



Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals

Èlia Ripoll Llagostera

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Tesi doctoral presentada per En/Na

Èlia RIPOLL LLAGOSTERA

amb el títol

" Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals "

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

MEDICINA

Barcelona, 12 d'abril de 2013

**Facultat de Medicina
Departament de Patologia i Terapèutica Experimental**



UNIVERSITAT DE BARCELONA



ACRÒNIMS:

A

Aa: aminoàcid

ABCD1: transportador ABC

Ago2: Argonaute 2

APC: cèl·lula presentadora d'antigen

AP1: proteïna activadora 1

ATF2: factor activador de transcripció 2

C

CH: xalcona sintasa

CCR7: receptor de quimosina tipus 7

D

DICER: ribonucleasa membre de la família de les RNAsa III

DNA: àcid desoxiribonucleic

dsDNA: DNA de doble cadena

dsRNA: RNA de doble cadena

E

ERI-1: 3'-5' exoribonucleasa 1

EIF-2: eukariotic translation initiation factor

F

FEDER: federació espanyola de malalties rares.

H

HIF: factor induït per hipòxia

HIGM: Síndrome híper IgM

HLA: *human leukocyte antigen*

HUVEC: cèl·lula humana endotelial vascular

I

IC: immunocomplexes
ICAM: molècula d'adhesió intercel·lular
IFN: interferó
IkB: inhibidor s de NF-kB
IR: insuficiència renal
IRF: factor regulador d'interferó

J

JAK: quinasa tipus Janus

L

LES: lupus eritematós sistèmic
LFA-1: antigen de funció limfocitària
LN: nefritis lúpica
LNA: *locked nucleic acid*
LPS: lipopolisacàrid

M

MAPK: proteïna quinasa activada per mitògens
MCP1: proteïna quimiotàctica de monòcits
MHC: Complex major d'histocompatibilitat
MIP: proteïna inflammatòria de macròfags
miRNA: micro RNA
MMP: metal·loproteasa
MPP: pèptid permeabilitzador de membrana

N

NCA: nefropatia crònica de l'empelt
NFAT: factor nuclear de cèl·lules T activades
NF-kB: Factor nuclear Kappa B
NK: Natural killer
NZB/NZW: New Zealand Black / New Zealand white

P

PEG: polietilenglicol
PEI: poli-etilenimina

PI3: inositol trifosfat
PKR: dsRNA dependent protein kinase R
PP2AC: proteïna fosfatasa 2
PRR: *pathogen receptor recognition*
PS: fosforotioat
PTD: domini de transducció proteica
P4H-a2:

R

RANTES: CCL5, lligand quimiosina n.5
RIG1: *retinoid-inducible gene 1*
RISC: complex silenciador induït per RNA
RNA: àcid ribonucleic
RNAi: interferència per RNA

S

shRNA: shorthairpin RNA
siRNA: *small interference RNA*
ssDNA: DNA de cadena simple
SNALP: *stable nucleic acid lipid particles*
SNP: polimorfisme d'un sol nucleòtid
STAT: transductor de senyal i activador de la transcripció

T

TCR: receptor de cèl·lules T
TGF: factor de creixement transformant
TLR: Receptor toll like
TNF: Factor de necrosis tumoral
TNF-R: Receptors de Necrosis Tumoral
TRAF: factor associat a TNF
TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand

V

VCAM: molècula d'adhesió vascular

I. ÍNDEX

I. ÍNDEX	7
II. INTRODUCCIÓ	11
1. Senyal de coestimulació CD40 - CD40L	13
1.1. CD40	13
1.1.1. Estructura del gen de CD40	13
1.1.1.1. Humà	13
1.1.1.2. Ratolí	14
1.1.1.3. Rata	15
1.1.2. Expressió cel·lular	15
1.2. CD40L	17
1.2.1. Estructura del gen de CD40L	17
1.2.1.1. Humà	17
1.2.1.2. Ratolí	18
1.2.1.3. Rata	19
1.2.2. Unió CD40-CD40L	19
1.2.3. Expressió cel·lular	19
1.3. Mutacions gèniques	21
1.4. SNP	21
1.5. Transducció de senyals de CD40	22
1.6. Vies de senyalització de CD40	23
1.6.1. TRAF: Factors associats a la família de TNF-R	23
1.6.2. Papers de les STATS	25
1.6.3. Factors de transcripció	26
1.7. Funcions biològiques de CD40-CD40L	27
1.7.1. Activació del limfòcit T	28
1.7.2. Activació del limfòcit B	30
1.7.3. Canvi de isotip	31
1.7.4. Formació de centres germinals	31
1.7.5. Regulació de mediadors d'inflamació	32
2. RNA interferència. Silenciament gènic post transcripcional	34
2.1. Història	34

2.2. Teràpia RNAi	34
2.3. Mecanisme de RNA d'interferència	35
2.4. Vies d'administració d'un RNA d'interferència	38
2.5. Biodistribució	39
2.6. Limitacions del mecanisme	40
2.6.1. Activació de la resposta immune	40
2.6.2. Efectes "Off target"	43
2.7. Estratègies per millorar l'eficàcia	43
2.8. Disseny del siRNA	43
2.8.1. Seqüència	43
2.8.2. Longitud	44
2.8.3. Estructura	44
2.9. Lliurament de la molècula siRNA	45
2.10. Modificacions químiques	46
2.10.1. Modificacions de l'enllaç fosfodièster	47
2.10.2. Modificacions de la posició 2' del sucre	47
2.11. Bioconjugació	49
2.11.1. Conjugació amb lípids	49
2.11.2. Conjugació amb pèptids	49
2.12. Formació de Complexes	50
2.12.1. Lípids catiónics	50
2.12.2. Polimers catiónics	51
2.12.3. Liposomes	52
2.13. Aplicacions terapèutiques	53
3. Transplantament renal	55
3.1. Epidemiologia i prevalença	55
3.2. Fisiopatologia del procés de trasplantament	55
3.3. Immunologia del trasplantament. Complex major d'histocompatibilitat.	57
3.4. Mecanismes efectors de la resposta al·logènica. Rebuig	58
3.5. Rebuig agut cel·lular	59
3.5.1. Mecanismes patològics	59

