

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
Dip. di Medicina Animale, Produzioni e Salute  
Dip. di Biomedicina Comparata e Alimentazione (BCA)

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in  
MEDICINA VETERINARIA

Valutazione ematologica di primati  
(*M. fascicularis*) sottoposti a xenotrapianto  
di reni o di precursori neuronali

Relatore  
Dott.ssa Laura Cavicchioli

Correlatore  
Dott.ssa Mariaelena Gelain

Laureanda/o  
Arianna Salmaso  
Matricola n.  
583272/MV

ANNO ACCADEMICO 2012 – 2013



# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>5</b>
1) LO XENOTRAPIANTO	5
1.1- Lo xenotrapianto di rene	6
1.2- Lo xenotrapianto di precursori neuronali	7
1.3- Lo xenotrapianto a Padova	8
2) IL RIGETTO	10
2.1- Il rigetto nello xenotrapianto di organo solido	10
2.2- Il rigetto nello xenotrapianto di precursori neuronali	12
3) TERAPIA IMMUNOSOPPRESSIVA E IMMUNOMODULATORIA	14
3.1- Ciclofosfamide	15
3.2- Ciclosporina A	15
3.3- Micofenolato sodico	16
3.4- Rituximab	16
3.5- GAS 914	17
3.6- Immunoglobulina IV	17
3.7- Anti CD154	18
3.8- Corticosteroidi	18
<b>SCOPO</b>	<b>20</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>21</b>
4) PRIMATI	21
4.1- Primati sottoposti a xenotrapianto di rene	22
4.2- Primati sottoposti a xenotrapianto di precursori neuronali	24
5) PRELIEVO E ANALISI DEL MIDOLLO OSSEO	24
6) STRISCIO DI SANGUE PERIFERICO	26
7) ESAME EMOCROMOCITOMETRICO	27
8) ANALISI DEI DATI	27

<b>RISULTATI</b>	<b>28</b>
9) ANALISI DEL MIDOLLO OSSEO	28
9.1- ANALISI QUANTITATIVA	28
9.1a- Rapporto mieloidi/eritroidi	28
9.1b- Maturation Index mieloide	30
9.1c- Maturation Index eritroide	31
9.1d- Altre cellule	33
9.2- ANALISI QUALITATIVA	35
10) ANALISI ESAME EMOCROMOCITOMETRICO	36
10.1- Emoglobina ed ematocrito	37
10.2- Leucociti	38
10.3- Piastrine	38
10.4- Reticolociti	38
11) VALUTAZIONE MORFOLOGICA DELLO STRISCIO DI SANGUE PERIFERICO	39
11.1- Eritrociti	39
11.2- Eritrociti nucleati	39
11.3- Neutrofili	39
11.4- Linfociti	39
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>40</b>
<b>CONCLUSIONI</b>	<b>45</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>46</b>
<b>SITOGRAFIA</b>	<b>55</b>

# INTRODUZIONE

## 1) LO XENOTRAPIANTO

Il trapianto, ovvero l'allograpianto in cui ricevente e donatore appartengono alla stessa specie, rappresenta oggi una delle più importanti opzioni terapeutiche per prolungare la sopravvivenza di pazienti affetti da insufficienza terminale d'organo o da altre gravi patologie. La scarsità di organi umani che possano essere recuperati e che siano utilizzabili con una buona probabilità di successo ne limita l'applicazione. In Unione Europea, nel 2009, sono stati eseguiti circa 30.000 allograpianti di organo solido, quando i pazienti in attesa di tale intervento erano oltre 65.000 (Council of Europe; 2010). La maggior parte dei pazienti in lista per un trapianto, pertanto, muore per l'aggravarsi delle condizioni cliniche durante l'attesa per trovare un donatore. Per supplire a tale carenza d'organi, la ricerca medica sta studiando le diverse specie animali come fonte alternativa d'organi e tessuti, ponendosi l'obiettivo di considerare lo xenotrapianto, ovvero un trapianto che vede come donatore e ricevente due soggetti appartenenti a specie diverse, come nuova e sicura opzione terapeutica per l'uomo. Ovviamente, tale sperimentazione presenta numerose problematiche di ordine etico, medico e chirurgico ma, al momento, l'ostacolo maggiore da superare è rappresentato dal rigetto. Tale problema è presente anche nell'allograpianto, ma diviene ancor più critico nel caso in cui ricevente e donatore appartengano a specie animali differenti (Samstein B. and Platt J.L., 2000). Tra le specie animali utilizzate nella ricerca trapiantologica, il primate non umano si classifica come un modello eccellente, grazie all'alto livello di omologia genetica e alle somiglianze biochimiche e fisiologiche con l'uomo (Sibal L.R. e Samson K.J., 2001; Hérodin *et al.*, 2005). Nonostante queste affinità con l'essere umano, esso non può tuttavia rappresentare la prima scelta come donatore sia per l'alto rischio di trasmissione all'uomo di agenti infettivi, dovuto all'appartenenza allo stesso ordine tassonomico, che per la difficoltà di allevamento, l'incompatibilità dovuta alle dimensioni degli organi, ed infine, non da meno, per motivi etici (Yang Y.G. e Sykes M., 2007). Si potrebbe ovviare invece a molte di queste limitazioni con l'utilizzo della specie suina. Il suino infatti, oltre ad essere facilmente allevato ed essere un animale prolifico, presenta omologie anatomo-fisiologiche con la specie umana, e le dimensioni dei suoi organi sono compatibili con quelle degli

organi umani. Inoltre può essere allevato in condizioni “pathogen free” che riducono il rischio zoonosico; è meno implicato nelle obiezioni etiche in quanto viene già largamente sfruttato a scopi alimentari ed infine in questa specie è agevole il ricorso all'ingegneria genetica per ridurre l'incompatibilità antigenica alla base del rigetto (Cooper D.K., Gollakner B., Sachs D.H., 2002).

### 1.1 - LO XENOTRAPIANTO DI RENE

I primi tentativi di xenotrapianto risalgono ai primi anni del 1900 ma si rivelarono fallimentari poiché, non essendo ancora conosciuti i farmaci immunosoppressori, i pazienti decedevano in breve tempo e così questa pratica fu abbandonata per decenni (Samstein B. e Platt J.L., 2000). Solo negli anni 1960, grazie all'utilizzo dei primi farmaci immunosoppressori, Keith Reemtsma riuscì a prolungare la sopravvivenza di 13 pazienti, trapiantati con reni di scimpanzè, fino a una media di 8 settimane. Nonostante la maggior parte dei pazienti andasse incontro a rigetto perché i farmaci a disposizione erano pochi, e poco si conosceva sul loro dosaggio, una paziente sopravvisse per 9 mesi. Questo successo aprì la strada ad altre sperimentazioni senza arrivare tuttavia a risultati soddisfacenti (Cooper D.K., 2012). Oggi la maggior parte degli autori concorda nel sostenere che l'introduzione dell'ingegneria genetica potrebbe risolvere molti problemi e che lo xenotrapianto potrebbe prospettarsi come un'opzione terapeutica promettente. Un requisito che il rene di suino transgenico deve avere è quello di essere fisiologicamente compatibile con l'organismo del primate non umano. Zaidi e collaboratori hanno dimostrato che in questo modello sperimentale l'equilibrio elettrolitico, acido-base ed omeostatico sono infatti mantenuti (Zaidi A. *et al.*, 1998). Soin e colleghi hanno successivamente analizzato quali ormoni e molecole regolatrici, prodotti in sede renale o che hanno effetto su quest'organo, sono compatibili tra maiale e primate e quali invece vanno somministrati per via esogena, come ad esempio l'eritropoietina. Tale glicoproteina, infatti, prodotta dalle cellule renali del suino non ha effetto nello stimolare l'eritropoiesi nel primate e perciò a quest'ultimo viene somministrata la proteina ricombinante umana (Soin B. *et al.*, 2001). Vi è unanime consenso da parte dei ricercatori nel sostenere che la conoscenza di questi aspetti, uniti all'impiego di suini transgenici e di terapie immunosoppressive, permettano di applicare il trapianto di rene nel modello suino-primate non-umano, prevenendo i principali problemi derivanti dalla discordanza delle due specie (vedi paragrafo successivo)

## 1.2 - LO XENOTRAPIANTO DI PRECURSORI NEURONALI

Tra le possibili opzioni terapeutiche del Morbo di Parkinson (MP), una malattia neurodegenerativa che causa la morte dei neuroni dopaminergici della *substanza nigra* del mesencefalo ventrale, in questi ultimi anni si è inserito lo xenotrapianto di precursori neuronali (Hantraye P. e Badin R.A, 2012). Le cause che provocano la malattia non sono ancora del tutto note ma tra le varie ipotesi prevalgono quelle di origine genetica o tossica (Nicholson G. *et al.*, 2002). Tra le cause genetiche più accreditate, vi è la mutazione del gene SNCA che codifica per la proteina alfa-sinucleina (Spillantini M.G. *et al.*, 1997); questa proteina sarebbe prodotta in quantità più elevate in soggetti affetti dalla mutazione e il suo accumulo sarebbe dunque capace di danneggiare le cellule neuronali. Poiché la terapia attualmente in uso è rappresentata dalla somministrazione di L-DOPA, che però allevia la sintomatologia senza tuttavia arrestare la progressione della patologia e che in alcuni casi è risultata essere inefficace data la refrattarietà di certi pazienti al trattamento, il trapianto di cellule neuronali rappresenta una via terapeutica alternativa. A tale scopo si può ricorrere all'uso di cellule staminali o all'allograpianto di tessuto fetale embrionale, ma le obiezioni di carattere etico e le restrizioni legislative, oltre alla difficoltà di ottenere questi derivati cellulari, hanno indirizzato la ricerca a focalizzarsi su pratiche più concretizzabili come, ad esempio, l'utilizzo di animali come fonte di precursori neuronali. Molte informazioni sono note grazie a studi *in vitro* e all'utilizzo dei roditori (Modo M. *et al.*, 2002; Medicetty *et al.*, 2004), ma oggi il modello d'elezione nel riprodurre la patologia è rappresentato dal primate non umano (Emborg E.M., 2007).

La somiglianza negli esseri umani tra il parkinsonismo MPTP- indotto e il parkinsonismo idiopatico ha infatti portato ad utilizzare a scopi sperimentali l'intossicazione con MPTP (1-metil 4-feniltetraidropiridina) nei primati non umani come modello per tale malattia dove si osservano i sintomi tipici, riferibili a tremori, discinesia e rigidità muscolare. (De Long, 1990, Collier T.J. *et al.*, 2003). Un'ulteriore conferma dell'efficacia nell'indurre la malattia è data dal fatto che tutte le scimmie intossicate rispondono ai trattamenti con sostituti della dopamina usati nell'uomo (Collier T.J. *et al.*, 2003; Emborg E.M., 2007). La suscettibilità alla neurotossina è tuttavia legata a fattori individuali e può essere più o meno elevata, infatti alcuni animali hanno dimostrato una certa resistenza, sviluppando sintomatologia più lieve o ritardata rispetto a soggetti dello stesso gruppo sperimentale, guarendo spontaneamente a una certa distanza di tempo dal

trattamento o addirittura restando asintomatici. Ogni animale va periodicamente valutato dopo ogni dose per modificare o interrompere il trattamento qualora si riveli necessario (Emborg E.M., 2007; Kulak J.M., 2004).

Una volta che l'intossicazione si è stabilizzata, nel mesencefalo del primate vengono inoculate cellule embrionali di suino. E' stato dimostrato che i neuroni di suino riescono a crescere e svilupparsi nell'encefalo dei roditori e a formare sinapsi (Isacson O. *et al.*, 1995), ed altrettanto è stato rilevato all'esame istologico post mortem effettuato sull'encefalo umano di un paziente affetto da morbo di Parkinson in cui sono state inoculate cellule neuronali derivate da un embrione suino (Deacon T. *et al.*, 1997). La sperimentazione del trapianto di cellule neuronali derivate da embrioni umani in pazienti parkinsoniani non può essere applicata su larga scala per motivi di carattere etico e per le difficoltà pratiche riscontrate. Si stanno quindi sperimentando metodi alternativi, tra cui lo xenotrapianto, come possibile cura della malattia (Borlongan C.V. e Sanberg P.R., 2002). Le informazioni riguardanti l'efficacia di questo tipo di xenotrapianto e i meccanismi alla base del rigetto nel primate ad oggi sono stati per lo più dedotti da studi sul modello roditore-suino o derivano da analogie riscontrate con l'allograpianto e sono attualmente in fase di approfondimento (Hantraye P. e Badin R.A., 2012; Badin R.A. *et al.*, 2009; Badin R.A. *et al.*, 2011).

### 1.3 - LO XENOTRAPIANTO A PADOVA

Nel contesto della sperimentazione sullo xenotrapianto, condotta dal CORIT (Consorzio per la Ricerca sul Trapianto d'Organi, Tessuti, Cellule e Medicina Rigenerativa) a Padova, in parte presso i Dipartimenti MAPS e BCA dell'Università, si inserisce questo lavoro di tesi il cui scopo risiede nella valutazione ematologica di primati xenotrapiantati ed immunosoppressi, con particolare riferimento all'analisi citologica del midollo osseo. In particolare, vengono presi in esame i tessuti provenienti da due diversi tipi di xenotrapianto, quello di reni e quello di precursori neuronali ed entrambi i modelli sperimentali utilizzano il suino come donatore e il primate non umano (*Macaca fascicularis*) come ricevente.

**Lo xenotrapianto di rene** ha caratteristiche di rigetto sovrapponibili a quelle osservabili nello xenotrapianto di tutti gli organi solidi (ad esempio fegato, cuore, isole pancreatiche) i quali, per il fatto di possedere un proprio integro sistema vascolare, sono



particolarmente esposti all'attacco delle cellule immunitarie circolanti del ricevente. Facendo esprimere agli endoteli del donatore delle proteine immunologicamente "simili" a quelle del ricevente, la risposta immunitaria del ricevente viene pertanto modulata. Le sperimentazioni condotte nei precedenti 15-20 anni da alcuni gruppi di studio, tra cui quello del dr. Emanuele Cozzi, avevano come scopo quello di creare dei donatori della specie suina con un corredo genetico e un'espressione proteica, in particolare delle proteine del complemento coinvolte nei segnali a cascata indotti dal rigetto, simili a quelli umani (Cozzi E. e White D.J. 1995; Cozzi E. *et al.*, 1997a; Cozzi E. *et al.*, 1997b; Cozzi E. *et al.*, 2000). A partire da queste ingegnerizzazioni, negli anni successivi si sono inseriti poi numerosi progetti di ricerca del CORIT in associazione con l'Università di Padova e l'Ospedale di Padova. Il contesto sperimentale nel corso degli anni 2001-2012 è il medesimo e consiste in una nefrectomia bilaterale del ricevente e nell'inserimento di un rene (salvavita) del donatore. Le caratteristiche di transgenesi (e anche di knock-out) del donatore si sono evolute durante il corso degli anni in conseguenza alle innovazioni e alle scoperte ottenute nel campo dell'ingegneria genetica sul suino.

