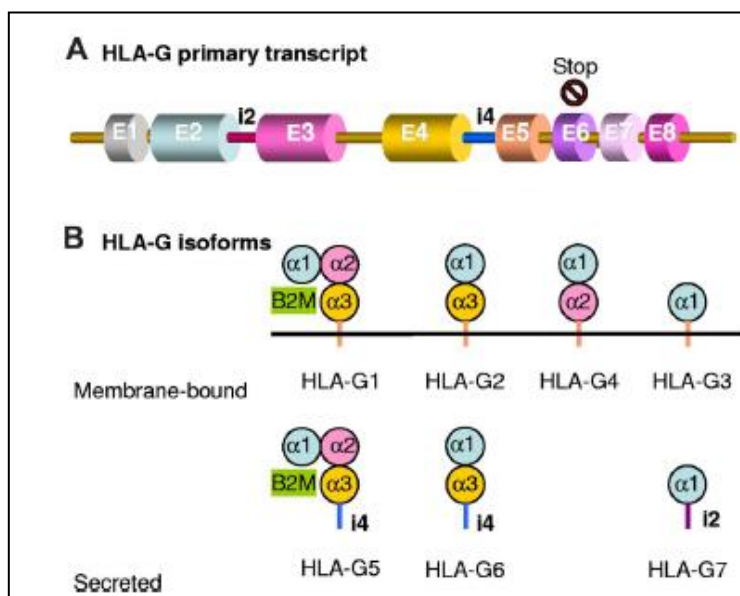


Figura 8: Trascritto primario e isoforme di HLA-G

La struttura del gene HLA-G è omologa a tutti gli altri geni HLA di classe I, ma il trascritto primario per HLA-G può generare, tramite splicing alternativo, 7 mRNA che codificano sia per isoforme di membrana (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3, HLA-G4) che solubili (HLA-G5, HLA-G6, HLA-G7).³⁶

Le isoforme solubili (sHLA-G) possono derivare anche dal taglio proteolitico di HLA-G di membrana (come nel caso di sHLA-G1 che deriva dal taglio proteolitico di HLA-G1 di membrana) mediante l'azione di metallo proteinasi della matrice (MMP), la cui identità è ancora ignota nonostante ci siano possibili candidati come la MMP2.³⁷ I maggiori produttori di sHLA-G sono i monociti/macrofagi e le cellule dendritiche.³⁸

Sia le forme di membrana che quelle solubili hanno delle proprietà immunosoppressive: possono inibire l'azione citotossica dei linfociti T tramite l'induzione dell'apoptosi o l'aumento della popolazione dei *Treg*, sono in grado di bloccare il differenziamento, la proliferazione e il rilascio di citochine nei linfociti B, inoltre HLA-G è in grado di inibire l'attività citotossica e la chemotassi delle cellule NK riducendo l'espressione dei recettori per le chemochine sulla loro membrana cellulare.³⁹

Studi di cristallografia hanno dimostrato che la struttura di HLA-G1 e HLA-G5 (isoforme *full-length*) sono costituiti da 3 domini α assemblati con una β 2-microglobulina, nelle isoforme tronche la β 2-microglobulina può mancare insieme a uno o due domini α . Sia le isoforme *full-length* che quelle tronche, possono formare dei dimeri mediante legami disolfuro tra le cisteine in posizione 42.³⁶ La dimerizzazione non comporta dei grossi cambiamenti nella struttura del monomero, anche se dati recenti hanno dimostrato che nel dimerico di HLA-G1 i siti di legame sono più accessibili, perciò legando con maggiore affinità il recettore, il segnale immunomodulatorio viene trasmesso in modo più efficace.³⁶

HLA-G media i suoi effetti sulle cellule target tramite il legame con specifici recettori: può interagire con il recettore LIR-1 (*leukocyte Ig-like receptor 1* o ILT-2) espresso dai linfociti T e B, NK, monociti/macrofagi, cellule dendritiche, con LIR-2 (*leukocyte Ig-like receptor 2* o ILT-4) espresso solo dalle cellule mieloidi (monociti, macrofagi, cellule dendritiche e neutrofili), con KIR2DL4 espresso dalle NK e infine con il CD160 espresso dai linfociti T, cellule NK e cellule endoteliali.⁴⁰⁻⁴¹

Una volta legato con i suoi recettori, HLA-G attiva meccanismi che reclutano fosfatasi capaci di inibire molecole chiave nell'attivazione delle cellule del sistema immunitario, come AKT, e può esercitare le sue funzioni immunosoppressive tramite l'induzione dell'apoptosi nelle cellule T CD8⁺, oppure arrestando il ciclo cellulare dei linfociti T e B in fase G₀/G₁. HLA-G può anche indurre un'immunomodulazione per via indiretta inducendo l'espansione di linfociti *Treg*.⁴² Ciò è stato osservato per la prima volta in seguito alla stimolazione di cellule T con APC che esprimevano

HLA-G: durante la stimolazione comparivano linfociti *Treg* che erano in grado di bloccare la reattività dei linfociti T.

I linfociti *Treg* indotti dalla presenza di HLA-G (sia solubile che di membrana) sono una popolazione distinta dai “*Treg* classici”, infatti non esprimono FoxP3 e CD25, l’unica caratteristica fenotipica che sembra distinguere i *Treg* indotti da HLA-G è la ridotta espressione dei marker CD4 e CD8.³⁶

Treg HLA-G⁺ costituiscono una differente sottopopolazione dei *Treg* indotti da HLA-G. Essi mostrano livelli normali di CD4 e CD8 e sono presenti anche nei donatori sani e sembrano essere generati nel timo. *Treg* HLA-G⁺ sono caratterizzati dall’espressione di HLA-G1 sulla membrana cellulare e dal rilascio di HLA-G5, ma non esprimono il CD25 e FoxP3. Inoltre possiedono un profilo di espressione citochinico che differisce dagli altri *Treg*, non inducendo un aumento di IL-10 e TGF- β o una riduzione di INF- γ , ma mediano i loro effetti immunosoppressivi attraverso l’espressione e il rilascio di HLA-G. Questa popolazione è presente anche in donatori sani, ma aumenta in caso di infiammazione.³⁶

Nei casi di trapianto renale la presenza di dimeri di sHLA-G potrebbero avere la funzione di prolungare la sopravvivenza dell’organo trapiantato, infatti è stato dimostrato che i valori di sHLA-G nel plasma sono significativamente più alti in pazienti che non hanno episodi di rigetto quando vengono comparati con quelli che vanno incontro a rigetto cronico.^{42,43}

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), anche conosciuta come 24p3, p25, *human neutrophil lipocalin* (HNL), *α 1 related protein*, *uterocalin* o *siderocalin*, è una glicoproteina di 198 aminoacidi, identificata per la prima volta nei granuli dei neutrofili.^{44,45}

Il gene che codifica per NGAL si trova nel locus 9q34.11, possiede 7 esoni che producono almeno 5 trascritti funzionali.⁴⁴ Il promotore del gene include anche un sito di legame per il fattore di trascrizione NF-kappaB (NFkB), attivato indirettamente da IL-17 secreta dai linfociti T *helper* 17 (Th17), dimostrando il ruolo fondamentale nel permettere la trascrizione del gene stesso.⁴⁶ L’espressione di NGAL inoltre è fortemente indotta dalla presenza di IL-1 α e IL-1 β , *insulin like growth factor-1* (IGF-1), *transforming growth factor alpha* (TGF- α) e *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α).⁴⁴

NGAL appartiene alla superfamiglia delle lipocaline che comprende un insieme di proteine che sembrano essere coinvolte in diversi meccanismi come il trasporto del retinolo, dei ferormoni, nella sintesi delle prostaglandine, nel controllo della crescita e della proliferazione cellulare, nella

regolazione dello sviluppo tissutale e del sistema immunitario, anche se molte di queste funzioni sono state scoperte in seguito ad evidenze indirette.⁴⁵

È stato inoltre ipotizzato che NGAL, grazie al sito di apertura del β -barrel estremamente flessibile, possa legare recettori di superficie cellulare capaci di trasportarlo all'interno e all'esterno delle cellule.⁴⁴ NGAL è espresso in diversi organi tra cui trachea, timo, pancreas, ghiandole salivari, midollo osseo. A livello del rene, in particolare, è sintetizzato principalmente dalla parte ascendente dell'ansa di Henle e dalle cellule intercalari dei dotti collettori.⁴⁶

È sintetizzata anche da numerosi tipi cellulari, come l'epitelio duttale della mammella, i macrofagi circolanti del fegato, cellule globulari bronchiali del polmone, pneumociti di tipo II, adipociti, leucociti, cellule del trofoblasto e condrociti.⁴⁴

NGAL, in condizioni non patologiche, viene filtrato dal glomerulo e riassorbito a livello del tubulo prossimale con un meccanismo megalina-dipendente, mentre è iper-espresso in seguito a danno renale ischemico o causato da sostanze tossiche.⁴⁶

Nel rene NGAL, associato al complesso sideroforo:ferro (*holo*-NGAL), viene internalizzato in un endosoma in seguito all'interazione con il suo recettore. L'ambiente acido dell'endosoma promuove il rilascio del ferro, che si accumula a livello citoplasmatico, ciò comporta una modulazione dell'espressione dei geni sensibili alla quantità di ferro, come quelli che codificano per il recettore della transferrina (TfR) e per la ferritina. Al termine, NGAL può essere degradato all'interno dei lisosomi oppure riciclato. Il trasporto di NGAL all'interno della cellula target, senza il complesso sideroforo:ferro (*apo*-NGAL), prevede che la lipocalina catturi il ferro nel citoplasma e lo trasporti nello spazio extracellulare. NGAL nelle cellule dell'epitelio renale esercita funzioni indipendenti dal trasporto del ferro, infatti determina l'attivazione di chinasi che mediano segnali

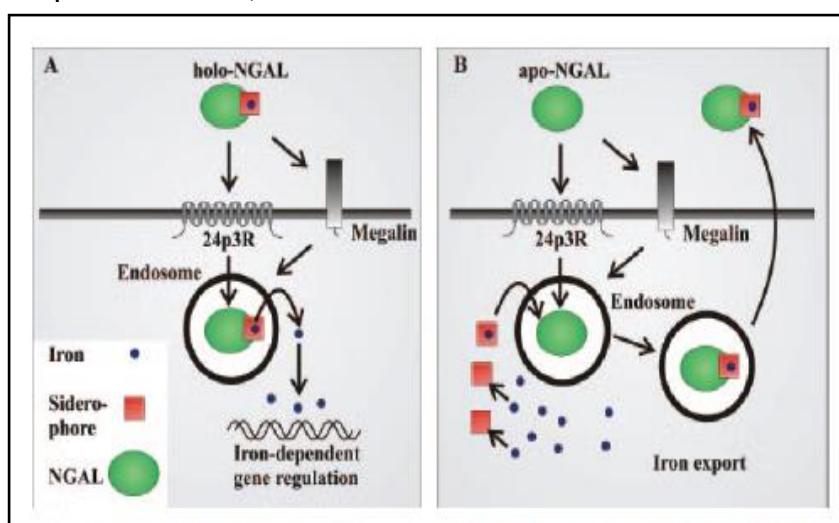


Figura 9: Modello rappresentativo del trasporto del ferro mediato da NGAL

extracellulari.⁴⁷ Quando NGAL è associato al complesso sideroforo:ferro risulta più efficiente nel prevenire i danni del tubulo renale rispetto alla forma *apo*-NGAL.⁴⁷

Sfruttando la capacità di legare il ferro libero, NGAL può prendere parte con attività batteriostatica anche in processi patologici, in quanto riduce la disponibilità dello ione, fondamentale per la crescita e la proliferazione batterica.

In ambito renale è stato dimostrato inoltre che NGAL riduce l'apoptosi e preserva l'espressione di N-caderina nelle cellule dell'epitelio renale in seguito a un evento ischemico. In questa situazione, infatti, NGAL potrebbe *up*-regolare l'espressione di enzimi protettivi come l'eme-ossigenasi.

Oltre che in infezioni batteriche, danno infiammatorio o ischemico, NGAL aumenta anche in patologie metaboliche, renali, intossicazioni da farmaci e neoplasie solide o ematologiche.⁴⁸

NGAL è costitutivamente espresso dai neutrofili umani, mentre nelle cellule epiteliali è sintetizzato solo quando sono presenti stimoli infiammatori, ciò ci permette di correlare questa lipocalina con un ruolo nella modulazione del sistema immunitario.⁴⁹

Evidenze hanno infatti dimostrato che NGAL media la chemiotassi dei neutrofili e può ridurre lo stress ossidativo.⁴⁶

Nonostante il ruolo di NGAL nei processi infiammatori, i suoi effetti sul sistema immunitario non sono ancora stati compresi pienamente, da alcuni studi emerge che questa lipocalina potrebbe anche favorire la rigenerazione tissutale.⁵⁰ Inoltre l'interazione di NFκB e NGAL, e quindi il suo coinvolgimento nell'immunità innata e adattativa, sembra suggerire un ruolo nella tolleranza immunologica. In particolare, è stato recentemente condotto uno studio, su cellule linfo-monocitarie di donatori sani trattati con dosi crescenti di NGAL, che dimostrò un aumento di espressione della molecola immunosoppressiva HLA-G in cellule CD4⁺ e CD8⁺ e un'espansione della popolazione di linfociti *Treg*, con attività immunomodulatrice.⁵¹

NGAL è attualmente utilizzato come *biomarker* renale, un parametro strutturale, biochimico, fisiologico o genetico, in grado di indicare la presenza, la severità o la progressione di una patologia.⁴⁸

Una molecola, per poter essere utilizzata come *biomarker*, deve essere semplice da misurare mediante approcci non invasivi, altamente specifica e sensibile, la sua manifestazione deve essere indice della presenza della patologia e proporzionale alla sua severità e prognostico per quanto riguarda l'esito della patologia.

Poiché i livelli di NGAL variano in diverse condizioni patologiche, questa proteina risulta essere un *biomarker* ad alta sensibilità ma con una bassa specificità. Ciò rende necessaria la combinazione con altri marcatori per la diagnosi delle patologie.

In clinica la funzione renale, viene attualmente valutata sulla base della concentrazione della creatinina sierica (SCr) o dell'azoto ureico (BUN). Evidenze però dimostrano che questi *biomarker* non sono così efficaci nell'individuare patologie renali a stadi ancora precoci, da qui nasce l'interesse per la ricerca di nuovi *biomarker* per la clinica in grado di individuare fasi precoci delle patologie.⁴⁸

In caso di CKD, NGAL è stato valutato come *biomarker* precoce in numerosi studi, con una buona *performance*. Mitsnefes e colleghi, in uno studio che comprendeva bambini con CKD tra lo stadio 2 e 4, hanno dimostrato che i livelli di NGAL nel plasma sono inversamente proporzionali al GFR, inoltre con una funzione renale < 30 ml/min, NGAL mostra una *performance* migliore rispetto alla cistatina C, una proteina di 13 kDa utilizzata come biomarker renale, in quanto è filtrata dal glomerulo e poi riassorbita nel tubulo contorto prossimale, quindi in caso di danno renale i suoi livelli sierici aumentano.^{48, 52}

Schmith-Ott e colleghi hanno condotto uno studio prospettico su 158 adulti con CKD allo stadio 3 o 4, in cui viene mostrato come un elevato rapporto, tra i livelli di NGAL urinari (uNGAL) e creatinina, è associato con un elevato rischio di morte, quindi la valutazione dei livelli urinari di questa lipocalina permetterebbe di valutare la progressione della patologia.⁴⁷ Livelli di NGAL urinari sia sierici (sNGAL) sono in grado di predire il rischio di progressione della CKD, in modo indipendente dall'età e dal GFR. In particolare, l'aumento di 10 ng/ml di uNGAL è associato con un aumento del 3% del rischio di progressione verso gli stadi successivi della CKD, mentre un incremento di 10 ng/ml di sNGAL è stato associato ad un aumento del rischio del 2%.

È stata valutata l'efficacia di NGAL come *biomarker* anche nel *delayed graft function* (DGF), causato da un danno ai tubuli renali dovuto a ischemia-reperfusion o a mediatori dell'immunità innata e adattativa. I risultati dello studio hanno mostrato come i livelli di uNGAL il giorno successivo al trapianto, predicono la DGF con un valore di AUC di 0,75, dati confermati anche da un altro studio multicentrico, in cui i livelli urinari di NGAL raccolti il giorno del trapianto, hanno permesso di identificare i pazienti che avrebbero sviluppato DGF con un AUC di 0,8-0,9.⁵³

AUC è una misura di accuratezza diagnostica, che presenta come valore massimo 1, quando il test è in grado di discriminare perfettamente i soggetti sani dai patologici, e minimo di 0,5 quando il test non riesce a distinguere i due gruppi. Più è elevato il valore di AUC, maggiore sarà

l'accuratezza del test. Quando AUC raggiunge i valori che vanno da 0,7 a 0,9 il test, come nel caso di NGAL, viene considerato moderatamente accurato.⁵⁴

In uno studio condotto su pazienti iperimmuni che avevano ricevuto un trapianto è stato dimostrato che i livelli sierici di NGAL erano notevolmente elevati in quei pazienti che avrebbero sviluppato il rigetto entro 30 giorni, in questo caso il valore di AUC per NGAL è di 0,7.⁵⁵

CAPITOLO II: LE CELLULE STAMINALI

Introduzione: le cellule staminali

Le cellule di un organismo sono soggette ad un fisiologico processo di senescenza e morte. Per sopperire a ciò, i tessuti si servono di cellule indifferenziate che mantengono l'integrità strutturale e funzionale, definite staminali.

Il termine “cellula staminale” fu coniato per la prima volta da Edmund Beecher Wilson per indicare una cellula germinale primordiale mitoticamente quiescente.¹ Nel 2000, Gheron e Robey e Watt et al, definirono le cellule staminali come cellule immature, o non differenziate, clonogeniche, in grado eseguire divisioni cellulari asimmetriche. Di queste, una rimarrà staminale e una, progredendo nel processo di sviluppo, diventerà una cellula precursore e perderà progressivamente la capacità di proliferare.² Questa cellula potrà poi moltiplicarsi e differenziarsi in fenotipi cellulari che a loro volta daranno origine ad una progenie con diminuito potenziale differenziativo, fino alla formazione di cellule differenziate mature.³⁻⁵

Con lo sviluppo di procedure di fecondazione assistita e la conseguente produzione di embrioni in sovrannumero, si è resa possibile la disponibilità di cellule con un alto grado di staminalità: lo zigote, prima cellula staminale, totipotente per eccellenza, capostipite di tutte le cellule di un organismo. Lo zigote, e i discendenti delle prime tre divisioni cellulari, sono definiti infatti *totipotenti*, in quanto sono in grado di originare un intero individuo.⁶⁻⁸

Allo stadio embrionale di otto cellule, i singoli blastomeri riducono il proprio potenziale differenziativo, iniziando a formare la blastocisti, caratterizzata da un accumulo di cellule chiamato embrioblasto (*inner cell mass, ICM*), da cui si sviluppa l'embrione. Le cellule dell'embrioblasto sono considerate cellule *pluripotenti*, ovvero cellule in grado di dare origine a quasi tutte le linee cellulari dei tre foglietti germinali.⁹ Molti tessuti adulti hanno invece al loro interno cellule staminali *multipotenti*, ovvero cellule in grado di produrre un numero limitato di linee cellulari, appropriate alla loro collocazione.⁸ Alla base della piramide, si trovano invece le cellule staminali *unipotenti*, cellule in grado di generare solo una specifica linea cellulare.¹⁰

La definizione di cellula staminale e staminalità è in costante evoluzione. Le principali caratteristiche di una cellula staminale sono però ben definite:¹¹

1. capacità di automantenimento (*self-renewal*), vanno incontro a molteplici e sequenziali divisioni cellulari, mantenendo uno stato altamente indifferenziato e presentando caratteristiche morfologiche, strutturali o antigeniche diverse dalle cellule di tessuti maturi;

2. capacità di generare una progenie cellulare con le stesse caratteristiche della cellula madre tramite divisioni cellulari asimmetriche;
3. capacità di differenziare in almeno un tipo cellulare in relazione alla sua derivazione originale;
4. capacità di ripopolare un tessuto di origine danneggiato, rispondendo a segnali e fattori prodotti dal tessuto lesionato;
5. popolare o contribuire al rinnovamento di un tessuto anche in assenza di danno, mantenendo l'integrità strutturale e funzionale del tessuto di origine.

Inizialmente si riteneva che le cellule staminali fossero presenti nell'organismo solo nei tessuti a rapido rinnovamento, come per esempio l'epidermide o il sangue. Ulteriori studi hanno portato alla definizione che tutti i tessuti maturi contengano “nicchie” di cellule staminali, anche tessuti classificati perenni, come cuore e cervello. Sono cellule dal destino non ancora ben definito che assumono il proprio ruolo specializzandosi, attraverso un processo di differenziamento, in un determinato “*lineage*” cellulare.

Cellule staminali adulte

Le cellule staminali adulte (*Adult Stem Cells, ASC*) sono cellule indifferenziate il cui ruolo principale è quello di mantenere l'integrità di tessuti specifici, provvedendo al normale riciclo cellulare e al riparo di eventuali danni, anche se non in modo illimitato.

La rapidità con cui queste cellule sostengono l'omeostasi tissutale è variabile: alcuni tessuti adulti, come l'epidermide, l'intestino e il sangue sono caratterizzati da un continuo rinnovamento, altri come il tessuto cardiaco o quello nervoso, sono considerati a più lento potenziale rigenerativo, anche se provvisti di una popolazione staminale residente.¹²

A differenza delle cellule staminali embrionali (*Embryonic Stem Cells, ESCs*), le cellule staminali adulte sono cellule considerate *multipotenti* o *unipotenti*, hanno infatti un potenziale di replicazione finito, oltre il quale non riescono a dividersi, raggiungendo uno stadio di così detta senescenza replicativa.¹³ Questo porta ad un progressivo differenziamento verso uno stadio maturo, dovuto ad una carenza dell'attività delle telomerasi, comunque superiore ai livelli medi delle cellule somatiche.¹⁴ Il potenziale replicativo delle cellule è infatti direttamente correlato all'attività telomerasica¹⁵⁻¹⁷ che è una caratteristica delle cellule ai primi stadi di sviluppo embrionale.^{18,19}

Il potenziale staminale è garantito all'interno delle nicchie da diversi fattori: il contatto cellula-cellula e cellula-matrice, l'azione di fattori diffusibili, come pure l'esclusione di stimoli proliferativi e differenziativi che devono poter raggiungere le cellule staminali solo in casi specifici di

necessità. *In vivo*, il pool di cellule staminali si trova in uno stato quiescente e, all'occorrenza, si attiva il programma proliferativo e poi differenziativo. *In vitro*, invece, viene meno il controllo da parte del microambiente presente nelle nicchie di staminalità e, in presenza di fattori mitogeni che si possono trovare nel siero del terreno di coltura, le cellule mostrano un'elevata capacità proliferativa.

Anche la regolazione dell'espressione genica ha un ruolo importante nel mantenimento della staminalità; sono ormai noti geni che codificano per fattori di trascrizione specifici, i quali presentano un'azione fondamentale nel mantenere la capacità di automantenimento e differenziamento delle cellule staminali.

Oct-4 (*octamer-binding transcription factor 4*) è considerato indispensabile per il mantenimento dello stato indifferenziato delle cellule embrionali e nelle prime fasi di sviluppo embrionale. È un fattore di trascrizione dei "POU domain genes" espresso esclusivamente a livello dei blastomeri e delle cellule pluripotenti negli stadi precoci dell'embrione, con un importante ruolo nel determinare i primi passaggi dell'embriogenesi e del differenziamento. Durante lo sviluppo embrionale la sua espressione risulta down-regolata nelle fasi di differenziamento e sviluppo. Questo suggerisce che Oct-4 gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo dei mammiferi e nell'auto-mantenimento delle cellule staminali embrionali. Oct-4 attiva e blocca la trascrizione di altri geni target interagendo con altri importanti fattori di trascrizione, uno su tutti SOX2.^{20,21}

SOX2 (*SRY-related box protein*) fa parte di una famiglia di fattori di trascrizione composta da circa 20 membri. Come Oct-4, SOX2 si è dimostrato indispensabile per le prime fasi di sviluppo embrionale, tanto che l'inattivazione di uno solo di questi due geni risulta letale per l'embrione. Oct-4 e SOX2 inoltre cooperano per l'attivazione dell'espressione di altri geni tra cui Nanog.²²

Il grande interesse nei confronti di Nanog (*homeobox protein Nanog*) è dettato dalla sua azione nel mantenere la pluripotenza delle cellule indifferenziate. Modelli di embrioni privi di Nanog inizialmente sembrano capaci di dare origine alle cellule pluripotenti, ma immediatamente differenziano per formare l'endoderma extra-embryonico. Per questo, durante lo sviluppo, Nanog sembra essere richiesto più tardi rispetto Oct-4, ma entrambi sono essenziali per il mantenimento della pluripotenza.²⁰

La rete costituita da questi tre fattori di trascrizione necessita di una fine regolazione, in senso positivo o negativo, dato che una loro ipo- o iper-espressione potrebbe alterare le caratteristiche di staminalità e pluripotenza delle cellule staminali. L'espressione di questi fattori risulta quindi fondamentale per la definizione di staminalità e la caratterizzazione anche di popolazioni staminali ritrovate in tessuti adulti.