3.5.2. Diagnòstic i classificació	60
3.6. Rebuig agut humoral	62
3.6.1. Mecanismes patològics	62
3.6.2. Diagnòstic i classificació	64
3.7. Paper de la coestimulació en el rebuig agut	64
4. Lupus eritematós sistèmic	66
4.1. Concepte	66
4.2. Epidemiologia i prevalença	66
4.3. Epidemiologia de les manifestacions clíniques i serològiques	67
4.4. Etiologia	68
4.4.1. Factors hormonals	68
4.4.2. Factors genètics	69
4.4.3. Factors ambientals	72
4.5. Mecanismes patogènics	73
4.5.1. Apoptosis i autoimmunitat	73
4.5.2. Epigenètica	73
4.5.3. Alteració del limfòcit T	74
4.5.4. Hiperactivació del limfòcit B	76
4.5.5. Producció d'autoanticossos contra antígens	77
4.5.6. Anticossos anti DNA	77
4.5.7. Immunocomplexes	78
4.5.8. Complement	79
4.6. Nefritis lúpica	80
4.6.1. Classificació de la nefritis lúpica	82
4.6.2. Model murins experimentals de LES	86
4.6.3. New Zealand Black / New Zealand white F1 (NZB/NZWF1)	86
III. HIPÒTESIS I OBJECTIUS	89

IV. RESULTATS	95
<u>Article 1:</u> Cold ischemia, innate immunity and deterioration of the glomerular filtration barrier in antibody mediated acute rejection.	99
<u>Article 2:</u> In vivo therapeutic efficacy of intra-renal CD40 silencing in a model of humoral acute rejection.	117
<u>Article 3:</u> Cholesterol-siRNA anti-CD40 reduces the progression of experimental lupus nephritis modulating local milieu and systemic mechanisms.	131
V. DISCUSSIÓ	173
VI: CONCLUSIONS	187
VII: BIBLIOGRAFIA	191
VIII: ANNEX	215

II. INTRODUCCIÓ

1. Senyal de coestimulació CD40-CD40L

1.1. CD40

CD40 va ser descrit cap al 1984 per diferents grups com un polipèptid de 50 kDa a la superfície dels limfòcits B, i també a les cèl·lules de carcinoma [1, 2]. La proteïna que codifica aquest gen pertany a la superfamília de Receptors de Necrosis Tumoral (TNF-R). La seva estructura és típica d'una proteïna tipus I transmembrana. El seu pes molecular varia entre 43 i 50 kDa. També rep el nom de TNRF5 (*tumor necrosis factor receptor 5*). La via de senyalització està regulada per diferents mecanismes de control endògens i és específica depenent del tipus cel·lular. L'expressió de CD40 està regulada a nivell post transcripcional i s'han descrit diferents isoformes del mRNA de CD40 degut a un *splicing* alternatiu. Altres membres d'aquesta superfamília són CD30, CD27, CD95, RANK [3].

S'ha vist que CD40 s'expressa de forma constitutiva en varis tipus cel·lulars. La seva expressió però, també és induïble. Se sap que hi ha certes citocines pro inflamatòries que indueixen l'expressió de CD40 *in vitro* com són IL1, IL3, IL4, TNF α , IFN γ . Aquestes provoquen un augment de la síntesis que s'observa a les 6-12 h després de l'estímul, assolint un pic màxim d'expressió a les 24h que persisteix fins a les 72h aproximadament [4]. Se sap que proteïnes procedents de virus o bacteris també provoquen un augment d'expressió de CD40 com és el cas de LPS [5, 6].

1.1.1. Estructura del gen de CD40

1.1.1.1. Humà:

El gen que codifica per CD40 en humà està localitzat al cromosoma 20, exactament entre els segments 20q11-20q13-2. El gen està format per 9 exons i 8 introns. El seu mRNA té 1.5 kb. La proteïna està composta per 277 aminoàcids (Aa), dels quals 193 estan situats al domini extracel·lular, 22 estan al domini transmembrana i 62 estan situats a una cua intracel·lular. Aquesta proteïna es va descobrir l'any 1984 utilitzant anticossos monoclonals en limfòcits B [7]. Igual que altres membres de la família

TNFR, la proteïna CD40 es caracteritza per presentar 4 dominis extracel·lulars enriquits en cisteïna, de 45 Aa cadascun i amb 6 residus de cistina formant 3 ponts disulfur [8]. El domini intracel·lular de la proteïna CD40 no presenta semblança amb altres membres de la família. Aquest conté diferents dominis d'unió a proteïnes adaptadores que són importants per la transducció de senyals (Figura 1).

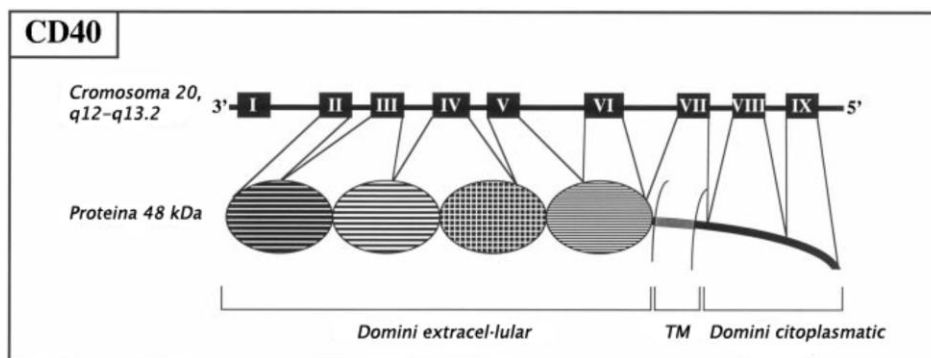


Figura 1. Estructura del gen i la proteïna de CD40 humà. Modificat [4].

1.1.1.2. Ratolí:

El gen que codifica per CD40 de ratolí està localitzat a la part distal del cromosoma 2 regió H3. El gen està format per 9 exons; l'exó I codifica per la seqüència *leader*, els exons II a VI codifiquen per la regió extracel·lular, l'exó VII codifica per la regió transmembrana i els exons VIII a IX codifiquen per la regió intracel·lular.