I suini utilizzati nelle sperimentazioni come donatori di reni sono pertanto resi knock-out per la glicoproteina  $\alpha$ -Gal che scatena una reazione immunitaria immediata nel ricevente e/o sono transgenici per poter codificare per proteine umane regolatrici del complemento come ad esempio hDAF, MCP e CD46 (Cozzi *et al.*, 2000; Vadori M. *et al.*, 2011). I risultati ottenuti hanno permesso di compiere alcuni passi in avanti nello xenotrapianto in questo modello preclinico nel campo della chirurgia (Baldan N. *et al.*, 2004), della patologia (Cavicchioli L. *et al.*, 2007), dell'immunologia (Cozzi *et al.*, 2004) e della coagulazione (Spiezia L. *et al.*, 2013).

**Lo xenotrapianto di precursori neuronali** si inserisce nel progetto Europeo denominato Xenome che tra gli scopi aveva il reperimento di una possibile terapia per alcune malattie neurodegenerative come il morbo di Parkinson (Xenome 2008-2012). La specie donatrice è rappresentata dal suino, transgenico per una molecola umana, CTLA4-Ig, inibente le cellule T. L'espressione di questa proteina è stata rilevata in diverse aree dell'encefalo degli embrioni transgenici, tra cui il mesencefalo, l'ippocampo e la corteccia (Martin C. *et al.*, 2005). Studi *in vitro* hanno dimostrato che l'espressione di questa molecola riduce del 50% la risposta proliferativa dei Linfociti T umani nei saggi di proliferazione cellulari eseguiti (*Ibid.*). Dopo aver isolato dai donatori l'area ventrale del

mesencefalo ed averla sottoposta a disgregazione meccanica, si è ottenuta una sospensione cellulare che è stata purificata e in seguito utilizzata per l'inoculo nel ricevente. I riceventi sempre appartenenti alla specie *Macaca fascicularis* sono stati intossicati con MPTP; una volta comparsa e stabilizzata la sintomatologia clinica, i neuroni sono stati sostituiti, tramite un intervento di inoculazione in stereotassi con precursori neuronali dei donatori (Badin R.A. *et al.*, CTS-IXA 2011 Joint International Congress).

## 2) IL RIGETTO

### 2.1 - IL RIGETTO NELLO XENOTRAPIANTO DI ORGANO SOLIDO

Lo xenotrapianto di organi solidi, e di particolare interesse in questo studio, di rene, può portare a 4 principali tipi di rigetto, differenziati in base al momento di insorgenza e ai meccanismi patogenetici che li caratterizzano. Il primo e più precoce viene definito **rigetto iperacuto** (in inglese abbreviato in "HAR", Hyper-Acute Rejection) ed insorge da pochi minuti a qualche ora dopo la rivascolarizzazione dell'organo trapiantato. Istologicamente si osservano danno endoteliale, emorragia interstiziale diffusa, edema e formazione di trombi in vasi di piccolo calibro. Anticorpi pre-esistenti nel plasma del ricevente si legano ad antigeni presentati dalle cellule endoteliali del donatore attivando una serie di reazioni che implicano l'attivazione della cascata del complemento e delle cellule endoteliali stesse, le quali, tramite una serie di interazioni, sono in grado di attivare l'aggregazione piastrinica (Cozzi E. *et al.*, 2005). Cooper e collaboratori scoprirono che questi anticorpi innati appartengono alla classe delle IgM e si legano all'antigene riconosciuto in un trisaccaride nominato ervano danno endoK. *et al.*, 1993). Galili e colleghi hanno poi dimostrato che questo saccaride è tipico di mammiferi inferiori, ma non si riscontra invece nelle cellule dei primati, dell'uomo e le specie di scimmie del Vecchio Mondo (Galili U. *et al.*, 1988).

Nel corso degli anni si sono studiati vari metodi per superare il problema del rigetto iperacuto. Un primo approccio è stato quello di rimuovere gli anticorpi del ricevente tramite perfusione di siero *ex vivo*, plasmaferesi o neutralizzazione anticorpale, ma in seguito si è rivelato più efficace eliminare gli antigeni  $\alpha$ -Gal del donatore tramite l'ingegneria genetica (Cozzi E. *et al.*, 2005). Per prevenire i danni causati dall'attivazione della cascata del complemento, invece, un metodo consiste nel somministrare alcune sostanze capaci di inibire *in vivo* tale meccanismo (tra cui, ad esempio, il veleno di cobra,

inibitori di C1, anticorpi contro C5, etc.) ma i costi elevati e la comparsa di effetti collaterali hanno indotto la ricerca a ricorrere a nuove tecnologie. I primi suini geneticamente modificati ottenuti (Cozzi E. *et al.*, 1995; Cozzi E. *et al.*, 1997a; Cozzi E. *et al.*, 1997b), nonostante le difficoltà annesse all'ingegneria genetica, sono stati efficacemente impiegati nelle sperimentazioni e prevengono il rigetto iperacuto. In particolare, la transgenesi ha permesso infatti di produrre suini capaci di codificare per proteine umane regolatrici del complemento, tra cui hDAF (human Decay Accelerating Factor), MCP e CD46 (cofattori di membrana), e CD59 (Cozzi *et al.*, 2000). Grazie a questa serie di interventi, oggi il problema del rigetto iperacuto si considera superato.

Costituisce invece attualmente il maggior ostacolo per i ricercatori il **rigetto umorale acuto** (in inglese AHXR, Acute Humoral Xenograft Rejection), detto anche “rigetto ritardato”, che subentra dopo oltre 24 ore dal trapianto e si protrae per giorni o settimane. Istologicamente si riscontrano perdita dell'integrità endoteliale, stravasato di sangue, trombosi ed edema, associati a coagulopatia da consumo ed emorragia. Fin dall'esordio vi è deposizione di fibrina, che si amplifica col progredire del rigetto. In fase di progressione si ha inoltre deposito di immunoglobuline e di prodotti della coagulazione ed è presente anche un infiltrato cellulare, composto da neutrofili, macrofagi, linfociti T e Natural Killer (visto in Cozzi *et al.* 2005). Anche in questo caso il rigetto è dovuto a reazioni anticorpali associate ad attivazione del complemento. Kuwaki e collaboratori hanno dimostrato che gli anticorpi responsabili in questo tipo di rigetto possono essere diretti sia contro antigeni di tipo Gal che non-Gal poiché anche soggetti trapiantati con organi suini in cui erano stati precedentemente rimossi gli antigeni Gal (tramite ingegneria genetica) hanno manifestato segni di rigetto acuto (Kuwaki K. *et al.*, 2005).

Va notato quindi che nel rigetto iperacuto sono coinvolti principalmente anticorpi innati, che reagiscono contro l' epitopo  $\alpha$ -Gal presente su un saccaride sintetizzato dal suino ma non dal primate e che quindi reagiscono contro molecole del tutto “nuove” per il ricevente, mentre nel rigetto acuto vengono prodotte nuove immunoglobuline dopo il contatto del plasma del primate con cellule di maiale, in seguito alla incompatibilità esistente tra stessi tipi cellulari ma appartenenti a una specie discordante, cioè filogeneticamente lontana dalla scimmia.

Le evidenze che hanno permesso di stabilire che il rigetto acuto è causato in primo luogo da reazioni anticorpali sono le seguenti: 1) nell'organo rigettato si evidenzia un'alta concentrazione di anticorpi anti-suino; 2) i farmaci immunosoppressori prevengono o ritardano l'insorgenza del rigetto acuto; 3) la somministrazione intravenosa di un polimero equivalente ad  $\alpha$ -Gal lega gli anticorpi anti-Gal, sequestrandoli dal circolo ed abbassandone notevolmente il titolo; 4) l'immunoaferesi (cioè il sequestro degli xenoanticorpi dal circolo) eseguita pre e post-trapianto nel primate riduce gli effetti dannosi del rigetto acuto (Cozzi E. *et al.*, 2005).

Studi più recenti, effettuati sul babuino, hanno individuato che la più probabile causa dell'attivazione della cascata del complemento, che si verifica durante il rigetto acuto, è il TF (Tissue Factor, conosciuto anche come CD142). La discrepanza esistente tra il TF espresso da anticorpi e piastrine del ricevente e quello espresso dalle cellule endoteliali del suino scatena le trombosi e i disordini della coagulazione riscontrabili in questa fase di rigetto (Lin C.C. *et al.*, 2010).

Per quanto il maggior problema immunologico per il ricevente sia costituito dal rigetto umorale acuto, non va sottovalutata l'importanza del terzo tipo di rigetto, il **rigetto cellulare acuto**. Questo tipo di rigetto, largamente studiato nell'allograpianto, non è stato invece approfondito nello xenotrapianto in quanto si verifica più raramente e in concomitanza con il rigetto umorale, quest'ultimo di priorità maggiore a causa della sua gravità (Schuurman H.J. *et al.*, 2003). Nel rigetto cellulare si ha infiltrato di macrofagi, linfociti T e B e Natural Killer, che possono causare gravi danni all'organo trapiantato e comprometterne la funzionalità; va però tenuto presente che questa evenienza si verificherebbe una volta superato il danno conseguente al rigetto umorale, che, ad oggi, è la prima minaccia per la sopravvivenza del ricevente. In aggiunta, il rigetto cellulare può essere sopito grazie all'utilizzo di farmaci immunosoppressori (Cozzi E. *et al.*, 2006).

Si è infine rilevato in alcuni casi il **rigetto cronico**, che però, nel caso dello xenotrapianto di rene, non fa in tempo ad insorgere a causa della breve sopravvivenza dei soggetti trapiantati che muoiono in fase di rigetto acuto (*Ibid.*).

## 2.2 - IL RIGETTO NELLO XENOTRAPIANTO DI PRECURSORI NEURONALI

Il sistema nervoso centrale è considerato “privilegiato” dal punto di vista immunologico poiché le reazioni immunitarie che avvengono in questo distretto sono meno violente di quelle che accadono in altre sedi dell’organismo. Esso è isolato dal resto del circolo sistemico tramite la barriera emato-encefalica, non è drenato da un suo sistema linfatico e non possiede un assetto specifico di cellule presentanti l’antigene (APCs). Nonostante queste caratteristiche, è stato dimostrato che linfociti attivati sono in grado di oltrepassare la barriera, che alcune cellule come, ad esempio, quelle della microglia possono anch’esse presentare l’antigene e che esiste un drenaggio linfatico attraverso il linfonodo cervicale profondo. Va inoltre tenuto presente che, nella procedura di inoculo di precursori neuronali nell’encefalo del ricevente, la barriera emato-encefalica viene inevitabilmente danneggiata. Da questi aspetti deriva che anche lo xenotrapianto di cellule neuronali va incontro a meccanismi di rigetto, anche se differenti da quelli precedentemente descritti nel caso di trapianto di organi solidi. Una peculiarità del trapianto cellulare, a differenza di quello di organi o tessuti, è quella di non avere l’apporto del sistema vascolare del donatore, ma di limitarsi a subire passivamente la vascolarizzazione da parte dei vasi del ricevente. In questo caso, il rigetto vascolare è fortemente limitato poiché non avviene un’interazione tra antigeni delle cellule endoteliali del donatore con gli anticorpi circolanti del ricevente (Barker R. e Hakan W., 2004).

Larsson e collaboratori hanno studiato le reazioni anticorpali in ratti e topi sottoposti a trapianto di cellule neuronali embrionali di suino e hanno dimostrato che in queste due specie di roditori i meccanismi di rigetto sono diversi (Larsson C. et al., 2001). Nei diversi modelli di riferimento è però emerso che i linfociti T hanno un ruolo determinante nell’innescare il rigetto (Melchior et al., 2002). In seguito a tale evidenza, risulterebbe perciò fondamentale l’impiego di farmaci immunosoppressori, quali gli inibitori della Calcineurina, che però nel caso specifico si rivelano inefficaci poiché difficilmente oltrepassano la barriera emato-encefalica (Tsiji et al., 1993).

Attualmente, il miglior metodo per prevenire la reazione infiammatoria innescata dai linfociti T risulta consistere nel produrre suini transgenici per hCTLA4-Ig (Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4-Immunoglobulin). Le molecole costimolatorie CD28 e CTLA4 sono entrambe capaci di regolare l’attività dei linfociti T fungendo da recettori per

i ligandi presenti sulla superficie di cellule presentanti l'antigene (APCs) ma, a differenza di CD28, CTLA4 è una molecola inibitoria. I meccanismi alla base di questo segnale inibitorio non sono ancora stati chiariti (Lin H. et al., 1998; Fallarino F. et al., 1998), ma è emerso che CTLA4 è in grado di diminuire la risposta infiammatoria mediata dai linfociti T poiché compete con CD28 per gli stessi ligandi (Badin R.A et al., 2009; Badin R.A. et al., 2011). Diversi studi condotti su topi sottoposti ad allotrapianto o a xenotrapianto, hanno provato infatti che la somministrazione dell'immunoglobulina di fusione CTLA4-Ig è in grado di prevenire il rigetto (Grohmann U. et al., 2002).

### 3) TERAPIA IMMUNOSOPPRESSIVA E IMMUNOMODULATORIA

Come evidenziato nei paragrafi precedenti, la principale sfida per i ricercatori resta oggi quella di superare il problema del rigetto. Le tecnologie di ingegneria genetica applicate dimostrano comprovata efficacia nel limitarlo ma non sono di per sé sufficienti a prevenirlo. Per ridurre notevolmente la risposta immunitaria del ricevente e poter preservare l'integrità dell'organo trapiantato, risulta dunque indispensabile affiancare alle strategie sopra descritte una terapia immunosoppressiva.

La terapia immunosoppressiva applicata ai pazienti trapiantati mira in primo luogo a diminuire la quantità e l'attività dei loro globuli bianchi, deputati all'attacco di strutture riconosciute come "*non self*" dall'organismo, come sono appunto le cellule dell'organo trapiantato. Questo ruolo è svolto in primo luogo dai linfociti B e T, principale bersaglio dei farmaci immunomodulatori impiegati. Va tuttavia tenuto presente che l'immunosoppressione sortisce, sì, un effetto positivo nel prevenire il rigetto ma, allo stesso tempo, predispone inevitabilmente il soggetto trattato ad essere più suscettibile alle infezioni; è quindi fondamentale monitorare costantemente le condizioni cliniche dei pazienti sottoposti a tale terapia.