L'impiego di ASC come terapia cellulare è maggiormente accettato dal punto di vista etico, rispetto all'utilizzo di ESC, non presenta problematiche limitanti legate alla compatibilità e al rigetto grazie alla possibilità di utilizzare cellule autologhe. Gli svantaggi a carico delle ASC riguardano principalmente le metodiche di isolamento e l'efficienza di espansione, talvolta più difficoltose rispetto agli altri tipi di staminali. La quantità di cellule ricavabili può essere un ulteriore fattore limitante per il loro utilizzo, per questo si è sviluppata l'esigenza di nuove strategie innovative per rendere disponibile un maggior numero di cellule all'isolamento.

L'utilizzo terapeutico delle ASC può essere applicato anche in pazienti affetti da patologie genetiche a partire dalle cellule staminali, con l'utilizzo delle più recenti tecniche di terapia genica, in modo da riparare il difetto genetico e reimpiantare successivamente le cellule così "corrette".

Nel 1997, l'epitelio limbo-corneale umano è stato ricostruito *in vitro* e trapiantato in due pazienti che soffrivano di una carenza di cellule staminali limbari con un conseguente difetto nella riparazione corneale e opacizzazione della superficie anteriore dell'occhio.²³ Il tessuto trapiantato è stato ottenuto coltivando cellule ottenute da una piccola biopsia della superficie oculare ottenendo un buon esito clinico documentato con risultati stabili fino ai 2 anni di *follow-up*, suggerendo che l'area della biopsia selezionata conteneva le cellule necessarie per una rigenerazione a lungo termine.

Un ulteriore esempio di terapia genica è stato recentemente presentato per il trattamento di epidermolisi bollosa distrofica recessiva (RDEB). La terapia ha previsto il trapianto di innesti epidermici autologhi generati da cheratinociti geneticamente corretti che sostengono la deposizione di collagene di tipo VII (C7) alla giunzione dermo-epidermica, proteina codificata dal gene COL7A1 ed essenziale per l'ancoraggio della formazione di fibrille alla giunzione dermo-epidermica.²⁴

Le terapie con cellule staminali rappresentano uno degli esempi più avanzati di medicina personalizzata e si stanno avvicinando sempre più all'applicazione sui pazienti. Tuttavia, nonostante l'indubbio potenziale di queste terapie, l'equilibrio tra rischio e vantaggio rimane difficile da prevedere. Come in ogni nuovo campo, in caso di assenza di precedenti applicazioni negli esseri umani e lacune nella scienza di base, i ricercatori e i regolatori dovrebbero continuare a cercare un equilibrio tra la riduzione al minimo dei rischi potenziali e l'assicurazione che le terapie non vengano allontanate inutilmente dai pazienti.²⁵

Plasticità delle cellule staminali adulte

Negli ultimi anni, un numero crescente di pubblicazioni ha affermato che il precedente dogma di “tessuto-specificità” per le cellule staminali adulte potrebbe non essere corretto.

Si riteneva, infatti, che le ASC fossero specializzate nel generare cellule mature tipiche del tessuto in cui risiedono. Studi recenti hanno invece mostrato un'inattesa plasticità di queste cellule. Wagers e collaboratori hanno definito la plasticità come la capacità delle cellule staminali adulte, teoricamente commissionate verso uno specifico *lineage* cellulare, di differenziare verso cellule di un tessuto di origine differente, se sottoposte all'azione di un particolare microambiente.

Inoltre, perché una cellula cambi il suo destino, deve rispondere a fattori di crescita e segnali specifici, in grado di determinare quali geni debbano essere attivati e quali no, in quanto contribuiscono ad influenzare il *pattern* di espressione genica di una cellula staminale, quindi anche il suo potenziale in termini di plasticità.²⁶

Tuttavia la questione della plasticità somatica rimane ancora controversa e le prospettive terapeutiche risultano difficoltose.

Per un possibile uso delle cellule staminali adulte nei *trial* clinici di medicina rigenerativa, infatti, si deve raggiungere una caratterizzazione più fine della popolazione cellulare responsabile della generazione di cellule mature di diversi tessuti.²⁷

Cellule staminali mesenchimali

Le cellule staminali mesenchimali (*Mesenchymal Stem Cells*, MSC) sono cellule *multipotenti* che derivano dal mesenchima, il tessuto connettivo embrionale sviluppatosi dal mesoderma, uno dei tre foglietti germinativi che si differenzia intorno alla terza settimana di gestazione, le MSC, quindi, sono capaci di dare origine a tutti i tessuti di origine mesodermica: cartilagine, osso, muscolo liscio e scheletrico, legamenti, tessuto adiposo e stroma midollare²⁸, sia *in vitro*^{29,30} che *in vivo*.³¹

Anche se ancora esistono pareri discordanti, sembra che queste cellule siano in grado di andare incontro a trans-differenziazione e dare origine a cellule sia del mesoderma, che di neuroectoderma ed endoderma se sottoposte a specifiche condizioni sperimentali *in vitro*.³²

Ad esempio, diversi gruppi hanno anche dimostrato che le MSCs presentano capacità differenziativa in senso epatogenico e miogenico.^{33,34}

Le MSC vennero scoperte nel 1966 da Friedenstein, che descrisse una popolazione di cellule isolate dallo stroma midollare di topo, clonogeniche, aderenti alle piastre e in grado di andare incontro *in vitro* a differenziazione in osso, tessuto adiposo e cartilagine.³⁵

Negli anni successivi altri studi hanno evidenziato come le cellule staminali mesenchimali risiedano all'interno non solo del midollo osseo ma anche della maggior parte dei tessuti connettivi: sangue periferico³⁶, muscolo scheletrico³⁷, tessuto adiposo³⁸, osso trabecolare³⁹, tendini⁴⁰, tessuti placentari^{41,44}, derma⁴⁵, membrana e liquido sinoviale.⁴⁶⁻⁴⁸

Le MSC isolate da tessuti differenti mostrano caratteristiche fenotipiche simili *in vitro*, quali una morfologia *fibroblast-like*, con una scarsa quantità di citoplasma, pochi mitocondri ed un apparato del Golgi poco sviluppato, l'adesione al fondo della piastra di coltura e la propensione a proliferare e differenziare in risposta all'esposizione a fattori di crescita. In uno studio di Sakaguchi et al, vengono comparate cellule isolate da diversi tessuti tra cui midollo osseo, muscolo scheletrico e tessuto adiposo, dimostrando come le cellule isolate dalle diverse fonti abbiano una differente capacità di differenziazione condrogenica.⁴⁸

In uno studio successivo, Sotiropoulou et al ha riportato che la tecnica di isolamento, il medium e i substrati di coltura, la densità di coltura, i fattori di crescita, ma anche l'età del donatore e l'eventuale presenza di patologie, possano influenzare *in vitro* l'espansione, la differenziazione e le proprietà immunogeniche di queste cellule, alterando così il *pattern* di marcatori.⁴⁹

Si ritiene, infatti, che il fenotipo subisca continue modifiche in risposta al microambiente sia *in vitro* che *in vivo*, per questo motivo non si è ancora ottenuta una caratterizzazione chiara e specifica delle MSC.⁵⁰

Lo studio dell'immunofenotipo in campioni a fresco è reso ulteriormente difficoltoso dalla bassa percentuale delle MSC all'isolamento. Ad esempio nel midollo osseo si è stimata una frequenza dello 0,001-0,01% di MSC.

In generale, le cellule mesenchimali staminali esprimono numerosi recettori importanti per l'adesione cellulare e l'interazione con le cellule emopoietiche. Esprimono molecole di adesione, recettori per fattori di crescita e citochine, integrine.¹³

Sebbene i marcatori per identificare le cellule staminali mesenchimali siano numerosi, secondo quanto riportato dall'International Society for Cytotherapy, le cellule staminali mesenchimali sono definite tali qualora, oltre a crescere in aderenza, esprimano i marcatori CD73, CD90 e CD105, mentre siano negativi per CD14, CD19, CD34, CD45.⁵¹

Le MSC sono facilmente isolabili senza incorrere in problemi di carattere etico. Data, inoltre, la loro capacità differenziativa, insieme ad una buona capacità di automantenimento e alle potenzialità di espansione *ex vivo*, le MSC sono diventate oggetto di diverse ricerche nell'ambito della terapia rigenerativa, alla cui base risiede la possibilità di avere a disposizione una popolazione cellulare autologa con un alto tasso di moltiplicazione ed in grado di differenziarsi a

sostegno del tessuto danneggiato. Nell'ultimo decennio, sono infatti stati messi a punto diversi protocolli terapeutici che utilizzano MSC in campo cardiologico^{52,53} ed ortopedico.^{54,55} Sono state utilizzate in co-trapianto con le HSC (Hematopoietic Stem Cells), nel trattamento della *Graft versus Host Disease* (GvHD)⁵⁶ e sono state utilizzate in studi preclinici e clinici con risultati efficaci nella terapia di patologie come il diabete di tipo 1, il morbo di Crohn e di Parkinson.^{57,58}

Capacità immunomodulatoria

Negli ultimi anni si è evidenziata una scarsa immunogenicità nelle MSC dirette a tutti i tipi di cellule del sistema immunitario.⁵⁹ Questa caratteristica risulta utile soprattutto per quanto riguarda un possibile utilizzo clinico nell'ambito della medicina rigenerativa e della terapia cellulare, in cui le cellule hanno il compito di ricostruire tessuti danneggiati ed evitare la GvHD.

Le MSC hanno evidenziato la capacità di modulare la risposta immunitaria allogenica di linfociti, di cellule presentanti l'antigene (APC) e di linfociti *Natural Killer* (NK), inoltre inibiscono l'espressione dei recettori NK-attivatori e l'induzione di funzioni effettrici, quali l'attività citotossica e la produzione di citochine da parte delle cellule della risposta immunitaria.

Studi hanno dimostrato infatti come le MSCs siano in grado di sopprimere la reazione linfocitaria: Di Nicola et al. hanno evidenziato come, la proliferazione di cellule T umane stimolate dalla presenza di linfociti irradiati e cellule dendritiche, venga sensibilmente depressa dalla presenza in co-cultura di MSC.⁶⁰ Inoltre, è stato dimostrato che le stesse MSC sono prive delle proteine HLA (Human Leukocyte Antigen) di classe II anche una volta differenziate, ed esprimono bassi livelli di proteine co-stimolatorie, evitando in questo modo di suscitare una reazione linfocitaria.⁶¹ Esprimono invece molecole di adesione essenziali per l'interazione con le cellule T (VCAM-1 e ICAM-1), e mancano nell'espressione di molecole co-stimolatorie come CD80, CD86 e CD40. Lo studio dell'espressione di queste molecole, fornisce un insieme di osservazioni che permettono di comprendere la loro capacità di modulare la risposta immunitaria, fenomeno estremamente complesso e dipendente anche dal particolare microambiente e *network* di citochine in cui la cellula si viene a trovare.

Mimando la funzione fisiologica delle MSC nelle nicchie emopoietiche del midollo, il meccanismo risultante è il blocco dei linfociti T nella fase G₀-G₁ del ciclo cellulare.

È stato ipotizzato che la capacità delle MSC di mediare la soppressione della proliferazione dei linfociti T avvenga attraverso diversi meccanismi:

- la secrezione da parte delle MSC di citochine immunosoppressive quali IL-10, IL-2 e TGF-β;

- l'interazione cellula-cellula;
- la presenza della indolamina 2,3-dioxygenasi (IDO), un enzima indotto da INF- α che catalizza la degradazione del triptofano in chinurenina, proteina con un ruolo fondamentale nell'immunosoppressione dei T.⁶¹²

Inoltre, l'attività immunomodulatoria in senso soppressivo delle MSC è associata a numerose molecole solubili quali il fattore di crescita epatocitario (HGF), *transforming growth factor- β* (TGF- β), *tumour necrosis factor- α* (TNF- α), prostaglandina E2 (PGE2), e l'antigene solubile HLA-G.⁶³

L'antigene HLA-G è una molecola HLA di classe I non classica, che possiede proprietà inibitorie nei confronti delle cellule del sistema immunitario tra cui le cellule NK, i linfociti T e le cellule dendritiche. L'espressione di questa molecola infatti risulta un evento positivo in caso di gravidanza o trapianto d'organo, al contrario è associata a conseguenze negative in caso di neoplasie o infezioni virali, in quanto porta le cellule a sfuggire al controllo del sistema immunitario facendo progredire la malattia.

Il ruolo immunomodulatorio delle MSC è dato quindi dall'interazione con varie cellule del sistema immunitario, dall'inibizione dei processi infiammatori e dalla promozione di *pathway* antiinfiammatori.

L'interesse applicativo è correlato alla loro capacità di limitare la proliferazione dei linfociti T stimolati con agenti mitogeni e con gli alloantigeni che determinano il rigetto del trapianto. Inoltre le MSCs sono resistenti alla citossicità mediata dai linfociti T CD8⁺ inibiscono il differenziamento delle cellule dendritiche responsabili della presentazione dell'antigene ai linfociti T naive e la proliferazione dei linfociti B, limitando la produzione anticorpale e favorendo la formazione di cellule T regolatorie.⁶⁴⁻⁶⁷

Nel loro complesso queste cellule sono in grado di mediare un'attività tolerogena dose-dipendente sia nei confronti della risposta immunitaria innata che adattativa.

A livello terapeutico, risultati sperimentali mostrano che MSC iniettate tramite infusione endovenosa sono in grado di migrare fino al sito danneggiato in caso di infarti miocardici⁶⁸, e di danni ischemici al cervello.⁶⁹ Se iniettate localmente, come nel caso di una sospensione somministrata nel ginocchio per via intra-articolare, si sono rivelate in grado di localizzarsi e riparare il menisco e la cartilagine nelle zone maggiormente lesionate.⁷⁰

Tuttavia, i meccanismi che guidano le MSC verso il sito danneggiato sono ancora da chiarire. In uno studio è stato dimostrato come una chemochina monocitaria espressa in presenza di un danno ischemico cerebrale, ed assente in cervello sano, sia in grado di richiamare le MSC iniettate in prossimità del danno stesso.⁷¹

Una volta nel sito danneggiato le cellule devono poi differenziare in un fenotipo appropriato per rigenerare il tessuto, ma ad oggi non si conoscono ancora i meccanismi alla base di questo fenomeno.

Fonti alternative di MSC

La prima fonte di MSC che ha permesso di allestire colture primarie *in vitro* è stata il midollo osseo. Sebbene quest'ultimo rappresenti una fonte ricca di cellule, l'invasività dei sistemi di prelievo non consentono di disporre di un buon numero di campioni e la quantità risulta essere piuttosto limitata. Per questi motivi sono state ricercate nuove fonti, tra cui le più studiate sono la placenta e gli annessi embrionali ed il tessuto adiposo.

La possibilità di utilizzare il sangue cordonale come possibile fonte di MSC deriva dalla loro capacità di supportare l'emopoiesi. Questa fonte presenta un'alta percentuale di cellule CD34⁺/CD38⁻, suggerendo che nel sangue neonatale possano essere presenti progenitori dotati di potenziale proliferativo e differenziativo. Diversi autori hanno escluso la possibilità che nel cordone potessero essere presenti anche progenitori mesenchimali, ma nel 2004 Bieback ed i suoi collaboratori hanno dimostrato che è possibile isolare elementi simili a MSC dal sangue di cordone con un'efficienza maggiore del 60%.⁷² Tali cellule hanno una frequenza molto più bassa nel cordone rispetto che nel midollo, esprimono alcuni tipici marcatori mesenchimali, mentre mancano di quelli emopoietici. Sono inoltre in grado di differenziare in senso osteogenico e condrogenico.

All'interno del cordone ombelicale scorrono i vasi ombelicali immersi in un tessuto mesenchimale ricco di acido ialuronico, la gelatina di Wharton, che impedisce la formazione di occlusioni e costrizioni all'interno del cordone durante il movimento del feto, da cui possono essere ottenute cellule mesenchimali (*Wharton's Jelly-Mesenchymal Stem Cells*, WJ-MSCs). Una delle prime scoperte riguardante queste cellule, si deve al gruppo di Wang, il quale è riuscito ad isolare una popolazione di cellule con marcatori tipici delle cellule staminali mesenchimali, recettori di matrice (CD44, CD105), integrine (CD29, CD51), ma non marcatori emopoietici (CD34, CD45).⁷³ Infine, ha dimostrato che, sotto apposite condizioni di coltura, le WJ-MSC sono capaci di differenziare in adipociti e osteociti.

Una fonte di MSC scoperta di recente ed argomento di studio molto interessante, risulta essere la placenta. Il vantaggio di utilizzare un tessuto di scarto risiede nella sua facile reperibilità e mancanza di implicazioni di carattere etico. Le cellule estratte dalla placenta sono dotate di importanti capacità immunomodulatorie. Durante la gravidanza, infatti, è a livello di questo

organo che viene mantenuta la tolleranza materno-fetale. Tale proprietà, in comune con le staminali midollari, è dovuta alla scarsità di molecole MHC di tipo II e co-stimolatorie ed alla presenza delle molecole HLA-G. Le cellule mesenchimali isolate da membrana amniotica (*Amniotic Membrane - Mesenchymal Stem Cells, AM-MS*) e corion (*Corionic Membrane - Mesenchymal Stem Cells, COR-MS*) hanno una derivazione di origine mesodermica extraembrionale. A livello morfologico sia AM- che COR-MS mostrano un aspetto *fibroblast-like* ed esprimono antigeni di superficie classici associati alle MS da midollo osseo. Risultano positive per CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e CD166, e negative per marcatori emopoietici (CD34, CD45) e monocitari (CD14) classici. Entrambe le popolazioni isolate dalla porzione mesenchimale delle membrane fetali hanno dimostrato la capacità di differenziare verso i “*lineage*” mesenchimali classici, osteogenico, adipogenico e condrogenico. È stato successivamente analizzato anche il potenziale differenziativo verso tipologie cellulari appartenenti a tutti i foglietti germinativi, quindi in senso ectodermico, mesodermico ed endodermico.⁷⁴⁻⁷⁷

La membrana amniotica è attualmente già utilizzata nella pratica clinica per trattare ulcere, sia dermiche che croniche oculari ed ustioni, senza dar luogo a reazioni immunitarie di rigetto, evitando quindi la necessità di una terapia immunosoppressiva.

Il tessuto adiposo

Il tessuto adiposo è un tessuto altamente complesso, costituito da adipociti maturi, pre-adipociti, cellule dei vasi, cellule endoteliali e immunitarie.⁷⁸⁻⁸⁰

Il tessuto adiposo deriva dallo strato mesodermico dell'embrione e si sviluppa sia nel periodo prenatale che postnatale. Comincia a comparire verso il secondo trimestre della gravidanza e verso il 50°-70° giorno di gestazione, si identificano i precursori, pre-adipociti, contemporaneamente alla presenza dei fibroblasti.

Il tessuto adiposo svolge molteplici funzioni:

- trofica, rappresentando per l'organismo una cospicua riserva di materiali energetici;
- meccanica, in quanto estende le potenzialità plastiche e previene alcune rotture dovute a stress fisici di altri tessuti. Inoltre, riveste i nervi, i vasi, i muscoli e riempie alcuni interstizi del midollo osseo;
- termica, e grazie a questa caratteristica, è importante la sua presenza negli strati sottocutanei e in determinate regioni, come ad esempio l'addome, per impedire la perdita di calore verso l'esterno;

- metabolica, come parte integrante della regolazione dell'appetito e del metabolismo. In qualità di tessuto di deposito, può anche subire variazioni in seguito allo stato nutrizionale dell'individuo.

Nel 2001, Zuk et al. descrisse per la prima volta il tessuto adiposo umano come fonte di cellule stromali/staminali mesenchimali multipotenti, simili a quelle presenti nel midollo osseo.^{38, 81-83}

La localizzazione delle cellule progenitrici del tessuto adiposo è rimasta per lungo tempo controversa; il dubbio riguardava l'origine endoteliale, pericitica o stromale. I pre-adipociti e le cellule endoteliali condividono antigeni di superficie, in accordo con una derivazione comune.

Le cellule stromali derivate da tessuto adiposo (*Adipose-derived Stem Cells, ASC*) sono state identificate nella frazione vascolo stromale (*Stromal Vascular Fraction, SVF*), composta da diversi tipi cellulari: progenitori staminali, periciti, cellule progenitrici endoteliali, cellule del sangue circolanti, macrofagi, residenti o infiltrati CD14⁺/CD31⁺, fibroblasti, cellule endoteliali CD34⁺/CD31⁺ e precursori degli adipociti CD34⁺/CD31.^{84,85}

Circa l'1% delle cellule totali nel tessuto adiposo sono cellule staminali multipotenti, che crescono in aderenza e possono differenziare *in vitro* verso linee mesodermiche come osteoblasti, adipociti e condrociti, positivi per marcatori mesodermici come CD73, CD90, CD105 e negativi per marcatori ematopoietici come CD14, CD34, CD45.^{86,87}

Secondo alcuni autori, il meccanismo omeostatico che mantiene il volume totale del tessuto adiposo a livelli costanti, avviene non solo in seguito all'aumento di volume degli adipociti preesistenti, ma anche attraverso la generazione di nuovi adipociti dal *pool* di cellule staminali progenitrici.⁸⁸

La presenza di progenitori cellulari è stata verificata anche tramite traccianti radioattivi, mostrando un tasso di ricambio delle cellule adipose variabile tra i 6 e i 15 mesi negli esseri umani. Presumibilmente è quindi presente una popolazione di cellule staminali in questo tessuto, responsabile della replicazione degli adipociti maturi nel corso della vita.

La presenza di buone capacità differenziative dei progenitori cellulari del tessuto adiposo, inoltre, si riscontra in alcune patologie umane: bambini affetti da eteroplasia ossea progressiva presentano la formazione di tessuto osseo ectopico all'interno dello strato di tessuto adiposo sottocutaneo.⁸⁹ Analisi istologiche dimostrano la presenza di osteoblasti e condrociti oltre agli adipociti, suggerendo quindi che le cellule staminali derivanti dal tessuto adiposo presentino un potenziale adipogenico, condrogenico e osteogenico^{90,91}, anche se la differenziazione in senso condrogenico sembrerebbe essere inferiore per le cellule di derivazione adiposa rispetto alle cellule mesenchimali isolate da midollo.^{92,93}

Alcuni autori hanno dimostrato inoltre come queste cellule abbiano un elevato potenziale angiogenico e siano in grado di ripristinare il flusso ematico dopo ischemia al pari delle cellule di derivazione midollare.^{94,95}

Le ASC mostrano anche capacità di secernere molecole bioattive in grado di stimolare l'angiogenesi, la rivascolarizzazione degli innesti di grasso, con proprietà anti-fibrotiche, anti-apoptotiche e immunomodulatorie.⁹⁶ Queste caratteristiche potrebbero rappresentare alcuni degli effetti osservati dopo l'innesto chirurgico del tessuto adiposo, come il miglior tropismo della pelle, la chiusura accelerata di ferite o ulcere complesse e la valorizzazione dell'aspetto cutaneo dopo danni da radioterapia.⁹⁷⁻⁹⁹

Trattando ASC murine con sostanze neurogeniche, sono state in grado di dare origine a fenotipi neuronali positivi alla colorazione per le proteine acide gliali fibrillari (*glial fibrillary acidic protein, GFAP*) e altre sostanze neuronali.¹⁰⁰

Nel 2006, Timper et al, differenziarono le cellule staminali mesenchimali adipose in fenotipi pancreatici endocrini in grado di sintetizzare ormoni come insulina, glucagone e somatostatina, fornendo così uno spiraglio per la cura del diabete mellito di tipo I.¹⁰¹

Infine, anche se le cellule isolate da tessuto adiposo non sono in grado di andare incontro a differenziazione ematopoietica, sembrano fornire un importante supporto nella differenziazione di progenitori ematopoietici in cellule mieloidi e linfociti B.¹⁰²

Mentre le basi molecolari del differenziamento in linee cellulari di origine mesodermica è ormai noto, gli eventi chiave e i fattori di trascrizione che danno inizio a differenziamenti in altri *lineage* cellulari non sono ancora stati identificati. Per questo gli studi si stanno concentrando sul chiarimento di questi meccanismi e sul rendere fattibile una terapia cellulare per patologie epatiche pancreatiche e nervose.

Anche se l'espressione dei marker molecolari di superficie e l'espressione genica delle MSC da tessuto adiposo sembrano essere simili a quelle del midollo osseo^{103,104} esistono alcune differenze molecolari.

Nel 2005, uno studio analizzò l'espressione genica di cellule derivate da tessuto adiposo, midollo osseo, cordone ombelicale e fibroblasti di derma¹⁰⁵, verificando che 25 geni risultavano maggiormente espressi nelle MSC rispetto ai fibroblasti, senza trovare differenze fenotipiche.

Uno studio del 2004 identificò, invece, 24 geni sovraespressi nelle cellule staminali da tessuto adiposo comparandole a quelle di midollo e descrissero differenti espressioni per 8 marker di superficie in queste cellule. In accordo con i dati raccolti, gli autori ipotizzarono che meno dell'1% dei geni venisse espresso diversamente tra MSC da tessuto adiposo e midollo.¹⁰⁶

Come le BM-MSC (bone marrow -MSC), le cellule di origine adiposa non esprimono antigeni HLA e hanno proprietà immunosoppressive che le rendono disponibili per trapianti allogenici e fonte alternativa alle cellule di origine midollare¹⁰⁷, con la possibilità di utilizzarle, quindi, nel trattamento della GvHD.^{108,109}

Sebbene gli studi ancora siano limitati, fattori come l'età del donatore, la localizzazione del tessuto (sottocutaneo o viscerale), il tipo di procedura chirurgica utilizzata, le condizioni di coltura possono influenzare sia la proliferazione che la capacità differenziativa delle ASC.