El seu mRNA també presenta *splicing* alternatiu degut a que el gen presenta dos senyals de poliadenilació, s'obtenen 5 isoformes diferents de mRNA, de les quals només quatre són codificants i la isoforma tres no ho és. La proteïna està composta per 305 Aa; 193 situats al domini extracel·lular, 22 transmembranals i 90 intracel·lulars (Figura 2).

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

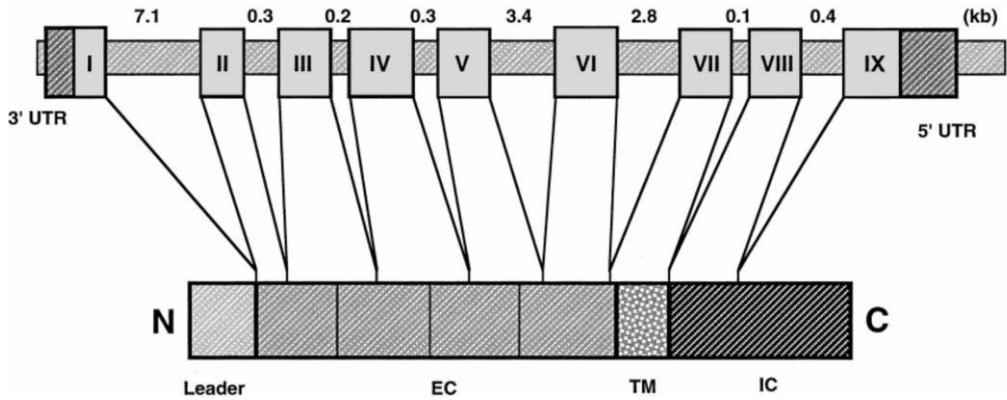


Figura 2. Estructura del gen i la proteïna de CD40 de ratolí. Modificat de [8].

La proteïna humana i murina comparteixen un 62% d'homologia, però si analitzem la part intracel·lular de les dues espècies són homòlogues en un 78%. Els últims 32 Aa de l'extrem carboxil estan totalment conservats en ambdues espècies. La conservació dels dominis extracel·lulars rics en cisteïna suggereix que la proteïna tant humana com de ratolí es pleguen en els mateixos dominis.

1.1.1.3 Rata:

El gen que codifica per CD40 de rata està localitzat al cromosoma 3, exactament a la regió q42. El ser mRNA presenta *splicing* alternatiu, s'obtenen 4 isoformes diferents de mRNA. La proteïna resultant està composta per 289 Aa (Figura 3).



Figura 3. Estructura del gen i la proteïna de CD40 de rata. Modificat de NCBI

1.1.2. Expressió cel·lular

Cèl·lules dendrítiques: Aquestes cèl·lules independentment del seu origen (sang perifèrica, amígdala, dermis, etc.) expressen CD40 [9-11], i la seva activació indueix al desenvolupament de la cèl·lula i alteracions en el seu fenotip. Hi ha un important

paper potencial del senyal CD40/CD40L en la interacció entre la cèl·lula dendrítica i el limfòcit T. També en el desenvolupament funcional de la cèl·lula B al fol·licle [12].

Limfòcits B: CD40 juga un paper important en l'ontogènia dels limfòcits B [13] ja que s'ha vist que des del seu estat embrionari, aquests expressen CD40. A part d'aquesta participació en la ontogènia, els limfòcits B adults expressen CD40 sense tenir en compte la seva futura funció o localització [14]. Els limfòcits B de les amígdales poden alliberar la forma soluble de CD40, que s'uneix a CD40L del limfòcits T [15].

Cèl·lules progenitores hematopoètiques: S'ha vist que cèl·lules CD34+ del moll de l'os i del cordó umbilical expressen CD40 en etapes inicials del desenvolupament de la línia mieloide [16].

Limfòcits T: L'expressió de CD40 es troba en limfòcits activats CD4+, CD8+, CD4+/CD8+, TCR+ [17]. La unió de CD40 amb CD40L indueix l'expressió de CD25, CD40L i CD69; la proliferació de limfòcits activats CD4+ i CD8+; i la secreció d'IFN γ , TNF α , i IL12 [18].

Basòfils: Expressen CD40 en etapes inicials de la seva diferenciació [19].

Eosinòfils: Eosinòfils de sang perifèrica de pacients atòpics expressen elevats nivells de CD40 [20].

Monòcits/macròfags: Expressen CD40 de forma constitutiva. La interacció amb CD40L indueix l'expressió de IL12, que pot induir l'expressió de CD40L als limfòcits T [21].

Cèl·lules epitelials: S'ha vist expressió de CD40 en diferents epitelis patològics, en canvi, no es veu aquesta expressió en epitelis sans. Aquest fet que implica un rol de CD40 en el desenvolupament de carcinomes, neoplàsies epitelials, llocs amb inflamació crònica [22], com és el cas també del trasplantament degut a la lesió per isquèmia reperfusió, malalties autoimmunes, etc.

Cèl·lules endotelials: Les cèl·lules endotelials de varis teixits (melsa, tiroides, pell, musculatura, ronyó, pulmó, vasos, cordó umbilical) tenen una expressió basal i constitutiva de CD40, la qual es pot induir amb citocines pro-inflamatòries. La interacció amb CD40L indueix una expressió de molècules d'adhesió com E-selectina, VCAM o ICAM, promou el reclutament de cèl·lules mononuclears, promou la generació de la placa arterioscleròtica i contribueix al procés de trombosis. S'ha vist

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

que en teixits inflamats hi ha una sobre-expressió de CD40 comparat amb teixits normals [23, 24].

Cèl·lules musculars llises: L'expressió de CD40 en aquest tipus cel·lular és induïda per estímuls pro-inflamatoris [25].

Queratinòcits: Tant els queratinòcits indiferenciats com els madurs expressen CD40 de forma constitutiva. La unió amb CD40L induïx l'expressió de citocines, molècules d'adhesió, i redueix la proliferació [26].

Fibroblasts: L'expressió de CD40 en fibroblasts és induïble per citocines pro inflamatòries com IFN γ [27] i la unió amb el lligand provoca la secreció de molècules d'adhesió, citocines, ciclooxigenasa 2 i prostaglandina E₂ [28]. Hi ha estudis que suggereixen que la interacció entre els fibroblasts del teixit i els limfòcits T infiltrants promouen la fibrogènesis local [29].