Di seguito vengono descritte le terapie immunosoppressive e immunomodulatorie utilizzate nei primati sottoposti a xenotrapianto di rene e di precursori neuronali in questo progetto sperimentale. I trattamenti farmacologici sono suddivisi in due fasi: una fase di induzione e una fase di mantenimento. Per l'induzione vengono somministrati Ciclofosfamide (CyP) e anticorpo monoclonale anti CD20 (Rituximab), affiancati alla

somministrazione di Ciclosporina A e Micofenolato di Sodio come adiuvanti ed infine di GAS 914, Immunoglobulina IV e anticorpo monoclonale e anti CD154 come “collaterals”. Nella fase di mantenimento vengono invece somministrati ciclosporina A, micofenolato di sodio e corticosteroidi (Cozzi E. *et al.*, 2002).

### 3.1 - CICLOFOSFAMIDE

La ciclofosfamide (CYP) è un agente alchilante capace di legarsi ai filamenti del DNA. E' considerata un pro-farmaco che per acquisire la sua proprietà alchilante necessita di bioattivazione in sede epatica, dove è metabolizzata nei suoi due metaboliti citotossici: acroleina e mostarda fosforamidica. Il meccanismo d'azione consiste nell'interferire sul ciclo cellulare bloccando le mitosi cellulari. Questa molecola viene impiegata principalmente come farmaco antitumorale, ma il suo effetto si rivela idoneo anche nel caso della terapia anti-rigetto post trapianto. A dosaggi medio-bassi essa interferisce con determinate fasi del ciclo cellulare, mentre a dosaggio elevato essa è in grado di bloccarlo in ogni sua fase (Boothe D. M., 2001). Gli alchilanti sono citotossici soprattutto per cellule in rapida crescita, come ad esempio le cellule tumorali, i linfociti B e T e le cellule del midollo osseo (Booth e McDonald, 1991). Uno dei più gravi effetti collaterali riportati per questo farmaco è infatti la mielotossicità, caratterizzata da marcata leucopenia, cui possono aggiungersi talvolta anemia e trombocitopenia (Carli S., Ormas P., Re G., Soldani G. 2009). Lam e collaboratori hanno sottolineato come la ciclofosfamide contribuisca ad aggravare l'anemia di macachi sottoposti a trapianto di rene (Lam *et al.*, 2002). Altri effetti collaterali riportati per questo farmaco sono nausea e vomito, che tuttavia insorgono raramente; talora può comparire alopecia e in alcuni casi è insorta una cistite emorragica, probabilmente causata dall'acroleina che viene eliminata nell'urina e che provoca irritazione della mucosa vescicale (Adams R., 1999). Poiché il farmaco è eliminato principalmente per via renale, è opportuno prestare molta cautela nei dosaggi e nei tempi di somministrazione, specialmente in pazienti in cui la funzionalità renale sia compromessa. La ciclofosfamide è disponibile sotto forma di preparazioni iniettabili per via endovenosa, o in compresse somministrabili per via orale (Boothe D. M., 2001).

### 3.2 - CICLOSPORINA A

La ciclosporina A (CyA) è uno dei farmaci più importanti impiegati nella prevenzione del rigetto post trapianto. Essa ha un effetto inibitorio molto selettivo e specifico sui linfociti T, bloccandone le fasi più precoci di differenziazione. Il suo effetto immunosoppressore si esplica in seguito al legame con la ciclofilina, un recettore proteico citoplasmatico. Tale complesso così formato si lega a sua volta alla calcineurina, inibendone l'attività calcio-dipendente di defosforilazione di proteine regolatrici. In questo modo vengono bloccate le trascrizioni di geni codificanti per citochine specifiche quali l'interleuchina 2 (IL-2), per alcuni protooncogeni e per recettori delle citochine. La produzione di IL-2 è anche limitata dal fatto che la ciclosporina induce un aumento nell'espressione del *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), un potente inibitore della proliferazione dei linfociti T (Hardman J.G., Limbird L.E. *et al.*, 1996). Il farmaco non ha invece alcun effetto sui Linfociti B. La ciclosporina è caratterizzata da uno stretto indice terapeutico nei pazienti umani, in cui la nefrotossicità rappresenta il maggiore effetto collaterale. Tale effetto dannoso viene esacerbato quando il farmaco è usato in associazione con altre molecole citotossiche e va maneggiato con cautela in pazienti sottoposti a trapianto di rene. Sono stati segnalati anche casi, sebbene più rari, di epatotossicità, neurotossicità e ipertensione. Le formulazioni disponibili sono una preparazione iniettabile per uso endovenoso e due diversi tipi di preparazioni per uso orale. La ciclosporina viene spesso utilizzata in associazione con altri farmaci, quali i glucocorticoidi (Boothe D. M., 2001).

### 3.3 - MICOFENOLATO SODICO

Il micofenolato di sodio (MPS) è un analogo del micofenolato mofetile ma è prodotto in una nuova formulazione che è caratterizzata da una minore enterotossicità (Budde K., Curtis J. *et al.*, 2003). Da questo pro-farmaco deriva l'acido micofenolico (MPA), che è un potente e selettivo inibitore reversibile della inosina monofosfato deidrogenasi, un enzima necessario alla sintesi delle purine. Il farmaco è classificato come antimetabolita e mostra selettività per i linfociti, in quanto le purine sono fondamentali per la loro sintesi *ex novo* dal DNA (Boothe D. M., 2001). A differenza di altri immunosoppressori, questo farmaco è caratterizzato da minore nefrotossicità, tanto che Weir e collaboratori lo ritengono particolarmente adatto alla terapia di mantenimento contro il rigetto cronico poiché può



essere somministrato per un lungo periodo senza causare gravi effetti collaterali. Pertanto il suo impiego, affiancato all'utilizzo di anticorpi monoclonali in fase di induzione, anziché di farmaci fortemente citotossici, potrebbe preservare a lungo la funzionalità dell'organo trapiantato nonché prolungare la vita del paziente (Weir M.R. *et al.*, 2001).

### 3.4 - RITUXIMAB

Il Rituximab è un anticorpo monoclonale chimerico (ovvero costituito per il 70% da sequenze umane) diretto contro l'antigene CD20 specifico dei linfociti B. Esso inibisce la proliferazione di linfociti B sia normali sia tumorali, e sembra capace di indurre anche l'apoptosi. Per tale ragione questo farmaco è principalmente impiegato nella terapia dei linfomi non-Hodgkin's ma viene utilizzato anche per la cura di malattie autoimmuni e come terapia anti-rigetto nel caso del trapianto di rene. Inoltre è associato ad effetti collaterali lievi, a differenza di altri farmaci citotossici. Tali effetti, per lo più riconducibili a nausea, febbre e lieve ipotensione, si scatenano solitamente in seguito alla prima somministrazione ma vanno via via migliorando col progredire del trattamento. Al Rituximab non sono associati effetti di pancitopenia, a differenza di quanto riportato per le associazioni dei farmaci immunosoppressori comunemente impiegati (Coiffier B. *et al.*, 1998).

### 3.5 - GAS 914

Il GAS 914 è un polimero di sintesi con struttura chimica molto simile a quella degli antigeni naturali  $\alpha$ -Gal presentati sulle membrane cellulari del suino e riconosciuti dagli anticorpi (Ig-M) specifici del primate non umano. Questa molecola è così simile ai suddetti antigeni che viene anch'essa riconosciuta e legata dagli anticorpi del primate, ma, a differenza degli antigeni del suino, tale interazione non scatena alcuna risposta immunitaria. Il GAS 914 viene somministrato per via endovenosa affinché possa captare, con l'elevata avidità che contraddistingue i polimeri, gli anticorpi anti- $\alpha$ Gal circolanti nel plasma del ricevente. In questo modo è possibile diminuire di oltre il 90% la quantità di anticorpi circolanti anti- $\alpha$ Gal del primate prevenendo la reazione di rigetto vascolare dell'ospite. La molecola è efficace e sicura in quanto non è dotata di proprietà immunogeniche né è mai stata associata a casi di tossicità per il ricevente (Katopodis A.G. *et al.*, 2002).

### 3.6 - IMMUNOGLOBULINA IV

Alcuni pazienti in attesa di trapianto possiedono un elevato titolo di anticorpi anti-IgG del donatore, detti anche anticorpi anti-HLA (Human Leukocytes Antigen). Questi anticorpi si sviluppano in seguito all'esposizione del siero del paziente ad antigeni HLA "non self" che generalmente vengono a contatto con esso in seguito a trasfusioni, trapianto o anche nel caso della gravidanza (infatti le donne mostrano alti titoli di tali anticorpi anche quando non precedentemente sottoposte a trapianti o trasfusioni). La presenza di questi anticorpi rappresenta una controindicazione per l'intervento di trapianto poiché essi potenziano la risposta immunitaria del ricevente. Diversi ricercatori hanno recentemente dimostrato che l'infusione di IgIV nei pazienti con alti titoli di anticorpi anti-HLA si è rivelata efficace nell'abbassarli, rendendo così più sostenibile l'intervento di trapianto. L'IgIV è dotata infatti di potenti effetti immunomodulatori; essa riduce non solo l'allosensibilizzazione, ma anche il danno da ischemia-riperfusion e il numero di casi di insorgenza di rigetto acuto, migliorando le aspettative di sopravvivenza del ricevente. I meccanismi d'azione alla base di questi effetti modulatori sono attualmente in fase di studio. Tra questi sono stati ipotizzati: una attività anti-citochine e l'inibizione della trascrizione genica per le citochine, un'attività anti T-cell receptor e anti-CD4, la capacità di indurre apoptosi dei linfociti B *in vitro* e di inibire l'attivazione dei linfociti T, etc. Sebbene la somministrazione di IgIV non sia di per sé sufficiente ad inibire il rigetto, è stata da più autori riconosciuta la sua efficacia nel ridurre alcuni dei meccanismi alla base di esso. Questa terapia si prospetta quindi molto indicata per migliorare la tolleranza immunologica del ricevente, affiancata ad altre strategie immunomodulatrici comunemente applicate a tale scopo (Glotz D. *et al.*, 2002; Jordan S.C. *et al.*, 2004).

### 3.7 - ANTI CD154 (LIGANDO CD40)

La costimolazione delle proteine regolatrici CD40 e CD154 espresse dai linfociti T esercita un ruolo fondamentale per il meccanismo di rigetto post-trapianto. La somministrazione dell'anticorpo monoclonale anti-CD154 in diversi modelli animali sottoposti a trapianto ha dato esito ad un prolungamento della sopravvivenza dei pazienti. Maurik e colleghi hanno tuttavia dimostrato tramite studi condotti sul topo che questa terapia non è efficace nel bloccare la risposta immunitaria cellulo-mediata dei linfociti CD8+. Per ottimizzare quindi l'effetto anti-rigetto dell'anticorpo monoclonale anti CD154

deve essere affiancato al suo utilizzo quello di un anticorpo monoclonale anti-CD8+ (Maurik *et al.*, 2002). Graca e collaboratori hanno dimostrato inoltre che la tolleranza immunitaria indotta dall'infusione di anticorpo anti CD154 viene trasmessa anche ai nuovi cloni di linfociti T. I nuovi linfociti T prodotti vengono riversati nel plasma entrando in contatto coi linfociti T già trattati con anticorpo anti CD154 e, in circa sei settimane, divengono a loro volta tollerati (Graca *et al.*, 2000).

### 3.8 - CORTICOSTEROIDI

I corticosteroidi (CS) sono usati da soli o, più spesso, in combinazione con altri farmaci immunosoppressori nella prevenzione contro il rigetto di trapianto. Generalmente vengono utilizzati prednisone e prednisolone. Queste sostanze riescono infatti ad inibire la proliferazione dei linfociti T, gli anticorpi da essi prodotti e la trascrizione genica di alcune citochine (IL-1, IL-2, IL-6, interferone  $\alpha$  e TNF- $\alpha$ ). I corticosteroidi svolgono inoltre una funzione antiinfiammatoria aspecifica ed inibiscono la diapedesi leucocitaria (Hardman J.G., Limbird L.E. *et al.*, 1996). I principali effetti indesiderati conseguenti all'utilizzo di questi farmaci per trattamenti prolungati sono: l'aumento di suscettibilità alle infezioni, il rischio di sviluppare diabete mellito, insufficienza renale, ipertensione, ipercolesterolemia e sindromi di Cushing iatrogene (Boothe D. M., 2001).

## SCOPO

*In letteratura sono reperibili scarse informazioni sull'ematologia dei primati non umani ed in particolare della specie *Macaca fascicularis*. Uno studio dettagliato in questo contesto è stato condotto da Provencher-Bolliger A. e Fontaine M. nel 1998. Questi autori hanno analizzato il midollo osseo di soggetti sani di *M. fascicularis* ed hanno messo in relazione i dati ottenuti con i dati relativi all'esame emocromocitometrico, per stabilire la normale distribuzione cellulare del midollo ematopoietico in questa specie. Nella maggior parte dei casi però, i primati sono impiegati come modelli sperimentali e sottoposti a stress di diverso tipo, pertanto i dati clinici ottenuti si discostano dalla norma. Nel caso specifico del presente lavoro, il pool di primati valutati è stato sottoposto a xenotrapianto e/o ad immunosoppressione; lo scopo è dunque quello di constatare se i loro parametri ematologici si discostano dalla norma e quali alterazioni si riscontrano.*

*Questa valutazione si basa pertanto sulle analisi di:*

- morfologia e conte differenziali degli strisci midollari terminali in primati sottoposti a xenotrapianto di rene e di precursori neuronali;
- striscio di sangue periferico e i dati ematologici relativi ai primati esaminati;

*Sulla base dei dati estrapolati, si procederà quindi a correlare il tipo di alterazioni riscontrate con la storia clinica dei soggetti per mettere in rilievo eventuali associazioni tra tipo di trapianto e/o di terapia ricevuti e lesioni midollari riscontrate.*

## MATERIALI E METODI

### 4) PRIMATI

Tra i 114 primati di specie *Macaca fascicularis* sottoposti a xenotrapianto a scopo sperimentale dal CORIT (IZS delle Venezie, Legnaro, PD) negli anni 2000-2013 sono stati selezionati i soggetti di cui erano disponibili gli strisci ematici, gli striscio midollare e i dati degli esami emocromocitometrici.

I primati selezionati provengono da allevamenti autorizzati delle Isole Mauritius (Centre de Recherche Primatologique, Fernet, Mahelbourg), della Cina (Gaoyao Kangda Laboratory Animal Science & Tecnology Co., LTD China) o delle Filippine (SINCONBRE LTD di Malaka City; Simian Conservation Breeding and Research Center Inc., Tanay).

Tutti gli animali sono stati sottoposti a screening virologico effettuato presso la ditta fornitrice, per escludere la presenza di agenti infettivi quali Ebola, Marburg, Herpesvirus B, HIV1/2, SIV, EBV (Epstein Barr Virus), SRV (Simian Retro Virus) RhCMV (Rhesus Cytomegalovirus). Sono stati effettuati all'arrivo un esame ematobiochimico, microbiologico e parassitologico di tutti i soggetti e la determinazione del gruppo sanguigno; inoltre, all'arrivo e ogni 6 mesi si effettuava lo skin test per l'accertamento antitubercolare

In totale, i primati selezionati sono 62, di cui 32 femmine e 24 maschi, di età compresa tra 3 e 5 anni. Di questi, 36 sono stati sottoposti a xenotrapianto di rene (gruppo XR, "xenotrapianto rene") e 17 a xenotrapianto di precursori neuronali (gruppo XPN, "xenotrapianto precursori neuronali").