Nell'uomo è stato osservato che il numero maggiore di cellule staminali viene raccolto dal tessuto adiposo sottocutaneo a livello del braccio, rispetto a coscia, addome e seno, mentre per quanto riguarda l'età del donatore è stato dimostrato che la capacità di adesione alle piastre e di proliferazione, sono maggiori in campioni prelevati da donatori giovani, ma la capacità di differenziazione si mantiene anche con l'aumentare dell'età.¹¹⁰

L'utilizzo di canule di diametro variabile per aspirare il tessuto adiposo sottocutaneo tramite ha permesso di disporre di ampie quantità di tessuto adiposo, con tecniche minimamente invasive anche per il paziente, semplificando l'isolamento, senza alterare in modo significativo la vitalità delle cellule isolate dalla frazione cellulare vascolo-stromale.¹¹¹ Questo permette inoltre un utilizzo diretto per applicazioni terapeutiche o per l'isolamento della componente cellulare staminale.^{112,113}

Applicazioni

Le MSC da tessuto adiposo rappresentano una prospettiva promettente sia di terapia cellulare che di medicina rigenerativa con trattamenti autologhi o eterologhi, grazie alla possibilità di utilizzare cellule vitali, facilmente reperibili in numero elevato, con lo scopo di riparare, sostituire e riportare ad una normale funzione fisiologica tessuti danneggiati o con funzionalità alterata.^{38,114,115}

Diverse localizzazioni anatomiche di tessuto adiposo, quindi, hanno differenti caratteristiche metaboliche, attività lipolitica, composizione in acidi grassi e espressione genica e queste potrebbero influenzare le caratteristiche a lungo termine del campione trapiantato.

L'ipotesi è che le cellule, una volta trasferite nel sito d'interesse mantengono proprietà del sito di origine. Sono quindi necessari ulteriori studi per dimostrare se differenti fonti anatomiche di MSC (sottocute periferico, sottocute addominale, omento) mostrino differenze metaboliche e comportamentali una volta attecchite. Inoltre la tecnica chirurgica utilizzata per il prelievo influenza la proliferazione cellulare delle ASC.¹¹⁶

Le cellule staminali derivanti dal tessuto adiposo hanno dimostrato la capacità di favorire e velocizzare la guarigione delle ferite, ulcere, difetti cutanei e migliorare la pigmentazione della pelle. Klinger e collaboratori, hanno ottenuto ottimi risultati anche nel trattamento di diversi casi di estese cicatrici del volto, riconducibili a ustioni di secondo e terzo grado. Dopo l'innesto di tessuto adiposo, è stato notato un netto miglioramento nella deposizione di nuovo collagene, iper-vascolarizzazione cutanea ed iperplasia del derma. Responsabili di questi effetti e quindi capaci di migliorare la qualità delle cicatrici sembrano essere le cellule staminali trapiantate.¹¹⁷

Nel 1997, Coleman ha standardizzato una procedura chirurgica di *lipofilling* per ripristinare il volume del viso.¹¹⁸ Successivi studi hanno dimostrato che l'innesto di tessuto adiposo ha bisogno di contenere adipociti vitali per ottenere un'azione volumizzante ed una componente staminale per ottenere un'azione rigenerante efficace e duratura nel tempo. La dimensione dei *cluster* adipocitari deve essere inferiore a 1 mm (0,3-0,8 mm) per migliorare la vascolarizzazione e semplificare le iniezioni superficiali.¹¹⁹⁻¹²²

Diverse procedure di *lipofilling* sono state sviluppate negli ultimi due decenni. Nelle prime applicazioni mediche, sono state impiegate cannule con diametro dei pori laterali da 3 a 6 mm, per eseguire l'innesto come riempimento dopo traumi, malattie o invecchiamento. Successivamente, sono state sviluppate procedure che utilizzavano volumi ridotti del tessuto iniettato per migliorarne l'attecchimento.

Ogni anno aumenta il numero di studi clinici che valutano l'efficacia e la sicurezza delle staminali da tessuto adiposo nella ricostruzione e nella rigenerazione dei tessuti. Secondo il database di studi clinici (ClinicalTrials.gov 2017), sono attualmente registrati 248 studi che utilizzano ASC, principalmente per il trattamento di malattie dell'osso, della cartilagine, del sistema nervoso e autoimmuni.

Diversi protocolli sono stati sviluppati per isolare le cellule staminali dai campioni di lipoaspirato utilizzando procedure enzimatiche o non enzimatiche. Anche se i protocolli sono piuttosto simili agli altri, le differenze nella concentrazione degli enzimi, nel numero di lavaggi, nei parametri di centrifugazione, nella emolisi e nelle condizioni di coltura, possono influenzare l'efficienza e la riproducibilità dell'isolamento. Inoltre, i chirurghi utilizzano tecniche distinte per il prelievo del tessuto adiposo, aumentandone la variabilità e il possibile confronto tra i campioni.

Negli ultimi anni inoltre, sono stati introdotti diversi tipi di cannula e dispositivi automatici per isolare cellule staminali da tessuto adiposo, che utilizzano collagenasi o sfruttano forze meccaniche, con un mercato in rapida crescita.¹²³ Questo richiede l'introduzione di nuovi sistemi di controllo della qualità, per valutare le caratteristiche del tessuto adiposo utilizzato prima

dell'iniezione nel paziente, con particolare attenzione alle cellule staminali mesenchimali e alla composizione in periciti del campione.¹²⁴⁻¹²⁸

Un recente studio ha valutato le caratteristiche biologiche delle ASC isolate mediante la tecnica standardizzata da Coleman, rispetto all'utilizzo di una cannula con diametro inferiore. Si è confermato il mantenimento della proliferazione cellulare, delle capacità differenziative e immunomodulatorie delle staminali mesenchimali, migliorando la fluidificazione del campione prelevato. Questo comporta un aumento delle applicazioni cliniche dei trapianti autologhi di staminali da tessuto adiposo.¹²⁹

Terapie cellulari e trapianti d'organo

Come descritto in precedenza, l'iniezione di cellule staminali autologhe o eterologhe nei soggetti sottoposti a trapianto potrebbe indurre una migliore tolleranza immunologica verso i tessuti trapiantati.

I linfociti T regolatori (*Treg*) sono una popolazione cellulare altamente soppressiva. Le evidenze che i *Treg* siano correlati alla tolleranza nel trapianto derivano da studi preclinici su modelli animali.¹³⁰ Su modelli murini umanizzati è stato dimostrato che iniezioni di *Treg* umani espansi *ex vivo* sono efficaci nel prevenire il rigetto.¹³¹ L'induzione della tolleranza immunologica è caratterizzata dalla riduzione degli effettori T alloreattivi e dall'incremento del numero di *Treg* nei tessuti linfoidei e nell'organo trapiantato.¹³² Ciò supporta l'ipotesi che i *Treg* possano essere utili per indurre tolleranza immunologica anche nell'uomo.

Dati preliminari su trial clinici di fase I e II attualmente in corso, suggeriscono che terapie basate su infusioni di *Treg* sono efficaci come terapia adiuvante nel trattamento di GvHD e suggeriscono l'introduzione di questo approccio in altre malattie con background immunitario.^{133,134}

Considerata l'elevata eterogeneità dei *Treg*, è necessario capire come il meccanismo d'azione e interazione tra le diverse sottopopolazioni nel contesto delle terapie cellulari e quale tecnica sia più opportuna per l'isolamento e l'espansione *ex vivo*.

Anche le cellule mesenchimali adulte (MSC) sono in grado di *down-regolare* casi di GvHD e il rigetto, sopprimendo i linfociti T effettori e le cellule della memoria, e al tempo stesso promuovendo lo sviluppo di linfociti T regolatori. Date le loro uniche proprietà immunomodulatorie, sia sull'immunità innata che adattiva, le MSC costituiscono una promettente popolazione per la terapia cellulare in caso di trapianto, in particolare per l'induzione della tolleranza.

Le MSC hanno la capacità di convertire le cellule presentanti l'antigene in un fenotipo inibitorio o soppressivo attraverso il contatto cellula-cellula, bloccando così le cellule dendritiche in uno stato semi-maturo e inducendo una tolleranza periferica associata alla riduzione di IFN, IL-12 e TNF- α .¹³⁵

In recenti studi, l'infusione di MSC in modelli sperimentali di trapianto di organo solido ha portato ad un aumento della tolleranza mediata dai *Treg*.¹³⁶

Le MSC sono inoltre in grado di avere un effetto sinergico con l'immunosoppressione farmacologica a basse dosi o transiente, finalizzata al mantenimento della tolleranza a lungo termine. L'utilizzo di farmaci immunosoppressori influenza la funzione di tutte le cellule T, indipendentemente dalla loro specificità antigenica, rendendo il ricevente suscettibile ad infezioni e tumori. L'uso prolungato di immunosoppressori è inoltre associato ad altri effetti indesiderati, come malattie cardiovascolari, ipertensione, sindromi metaboliche e un effetto tossico diretto sui tessuti trapiantati, contribuendo al rigetto dell'organo. L'infusione di mesenchimali potrebbe consentire una minimizzazione della terapia farmacologica di mantenimento.

Diversi studi *in vitro* ed *in vivo* documentano l'abilità delle MSC di indirizzare i linfociti T verso un fenotipo regolatorio. Co-culture di MSC umane con cellule mononucleate o con linfociti T CD4⁺ inducono la differenziazione di questi ultimi in *Treg* Foxp3⁺.¹³⁷

Altri meccanismi di generazione di *Treg* sotto induzione di MSC includono il rilascio di HLA-G solubile, una molecola non classica HLA di classe I³⁸, o di microvescicole.¹³⁹

Casiraghi et al. hanno dimostrato come MSC murine infuse in topi prima del trapianto di rene, siano in grado di localizzarsi preferenzialmente a livello degli organi linfoidei portando ad una precoce espansione dei *Treg*. Al contrario, le MSC infuse post-trapianto vanno a localizzarsi nel rene trapiantato portando ad una espansione inferiore di *Treg*.¹⁴⁰ Lo stesso team di ricerca ha effettuato uno studio clinico in cui sono stati reclutati due soggetti sottoposti a trapianto di rene da donatore vivente. Il giorno prima del trapianto entrambi i pazienti hanno ricevuto infusioni di BM-MSK autologhe espanse *ex vivo*. L'infusione di MSC ha favorito un ambiente pro-tollerogenico, caratterizzato dalla diminuzione dei linfociti T CD8⁺ rispetto al gruppo di controllo, che ha ricevuto la stessa terapia d'induzione ma non l'infusione di mesenchimali. La percentuale di linfociti T regolatori è lentamente aumentata in seguito ad una marcata riduzione, dovuta alla deplezione causata dalla terapia d'induzione.¹⁴⁰

Per testare la capacità immunomodulatoria e tollerogenica delle mesenchimali, studi hanno infuso cellule mesenchimali staminali derivate da tessuto adiposo (ASC) e cellule staminali

ematopoietiche (HSC) in pazienti soggetti a trapianto di rene da donatore vivente sotto condizioni non mieloablative, senza la convenzionale immunosoppressione. Nel *follow-up* a 6 anni lo studio ha dimostrato una sopravvivenza totale del 70%, di cui il 50% dei pazienti non sottoposto a terapia immunosoppressiva.¹⁴¹ Questo studio apre nuove prospettive per i protocolli clinici che utilizzano cellule staminali per l'induzione della tolleranza nel trapianto d'organo.

Nonostante gli studi preclinici e clinici siano promettenti, sono necessari ulteriori studi per standardizzare la metodica di somministrazione delle cellule mesenchimali e per capire esattamente come queste possano modulare al meglio la risposta immunitaria dell'ospite *in vivo*. È stato dimostrato, infatti, che il tempo d'infusione di MSC rispetto al trapianto di organi solidi è uno dei principali fattori che influenzano la capacità di MSC di espandere la componente *Treg* e prolungare la sopravvivenza dell'organo trapiantato.¹⁴²

SCOPO

Vari studi hanno dimostrato che i pazienti con CKD, in trattamento emodialitico sostitutivo, presentano alterazioni del sistema immunitario che ne aumentano la suscettibilità a infezioni, sia batteriche che virali.

Inoltre, è stato osservato che la procedura emodialitica, accentua la condizione di immunodeficienza di questi pazienti, a seguito della tossicità dei prodotti uremici e delle reazioni di biocompatibilità con le membrane dei filtri dializzatori che portano all'instaurarsi di una condizione di infiammazione cronica. Nei pazienti in emodialisi, infatti, si osserva uno squilibrio tra il numero di linfociti T CD4⁺ attivati e il numero di linfociti T regolatori. Questi ultimi risultano avere, inoltre, un'alterata funzionalità immunosoppressiva.

Ai fini del trapianto renale, terapia d'elezione per i pazienti con CKD, l'alterazione della risposta T regolatoria risulta importante: affinché un trapianto abbia successo, è necessario che i pazienti possiedano un sistema immunitario integro e in grado di autoregolarsi, con meccanismi di soppressione della risposta immunitaria efficienti, in grado di inibire eventuali alloreazioni che potrebbero causare la perdita dell'organo trapiantato.

Gli studi clinici condotti sono volti all'aumento del numero di *Treg* in circolo, al fine di migliorare la risposta immunosoppressiva. Buoni risultati sono stati raggiunti con l'impiego della Rapamicina, farmaco immunosoppressore in grado di regolare la crescita, la proliferazione, la motilità e la sopravvivenza cellulare, o con l'impiego di filtri dializzatori a bassa biocompatibilità, in modo da favorire la mobilitazione dei *Treg* in seguito all'aumentata attivazione del sistema immunitario. Tuttavia, l'utilizzo di molecole fisiologicamente presenti, risulterebbe più vantaggioso al fine di stimolare la risposta T regolatoria.

Tra i pazienti in attesa di trapianto di rene, inoltre, occorre prestare particolare attenzione ai pazienti iperimmuni, pazienti complessi con un elevato titolo di anticorpi IgG diretti contro gli antigeni HLA e non HLA, dovuti a precedenti esposizioni con antigeni *not-self*. La presenza di questi anticorpi è considerata una controindicazione al trapianto, poiché potrebbero determinare il rigetto dell'organo trapiantato. Per questo motivo, ad oggi, è molto difficile trovare loro un donatore compatibile e, di conseguenza, perdurano in lista d'attesa per trapianto di rene.

Attualmente, al fine di ridurre i tempi in lista d'attesa per trapianto d'organo, si stanno sviluppando protocolli di desensibilizzazione, basati principalmente su plasmaferesi e trattamenti farmacologici, che permettono ai pazienti iperimmuni di ricevere un trapianto di rene

anche in presenza di anticorpi anti HLA diretti contro gli antigeni del donatore. Dati di letteratura dimostrano però, che spesso questi protocolli non risultano efficaci e alcuni pazienti sottoposti a desensibilizzazione, continuano a mostrare anticorpi donatore-specifico, anche dopo mesi dal trapianto, determinando un rigetto acuto.

Numerosi studi clinici hanno valutato l'efficacia e la sicurezza delle staminali da tessuto adiposo nella ricostruzione e nella rigenerazione dei tessuti e, di recente, si è confermata la capacità immunomodulatoria e tollerogena delle mesenchimali anche in casi di trapianti d'organo, determinando un aumento di linfociti T regolatori nel ricevente, con una sopravvivenza totale del 70% nel follow-up a 6 anni.

Questo progetto ha quindi lo scopo di studiare i meccanismi di tolleranza immunologica dovuti all'utilizzo di *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL), proteina nota anche come *biomarker* precoce di danno renale, e valutare l'effetto immunomodulatorio sinergico di una popolazione staminale adulta su pazienti sottoposti a emodialisi e iperimmuni.

Dati in letteratura dimostrano che NGAL, infatti, è in grado di indurre l'espressione di molecole immunomodulanti e di determinare un aumento della popolazione dei linfociti T regolatori.

A tal fine, il progetto ha analizzato l'azione di NGAL e di una popolazione di cellule staminali derivanti da tessuto adiposo sulla componente linfo-monocitaria (PBMC) di pazienti in trattamento emodialitico e iperimmuni, provenienti dall'Unità Operativa di Nefrologia, Dialisi e Trapianto diretta dal Prof. La Manna, Policlinico Sant'Orsola, Bologna.

Durante la prima fase del progetto, si sono allestite colture di PBMC da soggetti con insufficienza renale cronica. I PBMC isolati sono stati attivati con fitoemoagglutinina (PHA), per mimare lo stato infiammatorio in cui si trovano questi pazienti, e sono stati trattati con dosi crescenti di NGAL (80 ng/ml, 320 ng/ml, 640 ng/ml) per 72 h di coltura. Attraverso tecniche citofluorimetriche si è analizzata la popolazione T regolatoria $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ e il ciclo cellulare. Infine si è valutata la proliferazione cellulare utilizzando un saggio ELISA.

Nella seconda fase dello studio, per approfondire l'analisi delle note capacità immunomodulatorie delle popolazioni mesenchimali anche verso soggetti con alterazioni del sistema immunitario, si sono allestite colture primarie di cellule staminali mesenchimali adulte isolate da lipoaspirati (ASC). Si è valutato l'effetto di NGAL su questa popolazione staminale, analizzandone la morfologia, il fenotipo, la proliferazione cellulare e l'espressione genica. Infine, con l'allestimento di co-culture, si è approfondito l'effetto sinergico del trattamento di NGAL e l'azione immunomodulante di ASC sulla popolazione linfo-monocitaria di pazienti in trattamento emodialitico.

MATERIALI E METODI

Arruolamento

Lo studio è stato condotto su un gruppo di pazienti sottoposti a emodialisi presso l'Unità Operativa di Nefrologia, Dialisi e Trapianto dell'Ospedale Sant'Orsola, Bologna, diretta dal Prof. La Manna.

I pazienti in emodialisi sono stati suddivisi in due gruppi, sulla base del loro valore di PRA.

Il prelievo di sangue è stato effettuato previo espresso consenso informato dei soggetti partecipanti, prima dell'inizio della sessione dialitica.

Isolamento di cellule mononucleate

Le cellule mononucleate (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) sono state isolate da sangue periferico mediante separazione su gradiente di densità, utilizzando Ficoll-Plaque® PLUS (GE Healthcare).

In seguito a centrifugazione, si ha la formazione di varie fasi: partendo dal fondo della provetta, si stratificano eritrociti e granulociti polimorfonucleati (eosinofili e neutrofili); all'interfaccia tra Ficoll e il plasma, si distribuiscono le cellule mononucleate del sangue (linfociti e monociti).

Il sangue periferico, prelevato in provette con EDTA, è stato diluito 1:2 con PBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, Gibco) sterile addizionato con 1% v/v di penicillina/streptomina (Sigma-Aldrich). Come controllo sono stati utilizzati *buffy-coat* diluiti 1:10.

10 ml di sangue diluito sono stati poi stratificati su 4,5 ml di Ficoll in provette da 15ml e centrifugati a 1500 rpm per 30 minuti in assenza di freno. Dopo la centrifuga, l'anello costituito da PBMC è stato raccolto, lavato due volte con PBS e centrifugato a 1500 rpm per 10 min, prima di eseguire l'emolisi dei globuli rossi mediante l'utilizzo di 1 ml di lisante VersaLyse Lysing solution (Beckman - Coulter) per 10 min al buio a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione, è stato eseguito un ulteriore lavaggio in PBS per eliminare la soluzione lisante. Il pellet di PBMC è stato risospeso infine in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco) al 10% FBS (*Fetal serum bovine*, Gibco).

Le cellule sono state infine contate in metilviioletto in modo da discriminare le cellule nucleate, per l'allestimento delle colture cellulari.

Coltura cellulare e trattamenti con NGAL

I PBMC isolati sono stati seminati a una densità di 1×10^9 cell/ml in piastre 6-well (Falcon) e attivati con 5 $\mu\text{g/ml}$ di PHA-L (*phytohemagglutinin-L*, Sigma-Aldrich), lectina con azione mitogena sui linfociti T, in grado di attivarli policlionalmente ed indurne la proliferazione. Infine, sono stati trattati con dosi crescenti di Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL, 80 ng/ml, 320 ng/ml, 640 ng/ml) e mantenuti in incubazione a 37°C per 72 h.

Al termine delle 72 h, i PBMC sono stati raccolti in una provetta da 15 ml per ogni condizione, per valutare la proliferazione cellulare mediante saggio ELISA e, una parte, è stata utilizzata per la caratterizzazione citofluorimetrica della componente T regolatoria e per l'analisi del ciclo cellulare.

Saggio di proliferazione

Il tasso di proliferazione cellulare dei PMBC è stato valutato mediante l'utilizzo di un saggio ELISA colorimetrico, che si basa sull'incorporazione della 5-bromo-2'-deossipuridina (BrdU, Cell Proliferation ELISA, Sigma).

La BrdU è un nucleotide sintetico analogo della timidina che viene incorporato nel DNA durante la fase di sintesi; valutando quindi la quantità di BrdU incorporata, è possibile ottenere una stima indiretta del tasso di proliferazione cellulare.

Dopo il trattamento di 72 h con dosi crescenti di NGAL, 100 μl di PBMC di ogni condizione sono stati seminati in una piastra 96-well in triplicato. Seguendo il protocollo fornito dalla ditta, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 10 μl di BrdU diluita 1:100 in RPMI e la piastra è stata incubata per 2 h a 37°C. Al termine, la piastra è stata centrifugata a 300 g per 10 minuti e dopo la rimozione del terreno per inversione le cellule sono state fissate per 30 minuti a temperatura ambiente. Sono poi stati aggiunti 100 μl di anticorpo anti-BrdU per pozzetto e la piastra è stata lasciata in incubazione a temperatura ambiente per 90 minuti. Al termine dell'incubazione l'eccesso di anticorpo è stato eliminato mediante lavaggi utilizzando una *washing solution* fornita dal kit. Sono stati aggiunti 100 μl di substrato (tetramethyl-benzidine, TMB) per pozzetto e la piastra è stata mantenuta al buio a temperatura ambiente per 30 minuti. Infine, sono stati aggiunti 25 μl di H_2SO_4 per pozzetto per effettuare la lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 450 nm con lettore di piastre Victor PerkinElmer.

Ciclo cellulare

L'analisi del ciclo cellulare permette di quantificare la percentuale di cellule distribuite nelle fasi del ciclo (G_0 - G_1 , S, G_2 -M).

La tecnica si basa sull'utilizzo del propidio ioduro, un intercalante degli acidi nucleici che legandosi alla doppia elica emette fluorescenza. In questo modo, le cellule in fase G_2 -M, con un quantitativo doppio di materiale genetico, emetteranno fluorescenza doppia rispetto a quella emessa da cellule in fase G_0 - G_1 . La fluorescenza emessa da una cellula in fase S sarà invece intermedia.

Questo saggio fornisce una valutazione addizionale sulla proliferazione di una coltura cellulare, che sarà tanto maggiore quanto più è elevato il numero di cellule in fase G_2 -M.

Dopo il trattamento di 72 h con dosi crescenti di NGAL, i PBMC destinati all'analisi del ciclo cellulare sono stati raccolti in una provetta da 15 ml per condizione e fissati in 500 μ l di etanolo al 70% in acqua. Infine, sono stati conservati a 4°C fino alla lettura al citofluorimetro eseguita presso il Servizio Trasfusionale del Sant'Orsola.

Per ogni condizione sono stati acquisiti 5×10^3 eventi tramite FACS Navio FC (Beckman-Coulter) con l'esclusione dei doppietti e l'analisi è stata eseguita con il software Kaluza FC Analysis.

Caratterizzazione immunofenotipica

L'analisi immunofenotipica è stata eseguita per valutare la percentuale di linfociti T regolatori (Treg, $CD4^+CD25^+FoxP3^+$) presenti nelle colture di PBMC attivati e trattati con NGAL.

A tal fine, sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anti-CD4-PC7 (Phycoerythrin Cyanin 7), anti-CD25-APC (Allophycocyanin) ed anti-FoxP3-PE (R-phycoerythrin). È stata effettuata inoltre anche la valutazione dell'espressione di HLA-G da parte dei linfociti T regolatori con anti-HLA-G -FITC (*Fluorescein isothiocyanato*) (Abcam 7904).

Dopo il trattamento di 72 h con dosi crescenti di NGAL, i PBMC destinati all'analisi citofluorimetrica sono stati raccolti in una provetta da 15 ml per condizione e fissati con 100 μ l di fissativo Intraprep (Beckman Coulter) per 10 min a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione è stato eseguito un lavaggio in PBS e il pellet è stato poi risospeso in 500 μ l di PBS e conservato a 4°C fino al momento dell'analisi, eseguita presso il Servizio Trasfusionale del Sant'Orsola. Per ogni condizione sono stati acquisiti 10^4 eventi tramite FACS Navio FC (Beckman-Coulter) e l'analisi è stata eseguita con il software Kaluza FC Analysis.

Valutazione di HLA-G solubile

Per valutare la quantità di HLA-G solubile (sHLA-G) rilasciato nei surnatanti delle colture di PBMC trattati con concentrazioni crescenti di NGAL, è stato utilizzato un saggio ELISA (sHLA-G ELISA Biovendor) capace di identificare le isoforme HLA-G1 e HLA-G5.