1.2. CD40L

El lligand de CD40, CD40L (també anomenat CD154 o gp39) és una glicoproteïna de membrana tipus II membre de la superfamília Factor de Necrosis Tumoral TNF i de 39 kDa de pes molecular. Altres membres d'aquesta família són el CD27L, CD30L, TNF α , TNF β , FasL, TRAIL, Ox40L [4].

CD40L s'expressa predominantment en limfòcits T CD4 activats. També s'ha descrit en limfòcits T CD8, en basòfils, eosinòfils, monòcits/macròfags i cèl·lules de Kupffer, cèl·lules natural killer, limfòcits B, plaquetes, mastòcits, cèl·lules dendrítiques, cèl·lules epitelials, cèl·lules endotelials, cèl·lules de la musculatura llisa, etc.

1.2.1. Estructura del gen de CD40L

1.2.1.1 Humà:

Està localitzat al cromosoma X concretament a la posició q26.3-27.1, consta de 5 exons i 4 introns. El primer codifica per la part intracel·lular, la part transmembrana i una petita porció de la part extracel·lular, la resta de porció extracel·lular és codificada pels exons II a V. Té una seqüència de DNA de 13 kb. Un cop transcrit, aquest gen dóna lloc a un mRNA de 2,3 kb que codifica per una proteïna que és un

polipèptid de 261 Aa, dels quals 22 formen la part citoplasmàtica, 24 la transmembrana i 215 la part extracel·lular (Figura 4).

A part de la forma transmembrana de 39kDa existeix una forma soluble (sCD40L). S'han caracteritzat tres fragments solubles biològicament actius d'aquesta proteïna de 14,18 i 31kDa [30, 31]. Aquests fragments s'han obtingut a partir de la divisió proteolítica del domini extracel·lular de la proteïna unida a la membrana en el moment de l'activació dels limfòcits T [31].

S'ha demostrat que CD40L forma complexes heteromultimèrics que consisteixen en una subunitat gran o sencera i una de petita a la superfície del limfòcits T humans [32]. La forma soluble més freqüent és la de 18kDa, que li falta la cua citoplasmàtica, la part transmembrana i part de la regió extracel·lular, però que conserva el domini d'unió a CD40; aquesta forma soluble de 18kDa es pot trobar en forma oligomèrica, predominant la forma trimèrica [33].

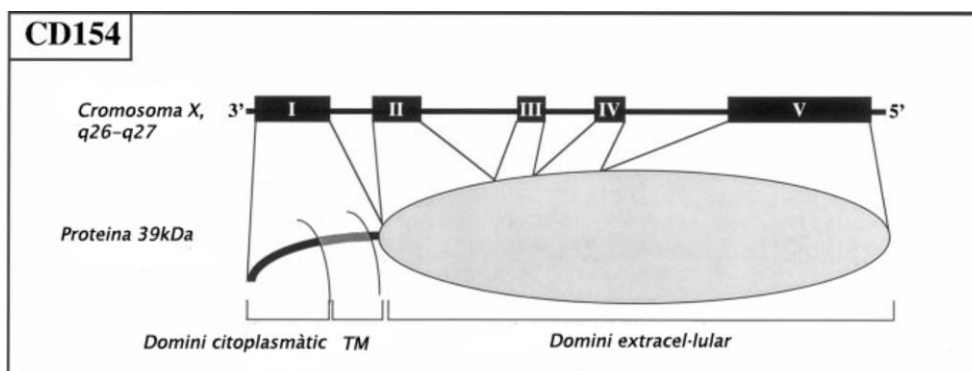


Figura 4. Estructura del gen i la proteïna de CD40L humà. Modificat de [8].

1.2.1.2. Ratolí:

El gen de CD40L humà i el de ratolí comparteixen un 80% d'homologia. També s'ha trobat una forma soluble de 33kDa [31]. La proteïna consta de 260 Aa, 22 dels quals formen el domini citoplasmàtic, 24 el domini transmembrana i 214 el domini extracel·lular.

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

1.2.1.3. Rata:

El gen que codifica per CD40L de rata està localitzat al cromosoma X, exactament a la regió q36.

1.2.2. Unió CD40-CD40L

La unió entre CD40 i el seu lligand esdevé estable gràcies a dos clústers de determinats residus amb càrrega presents en ambdues molècules: CD154 aporta els residus amb càrrega positiva K143, R203, i R207; i CD40 aporta els residus amb càrrega negativa D84, E114 i E117 [34]. S'ha demostrat que aquests clústers estan en els dominis conservats de la proteïna [35].

1.2.3. Expressió cel·lular

L'expressió de CD40L és induïble i transitòria. En el cas del limfòcits T la proteïna s'expressa a la superfície de la cèl·lula 5 minuts després de la seva activació. Aquest fet és degut a l'habilitat d'exposar un CD40L preformat [36]. Aquesta expressió és transitòria ja que hi ha un pic a les 6h i aquesta desapareix passades unes 12-24h [37]. Altres estudis han demostrat patrons de regulació similars en altres tipus cel·lulars, i que hi ha una síntesis *de novo* després de l'activació [38]. La seva expressió també es veu augmentada després de la unió amb CD40, fet que proposa una regulació autòloga [39].

A diferència de CD40, les cèl·lules que expressen CD40L no ho fan de forma constitutiva, sinó que la seva expressió és induïble.

Limfòcits T: La capacitat d'inducció de l'expressió de CD40L en aquestes cèl·lules depèn del grau de maduració. Els limfòcits del timus immadurs no expressen CD40L després d'un estímul. Els que si que ho expressen són CD4+, CD8+, CD45RO+CD45RA+.

Basòfils: Després de l'estímul i activació aquestes cèl·lules indueixen l'expressió de IgE, suggerint la funció dels basòfils durant l'al·lèrgia, no només produint mediadors

d'inflamació sinó també regulant la producció de IgE independentment del limfòcits T [40].

Eosinòfils: La inducció de l'expressió de CD40L als eosinòfils activa senyals de proliferació a les cèl·lules CD40+. S'ha vist que eosinòfils de pacients amb hipereosinofília expressen constitutivament CD40L, fet que implica el seu paper en processos inflamatoris [41].

Monòcits/macròfags: S'ha demostrat que hi ha una síntesis induïble de la proteïna i una major expressió en monòcits activats en lesions arterioscleròtiques i durant el rebuig crònic de l'empelt [42].