Quattro primati sono stati invece sottoposti ad autotrapianto di rene e non sono stati immunosoppressi (la descrizione del progetto di ricerca non è oggetto del presente lavoro); tre primati sono stati trattati con tossina MPTP, ma successivamente non sottoposti a xenotrapianto di precursori neuronali né a terapia immunosoppressiva.

Questi 7 soggetti, non sottoposti a xenotrapianto e senza terapia immunosoppressiva, sono stati considerati come un primo gruppo di confronto (gruppo NIS, "non immunosoppressi").

Infine 2 animali non sono stati sottoposti ad alcun intervento di trapianto, ma sono stati impiegati per uno studio di farmacocinetica e quindi immunosoppressi con gli stessi protocolli utilizzati per gli altri primati. Questi animali sono stati considerati come un secondo gruppo di confronto (gruppo IS, “immunosoppressi”).

L'utilizzo di animali-confronto è stato necessario poiché, per motivazioni di carattere etico, non è possibile sottoporre ad eutanasia primati non umani sani, se non in un numero limitato di casi, che rappresentano solo rare eccezioni. Per questo motivo, nel presente lavoro non sono inclusi animali-controllo propriamente detti, ma solamente animali che non hanno subito l'intera procedura di xenotrapianto e immunosoppressione e i dati ottenuti sono stati comparati con i parametri ematologici stabiliti per la specie *M. fascicularis*, ricavati da un pool di macachi sani concesso per una ricerca condotta nel 1998 (Provencher-Bolliger A. e Fontaine M. nel 1998).

Anche per la ricerca sopraccitata, come nel caso di questo lavoro, sono stati impiegati macachi di sesso sia maschile che femminile e sessualmente maturi, dai quali è stato effettuato un prelievo di midollo osseo dal femore entro pochi minuti dall'eutanasia. I campioni ottenuti sono stati allestiti ed analizzati con metodiche sovrapponibili a quelle descritte in questo elaborato.

#### 4.1 - PRIMATI SOTTOPOSTI A XENOTRAPIANTO DI RENE

Per eseguire l'intervento di xenotrapianto di rene sono stati utilizzati 36 suini donatori caratterizzati da transgenesi volte all'espressione di proteine umane del complemento e regolatrici della coagulazione (hDAF = human Decay Accelerating Factor, hTM = human trombomodulin, hEPCR = human endothelial protein C receptor) e/o knock out per alcuni epitopi  $\alpha$ Gal (GalKO) (Sachs D.H. e Galli C., 2009; Cozzi *et al.*, 1997a; Cozzi E. *et al.*, 2000a) come mostrato in TAB 1.

**Tabella 1:** distribuzione delle tipologie di transgenesi e/o knock out dei suini donatori di rene per lo xenotrapianto (hDAF=human Decay Accelerating Factor, GalKO=Gal knockout, hTM=human trombomodulin, hEPCR=human endothelial protein C receptor).

SUINI (n)	TRANSGENESI-KNOCK OUT
7	hDAF
8	GalKO
4	hDAF + GalKO
2	hDAF + GalKO + Cd55 + hTM + hEPCR
15	NESSUNA TRANSGENESI

I 36 primati sottoposti a xenotrapianto di rene sono stati suddivisi in base alla terapia immunosoppressiva di induzione e di mantenimento (TAB 2). Sempre in TAB 2 sono riportati inoltre i 2\* primati non sottoposti a trapianto ma immunosoppressi, e i 4 primati sottoposti ad intervento di autotrapianto e non sottoposti a terapia immunosoppressiva.

**Tabella 2:** Primati xenotrapiantati di rene sottoposti a terapia immunosoppressiva di induzione e di mantenimento. Nell'ultima riga sono riportati i 4 primati sottoposti a autotrapianto di rene e non sottoposti a terapia immunosoppressiva (CyP=ciclofosfamide, IVIg=ImmunoglobulinaIV, CyA=ciclosporina A, MPS=micofenolato sodico, CS=corticosteroidi).

PRIMATI (n)	TERAPIA INDUZIONE	TERAPIA MANTENIMENTO
18	CyP + GAS 914	CyA + MPS + CS
10	CyP	CyA + MPS + CS
2	Rituximab	CyA + MPS + CS
3	Rituximab + IVIg	CyA + MPS + CS
3	Anti CD154	CyA + MPS + CS
2*	CyP	CyA + MPS + CS
4	—	—

#### 4.2 - PRIMATI SOTTOPOSTI A XENOTRAPIANTO DI PRECURSORI NEURONALI

Con i precursori neuronali ottenuti da circa 10 embrioni suini (transgenici per CTLA4Ig o wild-type) per primate, 17 *Macaca fascicularis* sono stati sottoposti a xenotrapianto, tramite inoculazione diretta delle cellule neuronali stesse in stereotassi, nel putamen sinistro. I primati sono stati sottoposti a terapia immunosoppressiva di induzione con CyA, GAS 914 e MPS e di mantenimento con CyA, MPS e CS (Tab 3). Altri 3 primati, sottoposti ad intossicazione e non trapiantati e immunosoppressi sono stati utilizzati come confronto.

**Tabella 3:** Primati xenotrapiantati di neuroni sottoposti a terapia immunosoppressiva di induzione e di mantenimento. Nell'ultima riga sono riportati i 3 primati sottoposti a intossicazione con MPTP ma non trapiantati e non sottoposti a terapia immunosoppressiva.

PRIMATI (n)	TERAPIA INDUZIONE	TERAPIA MANTENIMENTO
17	CyA + GAS 914 + MPS	CyA + MPS + CS
3	—	—

#### 5) PRELIEVO e ANALISI DEL MIDOLLO OSSEO

I 62 campioni di midollo osseo selezionati sono stati ottenuti al momento della necropsia con tecnica di seguito descritta.

La necropsia è stata eseguita nella Sala Necropsie dell'Università di Padova a Legnaro. Il personale responsabile era composto da un medico veterinario anatomico-patologo, dai veterinari dello stabulario, dal personale tecnico dello stabulario e dell'università.

Entro i primi 20 minuti dalla morte dell'animale, veniva asportato uno dei due arti posteriori e prelevato il midollo osseo (come descritto da Reagan W.J. *et al*, 2011). Il femore, una volta isolato dai circostanti tessuti molli, è stato sezionato longitudinalmente con una sega circolare, in modo da rendere accessibile la cavità midollare contenuta al suo interno. Tramite specillo, si è asportata una porzione diafisaria di midollo che è stata strisciata su una serie di vetrini portaoggetti. In totale per ogni animale sono stati allestiti



circa 10-12 vetrini, in un piano di lavoro diverso da quello in cui avveniva la conservazione dei campioni biotipici in formalina, e sono stati fatti asciugare all'aria prima di essere inviati al laboratorio di istopatologia per la colorazione. Il midollo osseo non utilizzato per la preparazione dei vetrini è stato asportato e inserito all'interno di biocassette e fissato in formalina al 10% per la valutazione istologica. Anche l'epifisi prossimale del femore è stata fissata in formalina per valutare successivamente all'istologia il rapporto tra tessuto osseo e tessuto emopoietico.

Per la colorazione dei vetrini è stato impiegato un kit per colorazione May-Grunwald-Giemsa rapida (MGG QUICK STAIN 04-090805/L Bio Optica®) con la seguente procedura:

- immersione del vetrino 5 volte per 1 secondo nel fissativo (tra una immersione e l'altra si attende un istante che il liquido in eccesso sgoccioli);
- immersione del vetrino 5 volte per 1 secondo nell'Eosina in soluzione (facendo sgocciolare l'eccesso di liquido);
- immersione del vetrino 3-5 volte per 1 secondo nei coloranti tiazidici in soluzione (facendo sgocciolare l'eccesso di liquido);
- risciacquo del vetrino in acqua di fonte;
- asciugatura del vetrino all'aria.

Per l'analisi del preparato citologico di midollo osseo è stato utilizzato un microscopio ottico binoculare Olympus BX41. Il preparato è stato dapprima valutato a basso ingrandimento (obiettivo 4x-10x) per apprezzarne la cellularità e la qualità. I campioni selezionati per la valutazione ematologica erano tutti caratterizzati da buona cellularità e scarsa o nulla emodiluizione con presenza delle spicole, di una certa numerosità di adipociti e di megacariociti (indice di buona qualità dl prelievo).

La conta differenziale del midollo è stata eseguita tramite obiettivo a 60x e consiste nel contare un totale di almeno 500 cellule nucleate, distinguendone per ognuna la linea cellulare di appartenenza. Nella conta sono state incluse le cellule della linea eritroide e di quella mieloide, i linfociti, le plasmacellule, i macrofagi e i megacariociti. Altri tipi cellulari riscontrati solo occasionalmente nel midollo, quali gli osteoclasti, non sono stati inclusi nella conta. Anche cellule poco conservate e quindi inclassificabili non sono state contate.

Le percentuali di distribuzione ottenute dalla conta differenziale sono state utilizzate per calcolare il rapporto mieloidi/eritroidi (M:E). Questo rapporto indica la proporzione esistente tra comparto mieloide e comparto eritroide all'interno del midollo osseo. Il valore medio di M:E riportato per *M. fascicularis* è di 1.02 (con valore minimo di 0,67 e massimo di 1,85), come riportato da Provencher-Bolliger A. e Fontaine F. (1998). Inoltre è stato calcolato il Maturation index (MI), sia per la linea eritroide sia mieloide. Tale valore rappresenta il rapporto tra il numero di cellule appartenenti al comparto proliferativo e le cellule del comparto maturativo (Elmore S.A., 2006). Nello specifico, per la serie mieloide, le cellule appartenenti al comparto proliferativo sono i mieloblasti, i promielociti, i mielociti e i metamielociti. Granulociti a banda e segmentati appartengono invece al comparto maturativo. Per la serie eritroide, eritroblasti, prorubrociti e rubrociti sono cellule del comparto proliferativo, mentre i metarubrociti appartengono al comparto maturativo (Valli V.E. *et al.*, 2002).

## 6) STRISCI DI SANGUE PERIFERICO

I vetrini degli strisci di sangue periferico sono stati allestiti presso il laboratorio di analisi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delleVenezie, utilizzando il sangue prelevato dai primati al momento dell'eutanasia e conservato in provette contenenti EDTA. Per eseguire lo striscio, si versa una goccia di sangue a circa 1 cm dal bordo sabbato del vetrino portaoggetto e si appoggia delicatamente un secondo vetrino alla superficie del primo con inclinazione di circa 30° trascinandolo verso la goccia di sangue. Lo striscio così ottenuto va fatto asciugare all'aria. Una volta asciutto si procede alla colorazione May-Grunwald-Giemsa (vedi colorazione striscio midollare).

L'analisi dello striscio periferico è stata condotta utilizzando un microscopio ottico binoculare Olympus BX41®. A basso ingrandimento viene dapprima valutata la distribuzione degli eritrociti (stima dell'ematocrito) e l'eventuale presenza di aggregati piastrinici, cellule atipiche, etc. Ad ingrandimento 100x si procede alla conta delle cellule nucleate riscontrate fino ad un totale di 100 cellule, si valuta la morfologia delle cellule suddette nonché degli eritrociti e si stima infine se la quantità di piastrine riscontrate è accettabile, aumentata o ridotta. Nel caso in cui siano presenti globuli rossi nucleati, questi vengono inclusi nella conta delle cellule nucleate.

## 7) ESAME EMOCROMOCITOMETRICO

Gli esami ematobiochimici sempre provenienti dal sangue prelevato al momento dell'eutanasia sono stati eseguiti presso il laboratorio di analisi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie utilizzando un contaglobuli Cell Dyn 3500 (Abbott Diagnostics, Illinois, USA).

I parametri di interesse nel caso di questo lavoro sono stati i valori di emoglobina (Hgb g/dl) ed ematocrito (Hct %), la conta assoluta dei leucociti (Wbc K/ $\mu$ L) e le rispettive conte assolute di neutrofili e linfociti (K/ $\mu$ L). Poiché le conte degli altri leucociti quali eosinofili, basofili e monociti non superavano in nessun caso i 1000 elementi, non sono state incluse tra i parametri analizzati). Inoltre si è valutata la conta piastrinica (Plt K/ $\mu$ L) e la conta reticolocitaria (Ret K/ $\mu$ L).

## 8) ANALISI DEI DATI

L'analisi dei dati estrapolati è stata eseguita tramite supporto informatico (Microsoft Excel®).

La distribuzione dei dati ottenuti dall'intero set di campioni, sia per la citologia midollare sia per il sangue periferico e gli esami emocromocitometrici, è stata valutata attraverso la suddivisione in quartili e il calcolo di media, mediana, deviazione standard, valore minimo e massimo.

# RISULTATI

## 9) ANALISI DEL MIDOLLO OSSEO

### 9.1 - ANALISI QUANTITATIVA DEL MIDOLLO OSSEO

#### 9.1a- RAPPORTO MIELOIDI/ERITROIDI (M:E)

Il rapporto M:E in soggetti adulti e sani di *M. fascicularis* è mediamente di 1.02, con valore massimo riportato pari a 1.85 (Provencher-Bolliger A. e Fontaine M., 1998). Per la valutazione del M:E dei primati qui analizzati si farà riferimento a quest'ultimo valore, in quanto rappresenta il massimo valore di rapporto mieloidi/eritroidi riscontrato in soggetti sani.

Dei casi qui analizzati, solo 18 (di cui 7 fanno parte del gruppo XR, 6 del gruppo XPN, 4 al gruppo di confronto NIS e 1 al gruppo di confronto IS) mantengono valori inferiori a 1.85, con una percentuale media di eritroidi compresa tra 33% e 54% ed una percentuale media di mieloidi compresa tra 43% e 60%.

I rimanenti 44 primati presentano M:E elevato ( $> 1.85$ ) ed hanno percentuali di granulociti che superano il 50% e percentuali di eritroidi inferiori al 35% (con valore minimo di 0.55% e massimo di 33.2%). Di questi, 29 fanno parte del gruppo XR, 11 del gruppo XPN, 3 al gruppo di confronto NIS e 1 al gruppo di confronto IS

La tabella 4 indica la suddivisione in quartili del rapporto mieloidi/eritroidi calcolati sul totale di campioni analizzati.

**Tabella 4**

TOT. CAMPIONI	M/E
I Quartile	1,71
II Quartile	2,72
III Quartile	5,45
IV Quartile	133,67

Vengono riportati in tabella 5 media, deviazione standard, mediana, valore minimo e valore massimo relativi al rapporto mieloidi/eritroidi calcolati sul totale dei primati valutati.