Il saggio si basa sul legame di anticorpi anti-sHLA-G alle molecole di sHLA-G presenti nel campione, con successiva aggiunta di un anticorpo secondario coniugato con la perossidasi che ossida il substrato tetramethyl-benzidine (TMB). L'aggiunta finale dell'acido contenuto nella Stop Solution fornita dal kit, comporta un viraggio verso il giallo. L'assorbanza, misurata a 450 nm tramite lettore di piastre, è proporzionale alla concentrazione di sHLA-G presente nel campione. È stata eseguita anche una lettura a 595 nm, i cui valori vengono sottratti a quelli ottenuti con la lettura a 450 nm per eliminare il segnale di background.

Per valutare la quantità di sHLA-G presente nel campione è necessario costruire una retta di taratura utilizzando un *master calibrator* fornito dal kit, che contiene una quantità nota di sHLA-G. Il *master calibrator* viene ricostituito in acqua distillata e diluito tramite diluizioni seriali con RPMI per ottenere gli altri punti della retta. Secondo le indicazioni del kit è possibile risalire alla quantità di sHLA-G valutando che 2,5 U corrispondono a 1 ng.

Dopo il trattamento di 72 h dei PBMC con dosi crescenti di NGAL sono stati raccolti i surnatanti di ogni condizione di coltura. 100 µl di ogni surnatante e di ogni calibratore per la creazione della curva di taratura è stato seminato in duplicato in una piastra da 96 pozzetti pre-coated con un anticorpo monoclonale anti-sHLA-G.

Seguendo le indicazioni del kit, la piastra è stata incubata per 20 h a 4°C. Terminata l'incubazione, sono state eseguiti 3 lavaggi con la *Wash Solution*, è stata aggiunta la *Conjugate solution* contenente l'anticorpo secondario marcato con la perossidasi. A questo punto la piastra è stata incubata per 1 h in agitazione a 300 rpm.

Successivamente sono state eseguiti 3 lavaggi con *Wash Solution* e sono stati aggiunti 100 µl di substrato per pozzetto. La piastra è stata posta in incubazione al buio per 25 minuti. Infine la reazione è stata stoppata mediante l'aggiunta di 100 µl di *stop solution* e si è eseguita la lettura dell'assorbanza a 450 nm e 595 nm.

Isolamento di cellule mesenchimali da tessuto adiposo

I campioni di lipoaspirato sono stati ottenuti grazie alla collaborazione con il centro di chirurgia estetica e medicina estetica “Studio Vignoli” di Bologna (Prot.N. 1029/CE del 2 dicembre 2014).

Il materiale prelevato durante il processo di liposuzione, tramite cannula *nanofat*, viene collezionato in tubi da 50 ml sterili e trasportati direttamente in laboratorio per l’isolamento della componente mesenchimale.

20ml di lipoaspirato sono stati trattati con una soluzione di collagenasi II allo 0,075% p/v (*StarFish*) per 30 minuti a 37°C in agitazione. Successivamente, si è centrifugato a 1500 rpm per 10 minuti ed eliminato il surnatante contenente la parte fibrosa e la parte grassa. il pellet è stato risospeso in PBS (*Lonza*) addizionato di antibiotici all' 1% (*Penicillin-Streptomycin, Lonza*) e filtrato utilizzando uno strainer 100 µm (BD Biosciences) al fine di eliminare residui di tessuto fibroso ancora presenti.

La sospensione è stata ulteriormente centrifugata a 1500 rpm per 5 minuti per effettuare la lisi dei globuli rossi con 1 ml di soluzione lisante (*Versalys Lysing Solution, Beckman-Coulter*) e infine il pellet è stato risospeso in terreno Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM high glucose 4,5 g/l, *Lonza*) al 10% di FBS (*Fetal Bovine Serum, Lonza*). La frazione vascolo stromale (*stromal vascular fraction, SVF*) così ottenuta, dopo conta cellulare in eritrosina, è stata seminata a 20.000 cells/cm². Per questo studio sono stati utilizzati 4 diversi campioni di lipoaspirato.

Allestimento delle colture di mesenchimali

In seguito all’isolamento, le cellule mesenchimali/stromali da tessuto adiposo (ASC) sono state mantenute in coltura ad una densità di semina di 3.000 cell/cm² in DMEM H al 10% FBS e utilizzate tra il 3°- 7° passaggio per l’allestimento dei saggi successivi.

Valutazione dell’espressione genica

Al quarto passaggio in coltura, le ASC sono state seminate in piastre 6-well a 9.000 cells/cm² e dopo 24 ore è stato effettuato un cambio terreno con dosi crescenti di NGAL (80 ng/ml, 320 ng/ml, 640 ng/ml) in triplicato per valutare l’espressione genica, tramite RealTime-PCR delle colture trattate con le diverse concentrazioni analizzate di lipocalina.

Le piastre sono state mantenute in incubazione a 37°C per 72 h. Al termine del trattamento le cellule, per ogni condizione, sono state risospese con 1 ml di Trizol® (*Invitrogen*) e mantenute a -80°C fino all’estrazione dell’RNA totale.

Estrazione e quantificazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato estratto dalla sospensione di Trizol[®] seguendo le informazioni fornite dalla ditta (Invitrogen). Il Trizol[®] è una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato in grado di lisare i tessuti e dissolvere i vari componenti pur mantenendo l'integrità dell'RNA.

I campioni, una volta scongelati, sono stati mantenuti per 5 minuti a temperatura ambiente per permettere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici. Ad ogni campione sono stati aggiunti 200 µl di cloroformio per ml di Trizol[®]; le eppendorf sono state agitate vigorosamente per 15 secondi fino ad ottenere una sospensione lattiginosa. Trascorsi 7 minuti a temperatura ambiente, i campioni sono stati centrifugati a 12.000 g per 15 minuti a 4°C. A seguito della centrifugazione, la soluzione si separerà in due fasi: una fase inferiore organica, corrispondente al fenolo-cloroformio nella quale si trovano le proteine, e una fase superiore acquosa, contenente esclusivamente l'RNA. All'interfaccia tra le due fasi si stratifica il DNA. Facendo attenzione a non prelevare il DNA, la fase acquosa è stata prelevata, trasferita in una nuova provetta e addizionata di 500 µl di isopropanolo per ml di Trizol[®] per favorire la precipitazione dell'RNA.

I campioni sono stati quindi incubati overnight (O.N.) a -20°C. Successivamente, dopo 7 min a temperatura ambiente, sono stati centrifugati a 12.000 g per 10 minuti a 4°C.

Il sovranatante è stato rimosso e il pellet è stato lavato con 1 ml di etanolo al 75% in H₂O DEPC (dietilpirocarbonato) per ml di Trizol[®], agitando vigorosamente. I campioni sono stati infine centrifugati a 7.500 g per 5 minuti a 4°C.

Eliminato l'etanolo, il pellet è stato lasciato asciugare all'aria e infine risospeso in H₂O DEPC e conservato a -80°C.

La qualità dell'RNA estratto è stata determinata valutando la nitidezza delle bande 28S (4,7 kb) e 18S (1,9 kb) di rRNA, in seguito a corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1% in Buffer TAE (1X) (TRIS-acetato 40 mM-EDTA 1 mM, pH 7,5). Le bande sono state visualizzate utilizzando GelDoc (BioRad) in presenza di raggi UV, grazie alla presenza di bromuro di etidio, un intercalante di acidi nucleici.

I campioni di RNA sono preparati aggiungendo a 1,5µl di ciascun campione con 1,5 di Loading Dye 2X contenente i coloranti bromofenolo blu e xilene cianolo e l'agente denaturante formammide, per la separazione dei campioni di RNA durante la corsa. I campioni sono stati quindi denaturati a 70°C per 10 minuti al fine di eliminare le strutture secondarie dell'RNA prima di iniziare la corsa

elettroforetica. I campioni che presentavano delle bande di rRNA definite, quindi non degradati, sono stati utilizzati per i passaggi successivi.

È stato poi quantificato l'RNA totale estratto con lettura dell'assorbanza a 260 nm e 280nm tramite Nanodrop (Nanodrop Spectrofotometer ND-1000). L'indice della purezza del campione di RNA viene calcolato in base ai rapporti tra le assorbanze emesse a 260/230nm e 260/280nm: il primo indica un'eventuale contaminazione fenolica (valore ottimale 2), mentre il secondo indica un'eventuale contaminazione proteica (valore ottimale compreso tra 1,8 e 2,2).

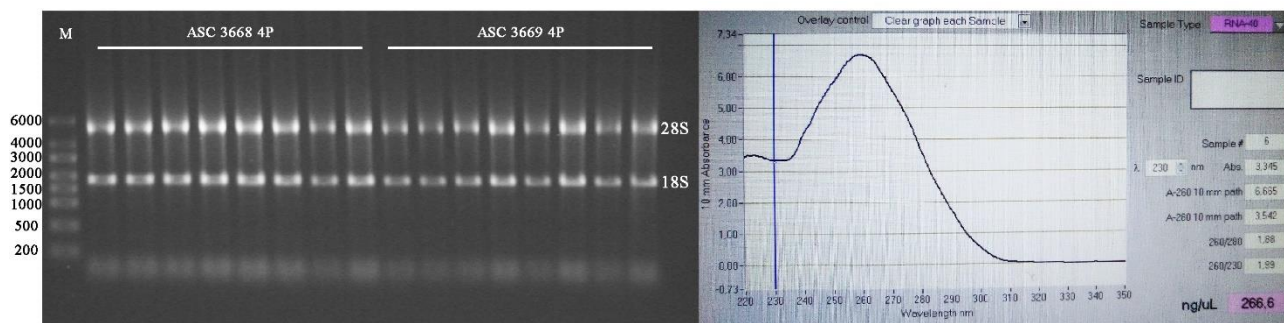


Figura 10: Immagine rappresentativa di una corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1% per valutare la qualità del RNA estratto. M: marker; 28S: RNA ribosomiale 28S (4700 bp); 18S: RNA ribosomiale 18S (1900 bp) e della quantificazione di un campione di RNA al Nanodrop.

Retrotrascrizione

La retrotrascrizione è una reazione che permette di ottenere un primo filamento di cDNA partendo dai campioni di RNA grazie alla presenza dell'enzima retrotrascrittasi. In seguito alla quantificazione dell'RNA, è stato eseguito il protocollo descritto dal kit "Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase" (ThermoFisher) che permette di retrotrascrivere RNA totale nel range di 1 pg – 5 μg. Per ciascun campione sono stati retrotrascritti 1,2 μg di RNA totale.

In ghiaccio è stata preparata una Master Mix per ciascun campione di 10 μL comprendente:

- 1 μL 10X dsDNase Buffer
- 1 μL dsDNase
- Template RNA
- H₂O, nuclease-free fino a 10 μL

Le provette sono state vortexate delicatamente e caricate nel termociclatore PTC-100™ (Peltier Thermal Cycler) preriscaldato per 2 min a 37°C. Infine sono stati aggiunti ad ogni provetta:

- 4 μL 5X Reaction Mix
- 2 μL Maxima Enzyme Mix
- 4 μL H₂O, nuclease-free

Dopo aver vortexato gentilmente, i campioni sono stati retrotrascritti con il seguente protocollo:

- 10 min a 25°C
- 30 min a 50°C
- 85°C per 5 min
- mantenimento a 4°C

La quantità di cDNA di ciascun campione in seguito a retrotrascrizione è stato quantificato tramite lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Cambridge, UK) a 260 nm e 280 nm e diluito a 100 ng/μl in H₂O DEPC.

Il cDNA così ottenuto è stato conservato a -20°C e utilizzato per le successive analisi di RealTime-PCR.

Progettazione primer

Per la progettazione dei *primer* sono stati utilizzati dei software che ne permettono il disegno e la validazione *in silico*. I *primer* sono disegnati tenendo in considerazione diversi parametri come la lunghezza e la temperatura di *melting* dell'amplicone, la percentuale di GC, l'assenza di strutture secondari e di dimeri di *primer*.

Il primo software utilizzato per la ricerca di una coppia di *primer* è "Gene" (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), che permette di studiare le caratteristiche del gene di interesse e contiene il link alla sequenza nucleotidica di RNA del gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>). Una volta indentificata la sequenza nucleotidica del gene, è stato utilizzato il software "Primer Blast" (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) che permette di individuare diverse coppie di *primer* che amplifichino esclusivamente il gene di interesse e che abbiano delle caratteristiche di temperatura, percentuale di GC compresa tra il 45%-55% definite dall'operatore.

Inoltre, la coppia di *primer* è stata preferibilmente costruita in modo che una delle due sequenze sia a cavallo tra due esoni (*exon junction*) oppure che le due sequenze siano su due esoni diversi allo scopo di evitare contaminazioni di DNA genomico. La specificità dei *primer* scelti è stata poi verificata con l'utilizzo del programma Amplify, che effettua una PCR *in silico* e permette di evidenziare la presenza di aspecifici o dimeri di *primer*. Le sequenze dei *primer* ottenuti sono riportate in Tabella 1.

La specificità dei *primer* è stata valutata analizzando le curve di *melting* al termine della reazione di RealTime-PCR, mentre la lunghezza degli ampliconi è stata verificata caricando i prodotti di PCR su gel di agarosio al 2%.

Tabella 1: sequenze delle coppie primer utilizzate nelle analisi di qRT-PCR. β -Actin e GAPDH sono stati utilizzati come geni housekeeping.

Unigene accession no.	Gene ID	GENE	Left Primer	Right Primer	Amplicone (bp)
Hs.544577	2597	GAPDH*	CCTGACCTGCCGTCTAGAAA	TGCTGTAGCCAAATTCGTTG	233
Hs.520640	60	β-Actin*	AGACCTGTACGCCAACACAGT	AGTACTTGCGCTCAGGAGGA	140
Hs.249184	5460	OCT-4	AGTTTGTGCCAGGGTTTTTG	ACTTCACCTTCCCTCCAACC	113
Hs.635882	79923	NANOG	CCTTCTGCGTCACACCATT	AACTCTCCAACATCCTGAACC	126
Hs.126256	3553	IL-1 β	AGCCATGGCAGAAGTACCTG	CCTGGAAGGAGCACTTCATCT	116
Hs.654458	3569	IL-6	CAATGAGGAGACTTGCCTGGT	AGCTGCGCAGAATGAGATGA	275
Hs.193717	3586	IL-10	GGCGCTGTCATCGATTTCTTC	GCCACCCTGATGTCTCAGTT	108
Hs.241570	7124	TNF-α	CCCCAGGGACCTCTCTCTAA	TCTCAGCTCCACGCCATT	145
Hs.437322	7130	TSG-6	TGGAAACCTCCAGCTGTAC	TGGCTTTGTGGGAAGATACTGT	114
Hs.297413	4318	MMP-9	GCCACCCGAGTGTAACCA	GAACCAATCTCACCGACCAG	67

Valutazione dell'efficienza dei primer

Prima di procedere negli esperimenti di analisi di espressione genica, per ogni primer è stata valutata l'efficienza di amplificazione con l'ausilio della tecnica di qRT-PCR. In via teorica l'efficienza della reazione di PCR del 100% consente il raddoppiare la quantità di amplificato ad ogni ciclo di PCR. Per verificare questa condizione si è allestito un esperimento di qRT-PCR con concentrazioni crescenti di cDNA (25, 50, 100, 200, 400 ng/ μ l). Ogni concentrazione è stata saggiata in duplicato. Il software ci consente di ottenere un grafico che riporta la concentrazione di cDNA sull'asse delle ascisse e il numero dei cicli sull'asse delle ordinate. La pendenza della retta che si ottiene indica l'efficienza della reazione. Tale valore deve essere compreso tra il 95%-105%.

RealTime-PCR

La Real-Time PCR è una reazione di amplificazione del DNA che consente di quantificare la sintesi del prodotto di PCR ad ogni ciclo di amplificazione in tempo reale, partendo da cDNA.

Il segnale che viene quantificato è dato dalla fluorescenza emessa da fluorofori nel momento in cui si intercalano alle molecole di DNA prodotte ad ogni ciclo di amplificazione ed aumenta in rapporto al numero di siti di legame ai doppi filamenti di DNA prodotti.

La quantità di prodotto amplificato può essere quindi determinata ad ogni ciclo di amplificazione, rilevando al termine della fase di estensione, la radiazione emessa del fluoroforo. Uno dei

fluorofori più utilizzati è il SYBR® Green. Il complesso DNA-SYBR® Green assorbe luce blu ad una lunghezza d'onda $\lambda_{max} = 488 \text{ nm}$ ed emette luce verde a una lunghezza d'onda $\lambda_{max} = 522 \text{ nm}$.

La reazione consiste in una serie di cicli di amplificazione; per ogni ciclo si possono distinguere tre fasi: denaturazione, *annealing* ed estensione. La denaturazione avviene ad una temperatura di 95°C per 30 secondi, la quale permette la rottura dei legami idrogeno tra le catene e, di conseguenza, la separazione della doppia elica di DNA stampo in due filamenti singoli. Seguono 45 cicli costituiti ognuno da una fase di denaturazione a 95°C per 5 secondi e una fase di *annealing*/estensione a 60 °C per 25 secondi seguita dalla lettura della fluorescenza alla fine di ogni ciclo. Nella fase di *annealing*, la temperatura viene abbassata in modo da permettere il legame dei *primer* alle sequenze complementari di DNA a singola elica localizzate alle estremità del frammento di interesse. Nell'ultima fase di estensione, la temperatura viene rialzata per massimizzare l'azione della DNA polimerasi, la quale estende i *primer* incorporando i singoli deossiribonucleotiditri-fosfati (dNTPs) complementari al filamento stampo. Ogni ciclo di amplificazione si ripete 30-40 volte per ottenere un'amplificazione esponenziale della sequenza target.

Al termine dei cicli di amplificazione, lo strumento esegue l'analisi delle curve di *melting* che permette di rilevare la presenza di dimeri di *primer* o ampliconi aspecifici. Infatti, ogni prodotto di amplificazione possiede una propria T_m specifica, dipendente dalla grandezza dell'amplicone e dalla natura dei nucleotidi che lo compongono. Per identificare la presenza di prodotti aspecifici, al termine della reazione, la temperatura viene alzata da un minimo di 60°C ad un massimo di 95°C tramite piccoli incrementi di 0,5°C ogni 5 secondi circa.

Quando la temperatura raggiunge la T_m specifica di un amplicone avviene la separazione dei filamenti e il conseguente calo della fluorescenza, visualizzabile graficamente da un picco. Se il prodotto di amplificazione è unico si visualizzerà un solo picco, al contrario la visualizzazione di più picchi indica la presenza di più prodotti aspecifici.

Utilizzando il kit SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix è stata valutata l'espressione dei geni in Tabella 1, utilizzando β -Actina e GAPDH come geni *housekeeping*.

In ghiaccio sono state preparate le Master Mix per ciascun gene da analizzare costituite da:

- SYBR® Green
- H₂O DEPC
- *Primer Forward* (5 μ M)
- *Primer Reverse* (5 μ M)

In una piastra da 96-well per PCR mantenuta in ghiaccio, sono stati aliquotati in ogni pozzetto 13,5 μ L di Master Mix e aggiunti 1,5 μ L di cDNA 100 μ g/ml in triplicato per ciascun campione in ogni pozzetto. La piastra è stata centrifugata per 5 minuti a 3000 rpm e caricata nel termociclatore (CFX96 BioRad).

L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il software CFX Manager (BioRad): l'espressione di ciascun gene di interesse è stata calcolata tramite quantificazione relativa utilizzando la formula $2^{-\Delta\Delta CT}$ ¹⁴³ e correggendo il risultato per l'effettiva efficienza dei primers.¹⁴⁴ Per ciascun gene, si calcola il valore del ΔCt per ogni condizione sperimentale, dato dalla differenza tra il Ct del gene di interesse e il valore del CT di un gene housekeeping. Infine, per ogni gene si calcola il valore del $\Delta\Delta Ct$ dato dalla differenza tra il ΔCT ottenuto per ogni singola condizione e il ΔCT ottenuto dalla condizione controllo. I geni housekeeping usati sono β -actin e GAPDH, ovvero due geni espressi costitutivamente nelle cellule e che non sono modificati dalle condizioni sperimentali. La stabilità dei geni housekeeping è stata valutata utilizzando due parametri calcolati dal software, CV e *M value*.¹⁴⁵ I geni β -actin e GAPDH hanno valori di *M value* e CV che rientrano nel range indicato riflettendo quindi la buona stabilità dei due geni. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata tramite il software qBase.

Caratterizzazione immunofenotipica

Le ASC al quinto passaggio sono state seminate a 9.000 cells/cm² in DMEM H al 10% FBS e dopo 24 ore a 37°C è stato effettuato un cambio terreno in presenza/assenza di NGAL 320 ng/ml, concentrazione in cui si è ottenuta l'effetto massimo nelle colture di cellule linfomonocitarie in seguito a trattamento con lipocalina.

Le colture sono state mantenute in incubazione per 72 h, al termine sono state analizzate in citofluorimetria per valutare l'immunofenotipo in relazione al trattamento con la lipocalina, investigando i cluster CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 (BD Biosciences).

Per l'analisi citofluorimetrica sono stati acquisiti 10⁴ eventi per saggio tramite CyFlow[®] Space (Sysmex - PARTEC) e l'analisi eseguita con il software FlowJo.

Proliferazione cellulare

L'analisi della vitalità delle ASC coltivate in presenza di NGAL 320 ng/ml si è effettuata utilizzando l'AlamarBlue Assay (Invitrogen). Questo test si basa sulla presenza di un indicatore colorimetrico/fluorimetrico di tipo REDOX che vira in base alla variazione dello stato di riduzione del terreno di crescita indotta dal metabolismo cellulare.

Le ASC tra il 5°-6° passaggio sono state seminate a 9.000 cell/cm² in piastre da 24-well in DMEM H al 10% di FBS. Dopo 24h si è provveduto ad un cambio terreno aggiungendo al terreno base il 10% *AlamarBlue* con e senza aggiunta di NGAL a 320 ng/ml, in triplicato. Le piastre sono state incubate al buio e si è effettuata una lettura della fluorescenza a EX 560 nm / EM 590 nm utilizzando il lettore di piastra Victor2 Multilabel Counter (Victor Multilabel Plate Reader - Perkin Elmer, Boston, MA, USA) ogni 24h, ripetendo la procedura e sostituendo il *medium*, fino alle 72h di trattamento. I valori di fluorescenza sono stati normalizzati rispetto al bianco.

Valutazione della tossicità di NGAL

Per valutare la percentuale di cellule apoptotiche o necrotiche in seguito al trattamento delle cellule mesenchimali/stromali con lipocalina, è stata eseguita la marcatura con Annessina V. Questa è una proteina ubiquitaria, capace di legarsi alla membrana cellulare in maniera Ca²⁺-dipendente, che presenta un'alta affinità per la fosfatidilserina (PS), generalmente localizzata sullo strato interno della membrana plasmatica. Poiché all'inizio dell'apoptosi avviene l'esposizione della PS sulla membrana esterna, il saggio con annessina V rappresenta un metodo di rilevazione delle fasi precoci dell'apoptosi tramite analisi citofluorimetrica.

Per distinguere le cellule vive da quelle apoptotiche e necrotiche, è stata utilizzata una doppia marcatura con propidio ioduro (PI), colorante in grado di legarsi agli acidi nucleici e che è in grado, quindi, di fornire un'informazione sulla quantità di DNA contenuta nelle cellule. Le cellule vive risultano negative sia ad annessina che al PI; le cellule in uno stadio iniziale di apoptosi risultano positive all'annessina e negative al PI; le cellule necrotiche saranno negative all'annessina e positive al PI, mentre le cellule positive ad entrambi i marcatori identificano cellule in apoptosi avanzata.

Per poter effettuare questa analisi, le ASC al quinto passaggio sono state seminate a 9.000 cell/cm² in DMEM H, 10% FBS. Dopo per 24 ore è stato effettuato un cambio terreno in presenza o assenza di NGAL 320 ng/ml.

Le colture sono state mantenute in incubazione a 37°C per 72 h e al termine del trattamento le cellule delle due condizioni sono state tripsinizzate e centrifugate a 1200 rpm per 5 min.

I pellet sono stati infine risospesi in *binding buffer 1X*, a cui si è aggiunta annessina V – FITC e PI, seguendo il protocollo descritto dal fornitore (BD Biosciences). I campioni sono stati vortexati delicatamente e incubati al buio per 20 minuti a temperatura ambiente prima di analizzarli al citofluorimetro. Per ogni condizione sono stati acquisiti 10^4 eventi tramite CytExpert (Beckman-Coulter) e l'analisi è stata eseguita con il software CytExpert (Beckman-Coulter).

Allestimento di co-culture

Le prove di immunomodulazione sono state effettuate mediante co-culture di cellule mononucleate isolate da sangue periferico secondo il protocollo precedentemente descritto, seminate su due linee di ASC.

Le ASC sono state seminate in piastre da 6-well ad una concentrazione di 9.000 cell/cm² in DMEM H al 10% FBS e incubate a 37°C, al 5% di CO₂ per 24 ore.

Le cellule mononucleate isolate da buffy-coat, utilizzato come controllo, e isolate da soggetti in emodialisi e iperimmuni, sono state seminate insieme alle ASC adese in terreno RPMI al 10% FBS in presenza o assenza di NGAL 320 ng/ml a 2×10^6 cell/pozzetto. L'attivazione dei PBMC si è ottenuta con aggiunta di PHA ad una concentrazione di 5 µg/ml. Parallelamente sono state allestite delle colture di controllo di PBMC, con e senza aggiunta di PHA.