Cèl·lules Natural Killer: Aquestes cèl·lules augmenten la seva expressió de CD40L després d'un estímul com IL2. S'ha vist que cèl·lules NK deficientes en l'expressió de CD40L no són funcionals [43].

Limfòcits B: poden expressar CD40L després de l'activació. Els limfòcits B dels pacients amb lupus eritematós sistèmic en fase activa, expressen espontàniament alts nivells de CD40L en comparació amb els que es troben als limfòcits T [44].

Plaquetes: Són la font majoritària de CD40 soluble en circulació. La seva expressió s'observa només després de pocs segons de l'activació en el procés de formació d'un trombe [45].

Mastòcits: S'ha vist expressió funcional de CD40L en mastòcits aïllats de pulmó i nasals [40].

Cèl·lules dendrítiques: La unió amb CD40 indueix una expressió de CD40L en augment a la superfície cel·lular. Les cèl·lules dendrítiques mancades de CD40L no tenen capacitat de regulació de la activació i maduració de cèl·lules B [39].

Cèl·lules endotelials i de la musculatura llisa: S'ha trobat expressió de CD40L en aquestes cèl·lules aïllades d'un focus d'inflamació com de lesions arterioscleròtiques, empelts renals i cardíacs que han sofert rebuig [42, 46].

Cèl·lules epitelials: S'ha vist que la seva expressió és induïda en les cèl·lules tubulars epitelials durant el rebuig crònic renal [47].

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

1.3. Mutacions gèniques

S'ha comprovat que mutacions en algun d'aquests dos gens donen lloc a una immunodeficiència primària severa anomenada síndrome híper IgM [48, 49].

Mutacions al gen codificant per CD40 dona lloc a un síndrome híper IgM tipus III, té caràcter autosòmic recessiu. Les característiques clíniques més rellevants són la disfunció en la generació i proliferació de cèl·lules B, la no formació de centres germinals [50, 51], la impossibilitat del canvi d'isotip en la cèl·lula B, i per tant, la inhabilitat per donar lloc a una resposta anticòs específica.

També dona lloc a neutropènia, IgM elevada, IgA, IgG i IgE molt disminuïdes. Tot això resulta en una major susceptibilitat i recurrència en la infecció de bacteries oportunistes [52].

Mutacions en el gen CD40L donen lloc també a la síndrome híper IgM tipus I (HIGM), la seva herència està lligada al cromosoma X i té caràcter recessiu. Les característiques clíniques són molt semblants a la tipus III, també inclou hepatomegàlia, esplenomegàlia, hipertròfia de les amígdals, neutropènia, anèmia hemolítica, trombocitopènia, etc. Hi ha una base de dades on es descriuen la majoria de mutacions que donen lloc a aquest síndrome [53].

1.4. SNP

S'han descrit diferents mutacions del gen CD40 i CD40L. Hi ha estudis que demostren la relació entre algun d'aquests SNP i diferents malalties (Taula1).

GEN	SNP	MALALTIA	REF
CD40	rs4810485	Lupus eritematós sistèmic	[54]
	rs1883832	Ictus isquèmic	[55]
		Associat al risc de limfoma	[56]
		Síndrome aguda coronaria	[57, 58]
		MPOC	[59]
		Pèrdua de massa òssia	[60]
		Osteoporosis	[61]
		Autoimmunitat	[62]
		Malaltia de Grave's	[63, 64]
		rs11086998	Augmenta funció del receptor
	rs1800686 rs1883832	IgE i asma	[66]
	rs4810485	Psoriasis	[67]
		Artritis reumatoide	[68, 69]
	rs1535045	Artritis reumatoide trombosi	[70]
rs3765459	Artritis reumatoide, trombosi	[70]	
CD40L	rs3092952	Síndrome aguda coronaria	[71]
	rs3092923	Associat al risc de limfoma	[56]
	rs1126535	Osteoporosis	[61]

Taula 1. Principals SNP descrits als gens CD40 i CD40L relacionats amb diferents malalties.

1.5. Transducció de senyals de CD40

La majoria d'estudis de la via de senyalització de CD40 s'ha fet en limfòcits B. Estudis basats en la homologia de TNF/TNF-R demostren que per l'activació efectiva de la via de senyalització de CD40 es requereix la multimerització del receptor. CD40L forma estructures trimèriques, que al unir-se amb CD40, implica la trimerització del receptor (Figura 5) [72].

Un procés ordenat i la oligomertització són crucials per la transducció de senyals. La forma trimèrica de CD40L és molt més potent que la forma monomèrica o dimèrica [73].

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

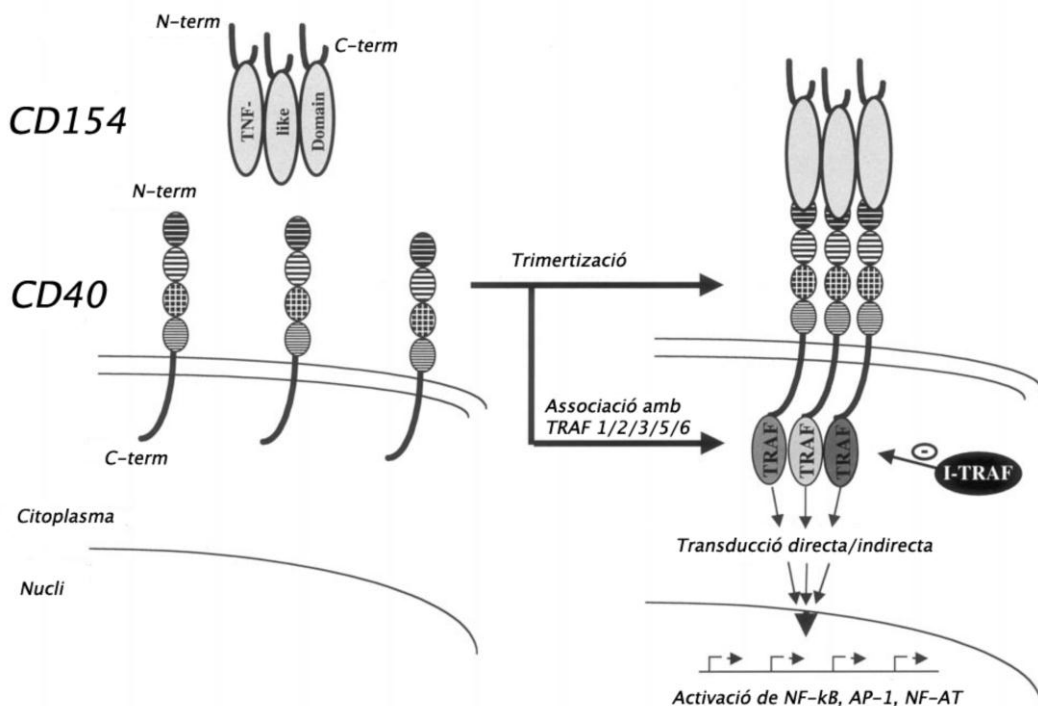


Figura 5. Mecanisme de senyalització de CD40. Modificat de [4].