**Tabella 5**

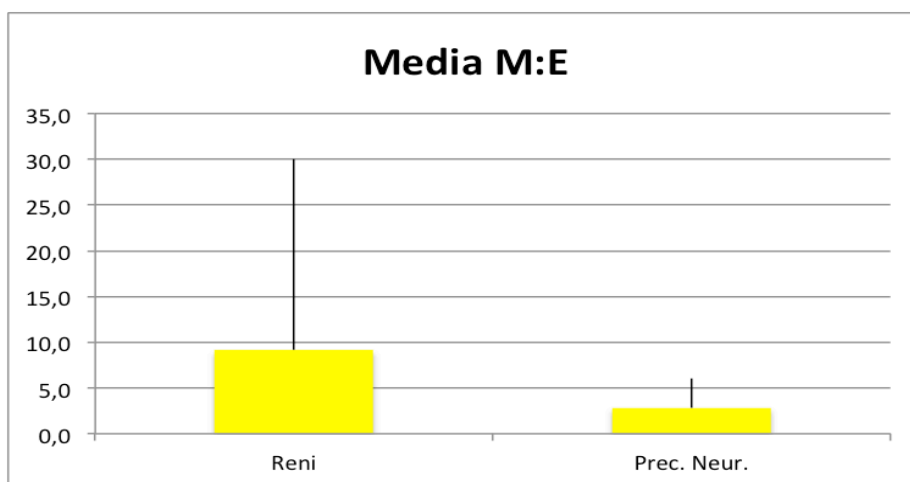
TOT. CAMPIONI	M/E
media	7,09
D.S.	17,46
mediana	2,72
min	0,80
max	133,67

In 16 casi di quelli sopra descritti il M:E supera il valore del III quartile ( $> 5.45$ ) e le percentuali di granulociti superano il 50% mentre quelle degli eritroidi inferiori al 15%.

Di questi, solamente un soggetto (1) appartiene al gruppo XPN mentre gli altri casi appartengono tutti al gruppo XR.

Il grafico 1 descrive media e deviazione standard del M:E riferite ai 2 gruppi XR e XPN (Per l'esiguità del numero di campioni che li costituiscono, i gruppi NIS e IS non sono stati inclusi nei grafici).

**Grafico 1**



### 9.1b- MATURATION INDEX (M:I) MIELOIDE

Il Maturation Index mieloide e quello eritroide nei mammiferi devono essere di circa 1:4 (Valli V.E. *et al.*, 2002). Negli animali analizzati solo 5 casi presentano un valore M:I inferiore a 0.25, di cui 2 membri appartenengono al gruppo XR, 1 membro al gruppo XPN e 2 membri al gruppo di confronto NIS.

In tabella 6 sono riportati la suddivisione in quartili del maturation index mieloide calcolati sul totale di campioni analizzati.

**Tabella 6**

TOT. CAMPIONI	M.I. (M)
I Quartile	0,41
II Quartile	0,56
III Quartile	0,96
IV Quartile	34,13

Vengono riportati in tabella 7 media, deviazione standard, mediana, valore minimo e valore massimo relativi al maturation index mieloide calcolati sul totale di campioni analizzati.

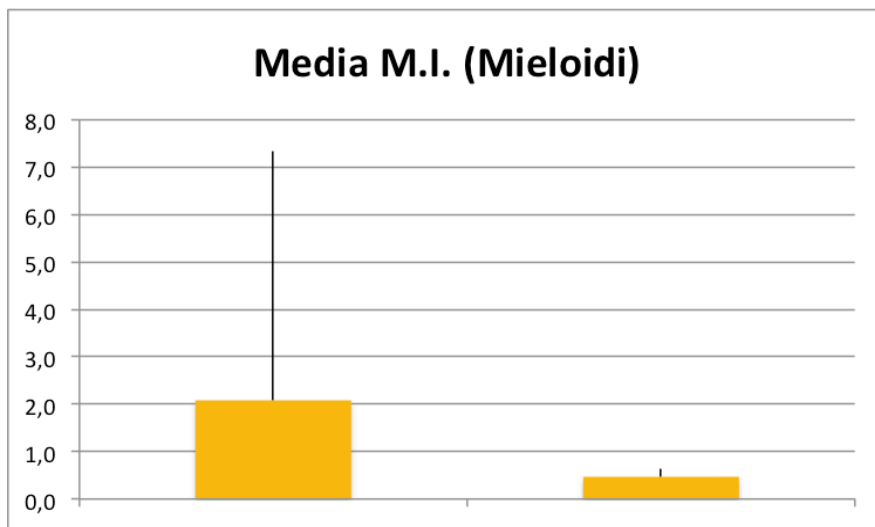
**Tabella 7**

TOT. CAMPIONI	M.I. (M)
Media	1,55
D.S.	4,39
Mediana	0,56
Min	0,17
Max	34,13

I rimanenti 57 primati hanno valori di M:I superiori a 0.25. Di questi, 34 appartengono al gruppo XR, 16 al gruppo XPN, 5 al gruppo di confronto NIS e 2 al gruppo di confronto IS. In 16 animali il M:I supera il valore del terzo quartile (0.96). Questi soggetti con maturation index mieloide più elevato sono rappresentati da: un (1) animale del gruppo XPN, 13 animali del gruppo XR e da 2 animali del gruppo di confronto IS.

Il grafico 2 descrive media e deviazione standard del M.I mieloide riferite ai 2 gruppi XR e XPN.

**Grafico 2**



#### 9.1c- MATURATION INDEX (M:I) ERITROIDE

Un solo animale (appartenente al gruppo XR) presenta un M:I eritroide normale pari a 0.25.

In tabella 8 sono riportati la suddivisione in quartili del maturation index eritroide calcolati sul totale di campioni

**Tabella 8**

TOT. CAMPIONI	M.I. (E)
I Quartile	0,63
II Quartile	1,17
III Quartile	2,32
IV Quartile	36

Vengono riportati in tabella 9 media, deviazione standard, mediana, valore minimo e valore massimo relativi al maturation index eritroide calcolati sul totale di campioni

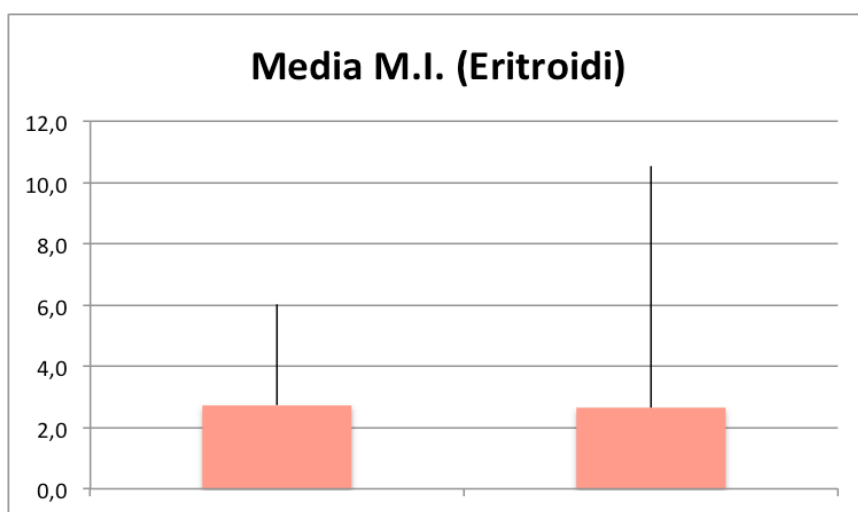
**Tabella 9**

TOT. CAMPIONI	M.I. (E)
media	2,71
D.S.	5,21
mediana	1,17
min	0,25
max	36

Tutti i casi analizzati eccetto uno hanno M:I eritroide  $> 0.25$ . L'insieme di tali casi con maturation index eritroide aumentato è composto da 35 membri del gruppo XR e dalla totalità dei campioni che compongono i gruppi XPN, NIS e IS. In 17 primati il M:I eritroide supera il valore del terzo quartile ( $> 2.3$ ). Rispettivamente questi casi sono composti da: 14 membri del gruppo XR, 2 di quello XPN e 1 del gruppo di confronto IS.

Il grafico 3 descrive media e deviazione standard del M.I eritroide riferite ai 2 gruppi XR e XPN.

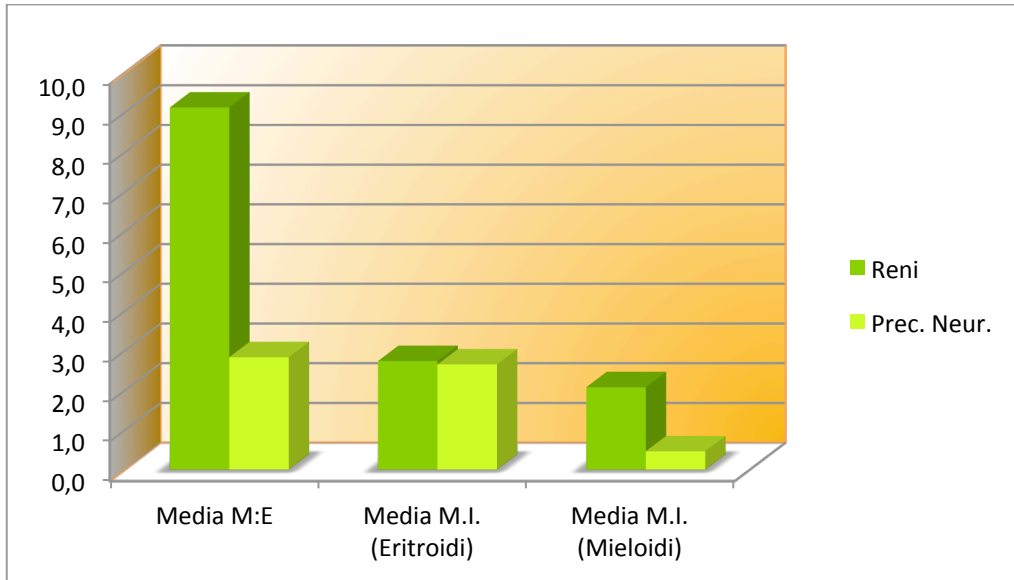
**Grafico 3**





Nel Grafico 4 sono riassunte le medie dei 3 indici sopra valutati (M:E, M.I mieloide, M.I eritroide) per i 2 gruppi XR e XPN.

**Grafico 4**



#### 9.1d- ALTRE CELLULE

##### MACROFAGI:

I macrofagi sono cellule normalmente presenti nel midollo osseo ma che di solito non costituiscono una delle popolazioni cellulari maggiormente rappresentative di questo tessuto. In mancanza di riferimenti bibliografici per questo specifico parametro abbiamo considerato troppo rappresentati nel midollo i macrofagi quando superiori al 5%.

In 2 animali, appartenenti al gruppo XR, i macrofagi rappresentano più del 5% delle cellule nucleate totali con valori rispettivamente di 8.4% e 5.7%. In tutti gli altri soggetti i macrofagi non raggiungono mai percentuali superiori a 2%.

##### LINFOCITI:

In 23 animali non sono stati osservati linfociti durante l'analisi differenziale del midollo e sono distribuiti nei 4 gruppi come segue: 12 campioni del gruppo XR, 6 campioni del gruppo XPN, 3 del gruppo di confronto NIS e 2 del gruppo di confronto IS.

In Tabella 10 le percentuali di linfociti di tutti i campioni analizzati sono suddivise in quartili.

**Tabella 10**

TOT. CAMPIONI	LINFOCITI
I Quartile	0
II Quartile	1,29
III Quartile	3,26
IV Quartile	21,85

16 casi presentano percentuali di linfociti che superano il valore del terzo quartile (3.25) e sono riconducibili a 13 primati del gruppo XR, a 2 del gruppo XPN, e ad uno (1) del gruppo di confronto NIS.

Per i linfociti, in mancanza di riferimenti bibliografici, abbiamo considerato che siano troppo rappresentati nel midollo quando superiori al 10%.

Tra i campioni che hanno linfociti oltre il valore del terzo quartile, in 6 di questi (appartenenti al gruppo XR) tali cellule rappresentavano più del 10% delle cellule nucleate totali.

Tutti gli altri campioni, tra cui i rimanenti 3 del gruppo di confronto NIS, avevano percentuali di linfociti superiori a 0 ma non erano distribuiti oltre il terzo quartile.

#### PLASMACELLULE

36 primati hanno percentuali di plasmacellule comprese tra 1.4% e 4.5%.

In Tabella 11 le percentuali di plasmacellule del totale dei primati vengono suddivise in quartili.

**Tabella 11**

TOT. CAMPIONI	PLASMACELLULE
I Quartile	1,70
II Quartile	2,51
III Quartile	4,56
IV Quartile	17,93

In 16 animali le plasmacellule superano il valore del terzo quartile (4.5), con percentuale minima di 4.6% e massima pari a 17.9%. Di questi, 14 appartengono al gruppo XR, 2 al gruppo XPN, uno (1) al gruppo confronto IS e uno (1) a quello NIS. 4 tra quelli del gruppo XR avevano anche una percentuale di linfociti superiore al 10% (su un totale di 6 animali con tale livello di linfocitosi).

## MEGACARIOCITI

Per i megacariociti, come per i macrofagi, il numero di elementi contati non deve essere di norma elevato. In mancanza di riferimenti bibliografici per questo specifico parametro abbiamo considerato troppo rappresentati nel midollo i megacariociti quando superiori al 5%.

Solo un (1) caso appartenente al gruppo XR aveva più del 5% di megacariociti sul totale di cellule nucleate (con percentuale pari a 5.04 % - il valore massimo registrato per i megacariociti tra tutti gli altri casi è 1.94%).

## 9.2 - ANALISI QUALITATIVA DEL MIDOLLO OSSEO

Per quanto riguarda la morfologia delle cellule osservate nei preparati citologici di midollo, verranno di seguito descritte le alterazioni più frequentemente rilevate.

A carico di rubroblasti e prorubrociti e, meno frequentemente, anche a carico dei mieloblasti, sono state osservate vacuolizzazioni citoplasmatiche. In alcuni casi tali vacuolizzazioni si sono riscontrate anche nel nucleo di queste cellule.

I metarubrociti spesso presentavano scarsa componente citoplasmatica e dimensioni ridotte.

I neutrofili segmentati presentavano nella maggior parte dei preparati analizzati nuclei ad anello, mentre in altri casi si presentava ipersegmentato. Meno frequentemente le dimensioni dei granulociti neutrofili erano notevolmente aumentate.

I macrofagi, in particolare quando presenti in percentuali più elevate rispetto alla media, presentavano vacuoli ricchi di emosiderina.

Infine, a carico dei megacariociti si è riscontrata spesso emperipolesi

## 10) ANALISI DEGLI ESAMI EMOCROMOCITOMETRICI

Gli intervalli di riferimento per i parametri analizzati all'esame emocromocitometrico sono tratti dal lavoro del 2012 di Bourgès-Abella e collaboratori.