Le co-culture sono state incubate a 37°C per 72 ore.

Al termine è stato risospeso il sovrinatante delle co-culture, in modo da riportare in sospensione le mononucleate sul fondo della piastra e trasferito il tutto in una provetta da 15 ml.

Le cellule mononucleate sono state analizzate in parte tramite saggio ELISA per la valutazione della proliferazione cellulare come descritto in precedenza ed in parte tramite analisi citofluorimetrica per la valutazione delle fasi del ciclo cellulare e per valutare la popolazione T regolatoria, come precedentemente descritto.

Le ASC sono state analizzate in citofluorimetria per la valutazione dell'espressione di HLA-G. L'utilizzo di *transwell* (Falcon) ha permesso di analizzare l'espressione genica tramite RealTime-PCR delle popolazioni singole dopo co-cultura seguendo i protocolli descritti in precedenza.

RISULTATI

Casistica

Per il progetto di studio sono stati arruolati i seguenti pazienti, suddivisi in base al valore di PRA max >80%. Nella prima tabella sono elencati i pazienti in trattamento emodialitico presso l'U.O. di Nefrologia, Dialisi e Trapianto del Policlinico S. Orsola non iperimmuni. Nella seconda tabella sono elencati i pazienti arruolati in trattamento emodialitico definiti iperimmuni, in quanto hanno presentato per almeno 3 volte un valore di PRA >80%.

Il gruppo di pazienti dializzati non iperimmuni arruolato presenta un'età media di 66,125 anni e il 67% è di sesso femminile, sottoposto a trattamento emodialitico in media da 6,3 anni.

Il gruppo di pazienti iperimmuni presenta un'età media di 59,5 anni, il 60% è di sesso maschile, con almeno un trapianto eseguito; il paziente in media è sottoposto ad emodialisi da 11,7 anni ed è iscritto alla Lista trapianti di Rene della regione Emilia-Romagna da 10,5 anni.

Tabella 2: Pazienti emodializzati arruolati nello studio

COD.	Età	Sesso	Patologia di base	Inizio dialisi	iscrizione in lista	Attesa per trapianto (gg)	N. trapianti eseguiti
A1	52	F	Nefropatia HIV-relata Uscita per trapianto	01/08/2008	31/07/2015	180	1
A2	53	F	Malattia renale vascolare per ipertensione maligna Uscita per trapianto	01/09/2005	03/10/2006	3077	1
A3	67	F	Uscita per siero scaduto		10/12/1995	179	
A5	58	M	Malattia policistica dominante dell'adulto Uscita per trapianto	05/10/2013	27/04/2017	218	1
A6	83	F	Pielonefrite cronica Deceduta	22/11/2012	no	/	/
A7	52	M	Diabete mellito, uropatia ostruttiva	26/05/2014	no	/	/
A8	83	F		13/04/2015	no	/	/
A9	81	F		21/04/2008	no	/	/
MEDIA	Età media 66,13 anni	67%F 33%M		trattamento emodialitico da 6,3 anni			

Tabella 3: Pazienti emodializzati iperimmuni arruolati nello studio

COD.	Età	Sesso	Patologia di base	Inizio dialisi	iscrizione in lista	Attesa per tx (gg)	Trapianti eseguiti	PRA max
01	69	F	Policistosi renale Rivalutazione di idoneità per secondo trapianto. Paziente iperimmunizzata. Attiva per tutti i programmi trapianto compreso quello dei donatori HCV. Comorbidità immunologiche	12/01/11	15/05/2012	2037	2	(24/09/2012) 88
02	51	M	Sindrome emolitico-uremica Si conferma la permanenza in lista per trapianto di rene con rischio aumentato per l'immunizzazione legata al pregresso trapianto e per i reperti vascolari. Comorbidità ipertensione, trattamento farmacologico, renale, immunologiche	01/03/95	01/05/1995	8261	2	(03/02/2005) 100
03	69	M	Policistosi renale Uscito di lista per secondo trapianto	01/10/08	21/03/2013	1141	2	(09/12/2010) 20
04	53	M	Pielonefrite cronica e nefropatia associata a reflusso vescico-ureterale Condizioni cliniche generali stabili. Si conferma l'idoneità al programma di trapianto di rene seppur a rischio aumentato per secondo trapianto e lunga storia nefrologica.	01/03/07	24/02/2009	3213	2	(29/10/2009) 100
05	62	M	Nefrite interstiziale (non altrimenti specificata) Uscito di lista per non idoneità clinica in data 25/01/2016	01/07/99	03/08/1999	6019	1	(22/02/2011) 8
06	55	F	Nefrite interstiziale Rivalutazione di idoneità secondo trapianto di rene di paziente immunizzata, già portatrice di trapianto renale da donatore cadavere dal 1984 al 1994. Rientrata in lista trapianto nel Malattia di base: nefropatia interstiziale da farmaci. La paziente si presenta in condizioni cliniche soddisfacenti e pertanto è confermata la sua permanenza in lista attiva e nel programma iperimmuni nazionale e regionale. Comorbidità vascolari, immunologiche	01/08/94	31/01/1995	8351	2	(10/02/2001) 100
07	66	F	Glomerulosclerosi cronica Vasculite autoimmune Rivalutazione di idoneità a secondo trapianto di rene di paziente di 68 anni in dialisi dal 2005 per una nefropatia secondaria a vasculite pANCA positiva. Politrasmusa. Immunizzata. In anamnesi si segnala: ipertensione arteriosa, problematiche di accesso vascolare. La paziente aveva già dato il consenso ai programmi trapianto disponibili. Sulla base dell'analisi degli accertamenti effettuati si conferma l'idoneità al trapianto con rischio aumentato. Comorbidità autoimmuni, immunologiche	17/06/05	28/06/2005	4550	1	(06/07/2011) 100
08	45	M	Sindrome emolitico-uremica Rivalutazione di idoneità a terzo trapianto di rene di paziente fortemente immunizzato, già portatore di trapianto renale da donatore: il primo dal 2002 al 2005; il secondo dal 2006 al 2010. Reni trapiantati entrambi in sede. Viene consegnata anche l'informativa del CNT in merito alle categorie di rischio dei donatori. In base agli esami disponibili si conferma l'idoneità al trapianto di rene singolo con rischio immunologico e cardiovascolare aumentato. Comorbidità immunologiche.	01/03/10	29/11/2011	2205	3	(08/02/2017) 45

			Glomerulonefrite cronica	01/07/13	18/12/2014	1090	2	(18/09/2017) 99
09	70	M	Paziente rientrato in Lista trapianto dopo un primo trapianto durato 25 anni. Nell'ultimo anno ha effettuato la nefrectomia del rene destro per neoplasia, TAC e PET, nonché il controllo oncologico che non ha dato controindicazioni al mantenimento in Lista. Anche le valutazioni cardiologiche e doppler sono soddisfacenti. Ho nuovamente spiegato i programmi trapianto ai quali può aderire e per i quali ha formalizzato il suo consenso, compreso il NHBD. Al momento si ritiene idoneo e fortemente motivato al trapianto.					
			Nefrite tubulo interstiziale (non pielonefrite)	15/12/11	25/10/2012	1699	1	(08/02/2013) 90
10	55	F	Uscita di lista per primo trapianto					
MEDIA	Età media 59,50	40%F 60%M	In trattamento emodialitico da 11,7 anni	Iscrizione in Lista da 10,5 anni	3856,6 giorni (10,6 anni)	> 1 trapianto eseguito		

Coltura cellulare e trattamenti con NGAL

Mediante la separazione su gradiente di densità è stato possibile isolare PBMC dal sangue periferico di pazienti in trattamento emodialitico e iperimmuni, prima dell'inizio della seduta dialitica.

I PBMC isolati dai soggetti dei tre gruppi in studio sono stati attivati con PHA 5 µg/ml e trattati con dosi crescenti di NGAL (80, 320, 640 ng/ml) per 72h. Come condizione basale si è utilizzata una coltura di PBMC non trattata con NGAL.

Proliferazione cellulare

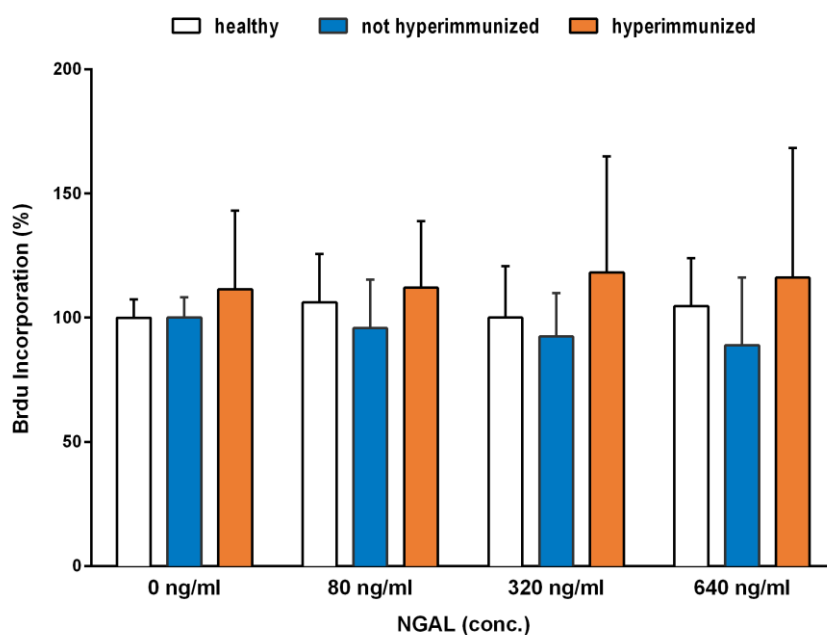


Figura 11: Valutazione della proliferazione cellulare mediante saggio ELISA. I dati sono presentati come media \pm SD, analizzati con test ANOVA tramite software GraphPad Prism.

Per valutare la proliferazione dei PBMC trattati con NGAL è stato utilizzato un saggio ELISA che si basa sull'incorporazione della BrdU nel DNA delle cellule proliferanti.

Il gruppo di controllo non mostra variazioni significative della proliferazione cellulare in seguito al trattamento con NGAL a tutte le concentrazioni in analisi. Analizzando i pazienti sottoposti ad emodialisi si può notare una lieve diminuzione della proliferazione cellulare dose dipendente, ma senza differenze significative.

I pazienti iperimmuni presentano una proliferazione maggiore sia rispetto al gruppo di controllo, sia rispetto ai pazienti in emodialisi, in tutte le condizioni analizzate, senza mostrare variazioni in seguito al trattamento con NGAL.

Ciclo cellulare

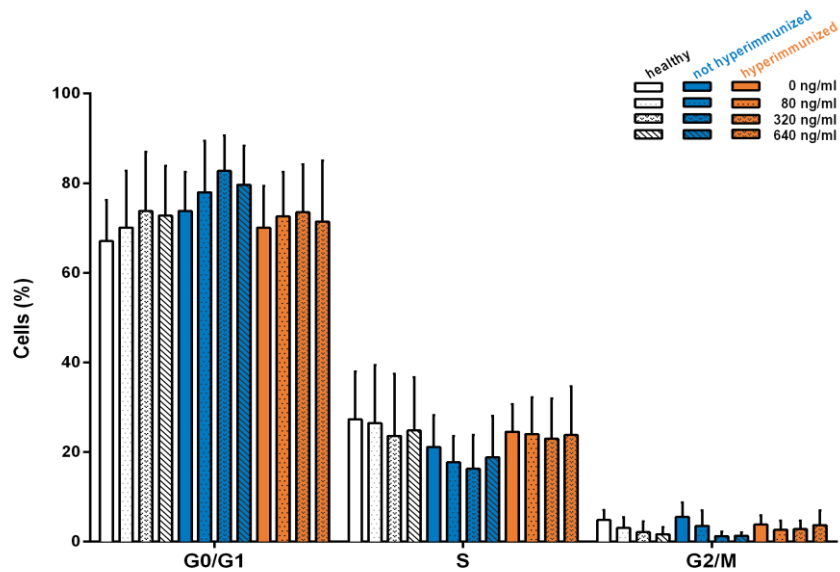


Figura 12: Valutazione del ciclo cellulare mediante analisi citofluorimetrica delle colture di PBMC dei tre gruppi in studio trattate con diverse concentrazioni di lipocalina. I dati sono presentati come media \pm SD, analizzati con software GraphPad Prism.

L'analisi del ciclo cellulare permette di valutare se il trattamento con NGAL comporti una variazione della linfo-proliferazione analizzando le cellule nelle diverse fasi di quiescenza/proliferazione.

Mediante il saggio citofluorimetrico, che si basa sull'incorporazione del propidio ioduro nel doppio filamento di DNA, si evidenzia per tutti i gruppi in analisi una tendenza dose dipendente nella riduzione della proliferazione dei PBMC, che si traduce in un aumento delle cellule in fase quiescente G0-G1.

Questi primi risultati dimostrano come il trattamento con NGAL non abbia un effetto tossico sulle cellule dei gruppi in studio e non comporti variazioni significative nella linfo-proliferazione dei PBMC a tutte le concentrazioni analizzate.

Caratterizzazione immunofenotipica

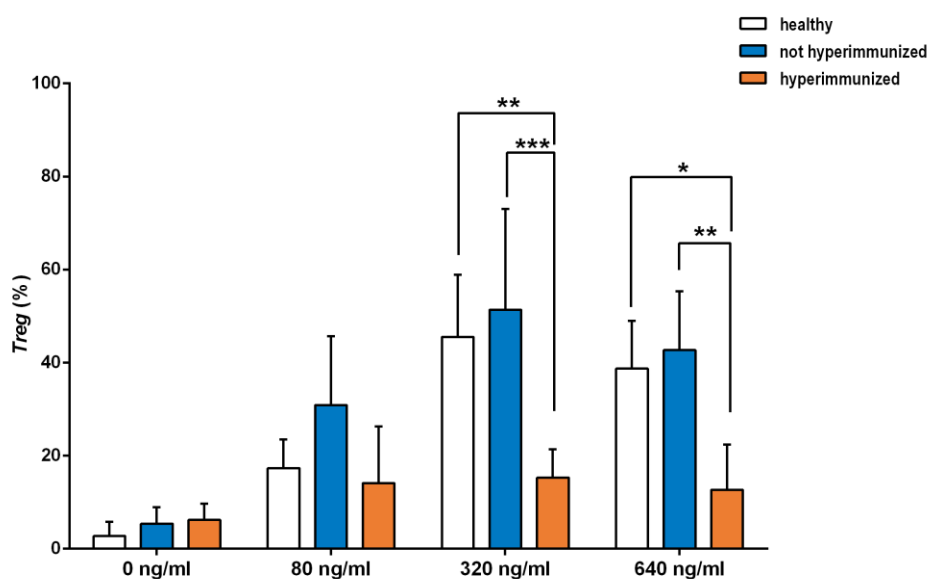


Figura 13: Percentuale di linfociti T regolatori nelle colture di PBMC dei tre gruppi in studio trattate con diverse concentrazioni di lipocalina. I dati sono presentati come media \pm SD, analizzati con tramite software GraphPad Prism, * $p < 0,05$

Per valutare se il trattamento con NGAL inducesse un aumento della componente regolatoria CD4⁺ in colture di PBMC isolati da pazienti in trattamento emodialitico, si è stata eseguita un'analisi immunofenotipica in seguito a trattamento con concentrazioni crescenti di NGAL (80, 320, 640 ng/ml) per 72 h analizzando l'espressione di marker caratteristici dei linfociti T regolatori, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺.

Diversamente dalle analisi precedentemente descritte, la percentuale di Treg viene modificata in seguito al trattamento con diverse concentrazioni di NGAL, inoltre si evidenzia un andamento nettamente diverso nei gruppi di pazienti analizzati.

Nel gruppo di controllo si mostra un aumento dose-dipendente della componente T regolatoria con valore massimo medio di 45,54% alla concentrazione 320 ng/ml di NGAL; lo stesso andamento lo si riscontra per il gruppo di pazienti in emodialisi non iperimmuni che mostrano un aumento con valore massimo della componente Treg di 51,37% alla stessa concentrazione di lipocalina.

Per i pazienti iperimmuni si nota un lieve incremento della percentuale di linfociti T regolatori rispetto alla condizione basale, ma non influenzato dalle concentrazioni di NGAL analizzate, infatti a 80, 320 e 640 ng/ml di NGAL si sono ottenuti in media 14,1%, 15,3% e 12,7% rispettivamente. In assenza di NGAL, nel gruppo dei controlli sani è stato possibile rilevare una percentuale media di Treg di 2,74%, mentre per i pazienti in emodialisi, come per i pazienti iperimmuni, risulta lievemente aumentata a 5,41%.

Alla concentrazione di 640 ng/ml, sia per i pazienti dializzati che per il gruppo di controllo la percentuale di Treg rilevato scende lievemente a 42,7% e 38,7% rispettivamente.

Oltre alla valutazione della percentuale di Treg indotte dal trattamento con NGAL, si è valutata l'espressione di HLA-G da parte di questa sottopopolazione linfocitaria.

L'analisi ha evidenziato anche per quanto riguarda questo marker di tolleranza, un aumento dose-dipendente rispetto al trattamento con NGAL, in modo analogo all'aumento di Treg.

Nel gruppo di controllo, come per il gruppo di dializzati non iperimmuni, si è ottenuta la massima espressione alla concentrazione di 320 ng/ml con il 47,52% e 60,16% rispettivamente.

Basalmente, si è riscontrata un'espressione pari al 6,7%, 4,62% e 5,64% nei tre gruppi analizzati, senza differenze significative.

L'aggiunta di lipocalina, alla minor concentrazione analizzata, determina un notevole aumento di espressione di HLA-G rispetto alla condizione basale, sia nel gruppo di controllo che nei pazienti non iperimmuni, ad un valore medio rispettivamente di 24,04% e 37,39%.

Il trattamento alla concentrazione maggiore, invece, ha determinato, come per la percentuale di Treg, una lieve diminuzione dell'espressione di HLA-G. Si è riscontrata una percentuale di espressione di 40,88%, 51,71% e 7,08% rispettivamente nei gruppi analizzati.

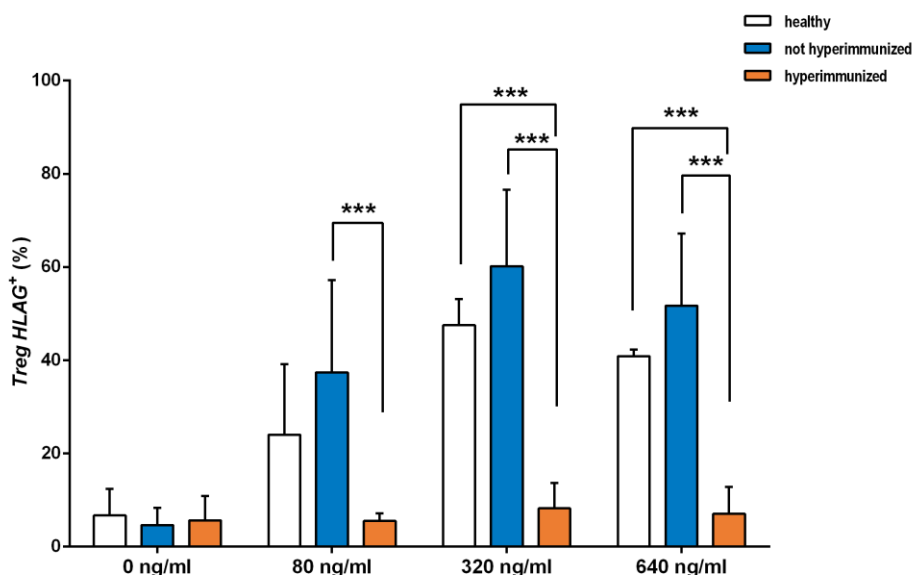


Figura 14: Percentuale di linfociti Treg HLA-G⁺ nelle colture di PBMC dei gruppi in studio trattate con diverse concentrazioni di lipocalina. I dati sono presentati come media \pm SD, analizzati con tramite software GraphPad Prism, *** $p < 0,001$

Valutazione del rilascio di HLA-G solubile

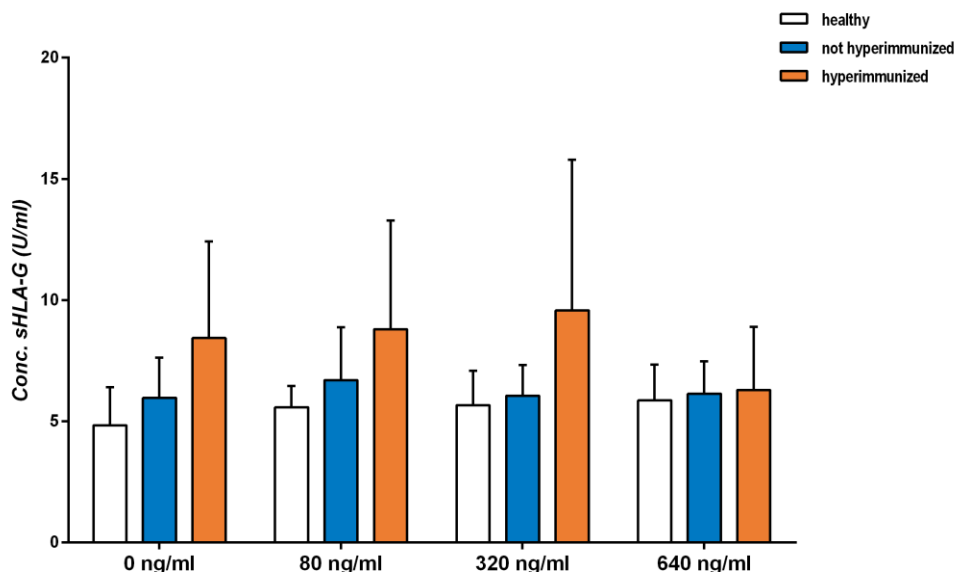


Figura 15: Concentrazione di sHLA-G rilasciato nei sovranatanti delle colture di PBMC dei gruppi in studio trattate con diverse concentrazioni di lipocalina. I dati sono presentati come media \pm SD, analizzati con tramite software GraphPad Prism.

Per valutare il rilascio di sHLA-G da parte dei PMBC trattati *in vitro* con dosi crescenti di NGAL è stato utilizzato un kit sHLA-G ELISA. Al termine delle 72h di trattamento con la lipocalina si sono raccolte aliquote di sovranatante per ogni condizione e mantenute a -80°C fino al momento dell'analisi.

Per i soggetti sani la quantità di sHLA-G rilevata nel sovranatante delle colture in assenza di NGAL corrisponde a 4,74U/ml e rimane stabile alle diverse concentrazioni analizzate di lipocalina, rispettivamente a 5,58, 5,67 e 5,88 U/ml per 80, 320, 640 ng/ml.

Anche per i pazienti dializzati il contenuto di sHLA-G rilasciato nel sovranatante delle colture cellulari rimane invariato alle diverse concentrazioni di NGAL, con un lieve aumento rispetto al gruppo di controllo.

Il gruppo dei pazienti iperimmuni presenta concentrazioni di sHLA-G più elevati rispetto ai due gruppi precedentemente analizzati, senza mostrare però differenze significative. Basalmente si è evidenziato il rilascio di 8,44 U/ml, 8,80 U/ml alla concentrazione di 80 ng/ml e 9,58 U/ml in seguito al trattamento con 320 ng/ml di NGAL; alla concentrazione maggiore di lipocalina il valore di sHLA-G di 6,30 U/ml è paragonabile agli altri due gruppi in studio.

Isolamento di cellule mesenchimali da tessuto adiposo

Utilizzando campioni di lipoaspirati, ottenuti con metodo *nanofat*, tramite digestione enzimatica è stato possibile isolare e successivamente ottenere colture di cellule mesenchimali stabilizzate *in vitro*.

Le cellule isolate presentano una morfologia di tipo fibroblastoide, tipica delle cellule staminali mesenchimali, come dimostrato in Fig.16, mantenuta per diversi passaggi.

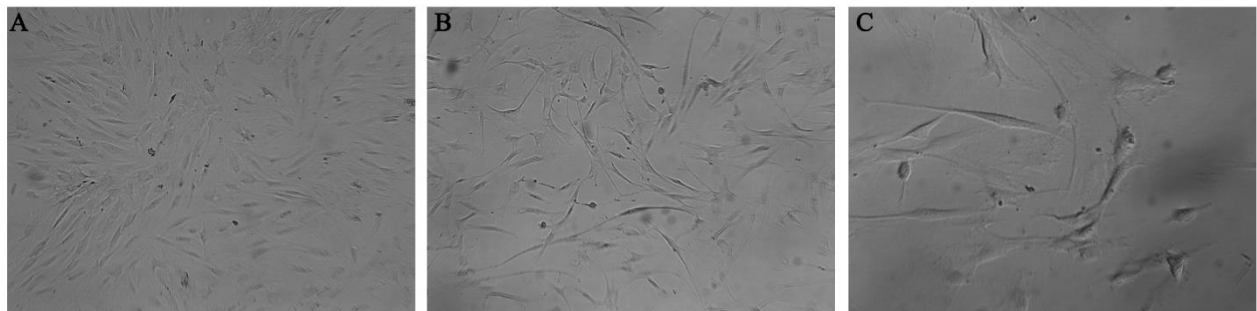


Figura 16: **A.** ASC 0°P a confluenza (4X); **B.** ASC 3°P (4X); **C.** ASC 6°P (10X).