La proteïna CD40 conté dos llocs de fosforilació principals en el seu domini citoplasmàtic, un d'ells és la treonina 234. S'ha vist que mutants o la substitució d'aquest aminoàcid per una alanina inhibeixen la transducció de senyal [74]. Aquestes àrees de fosforilació són dominis crítics per la senyalització ja que són llocs d'unió de proteïnes. En la transducció del senyal es creu que poden ocórrer diferents mecanismes que poden contribuir al procés; l'activació del receptor degut a quinases i fosfatases o l'associació de proteïnes en els respectius dominis d'unió.

1.6. Vies de senyalització de CD40

1.6.1. TRAF: Factors associats a la família de TNF-R

Degut a que la part citoplasmàtica de CD40 no té activitat intrínseca, aquest necessita un adaptador per poder iniciar la via de senyalització corresponent. Aquest

adaptador s'anomena TRAF, "*TNF receptor associated factor*". Actualment es coneixen 6 molècules TRAF, totes elles excepte TRAF4 s'uneixen a CD40.

El 1994 es va identificar TRAF3 com la primera proteïna associada a la senyalització de CD40, aquest interacciona amb el domini citoplasmàtic del receptor directament per una regió anomenada "domini TRAF" [75]. Totes les proteïnes d'aquesta família comparteixen homologia de seqüència d'aminoàcids en el seu domini carboxiterminal (domini TRAF).

Aquest domini TRAF té dues subregions, una regió carboxiterminal que es requereix també per la dimertització amb altres membres de la família i una regió aminoterminals que està menys conservada, on hi ha 5-6 estructures de dit de zinc similars als dominis d'unió a proteïna [75] (Figura 6).

Les proteïnes TRAF a través de la seva unió amb el domini citoplasmàtic del receptor, desencadena el reclutament de molècules TRAF i altres proteïnes intracel·lulars. S'acoblen formant un complex de senyalització multi proteic, que desencadena l'activació de cascades de quinases i l'activació de factors de transcripció nuclear com NF-kB, AP-1, NFAT, que regulen la transcripció de gens involucrats en la proliferació, diferenciació i apoptosi.

La unió de les proteïnes a través del seu domini TRAF al receptor, està alhora regulada per altres proteïnes adaptadores i inhibidors endògens intracel·lulars.

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

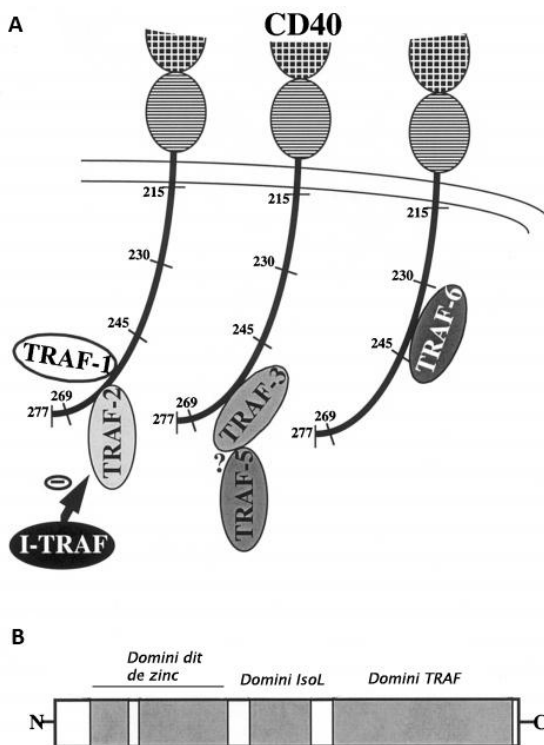


Figura 6. A) Mecanisme de senyalització de CD40 a través de la unió de les proteïnes TRAF. B) Estructura i dominis de les proteïnes TRAF. Modificat de [4]

1.6.2. Paper de les STATs

A part de les proteïnes TRAF, s'han descrit altres membres de la família de les STATs (*signal transducers and activators of transcription*) que estan implicats en la via de senyalització de CD40.

Les STATs són fosforilades per proteïnes quinases de la família JAK. Un cop activades formen dímers, que són translocats al nucli i s'uneixen a regions específiques de DNA per regular l'expressió de diferents gens [76] (Figura 7).