Viene riportata in tabella 12 la suddivisione in quartili sul totale di campioni (GRUPPI XR, XPN, NIS e IS) rispettivamente per: emoglobina, ematocrito, leucociti, neutrofili e linfociti.

**Tabella 12**

TOT. CAMPIONI	Hgb g/dl	Hct %	Wbc K/ $\mu$ L	Neu K/ $\mu$ L	Lym K/ $\mu$ L
I Quartile	5,76	18,55	4,73	2,97	0,82
II Quartile	7,74	24,35	7,48	5,02	1,75
III Quartile	9,5	32,18	11,55	8,65	2,47
IV Quartile	13,8	41,6	32,9	31,58	7,19

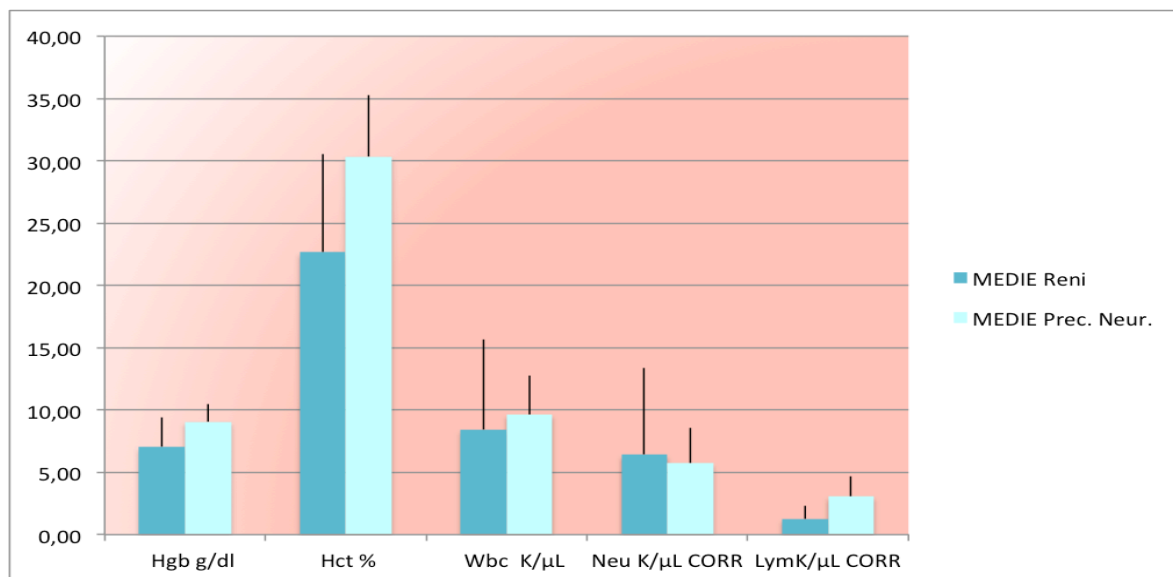
Vengono riportati in tabella 13 media, deviazione standard, mediana, valore minimo e valore massimo calcolati sul totale di campioni (GRUPPI XR, XPN, NIS e IS) rispettivamente per: emoglobina, ematocrito, leucociti, neutrofili e linfociti.

**Tabella 13**

TOT. CAMPIONI	Hgb g/dl	Hct %	Wbc K/ $\mu$ L	Neu K/ $\mu$ L	Lym K/ $\mu$ L
<b>media</b>	7,68	25,07	8,71	6,40	1,91
<b>Ds</b>	2,27	7,86	6,20	5,95	1,53
<b>mediana</b>	7,74	24,35	7,48	5,02	1,75
<b>min</b>	3,58	10,8	0,5	0,00	0
<b>max</b>	13,8	41,6	32,9	31,58	7,19

Nel Grafico 5 sono riassunte le medie e relative deviazioni standard dei parametri considerati negli esami ematobiochimici per i 2 gruppi XR e XPN.

**Grafico 5**



### 10.1 - EMOGLOBINA ED EMATOCRITO

Per valutare lo stato di anemia dei soggetti, si sono messi in relazione il valore di emoglobina (che normalmente in *M. fascicularis* deve essere pari o superiore a 10 g/dl) con la percentuale di ematocrito (accettabile se uguale o superiore a 36%).

Solo 8 primati (4 del gruppo XPN, 2 del gruppo XR, 1 del gruppo NIS e 1 del gruppo IS) avevano livelli di emoglobina ed ematocrito sufficientemente elevati da rientrare nel range di normalità.

54 animali su 62, di cui 35 del gruppo XR, 12 del gruppo XPN, 6 del gruppo di confronto NIS e uno (1) del gruppo di confronto IS, sono risultati anemici con emoglobina inferiore a 10 g/dl ed ematocrito inferiore al 34% .

In 18 primati l'anemia era più marcata arrivando a valori di emoglobina inferiori a 6 g/dl ed ematocrito inferiore a 21%. Questi erano rappresentati da 15 animali del gruppo XR, da 2 del gruppo XPN e da 1 del gruppo IS.

L'anemia più grave (Hgb = 3.5 g/dl, Hct = 10.8 %) si è riscontrata in un caso (gruppo XR).

#### 10.2 - LEUCOCITI

In 15 campioni si è rilevata leucopenia (Wbc < 4.7 K/ $\mu$ L) accompagnata in 11 casi da neutropenia (Neu < 2 K/ $\mu$ L) e in 9 anche da linfopenia (Lym < 1.15 K/ $\mu$ L). La linfopenia è stata osservata in totale in 25 casi.

2 campioni presentavano invece leucocitosi (Wbc > 25.7 K/ $\mu$ L) con neutrofilia (Neu > 20.6 K/ $\mu$ L).

In tutti i casi sopra analizzati i primati appartenevano al gruppo XR.

In 2 primati del gruppo XPN l'esame del sangue ha messo in evidenza la presenza di linfocitosi (Lym > 5.2 K/ $\mu$ L).

#### 10.3 - PIASTRINE

In 21 animali, tutti membri del gruppo XR, si è rilevata piastrinopenia (Plt < 224 K/ $\mu$ L).

#### 10.4 - RETICOLOCITI

Il numero medio di reticolociti in *M.fascicularis* è 71.19 K/ $\mu$ L, con valore massimo riportato pari a 79.05 K/ $\mu$ L (Wang H. *et al.*, 2012).

In 10 casi, 8 dei quali appartenevano al gruppo XR, 1 al gruppo XPN e 1 al gruppo NIS, il numero di reticolociti risultava aumentato (> 100 K/ $\mu$ L).

## 11) VALUTAZIONE MORFOLOGICA DELLO STRISCIO DI SANGUE PERIFERICO

### 11.1 - ERITROCITI

Tra gli eritrociti che presentavano alterazioni di forma si sono osservate più frequentemente target cell e stomatociti e, solo in rari casi, schistociti. Solo in rari casi (2) si sono evidenziate policromasia e anisocitosi.

### 11.2 - ERITROCITI NUCLEATI

Gli eritrociti nucleati non alla lettura dello striscio di sangue periferico in medicina umana.

Globuli rossi nucleati sono stati riscontrati solamente negli strisci di sangue periferico di primati del Gruppo XR, per un totale di 13 casi.

### 11.3 - NEUTROFILI

Tra le alterazioni a carico dei neutrofili sono state sporadicamente osservate anomalie delle granulazioni e ipersegmentazione.

### 11.4 - LINFOCITI

I linfociti non presentavano nessuna alterazione di rilievo, non erano presenti forme atipiche o linfociti attivati.

## DISCUSSIONE

Lo scopo ultimo di questo lavoro è di correlare il quadro citologico midollare riscontrato con la storia clinica dei soggetti valutati, per stabilire se vi siano eventuali associazioni tra tipo di trapianto e/o di terapia ricevuti e lesioni rilevate a carico del sistema ematopoietico.

Gli effetti midollari comunemente associati a una terapia immunosoppressiva, sia nell'uomo che nei primati non umani, sono leucopenia o, in caso di una mielodepressione generalizzata, pancitopenia (Welte K. *et al.*, 1987).

Nel midollo osseo dei macachi sottoposti a immunosoppressione qui studiati tali deplezioni non sono state osservate, ma, al contrario, si sono sempre osservati campioni con ottima o buona cellularità e con rapporto mieloidi/eritroidi generalmente aumentato. Sulla base delle percentuali di mieloidi ed eritroidi totali, rispettivamente, si è potuto stabilire che tale rapporto è aumentato per la presenza di iperplasia mieloide associata ad ipoplasia eritroide. In nessun caso il rapporto mieloidi/eritroidi era invece diminuito.

Va inoltre sottolineato che all'interno dei 2 gruppi di confronto (NIS e IS), costituiti da soggetti non sottoposti a xenotrapianto, il rapporto mieloidi/eritroidi non superava mai il valore del terzo quartile. I primati in cui il rapporto M:E era più alto erano stati tutti sottoposti a xenotrapianto di rene, eccetto uno, sottoposto invece a xenotrapianto di neuroni.

L'elevata produzione di leucociti prodotti dal midollo, nonostante la somministrazione di farmaci immunosoppressori, è probabilmente indotta dal rigetto che avviene nei primati sottoposti a xenotrapianto. La stimolazione antigenica che ne deriva e il notevole richiamo di granulociti neutrofili nei tessuti periferici coinvolti è tanto consistente da far sì che l'effetto immunosoppressivo non sia riscontrato in sede midollare.

Questa ipotesi viene confermata anche dall'esito degli esami istologici condotti sugli organi xenotrapiantati nei primati, in cui l'organo trapiantato si presenta ricco di infiltrato neutrofilico oltre che linfoplasmacellulare (Platt J.L. *et al.*, 1991). Questo tipo di infiltrato è un reperto frequente in diversi organi in *M. fascicularis* e sembra essere associato alla somministrazione di sostanze immunomodulatrici (Sato J. *et al.*, 2012). Il sequestro di leucociti in sede di organo rigettato, spiegherebbe anche perchè i primati sottoposti a



xenotrapianto di rene che avevano rapporto M:E elevato presentavano leucopenia all'esame emocromocitometrico.

Tuttavia, anche negli animali xenotrapiantati di precursori neuronali e sottoposti a terapia immunosoppressiva, ma che non andavano incontro a rigetto acuto, si è potuto evidenziare un quadro midollare e periferico pressoché nella norma, senza evidenti segni di leucopenia o marcata alterazione del rapporto mieloide/eritroide. In questo gruppo infatti i valori medi di M:E ratio erano di  $2.8 \pm 3.2$ , evidenziando quindi solo una lieve iperplasia mieloide. Questo quadro potrebbe essere spiegato dal fatto che la terapia immunosoppressiva induttiva in questi animali era principalmente basata sulla somministrazione di ciclosporina che non causa mielosoppressione, ma interferisce esclusivamente con la funzionalità linfocitaria (Bennett W.M. e Norman D.J., 1986). In questi animali invece non veniva somministrata ciclofosfamide che, come riportato in letteratura (Welte K. *et al.*, 1987), è il farmaco che più induce deplezione midollare e citopenie periferiche.

In tutti gli animali in terapia di mantenimento sono stati somministrati corticosteroidi. Tuttavia, negli animali esaminati in questo lavoro non erano presenti quadri periferici riferibili a possibili effetti di tale terapia. Il quadro di leucocitosi con neutrofilia e linfopenia tipico dei corticosteroidi potrebbe essere mascherato, negli animali sottoposti a trapianto di rene, dalle pesanti conseguenze del rigetto acuto e quindi dal grave stimolo infiammatorio presente nei tessuti coinvolti.

Anche i maturation index mieloide ed eritroide erano elevati nella maggior parte dei casi. Generalmente i maturation index eritroide e mieloide dovrebbero essere di 1:4 nei mammiferi (Elmore S.A., 2006).

Questi indici risultano aumentati quando lo stadio proliferativo prevale su quello maturativo all'interno dei due rispettivi comparti cellulari. All'interno dei 2 gruppi di confronto, gli indici più alti sono stati osservati nel gruppo sottoposto a immunosoppressione. Tra i fattori che potrebbero essere alla base di tale alterazione ci sono i farmaci immunosoppressori utilizzati. Questi farmaci, come la ciclofosfamide hanno la capacità di interferire con la mitosi, non solo dei linfociti, ma di altre cellule del sistema emopoietico (Weiss D.J. e Wardrop K.J., 2010). Si è visto infatti come, in medicina umana, i soggetti sottoposti a queste terapie presentano leucopenia associata ad anemia e trombocitopenia. Non si esclude quindi il fatto che anche nei primati non umani, tali farmaci possano interferire con i normali processi maturativi delle cellule ematopoietiche. Non bisogna inoltre dimenticare che il complesso cross-talk tra cellule ematopoietiche e

ambiente midollare non subisce solo le influenze dirette dei farmaci, ma può anche essere notevolmente condizionato da citochine e fattori di crescita i cui livelli possono variare notevolmente in condizioni di rigetto acuto. Queste molecole agiscono sia sulla linea mieloide che su quella eritroide, oltre che sulle altre linee cellulari del sistema ematopoietico; inoltre possono attivare tanto quanto inibire la proliferazione di questi elementi a seconda dei casi. Sia i farmaci immunomodulatori somministrati, che gli interventi di transgenesi applicati sul donatore possono modulare la sintesi e il rilascio di citochine da parte di determinate cellule targets. Queste molecole possono esercitare un effetto diretto o indiretto sulle cellule bersaglio (tra cui sono incluse anche quelle del midollo emopoietico e del sangue periferico) poiché oltre ad un effetto intrinseco esse agiscono tramite l'attivazione di altre citochine (Anderson T.D., 1993). Studi *in vivo* condotti su topi e ratti hanno dimostrato che alcune citochine inducono iperplasia mieloide mentre deprimono allo stesso tempo la linea eritroide (Ulich T.R., 1989).

Ovviamente, ogni citochina ha un effetto specifico, che varia anche in base alla specie animale considerata. Poiché le citochine regolano meccanismi complessi ed esplicano molteplici effetti, e poiché possono attivare altre molecole regolatrici, il loro effetto finale è difficilmente prevedibile.

Inoltre, il fatto che i granulociti vengono sequestrati prematuramente nella sede di rigetto potrebbe causare un loro rilascio dal midollo osseo a maturazione non ancora ultimata.

Le altre cellule che sono state incluse nell'analisi del midollo sono i macrofagi, i megacariociti, i linfociti e le plasmacellule.

I macrofagi erano presenti in percentuali elevate soltanto in 2 soggetti e i megacariociti in un solo soggetto. Per il numero ridotto di casi che presentavano tale alterazione non è stato possibile ricondurre questi tipi di iperplasia ad un evento preciso. Va tuttavia evidenziato che i macrofagi, qualora presenti in numero più consistente, contenevano vacuoli ricchi di emosiderina.