Trattamento di ASC con NGAL

Colture di cellule staminali al 6° passaggio sono state utilizzate per la valutazione dell'effetto di NGAL, alle diverse concentrazioni studiate, in termini di morfologia ed espressione di geni di staminalità e di geni coinvolti nel pathway infiammatorio.

Le ASC sono state seminate a 9.000 cell/cm², dopo 24h è stato cambiato il terreno di coltura ed è stata aggiunta la lipocalina a 80, 320, 640 ng/ml. Come condizione di controllo si è utilizzata una coltura mantenuta in terreno basale DMEM H al 10% FBS senza aggiunta di NGAL. Al termine delle 72h di trattamento si sono confrontate le colture al microscopio ottico senza notare differenze nella morfologia che nella proliferazione a tutte le condizioni analizzate.

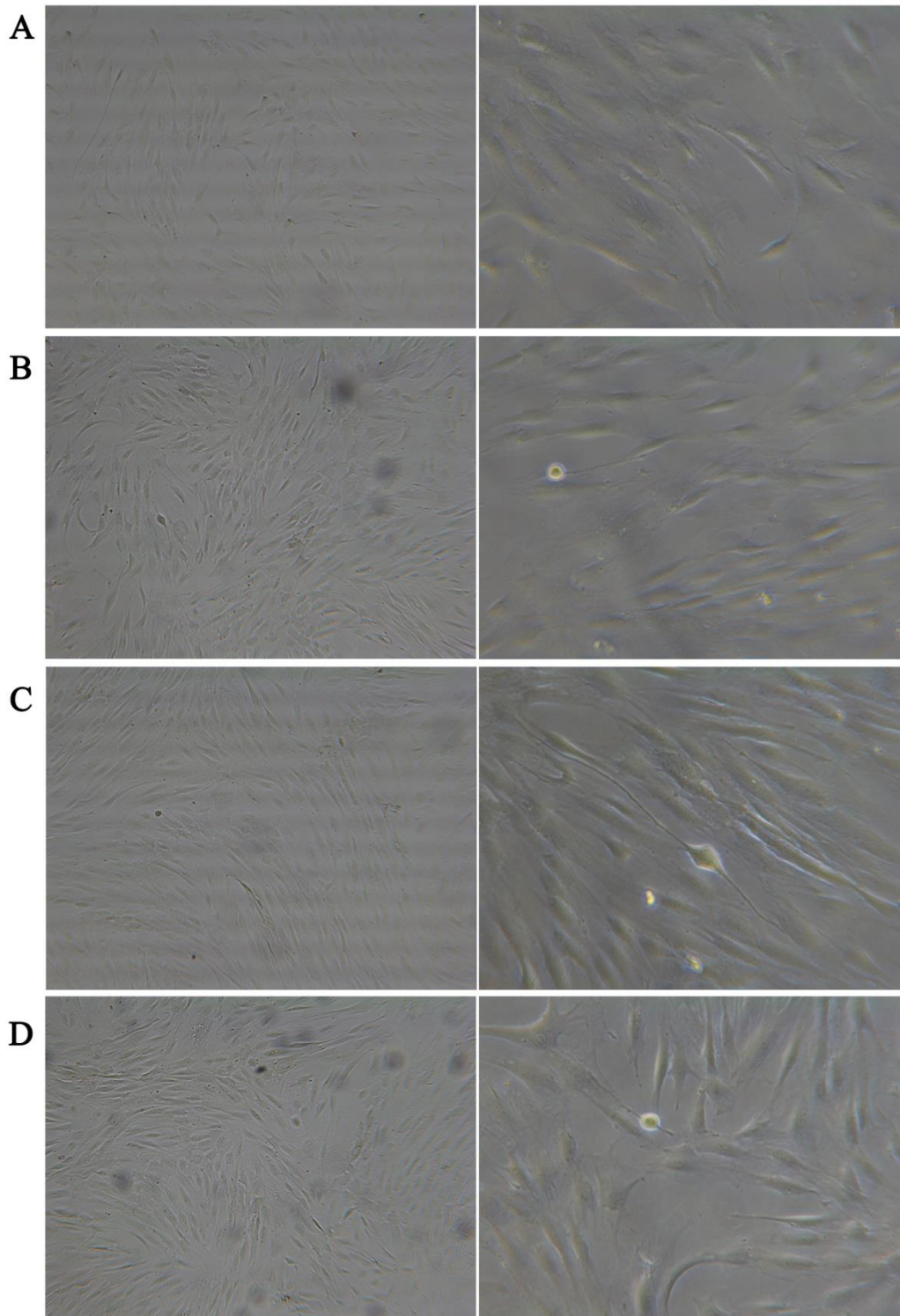


Figura 17: Immagini al microscopio ottico al termine delle 72h di trattamento con NGAL
A. 0 ng/ml NGAL; **B.** 80 ng/ml NGAL; **C.** 320 ng/ml NGAL; **D.** 640 ng/ml NGAL.
(ingrandimento 4X e 10X)

Valutazione dell'espressione genica tramite RealTime-PCR

Al termine delle 72h di trattamento delle colture di ASC con NGAL a 0, 80, 320, 640 ng/ml si sono valutati i profili di espressione di OCT-4 e NANOG, geni implicati nel mantenimento della staminalità, e di alcuni geni implicati nei meccanismi infiammatori tra cui IL-1 β , TNF- α , IL-6, TSG-6 e MMP9. Dall'analisi è emerso che il trattamento con la lipocalina su colture di cellule staminali da tessuto adiposo non modifica l'espressione genica in modo significativo per nessun gene preso in analisi, non influenzando nè l'espressione dei geni di staminalità e né pathway infiammatori.

	Sample (ng/ml)	Mean	95% value CI low	95% value CI high	significant	Tabella 4: <i>Valutazione dell'espressione genica analizzata tramite Realtime-PCR in ASC trattate per 72h con NGAL a 0, 80, 320, 640 ng/ml. I dati sono stati analizzati tramite software qBase</i>
OCT-4	0	1,000	0,788	1,269	NO	
	80	0,895	0,491	1,632	NO	
	320	0,799	0,487	1,312	NO	
	640	0,654	0,327	1,306	NO	
NANOG	0	1	0,64	1,562	NO	
	80	1,134	0,725	1,773	NO	
	320	0,933	0,511	1,702	NO	
	640	0,992	0,453	2,175	NO	
IL-1 β	0	1	0,512	1,954	NO	
	80	0,796	0,258	2,458	NO	
	320	0,852	0,191	3,808	NO	
	640	0,773	0,229	2,604	NO	
TNF-α	0	1,000	0,122	8,214	NO	
	80	1,256	0,627	2,517	NO	
	320	1,985	1,458	2,702	NO	
	640	1,313	1,051	1,641	NO	
IL-6	0	1,000	0,153	6,522	NO	
	80	0,659	0,149	2,914	NO	
	320	0,806	0,122	5,316	NO	
	640	0,610	0,162	2,294	NO	
TSG-6	0	1,000	0,419	2,385	NO	
	80	1,004	0,261	3,857	NO	
	320	0,914	0,201	4,157	NO	
	640	0,873	0,156	4,889	NO	
MMP9	0	1,000	0,412	2,425	NO	
	80	1,521	0,203	11,380	NO	
	320	1,624	0,475	5,550	NO	
	640	1,491	0,584	3,807	NO	

Non evidenziando differenze significative sull'espressione genica delle ASC alle diverse concentrazioni di NGAL analizzate, le analisi successive si sono concentrate su una singola concentrazione di lipocalina. Nella prima fase del progetto, in seguito a trattamento di PBMC alle diverse concentrazioni di NGAL si è ottenuto un maggior effetto immunomodulatorio a 320 ng/ml sia per il gruppo di controllo che per i pazienti in emodialisi non iperimmuni, mentre gli iperimmuni hanno avuto un andamento *un-responsive* a tutte le concentrazioni analizzate. Le analisi successive hanno confrontato gli effetti di NGAL a 320 ng/ml su colture di ASC nei confronti di proliferazione cellulare, immunofenotipo e tossicità.

Proliferazione cellulare

Eventuali effetti sulla vitalità e proliferazione cellulare in seguito al trattamento con NGAL 320 ng/ml su colture di ASC sono stati valutati tramite saggio AlamarBlue.

Come mostrato in *Figura 18*, non sono state evidenziate differenze significative nella proliferazione cellulare sulle colture di mesenchimali adulte in seguito al trattamento con lipocalina.

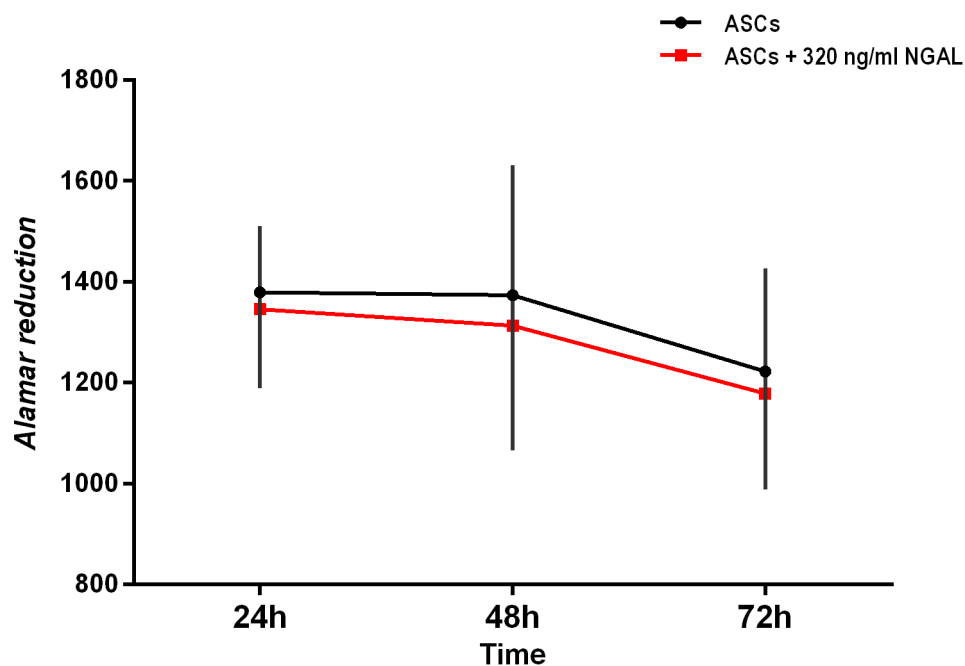


Figura 18: Curva di proliferazione cellulare di ASC trattate per 72h con NGAL 320 ng/ml. I dati sono presentati come media \pm SD, analizzati con tramite software GraphPad Prism.

Caratterizzazione immunofenotipica

È stato precedentemente valutato l'effetto di NGAL sul mantenimento della morfologia fibroblastoide in colture di ASC. Successivamente si è valutato l'effetto sull'immunofenotipo cellulare di colture di ASC trattate con 320 ng/ml di NGAL rispetto a colture di controllo.

Le ASC sono cellule mesenchimali definite dall'espressione di marker specifici (CD73, CD90, CD105) e l'assenza di marcatori emopoietici o endoteliali.

Colture di ASC al 6° passaggio sono state seminate a 9.000 cell/cm² e trattate per 72h con NGAL. Al termine si è valutata l'espressione di CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 tramite analisi citofluorimetrica e confrontata con una coltura di ASC di controllo.

Come mostrato in Figura 19 l'immunofenotipo non viene influenzato dal trattamento con 320 ng/ml di NGAL, le ASC non risultano positive per CD34 e CD45, marker emopoietici, mentre risultano positivi per CD73, CD90, CD105, specifici di colture di cellule mesenchimali.

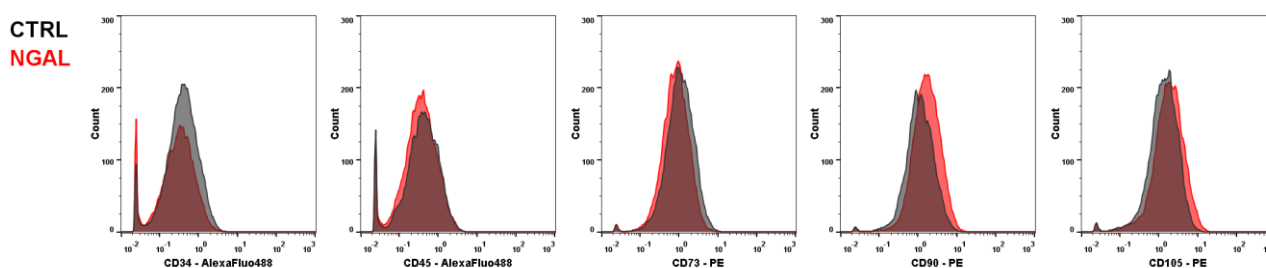


Figura 19: Caratterizzazione immunofenotipica di colture di ASC trattate con 320 ng/ml confrontate con una coltura di ASC di controllo. In entrambe le colture si ha la mancata espressione di marker emopoietici e la positività per marker tipici mesenchimali.

Valutazione della tossicità di NGAL

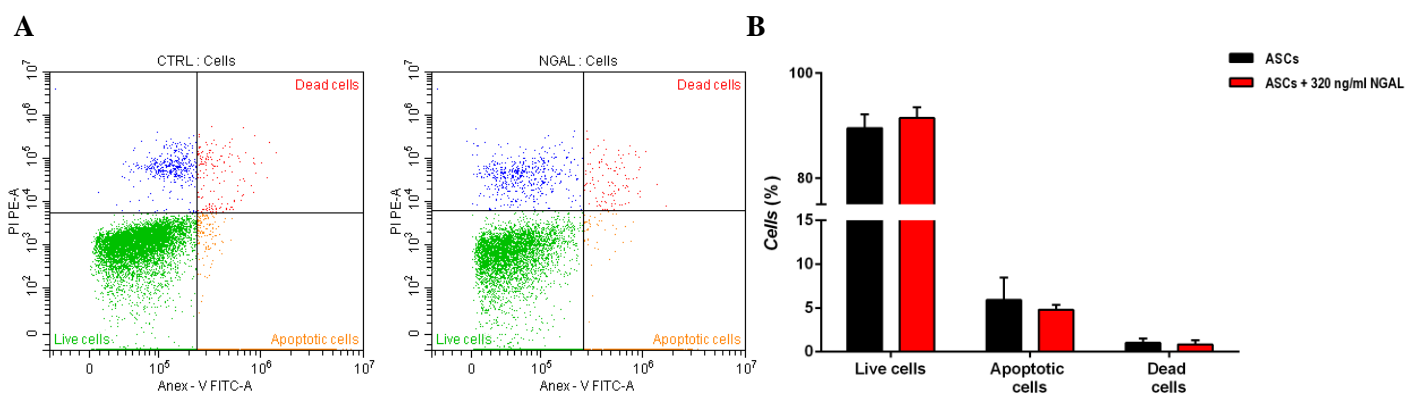


Figura 20: Valutazione della tossicità di NGAL a 320 ng/ml su colture di ASC.

A: immagine rappresentative dell'analisi citofluorimetrica nella coltura di controllo (CTRL) e nella coltura trattata con NGAL 320 ng/ml (NGAL) per 72h. **B:** Dati presentati come media \pm SD, analizzati con tramite software GraphPad Prism.

Tramite il saggio citofluorimetrico con Anessina V – PI, si è valutato un eventuale effetto di NGAL sui livelli di apoptosi delle colture di ASC. Dopo 72h di trattamento con la lipocalina a 320 ng/ml le colture di ASC non mostrano differenze significative dei livelli di apoptosi rispetto alla coltura di controllo. Le ASC presentano $89,53 \pm 2,66\%$ di cellule vive, il $5,91 \pm 2,56\%$ di cellule apoptotiche e il $1,03 \pm 0,47\%$ di cellule morte. La coltura trattata con la lipocalina a 320 ng/ml, invece, ha ottenuto in media il $91,45 \pm 2,08\%$ di cellule vive, il $4,80 \pm 0,55\%$ di cellule apoptotiche e il $0,84 \pm 0,49\%$ positive sia per Anessina V che per PI.

Minimi livelli di cellule apoptotiche e morte sono fisiologici per una coltura cellulare, inoltre trattamenti enzimatici necessari per portare in sospensione ed analizzare cellule che normalmente crescono in adesione, come le ASC, possono incidere nell'analisi.

Allestimento di co-colture

Dalle analisi effettuate sulle colture di ASC trattate con NGAL emerge che la lipocalina non influisce sulle caratteristiche tipiche delle cellule staminali mesenchimali adulte, quali morfologia, immunofenotipo e proliferazione cellulare. Inoltre il trattamento non ha effetti tossici e non modifica attiva geni coinvolti in *pathway* dell'infiammazione.

Si è quindi proseguito lo studio per analizzare la capacità immunomodulatoria delle ASC nei confronti di una popolazione linfo-monocitaria patologica di pazienti con insufficienza renale cronica in trattamento emodialitico.

Dopo 24h dalla semina delle ASC, si sono isolati PBMC da un soggetto per gruppo in analisi, in modo da valutare la capacità immunomodulatoria della stessa coltura, limitando ulteriori variabilità. Al termine delle 72h di co-coltura, si è valutata la proliferazione cellulare dei PBMC attivati sia con saggio ELISA, sia analizzando le fasi del ciclo cellulare, inoltre si è valutata la componente *Treg* indotta dalla co-coltura in concomitanza al trattamento con NGAL 320 ng/ml e la loro espressione di HLA-G. L'espressione di HLA-G è stata valutata anche nelle ASC post-co-coltura.

Proliferazione cellulare post co-coltura

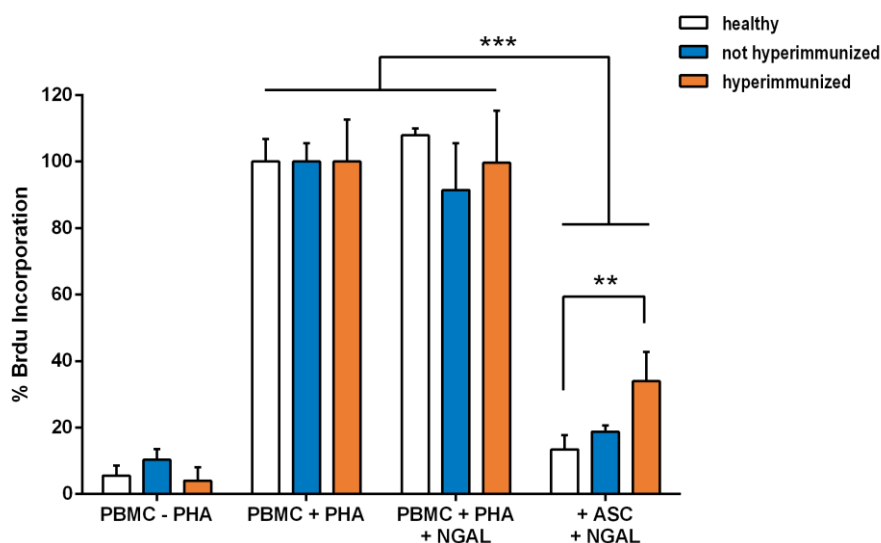


Figura 21: Valutazione della proliferazione cellulare post co-coltura mediante saggio ELISA. I dati sono presentati come media \pm SD, analizzati con test ANOVA tramite software GraphPad Prism.

Al termine delle 72h di co-coltura, dalla valutazione dell'incorporazione di BrdU tramite saggio ELISA, si è confermata una buona capacità immunomodulatoria della componente mesenchimale verso popolazioni linfo-monocitarie attivate sia sane che patologiche, determinando una riduzione della proliferazione di circa l'80% verso i PBMC del gruppo di controllo e dei pazienti sottoposti a emodialisi, mentre nei confronti dei pazienti iperimmuni le ASC hanno determinato una riduzione della proliferazione cellulare del 66%.

Ciclo cellulare post co-cultura

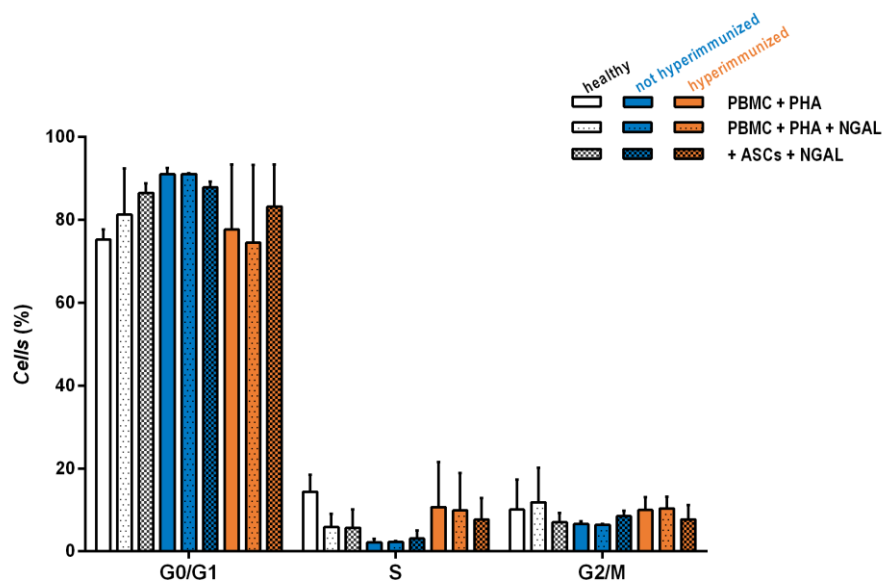


Figura 22: Valutazione del ciclo cellulare di PBMC dei tre gruppi in studio post co-cultura con ASC mediante analisi citofluorimetrica. I dati sono presentati come media \pm SD, analizzati con tramite software GraphPad Prism.

Dall'analisi delle fasi del ciclo cellulare dei PBMC attivati con PHA al termine della co-cultura si evidenzia un aumento della fase quiescente G_0-G_1 con percentuali paragonabili in tutti e tre i gruppi in analisi. L'inibizione della proliferazione risulta più evidente nel gruppo di controllo e per i pazienti iperimmuni. Nel gruppo di controllo si raggiunge, infatti, l'86,5% di PBMC in fase G_0-G_1 in seguito all'azione delle ASC; nel gruppo di dializzati si è ottenuto in media l'87,8% e per i pazienti iperimmuni 83,2%, determinando una riduzione media rispetto alla condizione di massima attivazione (PBMC + PHA) di 11,27% per i sani rispetto al 5,6% per gli iperimmuni.

Caratterizzazione immunofenotipica post co-coltura

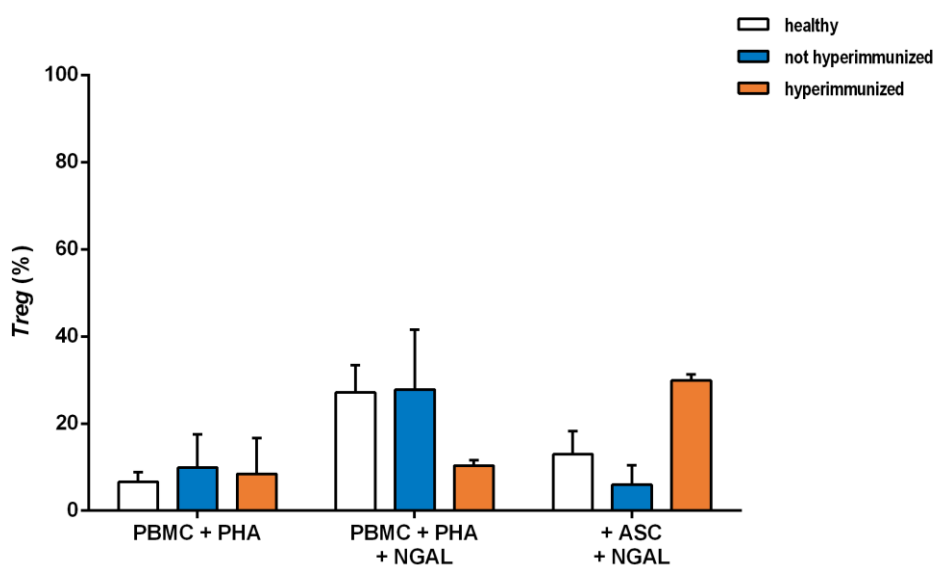


Figura 23: Percentuale di linfociti T regolatori $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ nelle colture di PBMC dei tre gruppi in studio post co-coltura con ASC. I dati sono presentati come media \pm SD, analizzati con tramite software GraphPad Prism.

Al termine delle co-culture si è analizzata la componente T regolatoria nei tre gruppi in studio. Come era stato evidenziato nella prima fase dello studio, si è confermato l'effetto immunomodulatorio di NGAL nel gruppo di emodializzati non iperimmuni in modo paragonabile al gruppo di controllo, mentre gli iperimmuni risultano non responsivi al solo trattamento con la lipocalina.

In seguito alla co-coltura con ASC, si è ottenuto un maggior effetto immunomodulatorio, in termini di percentuale di Treg, in misura più evidente proprio nel gruppo di iperimmuni, raggiungendo valori medi di 29,9% paragonabili a quelli ottenuti con la sola lipocalina negli altri due gruppi inseriti nello studio.