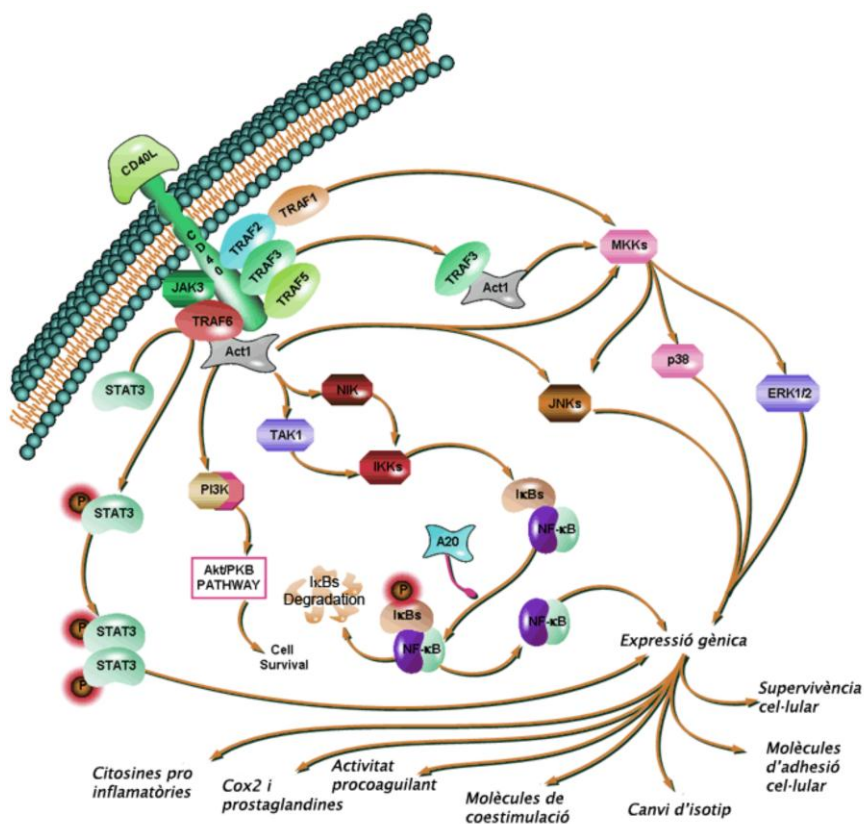


Figura 7. Visió general de les vies de senyalització de CD40, mediadors i processos modulats per la unió de CD40-CD40L. Modificat de SA. Biosciences.

1.6.3. Factors de transcripció

Pel que fa als factors de transcripció involucrats en la senyalització de CD40 se sap que s'activa NF- κ B, i també altres membres de la família com p50, relA, c-Rel [77]. S'ha demostrat activació de la I κ B quinasa i es creu que la inducció de NF- κ B també es pot donar per la via PI3 quinasa [78].

A part de NF- κ B, la senyalització de CD40 activa també el factor AP-1, format per heterodimers entre les proteïnes de la família Jun i Fos. També s'ha trobat que CD40 afecta l'expressió del factor ATF-2 i que indueix l'activació de NFAT [77].

1.7. Funcions biològiques de CD40-CD40L

Inicialment es considerava que la funció de CD40 i CD40L estava limitada als limfòcits T i B i involucrada en la immunitat humoral. Més tard es va descriure l'expressió d'ambdues proteïnes en altres tipus cel·lulars i es va veure que estava implicada en la regulació de diverses funcions biològiques (Figura 8). Conseqüentment, es va veure la seva associació a processos patològics i diferents malalties inflamatòries cròniques.

La interacció CD40-CD40L juga un paper molt important en l'activació del sistema immunitari. És crucial en la resposta immune primària i secundària generada al timus, en el procés de maduració dels limfòcits B, formació de cèl·lules B memòria, i generació i manteniment dels centres germinals [79].

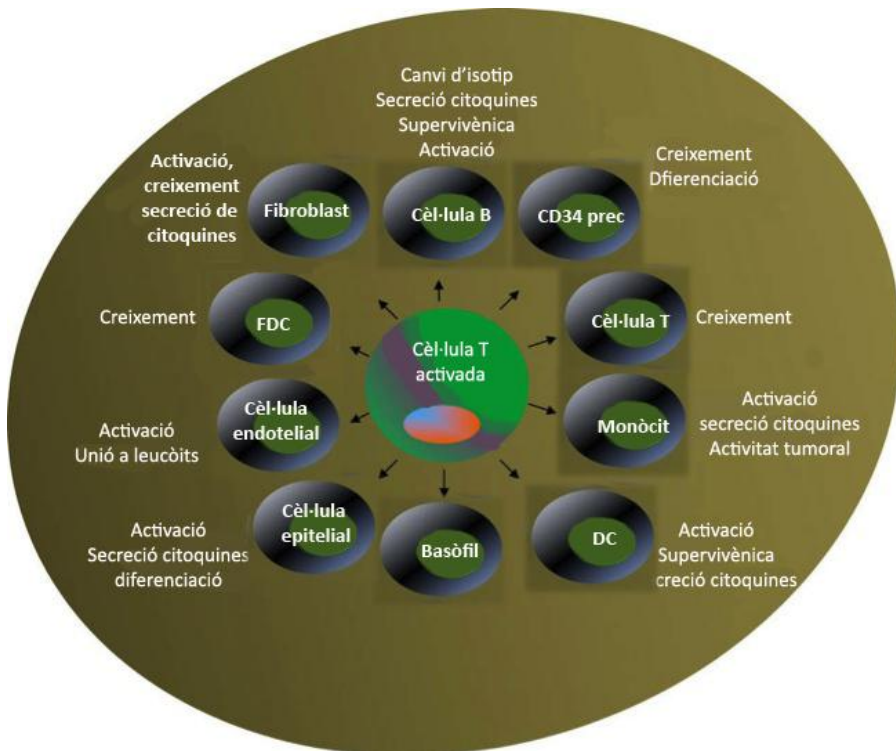


Figura 8. Funcions mediades per CD40 en la resposta immune i activació del limfòcits T. Modificat de [3].

1.7.1. Activació del limfòcit T

L'inici de la resposta immune específica requereix el processament de l'antigen per part de les cèl·lules presentadores d'antigen (APC), el reconeixement dels epítops pels limfòcits T i B i l'expansió clonal i diferenciació d'aquests limfòcits antigen específics a cèl·lules efectores.

Els limfòcits T presenten a la superfície un receptor anomenat TCR que reconeix els pèptids antigènics que els presenta una APC mitjançant el complex major d'histocompatibilitat (MHC).

El receptor TCR és un heterodímer format per cadenes transmembrana de tipus α i β majoritàriament o també per cadenes γ i δ . La seva porció carboxiterminal és constant, el seu domini aminoterminal és variable i conté un domini altament polimòrfic, que és el que li confereix la limfòcit T especificitat clonal per l'antigen. El receptor TCR s'uneix al complex CD3 que ajuda a la transducció del senyal a l'interior de la cèl·lula després de la unió del TCR amb l'antigen.

A la superfície de la cèl·lula T també s'expressen les molècules CD4 (limfòcits T *helper*) i CD8 (limfòcits T citotòxics) que ajuden al complex receptor TCR/CD3. Aquests participen en el reconeixement antigènic, estabilitat de la unió entre l'antigen i el receptor i el sistema de transducció de senyals.