I linfociti e le plasmacellule erano abbondantemente rappresentati nel midollo di alcuni primati, tuttavia in questi animali non era associata linfocitosi all'esame emocromocitometrico.

Gli unici 2 soggetti in cui si è rilevata linfocitosi erano stati sottoposti a xenotrapianto di precursori neuronali.

Tra le più frequenti patologie associate al trapianto si annoverano i disordini linfoproliferativi post-trapianto, che consistono in una classe di lesioni linfoproliferative,

che originano nella maggior parte dei casi dai linfociti B. Questi disordini si sviluppano generalmente in seguito alla soppressione dell'attività dei linfociti T, indotta dall'immunosoppressione.

E' importante sottolineare che sebbene alcuni soggetti presentassero livelli elevati di linfociti e/o di plasmacellule nel midollo o nel sangue periferico, nessuno di questi ha sviluppato un disordine linfoproliferativo post-trapianto.

Per quanto riguarda le alterazioni morfologiche osservate nei diversi tipi di cellule midollari dei macachi qui valutati, anche queste sono riconducibili a danni da tossicità midollare e descrizioni di tali alterazioni sono già state fornite in precedenza in letteratura (Rebar A.H., 1993).

Le vacuolizzazioni citoplasmatiche colpiscono frequentemente le forme blastiche, e sono dovute a un arresto di maturazione del citoplasma in seguito ad una ritenzione di RNA; quelle che avvengono a carico del nucleo invece, sono causate da una deplezione di DNA.

Il principale difetto di maturazione citoplasmatico nei precursori eritroidi è correlato ad un deficit nella sintesi dell'eme. In questo caso i metarubrociti appaiono di dimensioni ridotte e con scarso citoplasma, come quelli osservati nel midollo dei primati qui valutati.

Anche i neutrofili aumentati di dimensioni o dotati di difetti nucleari quali ipersegmentazione o nuclei ad anello sono un reperto frequente in midolli esposti a sostanze tossiche (Rebar A.H., 1993).

Nel caso dello xenotrapianto di rene, l'ipoplasia eritroide e quindi l'anemia che ne deriva, sono più gravi rispetto a quelle riscontrate nello xenotrapianto di precursori neuronali. L'anemia di questi animali è riconducibile a diverse cause, tra cui, ad esempio, la possibilità che il rene di suino apporti uno scarso livello di eritropoietina necessaria al primate o che l'eritropoietina prodotta non sia compatibile con quella del primate. In questi animali veniva somministrata eritropoietina umana di sintesi per via esogena, ma non si esclude che questa proteina ricombinante non sia efficace nei macachi o che i primati sviluppino anticorpi neutralizzanti contro l'eritropoietina umana o suina. Infine, è possibile che la ciclofosfamida interferisca con l'eritropoiesi (Lam *et al.*, 2002).

Anche i macachi xenotrapiantati di precursori neuronali presentavano anemia, ma in misura più lieve, probabilmente dovuta ad un ridotto intake di ferro. Nonostante il recupero conseguente allo xenotrapianto di precursori neuronali dimostrato in molti casi infatti, in

questi soggetti la funzionalità motoria era comunque compromessa, influenzando dunque anche la capacità dei primati di alimentarsi. Sebbene in questi casi gli animali fossero alimentati tramite sonda rinogastrica, la debilitazione fisica dei soggetti comportava comunque un ridotto assorbimento di nutrienti. Inoltre va aggiunto che tra i più frequenti effetti collaterali della ciclofosfamide sono riportati nausea e diarrea che compromettono notevolmente lo stato di nutrizione dei soggetti.

Solo in 10 (8 casi gruppo XR, 1 gruppo XPN e 1 NIS) casi l'anemia potrebbe essere considerata di tipo rigenerativo sulla base del numero assoluto di reticolociti (superiore ai 80 K/ $\mu$ L) e solo in due di questi casi (1 XR e 1 XPN) si è evidenziata policromasia nello striscio periferico. Tali valori si sono riscontrati in animali che non presentavano gravi quadri di anemia. Non si esclude quindi che questi siano animali in cui la terapia con eritropoietina si sia rilevata efficace.

## CONCLUSIONI

I primati non umani, e in particolare quelli appartenenti alla specie *M.fascicularis*, vengono sempre più frequentemente impiegati nella ricerca biomedica. In letteratura sono presenti informazioni riguardo l'ematologia di macachi normali ma non sono invece reperibili studi sulle condizioni del sistema emopoietico di soggetti xenotrapiantati. Questo lavoro ha permesso di osservare che la mielodepressione generalmente indotta dalla terapia immunosoppressiva non si rileva nel caso in cui l'animale sia stato sottoposto a xenotrapianto.

Esistono un gran numero di fattori in grado di influire sull'ematopoiesi di questi soggetti, dall'impiego di diversi farmaci, alla stimolazione antigenica determinata dal trapianto, alle condizioni cliniche cui giungono i primati al momento dell'eutanasia. Il presente studio non si è pertanto prefissato come scopo principale quello di ricondurre alle alterazioni individuate delle cause specifiche, ma piuttosto di documentare a quali variazioni vada incontro il tessuto emopoietico di animali esposti ai succitati stimoli.

## BIBLIOGRAFIA

- ADAMS R.H.: Farmacologia e terapeutica veterinaria, Ed. italiana a cura del prof. Carlo Beretta. EMSI-Roma 1999
- ANDERSON T.D.: Cytokine-Induced Changes in the Leukon. *Toxicologic Pathology* 21(2): 147-157, 1993
- BADIN R.A., DENARO L., VADORI M., BOLDRIN M., CAVICCHIOLI L., DEBENEDICTIS G.M., FANTE F., SGARABOTTO D., JAN C., DAGUIN V., NAVEILHAN P., VANHOVE B., BLANCHO G., SOULILLOU J.P., PLAT M., VENTURI E., BOTTÈ F., PADOAN A., MANARA R., ZAMPIERI P., D'AVELLA D., RUBELLO D., GIANELLO P., HANTRAYE P., COZZI E.: Xenotransplantation of porcine CTLA4-Ig<sup>+/+</sup> neural precursors enables recovery of the locomotor activity in parkinsonian primates. *CTS-IXA Joint International Congress - Xenotransplantation Abstracts*. Abstract n. 331, 2011a
- BADIN R.A., PADOAN A., VADORI M., BOLDRIN M., CAVICCHIOLI L., DEBENEDICTIS G.M., FANTE F., SGARABOTTO D., JAN C., DAGUIN V., NAVEILHAN P., SOULILLOU J.P., VANHOVE B., PLAT M., VENTURI E., BOTTE F., DENARO L., MANARA R., ZAMPIERI P., D'AVELLA D., RUBELLA D., HANTRAYE P., COZZI E.: Expression of CTLA4-Ig Is Indispensable To Enable Clinical Recovery in Parkinsonian Primate Recipients of Porcine Neural Xenografts. *American journal of transplantation* 11: 391 (Meeting Abstract), 2011b.
- BALDAN N., RIGOTTI P., CALABRESE F., CADROBBI R., DEDJA A., IACOPETTI I., BOLDRIN M., SEVESO M., DALL'OLMO L., FRISON L., DEBENEDICTIS G., BERNARDINI D., THIENE G., COZZI E., ANCONA E.: Ureteral stenosis in HDAF pig-to-primate renal xenotransplantation: a phenomenon related to immunological events?. *American Journal of Transplantation* 4(4):475-481, 2004
- BARKER R.A. AND WIDNER H.: Immune Problems in Central Nervous System Cell Therapy. *NeuroRx* 1(4): 472-481, 2004
- BLANDINI F. → SITOGRAFIA
- BOOTH N.H. E MCDONALD L.E.: Farmacologia e terapeutica veterinaria, Ed. italiana a cura del prof. Carlo Beretta. pp. 955-959. EMSI-Roma 1991

- BOOTHE D.M.: Small Animal Clinical Pharmacology and Therapeutics. Saunders 2001
- BORLONGAN C.V. E SANBERG P.R.: Neural transplantation for treatment of Parkinson's disease. *Drug Discovery Today* 7(12): 674-682, 2002
- BOURGÈS-ABELLA N., GEFFRÉ A., MOUREAUX E., VINCENTI M., BRAUN J.P. E TRUMEL C.: Abstract n. 43: Hematology reference intervals in Cynomolgus monkeys. European Society of Veterinary Clinical Pathology (ESVCP) 14th annual congress and Internal Society for Animal Pathology (ISACP) 15th biennial congress, Ljubljana, Slovenia, 3-7 Luglio 2012
- BUDDE K., CURTIS J., KNOLL G., CHAN L., NEUMAYER H., SEIFU Y. AND HALL M.: Enteric-coated Mycophenolate Sodium can be Safely Administered in Maintenance Renal Transplant Patients: Results of a 1-Year Study. *American Journal of Transplantation* 4(2): 237-243, 2003
- CARLI S., ORMAS P., RE G., SOLDANI G.: Farmacologia veterinaria. 1° Ed., Idelson-Gnocchi 2009
- CAVICCHIOLI L., DE ZAN G., ZAPPULLI V., CADROBBI R., DEDJA A., HUTABBA S., RAVAROTTO L., COZZI E., ANCONA E., CASTAGNARO M.: Histopathological findings in the gastrointestinal tract of primate recipients of porcine renal xenografts following different immunosuppressive regimens. *Xenotransplantation* 14(2):145-156, 2007
- COIFFIER B., KETTERER H.N., ENGERT A., TILLY H., MA D., JOHNSON P., LISTER A., FEURING-BUSKE M., RADFORD J.A., CAPDEVILLE R., DIEHL V., REYES F.: Rituximab (Anti-CD20 Monoclonal Antibody) for the Treatment of Patients With Relapsing or Refractory Aggressive Lymphoma: a Multicenter Phase II Study. *Blood* 92(6): 1927-1932, 1998
- COLLIER T.J., STEECE-COLLIER K., KORDOWER J.H.: Primate models of Parkinson's disease. *Experimental Neurology* 183(2): 258-262, 2003
- COOPER D.K.: A brief history of cross-species organ transplantation. *Baylor University Medical Center Proceedings* 25(1): 49-57, 2012
- COOPER D.K., GOLLAKNER B., SACHS D.H.: Will the pig solve the transplantation backlog?. *Annual Reviews Medicine* 53: 133-147, 2002

- COOPER D.K., GOOD A.H., MALCOLM A.J., IPPOLITO R.M., NEETHLING F.A., YE Y., ROMANO E., ZUHDI N.: Identification of carbohydrate structures that bind human antiporcine antibodies: implications for discordant xenografting in humans. *Transplantation Proceedings* 24(2): 559-562, 1992
- COOPER D.K., ORIOL R., YE Y., KOREN E.: Carbohydrate antigens of pig tissues reacting with human natural antibodies as potential targets for hyperacute vascular rejection in pig-to-man organ xenotransplantation. *Transplantation* 56(6): 1433-1442, 1993
- COUNCIL OF EUROPE: International Data on Organ Donation and Transplantation Activity, Waiting List and Family Refusals. Year 2009. International figures on donation and transplantation-2009. *Newsletter Transplant* 15(1): 25-38, 2010
- COZZI E. E WHITE D.J.: The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nature Medicine* 1(9): 964-966, 1995
- COZZI E., TUCKER A.W., LANGFORD G.A., PINO-CHAVEZ G., WRIGHT L., O'CONNELL M.J., YOUNG V.J., LANCASTER R., MCLAUGHLIN M., HUNT K., BORDIN M.C., WHITE D.J.: Characterization of pigs transgenic for human-decay accelerating factor. *Transplantation* 64(10): 1383-1392, 1997a
- COZZI E., YANNOUSOS N., LANGFORD G.A., PINO-CHAVEZ G., WALLWORK J., WHITE D.J.G: Effect of transgenic expression of human-decay accelerating factor on the inhibition of hyperacute rejection of pigs organs in xenotransplantation. *Xenotransplantation* II ed., Cap. 49, pp. 665-682, Springer Berlin Heidelberg, 1997b
- COZZI E., BHATTI F., SCHMOECKEL M., CHAVEZ G., SMITH K.G., ZAIDI A., BRADLEY J.R., THIRU S., GODDARD M., VIAL C., OSTILE D., WALLWORK J., WHITE D.J., FRIEND P.J.: Long term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts. *Transplantation* 70(1): 15-21, 2000a
- COZZI E., SOIN B., HOLMES B., E WHITE D.: Genetic Engineering of the Donor as an Approach to Clinical Xenotransplantation. *Transplantation Proceedings* 32(8): 2701-2703, 2000b
- COZZI E., VIAL C., OSTLIE D., FARAH B., CHAVEZ G., SMITH K.G.C., BRADLEY J.R., THIRU S, DAVIES H.F.S., WALLWORK J, WHITE D.J.G., GODDARD M., FRIEND P.J.: Maintenance triple immunosuppression with



- cyclosporin A, mycophenolate sodium and steroids allows prolonged survival of primate recipients of hDAF porcine renal xenografts. *Xenotransplantation*. Vol. 10(4): 300–310, 2003
- COZZIE., SIMIONIP., BOLDRIN M., SEVESO M., CALABRESE F., BALDAN N., CASTAGNARO M., GAVASSO S., FADIN M., ZERBINATI P., TORMENE D., TOGNIN G., THIENE G., PAGNAN A., ANCONA E.: Alterations in the Coagulation Profile in Renal Pig-to-Monkey Xenotransplantation. *American Journal of Transplantation* 4(3): 335–345, 2004
  - COZZI E., SEVESO M., BOSIO E., BESENZON F., ANCONA E.: Antibody Mediated Rejection in Pig-To-Nonhuman Primate Xenotransplantation Models. *Current drug targets- cardiovascular & Haematological Disorders* 5(3): 233-253, 2005
  - COZZI E., BOSIO E., SEVESO M., VADORI M., ANCONA E.: Xenotranplantation - current status and future perspectives. *British Medical Bulletin* 75-76: 99-114, 2006
  - DEACON T., SCHUMACHER J., DINSMORE J., THOMAS C., PALMER P., KOTT S., EDGE A., PENNEY D., KASSISSIEH S., DEMPSEY P. E ISACSON O.: Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nature Medicine* 3(3): 350-353, 1997
  - DELONG M.R.: Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neuroscience* 13(7): 281-285, 1990
  - ELMORE S.A.: Enhanced Histopathology of the Bone Marrow. *Toxicologic Pathology* 34(5): 666–686, 2006
  - EMBORG E.M.: Nonhuman Primate Models of Parkinson's Disease. *ILAR Journal* 48(4): 339-355, 2007
  - FALLARINO F., FIELDS P.E. E GAJEWSKI T.F.: B7-1 Engagement of Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4 Inhibits T Cell Activation in the Absence of CD28. *The Journal of Experimental Medicine* 188(1): 205-210, 1988
  - GALILI U., SHOHET S.B., KOBRIN E., STULTS C.L., MACHER B.A.: Man, Apes, and old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *Journal of Biological Chemistry* 263(33): 17755-17762, 1988
  - GLOTZ D., ANTOINE C., JULIA P., SUBERBIELLE-BOISSEL C., BOUDJELTIA S., FRAOUI R., HACEN C., DUBOUST A. AND BARIETY J.: Desensitization and