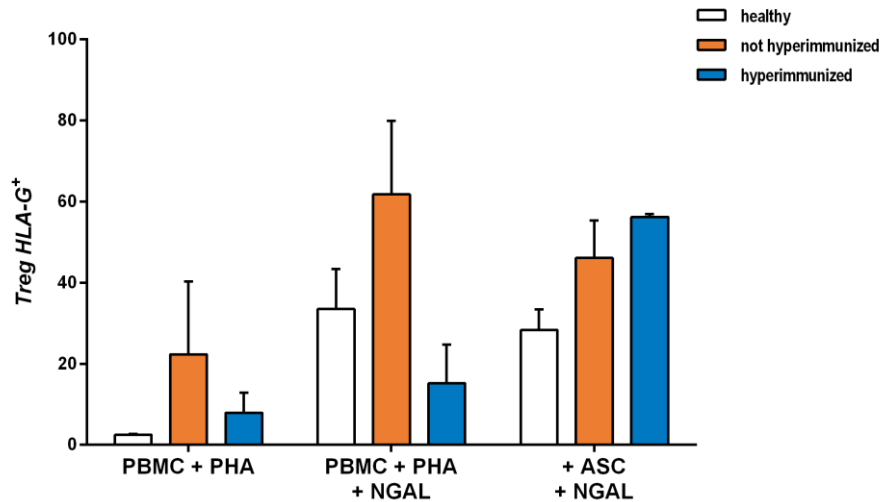


Figura 24: Percentuale di linfociti Treg HLA-G+ in PBMC dei tre gruppi in studio post co-coltura con ASC. I dati sono presentati come media \pm SD, analizzati con tramite software GraphPad Prism

Analizzando l'espressione di HLA-G al termine delle co-culture si è evidenziato un notevole aumento della percentuale di Treg HLA-G⁺ in tutti e tre i gruppi in studio. In particolare, nel gruppo di pazienti iperimmuni, non responsivi al trattamento con NGAL 320 ng/ml, si ottiene in media il 56,2% di Treg HLA-G⁺, confermando una buona capacità immunomodulatoria della popolazione mesenchimale anche nei confronti di una categoria patologica così complessa come quella di pazienti iperimmuni con insufficienza renale cronica.

L'espressione di HLA-G si è analizzata anche nella popolazione di mesenchimali e si sono confrontati i livelli basali rispetto a quelli al termine delle co-culture.

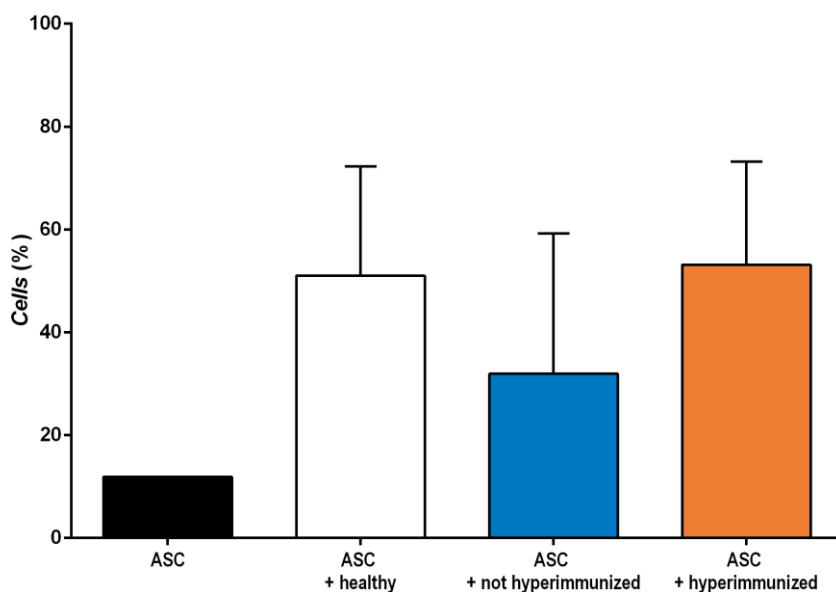


Figura 25: Percentuale di espressione di HLA-G in ASC basali e in co-cultura con PBMC dei tre gruppi di pazienti in studio. I dati sono presentati come media \pm SD, analizzati con tramite software GraphPad Prism.

Come dimostrato dal grafico, le ASC sono in grado di aumentare l'espressione di HLA-G rispetto alla condizione basale in presenza di PBMC sia derivanti da soggetti sani, sia di pazienti in trattamento emodialitico iperimmuni e non.

Valutazione dell'espressione genica post- co-culture tramite RealTime-PCR

Al termine delle co-culture di ASC e PBMC derivanti dalle tre categorie di soggetti in studio, si è inoltre analizzata l'espressione di alcuni geni tramite RealTime-PCR nella popolazione mesenchimale, al fine di approfondire i meccanismi alla base della loro capacità immunomodulatoria.

Tabella 5: Valutazione dell'espressione genica analizzata tramite Realtime-PCR in ASC basali e in co-coltura con PBMC derivanti dai tre gruppi in studio. I dati sono stati analizzati tramite software qBase, *p<0,05

	Sample	mean	95% value CI low	95% value CI high
OCT-4	ASC	1,000	0,483	2,071
	ASC +NGAL	0,931	0,419	2,070
	Co-colt healthy	0,667	0,361	1,233
	Co-colt healthy +NGAL	0,685	0,371	1,266
	Co-colt not hyperimmunized	0,690	0,377	1,263
	Co-colt not hyperimmunized +NGAL	0,779	0,408	1,487
	Co-colt hyperimmunized	0,892	0,405	1,963
	Co-colt hyperimmunized +NGAL	0,768	0,443	1,331
NANOG	ASC	1,000	0,559	1,790
	ASC +NGAL	0,903	0,602	1,355
	Co-colt healthy	0,530	0,286	0,980
	Co-colt healthy +NGAL	0,531	0,283	0,997
	Co-colt not hyperimmunized	0,395	0,290	0,538
	Co-colt not hyperimmunized +NGAL	0,512	0,260	1,006
	Co-colt hyperimmunized	0,430	0,277	0,667
	Co-colt hyperimmunized +NGAL	0,572	0,337	0,970

Si sono valutati i geni di staminalità OCT-4 e NANOG confrontando i livelli di espressione di ASC basali rispetto a ASC in co-coltura con PBMC dei diversi gruppi in studio, in presenza o meno di NGAL 320 ng/ml. L'espressione di OCT-4 nelle ASC non viene influenzata né dalla presenza di cellule linfo-monocitarie né dal trattamento con la lipocalina, mentre si è riscontrata una diminuzione nell'espressione di NANOG in seguito alla co-coltura con i pazienti dializzati, ma indipendente dal trattamento con la lipocalina.

Analizzando l'espressione di geni coinvolti in pathway infiammatori si sono riscontrate differenze significative nell'espressione di IL-1 β , IL-6 e TSG-6.

IL-1 ha molteplici effetti a livello sia locale che sistemico nell'organismo tra cui quello di favorire processi infiammatori, viene prodotta in risposta a infezioni batteriche, alla presenza di TNF e dall'interazione delle cellule produttrici, soprattutto macrofagi, con la componente CD4⁺. Dall'analisi risulta infatti che le ASC aumentano l'espressione di tale citochina in seguito alla co-coltura con cellule linfo-monocitarie dei tre gruppi in studio, indipendente dal trattamento con la lipocalina.

L'aumento di IL-1 β , come per IL-6, potrebbe essere dovuto al rilascio di TNF da parte dei PBMC attivati con PHA.

TNF- α è una citochina coinvolta nell'infiammazione sistemica, che induce la produzione di IL-1 e IL-6, principalmente prodotta da macrofagi. Dall'analisi non si riscontra un aumento dell'espressione di questa citochina da parte delle ASC, a conferma che l'aumento di espressione di IL-1 β e IL-6 potrebbero esser dovuti a citochine rilasciate dalla componente linfo-monocitaria attivata presente nelle co-culture.

IL-6 è una citochina che può avere attività sia pro- che antiinfiammatoria, mostra un effetto inibitorio sul rilascio di TNF e IL-1 determinando il rilascio di IL-10 e IL-1RA. Come mostrato in Tabella 6, le ASC in presenza di una popolazione linfo-monocitaria determinano un aumento dell'espressione di tale citochina, in modo da supportare l'azione soppressiva verso un sistema immunitario attivato.

TSG-6 (*Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein*) è una proteina secreta con attività antiinfiammatoria, infatti è in grado di formare un complesso e migliorare l'attività inibitoria di proteasi associate all'infiammazione. L'espressione di questa citochina è indotta principalmente da TNF- α e IL-1.

MMP9 è nota per essere una proteina inducibile, infatti la sua espressione dipende principalmente da fattori esterni, come il TNF- α , e risulta iper espressa in un contesto infiammatorio.

Analizzando l'espressione di questa metalloproteinasi in ASC, questa non risulta modificata dalla presenza di popolazioni linfo-monocitarie attivate.

Tabella 6 (pag. seguente): Valutazione dell'espressione genica analizzata tramite Realtime-PCR in ASC basali e in co-cultura con PBMC derivanti dai tre gruppi in studio. I dati sono stati analizzati tramite software qBase, * $p < 0,05$

Gene	Sample	mean	95% value CI low	95% value CI high	
IL-1 β	ASC	1,000	0,286	3,493	
	ASC +NGAL	0,944	0,326	2,735	
	Co-colt healthy	80,302	50,448	127,822	
	Co-colt healthy +NGAL	77,907	40,710	149,091	
	Co-colt not hyperimmunized	87,241	26,832	283,661	
	Co-colt not hyperimmunized +NGAL	87,840	27,289	282,751	
	Co-colt hyperimmunized	86,049	12,350	599,556	
	Co-colt hyperimmunized +NGAL	48,383	20,075	116,609	
TNF- α	ASC	1,000	0,182	5,509	
	ASC +NGAL	1,125	0,209	6,044	
	Co-colt healthy	2,186	1,910	2,502	
	Co-colt healthy +NGAL	2,360	1,855	3,002	
	Co-colt not hyperimmunized	1,790	1,191	2,690	
	Co-colt not hyperimmunized +NGAL	2,191	1,368	3,511	
	Co-colt hyperimmunized	6,209	0,161	238,904	
	Co-colt hyperimmunized +NGAL	1,702	1,324	2,186	
IL-6	ASC	1,000	0,170	5,884	
	ASC +NGAL	1,026	0,194	5,433	
	Co-colt healthy	57,327	33,833	97,137	
	Co-colt healthy +NGAL	66,048	40,264	108,343	
	Co-colt not hyperimmunized	63,674	36,431	111,289	
	Co-colt not hyperimmunized +NGAL	59,351	29,473	119,520	
	Co-colt hyperimmunized	24,234	1,700	345,455	
	Co-colt hyperimmunized +NGAL	71,407	47,641	107,030	
TSG-6	ASC	1,000	0,086	11,673	
	ASC +NGAL	0,963	0,098	9,515	
	Co-colt healthy	9,458	2,068	43,266	
	Co-colt healthy +NGAL	9,056	1,741	47,112	
	Co-colt not hyperimmunized	16,742	3,739	74,954	
	Co-colt not hyperimmunized +NGAL	14,916	3,376	65,901	
	Co-colt hyperimmunized	6,784	0,895	51,444	
	Co-colt hyperimmunized +NGAL	13,614	2,819	65,746	
MMP9	ASC	1,000	0,248	4,036	
	ASC +NGAL	0,867	0,222	3,377	
	Co-colt healthy	6,309	2,704	14,720	
	Co-colt healthy +NGAL	5,811	1,755	19,237	
	Co-colt not hyperimmunized	3,810	1,599	9,083	
	Co-colt not hyperimmunized +NGAL	4,797	1,242	18,533	
	Co-colt hyperimmunized	12,971	0,148	1.134,557	
	Co-colt hyperimmunized +NGAL	2,681	1,462	4,918	

CONCLUSIONI

Lo studio proposto si pone l'obiettivo di analizzare i meccanismi di tolleranza immunologica in seguito al trattamento di popolazioni linfo-monocitarie *in vitro* derivanti da pazienti con insufficienza renale cronica.

L'insufficienza renale cronica è una condizione patologica in cui si ha una progressiva e permanente perdita della struttura e della funzionalità renale. Allo stadio terminale, questa patologia è trattata mediante terapia sostitutiva, emodialisi o peritoneale, in attesa del trapianto renale che rimane la terapia di elezione.

I pazienti sottoposti ad emodialisi presentano varie complicanze, dipendenti dalla patologia di base causa dell'insufficienza renale cronica, dall'IRC stessa e dalla terapia dialitica.

Come già affermato, una delle complicanze riscontrate nei pazienti dializzati riguarda il sistema immunitario che risulta essere alterato, in particolare, l'alterazione più significativa coinvolge la componente regolatoria linfocitaria che presenta una minore funzionalità immunoregolatoria. Conseguentemente, la possibilità di un trapianto efficace per i pazienti con insufficienza renali si riduce, per la minor capacità di autoregolazione del sistema immunitario.¹⁴⁶

Negli ultimi anni l'attenzione dei ricercatori si è concentrata sul ruolo di NGAL come *biomarker* di danno renale acuto e cronico.⁴⁴ Nonostante i numerosi studi che hanno indagato il ruolo fisiologico e fisiopatologico di NGAL, questo non è del tutto chiarito. L'uso come *biomarker* in più condizioni patologiche suggerisce che NGAL potrebbe essere coinvolta in un processo comune a differenti condizioni patologiche accomunate da uno stato infiammatorio e da stress ossidativo.^{47,147}

Questo studio ha cercato di individuare il possibile coinvolgimento di NGAL in processi coinvolti nella risposta immunitaria, concentrandosi sull'ipotesi che questa lipocalina potesse promuovere la tolleranza immunitaria, non solo in soggetti sani, come è stato precedentemente analizzato, ma anche in soggetti con un sistema immunitario alterato, come i pazienti con insufficienza renale cronica.⁵¹

Dai risultati ottenuti durante la prima fase dello studio abbiamo potuto verificare un effetto dose dipendente della lipocalina analizzando l'immunofenotipo di linfociti CD4⁺ verso la componente T regolatoria CD25⁺FoxP3⁺ nei pazienti in trattamento emodialitico. Questo effetto è risultato, invece, inibito in pazienti definiti iperimmuni a tutte le concentrazioni di lipocalina analizzate.

NGAL ha determinato l'espressione di HLA-G di membrana, molecola tollerogena che svolge un ruolo significativo nella vita adulta specialmente in alcune condizioni patologiche di autoimmunità e tolleranza nel trapianto di organi³⁶, nella componente T regolatoria indotta, proponendosi così come mediatore in processi acuti e cronici.

Possiamo quindi ipotizzare che l'aumento di NGAL non è un processo casuale, ma può esprimere un significato biologico in varie condizioni patologiche ed essere modulato a favore della necessità biologica. Possiamo anche indirettamente ipotizzare che una ridotta capacità di produzione di NGAL potrebbe essere tradotta in una reazione inferiore all'infiammazione.

L'azione di NGAL nell'attivazione di cellule FoxP3⁺ deve essere considerato con estrema attenzione alla luce della funzione *Treg* in malattie autoimmuni, neoplastiche e nella tolleranza nel trapianto di organi solidi.^{94,95} Diversi autori hanno infatti proposto la terapia cellulare *Treg* per l'induzione della tolleranza del trapianto e di recente sono stati approvati diversi *trial* clinici che prevedono l'infusione di *Treg* a tale scopo.

Se clinicamente la maggior parte degli studi nella letteratura recente si sono concentrati sul suo ruolo di *biomarker* di malattie renali, neoplastiche e infiammatorie riteniamo che siano possibili altri scenari di interesse clinico, infatti, un ruolo di NGAL nell'immunità umorale può portare non solo alla comprensione di meccanismi fisiopatologici, ma anche ad un possibile utilizzo a fini terapeutici in molte condizioni in cui la regolazione dei processi immunitari può svolgere un ruolo di supporto.

Negli ultimi anni le cellule mesenchimali da tessuto adiposo rappresentano una prospettiva promettente sia di terapia cellulare che di medicina rigenerativa con trattamenti autologhi o eterologhi, grazie alla possibilità di utilizzare cellule vitali e facilmente reperibili in numero elevato, al fine di riparare, sostituire e riportare ad una normale funzione fisiologica tessuti danneggiati o con funzionalità alterata.^{38, 114, 115}

Più recentemente, l'attenzione dei ricercatori si è spostata verso l'azione paracrina delle cellule mesenchimali. Le MSC sono in grado, infatti, di rilasciare fattori solubili dotati di azione immunosoppressoria e antinfiammatoria sfruttando diversi meccanismi oltre che attraverso meccanismi di contatto cellula-cellula in grado di modulare le reazioni infiammatorie ed immunitarie.^{150, 151} Il potenziale effetto paracrino è suggerito da esperimenti *in vitro* che evidenziano il rilascio di un grande numero di citochine.¹⁵² In particolare l'azione anti-infiammatoria sembrerebbe essere mediata da IL1-RA (*Interleukin 1 α Receptor Antagonist*) e da una forma recettoriale solubile per TNF- α (TSG-6).

In recenti studi, l'infusione di MSC in modelli sperimentali di trapianto di organo solido ha portato ad un aumento della tolleranza mediata dai *Treg*.⁸¹

Diversi studi *in vitro* ed *in vivo* documentano l'abilità delle MSC di indirizzare i linfociti T verso un fenotipo regolatorio e la loro capacità di mediare il rilascio di HLA-G solubile.^{137-135, 65}

Al fine di valutare la capacità immunomodulatoria di cellule mesenchimali verso popolazioni linfomonocitarie patologiche, l'attivazione delle popolazioni linfocitarie effettrici con attività citotossica a favore invece dell'attivazione delle popolazioni linfocitarie regolatorie, durante la seconda fase del progetto si sono allestite colture primarie di cellule mesenchimali umane isolate da lipoaspirati (*human Adipose-derived Stem Cells, ASC*), prelevati con tecnica *nanofat*, da soggetti sani.

Le ASC sono considerate staminali multipotenti, in grado di esibire caratteristiche di cinetica proliferativa e plasticità differenziativa simili alle cellule staminali mesenchimali da midollo osseo. Ogni anno aumenta il numero di studi clinici che valutano l'efficacia e la sicurezza delle cellule staminali da tessuto adiposo, soprattutto per il loro utilizzo in clinica per trattamenti autologhi. Trattando colture di ASC con dosi incrementali di NGAL (80, 320, 640 ng/ml) non si sono evidenziate differenze significative sul grado di staminalità, proliferazione, immunofenotipo, tossicità e nell'espressione di alcuni geni coinvolti nei processi infiammatori. Questo potrebbe suggerire un'azione specifica di NGAL verso componenti del sistema immunitario, anche se non si possono escludere effetti non ancora approfonditi della lipocalina su questa popolazione.

Durante l'ultima fase del progetto, si è cercato di approfondire la capacità immunomodulatoria intrinseca delle ASC anche in un contesto infiammatorio patologico, come può essere quello rappresentato dai pazienti in trattamento emodialitico che versano in uno stato infiammatorio cronico.

A questo scopo, si è proseguito lo studio con l'allestimento di co-colture di ASC con PBMC derivati da pazienti in emodialisi e iperimmuni. Analizzando la proliferazione cellulare dei PBMC al termine della co-coltura, la valutazione della componente T regolatoria e l'espressione di HLA-G indotta dalla co-coltura, si è riscontrata una buona capacità immunomodulatoria anche in pazienti con insufficienza renale cronica.

In particolare, l'azione combinata di una popolazione di mesenchimali e il trattamento con NGAL ha determinato un aumento sia di *Treg* sia dell'espressione di HLA-G in pazienti iperimmuni, definiti non responsivi al trattamento a diverse concentrazioni con la sola lipocalina.

I risultati ottenuti fino ad ora necessitano sicuramente di ulteriori validazioni ed approfondimenti, in particolar modo per l'elevata eterogeneità dei pazienti con insufficienza

renale cronica rispetto a patologia di base, comorbidità, anni di trattamento dialitico e dal campione ridotto utilizzato per lo studio.

Questi risultati aprono una buona prospettiva per un possibile utilizzo di questa fonte di cellule staminali adulte come terapia cellulare autologa, in concomitanza e a supporto del trapianto di rene, in pazienti con uno stato immunologico alterato, per ridurre il rischio di rigetto acuto e per ampliare le possibilità di accesso al trapianto anche a pazienti con un PRA sfavorevole. Inoltre confermano l'azione di NGAL come proteina della fase acuta del danno renale con effetti immunomodulatori attivi sulle popolazioni cellulari dell'infiammazione cellulo-mediata con particolare riferimento alla componente CD4⁺, escludendo effetti diretti sulle staminali mesenchimali.

BIBLIOGRAFIA

CAPITOLO I

1. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am. J. Kidney. Dis.* 2002; 39 (2 Supple 1): S1-266.
2. AS. Levey, K. Eckardt, Y. Tsukamoto, A. Levin, J. Coresh, J. Rossert, D. De Zefuw, TH. Hostetter, N. Lameire, G. Eknoyan. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney International* 2005, 67: 2089-2100.
3. RJ. Haynes, CG. Winearls. Chronic kidney disease. *Surgery* 2010; 28:11, 525-529.
4. AS. Levey, J. Coresh. Chronic kidney disease. *Lancet* 2012; 379:165-80.
5. CG. Winearls, R. Haynes, R. Glassock. CKD Staging-evolution not devolution. *Nefrologia* 2010; 30(5):493-500.
6. G. Cianciolo, G. La Manna, ML. Cappuccilli, N. Lanci, E. Della Bella, V. Cuna, A. Dormi, P. Todeschini, G. Donati, F. Alviano, R. Costa, GP. Bagnara, S. Stefoni. VDR expression on circulating endothelial progenitor cells in dialysis patients is modulated by 25(OH)D serum levels and calcitriol therapy. *Blood Purification* 2011; 32:161-173.
7. V. Jha, G. Garcia-Garcia, K. Iseki, Z. Li, S. Naicker, B. Plattner, R. Saran, AYM. Wang, CW. Yang. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet* 2013; 382: 260-72.
8. WH. Kao, MJ. Klag, LA. Meoni, D. Reich, Y. Berthier-Schaad, M. Li, J. Coresh, N. Patterson, A. Tandon, NR. Powe, NE. Fink, JH. Sadler, MR. Weir, HE. Abboud, SG. Adler, J. Divers, SK. Iyengar, BI. Freedman, PL. kimmerl, WC. Knowler, OF. Kohn, K. Kramp, DJ: Leehey, SB. Nicholas, MV. Pahl, JR. Schelling, JR: Sedor, D. Thornley-Brown, CA: Winkler, MW. Smith, RS: Parekh, Family Investigation of Nephropathy and Diabetes Research Group. MYH9 is associated with nondiabetic end-stage renal disease in African Americans. *Nature Genetics* 2008; 40(10):1185-92.
9. Z. Kanji, CE. Powe, JB. Wenger, C. Huang, E. Ankers, DA. Sullivan, G. Collerone, NR. Powe, M. Tonelli, I. Bhan, AJ. Bernhardt, S. Dibartolo, D. Friedman, G. Genovese, MR: Pollak, R. Thadhani. Genetic variation in APOL1 associates with younger age at hemodialysis initiation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2011; 22(11): 2091-7.
10. AB. Fogo. Mechanisms of progression of chronic kidney disease. *Pediatr. Nephrol.* 2007; 22:2011-2022.
11. N. Chikotas, A. Gunderman, T. Oman. Uremic syndrome and end-stage renal disease: Physical manifestations and beyond. *J. Am. Acad. Nurse. Pract.* 2006; 18(5):195-202.
12. Johnson DW, Craven AM, Isbel NM. Modification of cardiovascular risk in hemodialysis patients: an evidence-based review. *Hemodial Int.* 2007 Jan;11(1):1-14.
13. Czopek A, Moorhouse R, Webb DJ, Dhaun N. The therapeutic potential of endothelin receptor antagonism in kidney disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015 Dec 23.
14. Giachelli CM. Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Dec;15(12):2959-64.
15. SM. Moe, NX. Chen. Mechanisms of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008;19: 213-216.
16. JL. Babitt, HY. Lin. Molecular mechanisms of hepcidin regulation: implications for the anemia of CKD. *Am. J. Kidney. Dis.* 2010; 55:726-741.
17. C. Kurts, U. Panzer, HJ. Anders, AJ. Rees. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13(10):738-53.
18. Q. Xing, B. Wang, H. Su, J. cui, J. Li. Elevated Th17 cells are accompanied by FoxP3+ Treg cells decrease in patients with lupus nephritis. *Rheumatology International* 2012; 32(4) 949-958.
19. L. Huber, N. Lachmann, M. Dürr, M. Matz, L. Liefeldt, HH. Neumayer, C. Schönemann, K. Budde. Identification and Therapeutic Management of Highly Sensitized Patients Undergoing Renal Transplantation. *Drugs* 2012; 72 (10): 1335-1354.
20. P. Stastny, IM. Salvador, B. Lavingia. Evaluation of the highly sensitized transplant recipient. *Pediatr. Nephrol.* 2011; 26:1927-1935.

21. J. Gloor, MD. Stegall. Sensitized renal transplant recipients: current protocols and future directions. *Nat. Rev. Nephrol.* 2010; 6, 297–306.
22. RR. Redfield, JR. Scalea, TJ. Zens, DA. Mandelbrot, G. Levenson, DB. Kaufman, A. Djamali. The mode of sensitization and its influence on allograft outcomes in highly sensitized kidney transplant recipients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2016; 31: 1746–1753.
23. L. Rees, JJ. Kim. HLA sensitization: can it be prevented? *Pediatr. Nephrol.* 2015; 30:577–587.
24. SC. Jordan, J. Choi, A. Vo. Kidney transplantation in highly sensitized patients. *British Medical Bulletin*, 2015, 114:113–125.
25. BM. Matta, JM. Lott, LR. Mathews. IL-33 is an unconventional Alarmin that stimulates IL-2 secretion by dendritic cells to selectively expand IL-33R/ST2+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2014; 193:4010–20.
26. K. Marfo, A. Lu, M. Ling, E. Akalin. Desensitization Protocols and Their Outcome. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2011; 6: 922–936.
27. T. Shah, D. Vu, E. Corrales-Tellez, J. Cicciarelli, I. Hutchinson, R. Naraghi, DI. Min. Effects of mycophenolic acid on highly sensitized patients awaiting kidney transplant. *Transplant Immunology* 2013; 28:32–37.
28. Report attività di donazione e trapianto organi-tessuti e cellule in Emilia Romagna 2016
29. U. Koch, F.y. Radtke. Mechanisms of T Cell Development and Transformation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2011; 27:539–62.
30. AK. Abbas, AH. Lichtman. *Le basi dell'immunologia. Fisiopatologia del Sistema immunitario.* Elsevier 2013.
31. S. Sakaguchi, M. Miyarç, CM. Costantin, DA. Hafler. FoxP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews Immunology* 2010; 8:490-500.
32. F. Salcido-Ochoa, N. Yusof, S. Swee-Shan Hue,D. Haase, T. Kee, O.Rotzschke. Are we ready for the use of Foxp3+ Regulatory T Cells for immunodiagnosis and immunotherapy in kidney transplantation? *Journal of Transplantation* 2012; 2012:397952.
33. DA. A. Vignali, LW. Collison, CJ. Workman. How regulatory T cells work. *Nature Reviews immunology* 2008; 8:523-532.
34. C. Asseman, S.Mauze, MW. Leach, RL. Coffman, F. Powrie. An Essential Role for Interleukin 10 in the Function of Regulatory T Cells That Inhibit Intestinal Inflammation. *J. Exp. Med* 1999 995–1003.
35. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Treg&cond=Transplant%3BFailure%2CKidney&rank=7>
36. ED. Carosella, B. Favier, N. Rouas-Freiss, P. Moreau J. LeMaout. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *BLOOD* 2008; 111:4962-4870.
37. R. Rizzo, A. Trentini, D. Bortolotti, MC, Manfrinato, A. Rotola, M. Castellazzi, L. Melchiorri, D. Di Luca, F. Dallochio, E. Fainardi, T. Bellini. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) generates soluble HLA-G1 by cell surface proteolytic shedding. *Mol. Cell. Biochem.* 2013; 381:243–255.
38. V. Pistoia, F. Morandi, X. Wang, S. Ferrone. Soluble HLA-G: are they clinically relevant? *Semin. Cancer Biol.* 2007;17(6): 469–479.
39. F. Morandi, R. Rizzo, E. Fainardi, N. Rouas-Freiss, Vito Pistoia. Recent advances in our understanding of HLA-G biology: lessons from a wide spectrum of human disease. *Journal of Immunology Research* 2016, Article ID 4326495.
40. CS. Clements, L. Kjer-Nielsen, J. McCluskey, J. Rossjohn. Structural Studies on HLA-G: Implications for Ligand and Receptor Binding. *Human Immunology* 2007; 68(4):220-6.
41. Z. Žilinská, H. Bandžuchová, M. Chrastina, B. Trebatický, J. Breza Sr, M. Handzušová, D. Kuba, J. Tirpáková, M. Pavlechová, I. Dedinská, B. Rychlý, K. Poláková. Expression of HLA-G transcripts in graft biopsy samples of renal transplant recipients. *Transplant Immunology* 2015; 33:159–165.
42. Naji, N. Rouas-Freiss, A. Durrbach, ED. Carosella, L. Sensébé, F.Deschaseaux. Concise review: combining human leukocyte antigen G and mesenchymal stem cells for immunosuppressant biotherapy. *Stem Cells* 2013; 31:2296–2303.
43. M. Ezeakile, V. Portik-Dobos, J. Wu, DD. Horuzsko, R. Kapoor, M. Jagadeesan, LL.Mulloy, A. Horuzsko. HLA-G Dimers in the Prolongation of Kidney Allograft Survival. *Journal of Immunology Research* 2014; Article ID 153981.

44. S. Chakraborty, S. Kaur, S. Guha, S.K. Batra. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1826 (2012) 129–169.
45. DH. Goetz, MA. Holmes, N. Borregaard, ME. Bluhm, KN. Raymond, R.K. Strong. The Neutrophil Lipocalin NGAL Is a Bacteriostatic Agent that Interferes with Siderophore-Mediated Iron Acquisition. *Molecular Cell*. 2002; 10: 1033–1043.
46. EV. Schrezenmeier, J. Barasch, K. Budde, T. Westhoff, K. M. Schmidt-Ott. Biomarkers in acute kidney injury – pathophysiological basis and clinical performance. *Acta Physiol*. 2016; 10.1111/apha.12764.
47. KM. Schmidt-Ott, K. Mori, JY. Li, A. Kalandadze, D J. Cohen, P. Devarajan, J. Barasch. Dual Action of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. *J Am Soc Nephro* 2007; 18: 407–413.
48. ME. Wasung, LS. Chawla, M. Madero. Biomarkers of renal function, which and when? *Clinica Chimica Acta* 438 2015; 350–357.
49. V. Hvidberg, C. Jacobsen, RK. Strong, JB. Cowland, SK. Moestrup, N. Borregaard. The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Letters* 2005; (579):773–777.
50. Clerico, C. Galli, A. Fortunato, C. Ronco. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as biomarker of acute kidney injury: a review of the laboratory characteristics and clinical evidences. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2012; 50(9):1505–1517.
51. G. La Manna, G. Ghinatti, PL. Tazzari, F. Alviano, F. Ricci, I. Capelli, V. Cuna, P. Todeschini, E. Brunocilla, P. Pagliaro, L. Bonsi, S. Stefoni. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Increases HLA-G+/FoxP3+ T-Regulatory Cell Population in an In Vitro Model of PBMC. *PLOS ONE* 2014; 9 e89497.
52. MM. Mitsnefes, TS. Kathman, J. Mishra, J. Kartal, PR. Khoury, TL. Nickols, J. Barasch, P. Devarajan. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in children with chronic kidney disease. *Pediatric Nephrology* 2007; 22:201–108.
53. P. Devarajan. Biomarkers for the Early Detection of Acute Kidney Injury. *Curr. Opin. Pediatr.* 2011; 23(2):194–200.
54. G. D’Arrigo, F. Provenzano, C. Torino, C. Zoccali, G. Tripepi. I test diagnostici e l’analisi della curva ROC. *Giornale italiano di Nefrologia* 2011; 28(6):642-647.
55. M. Field, D. Lowe, M. Cobbold, R. Higgins, D. Briggs, N. Inston, AR. Ready. The use of NGAL and IP-10 in the prediction of early acute rejection in highly sensitized patients following HLA-incompatible renal transplantation. *Transplant. International* 2014; 27: 362–370.

CAPITOLO II

1. Wilson EB. The cell in development and inheritance. MacMillan, London, 1896
2. Gehron Robey P. Stem cells near the century mark. *J Clin Invest* 2000; 105: 1489-1491.
3. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 2007; 25: 1384-1392.
4. Ryan J, Barry F, Murphy JM, Mahon B. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm* 2005; 2: 8.
5. Weissman IL. Stem Cells: Units of development, units of re generation and units in evolution. *Cell* 2000; 100: 157-168.
6. Alison MR, Poulosom R, Forbes S, Wright NA. An Introduction to stem cells. *J of Pathology* 2002; 197: 419-423.
7. Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg* 2005; 34: 415-423.
8. Lee EH, Hui JHP. The potential of stem cells in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg* 2006; 88-B: 841-851.
9. Conley BG, Young JC, Trounson AO, Mollard R. Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:555-567.
10. Cedar, S. H., Cooke, J. A., Patel, M. R., Luo, Z. & Minger, S. L. The therapeutic potential of human embryonic stem cells. *Indian J. Med. Res.* 125, 17–24 (2007).
11. Anderson, D. J., Gage, F. H. & Weissman, I. L. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat. Med.* 7, 393–395 (2001).

12. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676 (2006).
13. Pittenger, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147 (1999).
14. Jiang, Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41–49 (2002).
15. Brook FA, Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5709-5712.
16. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA; Swiergiel JJ, Marshall VS. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147.
17. Rosler ES, Fisk GJ, Ares X, Irving J, Miura T, Rao, MS, Carpenter MK. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev Dynam* 2004; 229: 259-274.
18. Wright WE e Shay JW. Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 682-688.
19. Rubin H. The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 675-681.
20. Rizzino, A. Sox2 and Oct-3/4: A versatile Pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells by functioning as molecular rheostats. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 1, 228–236 (2009).
21. Pesce, M., Wang, X., Wolgemuth, D. J. & Schöler, H. R. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech. Dev.* 71, 89–98(1998).
22. Loh, Y.-H. et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 38, 431–440 (2006).
23. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 349(9057), 990–993 (1997).
24. Hirsch T, Rothoefl T, Teig N, Bauer JW, Pellegrini G, De Rosa L, Scaglione D, Reichelt J, Klausegger A, Kneisz D, Romano O, Secone Seconetti A, Contin R, Enzo E, Jurman I, Carulli S, Jacobsen F, Luecke T, Lehnhardt M, Fischer M, Kueckelhaus M, Quaglino D, Morgante M, Bicciato S, Bondanza S, De Luca M. Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature*. 2017 Nov 16;551(7680):327-332.
25. Pellegrini G, Lambiasi A, Macaluso C, et al. From discovery to approval of an advanced therapy medicinal product-containing stem cells, in the EU. *Regenerative Medicine*. 2016;11(4):407-420.
26. Wagers, A. J. & Weissman, I. L. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116, 639–648 (2004).
27. Lemoli R.M. et al, Stem cell plasticity: time for a reappraisal?, *Haematologica* 2005; 90:360-381.
28. Minguell, J. J., Conget, P. & Erices, a. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33, 881–7 (2000)
29. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 2000; 113: 1161-1166.
30. Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem and Cell Biol* 2008; 40: 815-820.
31. Aslan H, Zilberman Y, Kandel L, Liebergall M, Oskouian RJ, Gazit D, Gazit Z. Osteogenic differentiation of non-cultured immuno isolated bone marrow-derived CD105+ cells. *Stem Cells* 2006; 24: 1728-37.
32. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49.
33. Theise, N. D. et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32, 11–6 (2000).
34. Grabowska, I. et al. Restricted myogenic potential of mesenchymal stromal cells isolated from umbilical cord. *Cell Transplant.* 21, 1711–26 (2012).
35. Friedenstein AJ. Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Haematol Blood Transfus* 1980; 25: 19-29.

36. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000; 2: 477-488.
37. Bosch P, Musgrave DS, Lee JY, Cummins J, Shuler T, Ghivizzani TC, Evans T, Robbins TD. Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. *J Orthop Res* 2000; 18 933-944.
38. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7: 211-228.
39. Sottile V, Halleux C, Bassilana F, Keller H, Seuwen K. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone* 2002; 30: 699-704.
40. Salingscamboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K, Obinata M, Amagasa T, Nifuji A, Noda M. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell like property. *Exp Cell Res* 2003; 287: 289-300.
41. Pieternella S, Anker SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 2003; 102: 1548-1549.
42. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* 2004; 6: 543-53.
43. Evangelista M, Soncini M, Parolini O. Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? *Cytotechnology*. 2008; 58:33-42.
44. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Buhring HJ, Evangelista M, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*. 2008; 26:300-11
45. Chunmeng S, Tianmin C. Effects of plastic-adherent dermal multipotent cells on peripheral blood leukocytes and CFU-GM in rats. *Transplant Proc* 2004; 36: 1578-81.
46. De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol* 2003; 160: 909-918.
47. Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Markham AF, Emery P, McGonagle D. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 817-827.
48. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2521-2529.
49. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24: 462-471.
50. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, & Robey P. G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19, 180-192 (2001).
51. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317.
52. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361: 45-46.
53. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705.
54. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res* 1998; 16: 406-413.
55. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Reed SA, Johnson SE. Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. *J Cell Physiol* 2008; 215: 329-336.

56. Le Blanc, K. et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363, 1439–41 (2004).
57. Hu, J. et al. Long term effects of the implantation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells from the umbilical cord for newly-onset type 1 diabetes mellitus. *Endocr. J.* 60, 347–57 (2013).
58. Schwarz, E. J., Alexander, G. M., Prockop, D. J. & Azizi, S. A. Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: engraftment in a rat model of Parkinson disease. *Hum. Gene Ther.* 10, 2539–49 (1999).
59. Campioni, D Lanza, F. Cellule mesenchimali stromali: caratterizzazione immunofenotipica e funzionale. *Lett. GIC* 20, 13–19 (2011).
60. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838-3843.
61. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003; 31: 890-896.)
62. Meisel, R. et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103, 4619–21 (2004).
63. Rizzo, R. et al. A functional role for soluble HLA-G antigens in immune modulation mediated by mesenchymal stromal cells. *Cytherapy* 10, 364–75 (2008).
64. Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M. C. & Moretta, L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 107, 1484–90 (2006).
65. Aggarwal, S. & Pittenger, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105, 1815–22 (2005).
66. Maccario, R. et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 90, 516–25 (2005).
67. Corcione, A. et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107, 367–72 (2006).
68. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *The Annals of Thoracic Surgery* 2002; 73: 1919-1925
69. Wang L, Li Y, Chen X, Chen J, Gautam SC, Xu Y, Chopp M. MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Hematology* 2002; 7: 113-117
70. Murphy JM, Heinegard R, McIntosh A, Sterchi D, Barry FP. Distribution of cartilage molecules in the developing mouse joint. *Matrix Biology* 1999; 18: 487-497.
71. Wang L, Li Y, Chen X, Chen J, Gautam SC, Xu Y, Chopp M. MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Hematology* 2002; 7: 113-117.
72. Bieback, K., Kern, S., Klüter, H. & Eichler, H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 22, 625–34 (2004).
73. Wang, H.-S. et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 22, 1330–7 (2004)
74. Portmann-Lanz, C. B. et al. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194, 664–73 (2006).
75. Sakuragawa, N. et al. Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells. *J. Neurosci. Res.* 78, 208–14 (2004).
76. Alviano, F. et al. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev. Biol.* 7, 11 (2007).
77. Ventura, C. et al. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human

- mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. *J. Biol. Chem.* 282, 14243–52 (2007).
78. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1796-1808.
 79. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003; 112: 1821-1830.
 80. Caspar-Bauguil S, Cousin B, Galinier A, Segafredo C, Nibbelink M, André M, Casteilla L, Pénicaud L. Adipose tissues as an ancestral immune organ: Site-specific change in obesity. *FEBS Lett* 2005; 579: 3487-3492.
 81. Casteilla L, Planat-Benard V, Cousin B, Silvestre JS, Laharrague P, Charrière G, Carrière A, Pénicaud L. Plasticity of adipose tissue: A promising therapeutic avenue in the treatment of cardiovascular and blood diseases. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2005; 98: 922-926.
 82. Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells* 2005; 23: 412-423.
 83. Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, André M, Pénicaud L, Casteilla L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: Site-specific differences. *Exp Cell Res* 2006; 312: 727-736.
 84. Tallone T, Realini C, Bohmler A, et al. Adult human adipose tissue contains several types of multipotent cells. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011; 4(2):200-210
 85. Sengenès, C., Lolmède, K., Zakaroff-Girard, A., Busse, R. & Bouloumié, A. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J. Cell. Physiol.* 205, 114–22 (2005).
 86. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytherapy.* 2013;15(6):641-648.
 87. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 2001; 189: 54-63.
 88. Szöke, K. & Brinckmann, J. E. Concise review: therapeutic potential of adipose tissue derived angiogenic cells. *Stem Cells Transl. Med.* 1, 658–67 (2012).
 89. Pignolo, R. J. et al. Heterozygous inactivation of Gnas in adipose-derived mesenchymal progenitor cells enhances osteoblast differentiation and promotes heterotopic ossification. *J. Bone Miner. Res.* 26, 2647–55 (2011).
 90. Huang, J. I. et al. Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plast. Reconstr. Surg.* 113, 585–94 (2004).
 91. Hicok, K. C. et al. Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Eng.* 10, 371–80.
 92. Huang JI, Kazmi N, Durbhakula MM, Hering TM, Yoo JU, Johnstone B. Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. *J Orthop Res* 2005; 23: 1383-1389.
 93. Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2005; 203: 398-409.
 94. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Pénicaud L, Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: Physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004; 109: 656-663.
 95. Moon MH, Kim SY, Kim YJ, Kim SJ, Lee JB, Bae YC, Sung SM, Jung JS. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem* 2006; 17: 279-290.

96. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch.* 2009;76(2):56-66.
97. Cherubino M, Rubin JP, Miljkovic N, Kelmendi-Doko A, Marra KG. Adipose-derived stem cells for wound healing applications. *Ann Plast Surg.* 2011;66(2):210-215.
98. Ogura F, Wakao S, Kuroda Y, et al. Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with nontumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. *Stem Cells Dev.* 2014;23(7):717-728.
99. Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev.* 2011;7(2):269-291.
100. Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 371-379.
101. Timper K, Seboek D, Eberhardt M. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341: 1135-1140.
102. Corre J, Barreau C, Cousin B, Chavoïn JP, Caton D, Fournial G, Penicaud L, Casteilla L, Laharrague P. Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors. *J Cell Physiol* 2006; 208: 282-288.
103. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 2001; 189: 54-63.
104. Musina RA, Bekchanova ES, Sukhikh GT. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. *Bull Exp Biol Med* 2005; 139: 504-509.
105. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 2005; 33: 1402-1416.
106. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 2004; 14: 311-324.
107. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue derived adult stem cells: Comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 2005; 129: 118-129.
108. Fang B, Song YP, Liao LM, Han Q, Zhao RC. Treatment of severe therapy-resistant acute graft-versus host disease with human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant* 2006; 38: 389-390.
109. Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro J, Colmenero I, Ramírez M, Bueren JA. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft versus-host disease. *Stem Cells* 2006; 24: 2582-2591.
110. Shi YY, Nacamuli RP, Salim A, Longaker MT. The osteogenic potential of adipose derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast Reconstr Surg* 2005; 116:1686- 1696.
111. Stosich, M. S. & Mao, J. J. Adipose tissue engineering from human adult stem cells: clinical implications in plastic and reconstructive surgery. *Plast. Reconstr. Surg.* 119, 71–83; discussion 84–5 (2007).
112. Pu LL, Cui X, Fink BF, Cibull ML, Gao D. The viability of fatty tissues within adipose aspirates after conventional liposuction: A comprehensive study. *Ann Plast Surg* 2005; 54: 288-292.
113. Tapp H, Hanley EN Jr, Patt JC, Gruber HE. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Exp Biol Med* 2009; 234: 1-9.
114. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 4279-4295.
115. Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, van Harmelen V, Götherström C, Blomqvist L, Arner P, Rydén M. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res* 2005; 308: 283-290.

116. Oedayrajsingh-Varma M, van Ham S, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, Ritt MJ, van Milligen FJ. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue harvesting procedure. *Cytotherapy* 2006; 8: 166-177.
117. Klinger, M., Marazzi, M., Vigo, D. & Torre, M. Fat injection for cases of severe burn outcomes: a new perspective of scar remodeling and reduction. *Aesthetic Plast. Surg.* 32, 465–9 (2008).
118. Coleman SR. Structural fat grafts: the ideal filler? *Clin Plast Surg.* 2001;28(1):111-119.
119. Tonnard P, Verpaele A, Peeters G, Hamdi M, Cornelissen M, Declercq H. Nanofat grafting: basic research and clinical applications. *Plast Reconstr Surg.* 2013;132(4):1017-1026.
120. Youn S, Shin JI, Kim JD, Kim JT, Kim YH. Correction of infraorbital dark circles using collagenase-digested fat cell grafts. *Dermatol Surg.* 2013;39(5):766-772.
121. Trepsat F. [Midface reshaping with micro-fat grafting]. *Ann Chir Plast Esthet.* 2009;54(5):435-443.
122. Nguyen PS, Desouches C, Gay AM, Hautier A, Magalon G. Development of micro-injection as an innovative autologous fat graft technique: The use of adipose tissue as dermal filler. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2012;65(12):1692-1699.
123. Oberbauer E, Steffenhagen C, Wurzer C, Gabriel C, Redl H, Wolbank S. Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: current state of the art. *Cell Regen (Lond).* 2015; 4:7.
124. Gennai AB, F.P. Superficial enhanced fluid fat injection (SEFFI and MicroSEFFI) in facial rejuvenation. *CellR4.* 2017;5(1):e2239.
125. Pak J, Lee JH, Kartolo WA, Lee SH. Cartilage Regeneration in Human with Adipose Tissue-Derived Stem Cells: Current Status in Clinical Implications. *Biomed Res Int.* 2016; 4702674.
126. Jo CH, Lee YG, Shin WH, et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells.* 2014;32(5):1254-1266.
127. Koh YG, Choi YJ, Kwon SK, Kim YS, Yeo JE. Clinical results and second-look arthroscopic findings after treatment with adipose-derived stem cells for knee osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2015;23(5):1308-1316.
128. Koh YG, Choi YJ, Kwon OR, Kim YS. Second-Look Arthroscopic Evaluation of Cartilage Lesions After Mesenchymal Stem Cell Implantation in Osteoarthritic Knees. *Am J Sports Med.* 2014;42(7):1628-1637.
129. Rossi M., Alviano F, Ricci F., Vignoli F., Marchionni C., Valente S., Zannini C., Tazzari P. L., Vignoli M., Bartoletti E., Bonsi L. In vitro multilineage potential and immunomodulatory properties of adipose derived stromal/stem cells obtained from nanofat lipoaspirates. *CellR4.* 2016; 4 (6):e2212.
130. Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med* 2002; 195: 1641.
131. Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, et al. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 786.
132. Golshayan D, Jiang S, Tsang J, et al. In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood* 2007; 109: 827.
133. Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juvcicka J, et al. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. *Clin Immunol* 2009; 133: 22.
134. Marek-Trzonkowska N, Mysliwiec M, Dobyszek A, et al. Administration of CD4+CD25highCD127- regulatory T cells preserves A-cell function in type 1 diabetes in children. *Diabetes Care* 2012; 35: 1817.
135. S. Beyth, Z. Borovsky, D. Mevorach, M. Liebergall, Z. Gazit, H. Aslan, E. Galun, J. Rachmilewitz, Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 105 (2005) 2214–2219.
136. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105:1815–1822.
137. Selmani Z, Naji A, Zidi I, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to

- induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells* 2008; 26:212–222.
138. Mokarizadeh A, Delirez N, Morshedi A, et al. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: Potent organelles for induction of tolerogenic signaling. *Immunol Lett* 2012; 147:47–54.
 139. Federica Casiraghi, Norberto Perico, and Giuseppe Remuzzi. Mesenchymal stromal cells to promote solid organ transplantation tolerance. *Wolters Kluwer Health* 2013; 1087-2418.
 140. Federica Casiraghi, Norberto Perico, and Giuseppe Remuzzi. Mesenchymal stromal cells to promote solid organ transplantation tolerance. *Wolters Kluwer Health* 2013; 1087-2418.
 141. A.V. Vanikar, et al., Six years' experience of tolerance induction in renal transplantation using stem cell therapy. *Clin. Immunol.* (2017)
 142. Casiraghi F, Azzollini N, Todeschini M, et al. Localization of mesenchymal stromal cells dictates their immune or proinflammatory effects in kidney transplantation. *Am J Transplant* 2012; 12:2373–2383.
 143. Livak KJ, Schmittgen “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2TD” San Diego, 2001.
 144. Pfaffl MW. “Relative quantification. In: Dorak T, editor. *Real Time PCR BIOS Advanced Methods*” Taylor & Francis; 2006.
 145. Jan Hellemans, Geert Mortier, Anne De Paepe, Frank Speleman, and Jo Vandesompele “qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data” *Genome Biol.* 2007; 8(2): R19.
 146. Lisowska KA, Dębska-Ślizień A, Jasiulewicz A, Bryl E, Witkowski JM. Influence of hemodialysis on circulating CD4^(low)CD25^(high) regulatory T cells in end-stage renal disease patients. *Inflamm Res.* 2014 Feb;63(2):99-103.
 147. SS, Loho T. Acute Kidney Injury (AKI) Biomarker. *Acta Med Indones.*; 44(3):246-55; 2012.
 148. DeJaco C, Duftner C, Grubeck-Loebenstien B, Schirmer M. Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunology.* Mar;117(3):289-300, 2006.
 149. D'Arena G, Rossi G, Vannata B, Deaglio S, Mansueto G, D'Auria F, Statuto T, Simeon V, De Martino L, Marandino A, Del Poeta G, De Feo V, Musto P. Regulatory T-Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia and Autoimmune Diseases. *Mediterr J Hematol Infect Dis.*; 4(1); 2012.
 150. Bartosh TJ, Ylostalo JH, Mohammadipour A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, Lee RH, Choi H, Prockop DJ. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107:13724-9.
 151. Prockop DJ. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): Controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther* 2009; 17:939–946.
 152. Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L'Huillier A, Ling W, Roberts AI, Le AD, Shi S, Shao C, Shi Y. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol* 2010; 184:2321–2328; Caplan AI, Dennis JE Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006; 98:1076–1084.