- Subsequent Kidney Transplantation of Patients Using Intravenous Immunoglobulins (IVIg). *American Journal of Transplantation* 2(8): 758-760, 2002
- GRACA L., HONEY K., ADAMS E., COBBOLD S.P. AND WALDMANN H.: Cutting Edge: Anti-CD154 Therapeutic Antibodies Induce Infectious Transplantation Tolerance. *The Journal of Immunology* 165(9): 4783-4786, 2000
  - GROHMANN U., ORABONA C., FALLARINO F., VACCA C., CALCINARO F., FALORNI A., CANDELORO P., BELLADONNA M.L., BIANCHI R., FIORETTI M.C. E PUC CETTI P.: CTLA4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nature Immunology* 3(11): 1097-1101, 2002
  - HANTRAYE P. E BADIN R.A.: *In vivo* imaging of integration and function of striatal grafts in rodent and nonhuman primate animal models. *Progress in Brain Research* 200: 329–343, 2012
  - HARDMAN J.G., LIMBIRD L.E., MOLINOFF P.B., RUDDON R.W., GOODMAN GILMAN A.: Goodman & Gilman's – The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9<sup>o</sup> Ed. Italiana: Le Basi Farmacologiche della Terapia a cura di Sirtori C. e Govoni S.. McGraw-Hill 1996
  - HÉRODIN F., THULLIER P., GARIN D., DROUET M.: Nonhuman primates are relevant models for research in hematology, immunology and virology. *European Cytokine Network* 16(2): 104-116, 2005
  - HOLMES B.J. RICHARDS A.C., AWWAD M., COPEMAN L.S., MCLAUGHLIN M.L., COZZI E., SHUURMAN H-J., DAVIES H.S.F.: Anti-pig antibody levels in naive baboons and cynomolgus monkeys. *Xenotransplantation* 9(2): 135-147, 2002
  - ISACSON O., DEACON T.W., PAKZABAN P., GALPERN W.R., DINSMORE J., BURNS L.H.: Transplanted xenogeneic neural cells in neurodegenerative disease models exhibit remarkable axonal target specificity and distinct growth patterns of glial and axonal fibers. *Nature Medicine* 1(11): 1189-1194, 1995
  - JORDAN S.C., TYAN D., STABLEIN D., MCINTOSH M., ROSE S., VO A., TOYODA M., DAVIS. C., SHAPIRO R., AVEY D., MILLINER D., GRAFF R., STEINER R., CIANCIO G., SAHNEY S., LIGHT J.: Evaluation of Intravenous Immunoglobulin as an Agent to Lower Allosensitization and Improve Transplantation in Highly Sensitized Adult Patients with End-Stage Renal Disease: Report of the NIH IG02 Trial. *Journal of American Society of Nephrology* 15(12): 3256-3262, 2004

- KATOPODIS A.G., WARNER R.G., DUTHALER R.O., STREIFF M.B., BRUELISAUER A., KRETZ O., DOROBEK B., PERSOHN E., ANDRES H., SCHWEITZER A., THOMA G., KINZY W., QUESNIAUX V.F.J., COZZI E., DAVIES H. F. S., MAÑEZ R., WHITE D.: Removal of anti-Gal $\alpha$ 1,3Gal xenoantibodies with an injectable polymer. *The Journal of Clinical Investigation* 110(12): 1869-1877, 2002
- KULAK J.M., SCHNEIDER J.S.: Differences in  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor binding in motor symptomatic and asymptomatic MPTP-treated monkeys. *Brain Research* 999(2): 193-202, 2004
- KUWAKI K., TSENG Y.L., DOR F.J., SHIMIZU A., HOUSER S.L., SANDERSON T.M., LANCOS C.J., PRABHARASUTH D.D, CHENG J., MORAN K., HISASHI Y., MUELLER N., YAMADA K., GREENSTEIN J.L., HAWLEY R.J., PATIENCE C., AWWAD M., FISHMAN J.A., ROBSON S.C., SCHUURMAN H.J., SACHS D.H., COOPER D.K.: Heart transplantation in baboons using alpha 1-3 galactosyltransferase gene knock-out pigs as donors: initial experience. *Nature Medicine* 11(1): 29-31, 2005
- LAM T.T., HAUSEN B., SQUIERS E., COZZI E. E MORRIS R.E.: Cyclophosphamide-Induced Postoperative Anemia in Cynomolgus Monkey Recipients of hDAF-Transgenic Pig organ Xenografts. *Transplantation Proceedings* 34(5): 1451-1452, 2002
- LARSSON L.C., FRIELINGS DORF H., MIRZA B., HANSSON S., ANDERSON P., CZECH K.A., STRANDBERG M., AND WIDNER H.: Porcine Neural Xenografts in Rats and Mice: Donor Tissue Development and Characteristics of Rejection. *Experimental Neurology* 172(1): 100–114, 2001
- LIN C.C., EZZERALAB M., SHAPIRO R., EKSER B., LONG C., HARA H., ECHEVERRI G., TORRES C., WATANABE H., AYARES D., DORLING A. AND COOPER D.K.: Recipient Tissue Factor Expression Is Associated With Consumptive Coagulopathy in Pig-to-Primate Kidney Xenotransplantation. *American Journal of Transplantation* 10(7): 1556-1568, 2010
- LIN H., RATHMELL J.C., GRAY G.S., THOMPSON C.B., LEIDEN J.M. E ALEGRE M.L.: Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4 (CTLA4) Blockade Accelerates the Acute Rejection of Cardiac Allografts in CD28-deficient Mice: CTLA4 Can

- Function Independently of CD28. *The Journal of Experimental Medicine* 188(1): 199-204, 1998
- MARTIN C., PLAT M., NERRIERE-DAGUIN V., COULON F., UZBEKOVA S., VENTURI E., CONDE F., HERMEL J.M., HANTRAYE P., TESSON L., ANEGON I., MELCHIOR B., PESCHANSKI M., LE MAUFF B., BOEFFARD F., SERGENT-TANGUY S., NEVEU I., NAVEILHAN P., SOULILLOU J.P., TERQUI M., BRACHET P., VANHOVE B.: Transgenic expression of CTLA4-Ig by fetal pig neurons for xenotransplantation. *Transgenic Res* 14(4): 373-384, 2005
  - MAURIK A., HERBER M., WOOD K.J., JONES N.D.: Cutting Edge: CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Alloantigen-Specific Immunoregulatory Cells That Can Prevent CD8<sup>+</sup> T Cell-Mediated Graft Rejection: Implications for Anti-CD154 Immunotherapy. *Journal of Immunology* 169(10): 5401-5404, 2002
  - MEDICETTY S., BLEDSOE A.R., FAHERENHOLTZ C.B., TROYER D., WEISS M.L.: Transplantation of pig stem cells into rat brain: proliferation during the first 8 weeks. *Experimental Neurology* 190(1): 32-41, 2004
  - MELCHIOR B., RÉMY S., NERRIERE-DAGUIN V., HESLAN J.M., SOULILLOU J.P. E BRACHET P.: Temporal Analysis of Cytokine Gene Expression During Infiltration of Porcine Neuronal Grafts Implanted Into the Rat Brain. *Journal of Neuroscience Research* 68(3): 284-292, 2002
  - MODO M., REZAIE P., HEUSHLING P., PATEL S., MALE D.K., HODGES H.: Transplantation of neural stem cells in a rat model of stroke: assessment of short-term graft survival and acute host immunological response. *Brain Research* 958(1): 70-82, 2002
  - NICHOLSON G., PEREIRA A.C., HALL G.M.: Parkinson's disease and anesthesia. *British Journal of Anaesthesiology* 89(6): 904-916, 2002
  - PLATT J.L., FISCHER R.J., MATAS A.J., REIF S.A., BOLMAN R.M., BACH F.H.: Immunopathology of Hyperacute Xenograft Rejection in a Swine-to-Primate Model. *Transplantation* 52(2): 214-220, 1991
  - PROVENCHER-BOLLIGER A., FONTAINE M.: Cytological examination and cellular composition of bone marrow in healthy, adult, cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Comparative Haematology International* 8(4): 183-190, 1998
  - REAGAN W.J., IRIZARRY-ROVIRA A., POITOUT-BELISSENT F., PROVENCHER-BOLLIGER A., RAMAIAH S.K., TRAVLOS G., WALKER D.,

- BOUNOUS D. E WALTER G.: Best practices for evaluation of bone marrow in nonclinical toxicity studies. *Veterinary Clinical Pathology* 40(2): 119-135, 2011
- REBAR A.H.: General Responses of the Bone Marrow to Injury. *Toxicologic Pathology* 21(2): 118-121, 1993
  - REEMTSMA K., MCCRACKEN B.H., SCHLEGEL J.U., PEARL M.A., PEARCE C.W., DEWITT C.V., SMITH P.E., HEWITT R., FLINNER R.L., CREECH O.Jr.: Renal heterotransplantation in man. *Annals of Surgery* 160: 384–410, 1964
  - SACHS D.H E GALLI C.: Genetic manipulation in pigs. *Current Opinion in Organ Transplantation* 14(2): 148–153, 2009
  - SAMSTEIN B. AND PLATT J.L.: Physiologic and Immunologic Hurdles to Xenotransplantation. *Kidney International* 60: 1592-1597, 2001
  - SATO J., DOI T., KANNO T., WAKO Y., TSUCHITANI M., NARAMA I.: Histopathology of Incidental Findings in Cynomolgus Monkeys (*Macaca Fascicularis*) Used in Toxicity Studies. *J Toxicol Pathol* 25(1): 63–101, 2012
  - SHUURMAN H.J., CHENG J., LAM T.: Pathology of xenograft rejection: a commentary. *Xenotransplantation* 10(4): 293-299, 2003
  - SIBAL L.R. AND SAMSON K.J.: Nonhuman Primates: a critical role in current disease research. *ILAR Journal* 42(2): 74-84, 2001
  - SOIN B., SMITH K.G., ZAIDI A., COZZI E., BRADLEY J.R., OSTLIE D.J., LOCKHART A., WHITE D.J. AND FRIEND P.J.: Physiological aspects of pig-to-primate renal xenotransplantation. *Kidney International* 60(4): 1592-1597, 2001
  - SPIEZIA L., BOLDRIN M., RADU C., BULATO C., BERTINI D., BON M., CAMPELLO E., VADORI M., GALLI C., GAVASSO S., NOTTLE M.B., COWAN P.J., COZZI E., SIMIONI P.: Thromboelastographic evaluation of coagulative profiles in pig-to-monkey kidney xenotransplantation. *Xenotransplantation* 20(2): 89–99, 2013
  - SPILLANTINI M.G., SCHMIDT M.L., LEE V.M., TROJANOWSKI J.Q., JAKES R., GOEDERT M.: Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388(6645): 839- 840, 1997
  - TSUJI A., TAMAI I., SAKATA A., TENDA Y. E TERASAKI T.: Restricted transport of cyclosporin A across the blood-brain barrier by a multidrug transporter, P-glycoprotein. *Biochemical Pharmacology* 46(6): 1096-1099, 1993

- ULICH T.R., DEL CASTILLO J., GUO K.Z.: In Vivo Hematologic Effects of Recombinant Interleukin-6 on Hematopoiesis and Circulating Numbers of RBCs and WBCs. *Blood* 73(1): 108-110, 1989
- VADORI M., DAHA M., KLAR N., BESENZON F., BALDAN N., CAVICCHIOLI L., DE BENEDICTIS G.M., BOLDRIN M., INNOCENTE V., FANTE F., CALABRESE F., BLANCHO G., GIANNELLO P., GALLI C., NOTTLE M.B., COWAN P., D'APICE A.J.F., COZZI E.: Study of complement activation in a life supporting pig to primate xenotransplantation model using GAL KO pigs. *Xenotransplantation* 18: 274, 2011
- VALLI V.E., MCGRATH J.P., CHU I.: Hematopoietic system: In Handbook of Toxicologic Pathology. Haschek W.M., Rousseaux C.G., Walling M.A.: 666-672. Editors Academic Press San Diego, CA 2002
- WAISS D.J., WARDROP J.K.: Shalm's Veterinary Hematology 6th Edition. Wiley-Blackwell 2010
- WANG H., NIU Y.Y., SI W., LI Y.J., YAN Y.: Reference data of clinical chemistry, haematology and blood coagulation parameters in juvenile cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Veterinarni Medicina* 57(5): 233-238, 2012
- WEIR M.R, WARD M.T., BLAHUT S., KLASSEN D.K., CANGRO C.B., BARTLETT S.T. AND FINK J.C.: Long-term impact of discontinued or reduced calcineurin inhibitor in patients with chronic allograft nephropathy. *Kidney International* 59(4): 1567-1573, 2001
- WELTE K., BONILLA M.A., GILLIO A.P., BOONE T.C., POTTER G.K., GABRILOVE J.L., MOORE M.A.S., O'REILLY R.J., SOUZA L.M.: RECOMBINANT HUMAN GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR Effects on Hematopoiesis in Normal and Cyclophosphamide-treated Primates. *The Journal of Experimental Medicine* 165(4): 941-948, 1987
- YANG Y.G. E SYKES M.: Xenotransplantation: current status and a perspective on the future. *Nature Reviews Immunology* 7(7): 519-31, 2007
- ZAIDI A., BHATTI F., SCHMOECKEL M., COZZI E., CHAVEZ G., WALLWORK J., WHITE D. AND FRIEND P.: Kidneys From HDAF Transgenic Pigs Are Physiologically Compatible With Primates. *Transplantation Proceedings* 30(5): 2465-2466, 1998

## SITOGRAFIA

- BLANDINI F.: Ruolo dei modelli sperimentali nello studio della malattia di Parkinson e dei parkinsonismi, 2005

Laboratorio di Neurochimica Funzionale, Istituto Neurologico C. Mondino, Pavia.

<http://www.limpe.it/2004/relazioni/pag%5B1%5D.%2022.pdf>

(accesso effettuato il 25 marzo 2013).

## **RINGRAZIAMENTI**

*Vorrei dedicare un grazie sincero alla dott.ssa Cavicchioli, per la professionalità e la disponibilità costanti con cui mi ha seguita e alla dott.ssa Gelain, per avermi aiutata in questo lavoro con pazienza e competenza.*

*Ringrazio inoltre l'intero staff dello stabulario per avermi permesso di raccogliere i dati necessari per lo sviluppo di questa tesi ed avermi accolta con cortesia e disponibilità; in particolare, vorrei ringraziare il dottor Boldrin per tutte le delucidazioni che mi ha fornito e per essere sempre stato disponibile per chiarire i miei dubbi.*