Per l'activació de limfòcits T naïve es requereix tant el senyal antigen específic via TCR com el senyal de la via de coestimulació. El primer senyal confereix especificitat antigènica al procés d'activació de la cèl·lula T, i indueix l'expressió d'altres molècules a la superfície del limfòcit T, però aquesta no és suficient per iniciar l'activació. Perquè l'activació es produeixi es requereix d'un segon senyal proporcionat per les molècules de coestimulació expressades tant a la superfície de la cèl·lula T com de la APC (Figura 9).

Aquest senyal també provoca un augment de la síntesi d'altres molècules coestimuladores, les quals amplifiquen el procés d'activació. Els dos senyals de

coestimulació principals són el sistema CD80/CD86 (també anomenant B7-CD28) i el sistema CD40-CD40L.

Si aquest segon senyal de coestimulació no es dóna, es produeix una situació de tolerància antigènica o no resposta, convertint-se així en cèl·lules anèrgiques que no responen davant la re-exposició de l'antigen, inhibint la seva proliferació i la producció de citosines *in vivo* o entrar en apoptosi.

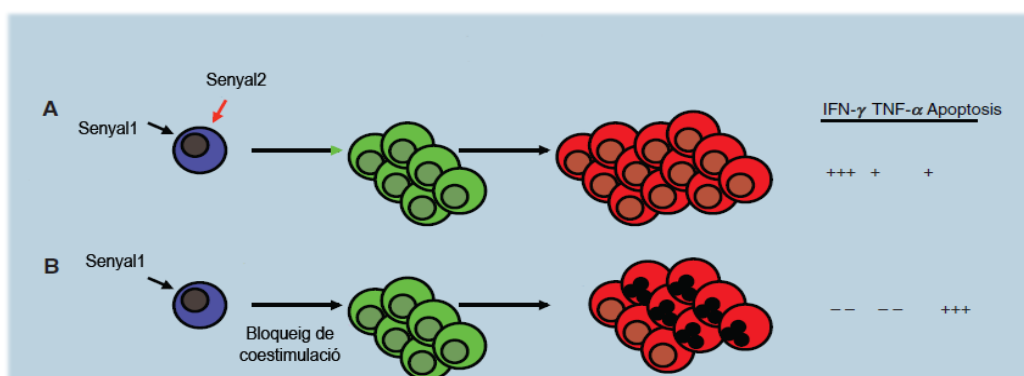


Figura 9. Principals senyals necessàries per l'activació de la cèl·lula T. Modificat de [80].

Quan la cèl·lula T és activada, aquesta modularà la resposta immune cel·lular o humoral activant i induint la proliferació d'altres tipus cel·lulars, i adquirint diferent fenotips que es diferencien segons un tercer senyal, que depèn del tipus de citocines que són alliberades en resposta a l'activació.

Les característiques específiques de l'antigen i dels senyals de coestimulació determinaran si es derivarà a una resposta de tipus humoral, cel·lular o altres (Figura 10).

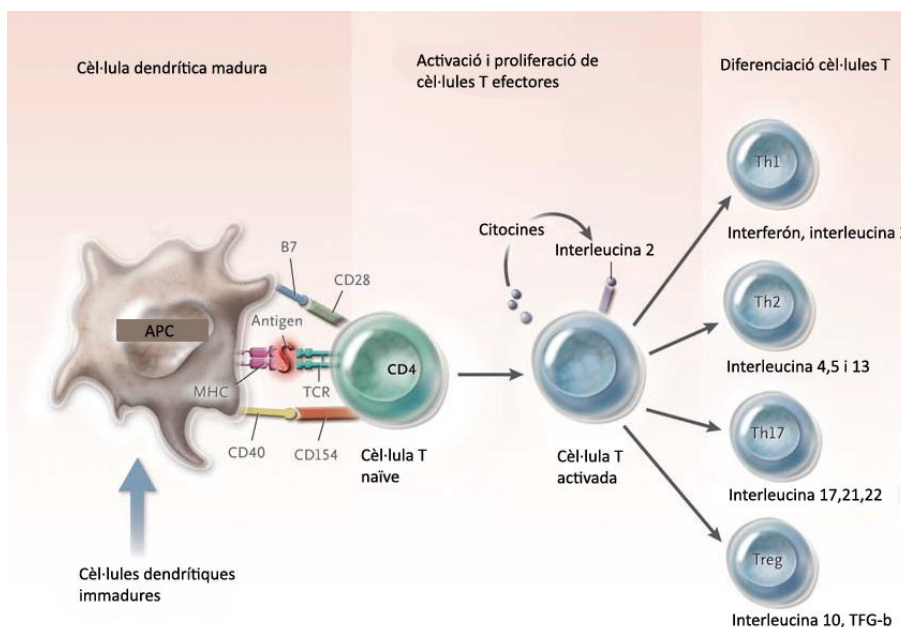


Figura 10. Activació del limfòcit, proliferació i diferenciació cap a diferents subtipus amb un perfil de secreció de citocines característic. Modificat de [81].

1.7.2. Activació del limfòcit B

Molts estudis impliquen la senyalització de CD40-CD40L i la seva capacitat de modulació del creixement i diferenciació dels limfòcits B. Després de la maduració en la medul·la òssia i la melsa, les cèl·lules immunocompetents B resten en els teixits perifèrics fins que troben un antígen i són activades.

L'activació de la cèl·lules B requereix dos senyals diferents. El primer senyal d'activació es produeix després de la unió de l'antigen al receptor de la cèl·lula B (BCR). Després de la unió, l'antigen s'internalitza per endocitosi, es digereix, i es forma un complex amb molècules MHC II a la superfície de la cèl·lula. El segon senyal d'activació es produeix a través d'un mecanisme que pot ser dependent o independent de la cèl·lula T. La majoria de les respostes per part de les cèl·lules B a

antígens requereixen la interacció amb la cèl·lula T *helper* (mecanisme dependent d'activació).

La presentació d'un complex antigen-MHC classe II en una cèl·lula B li permet actuar com una cèl·lula presentadora d'antigen quan s'enfronta a una cèl·lula T. La cèl·lula T activada, proporciona el segon senyal d'activació. Alternativament, hi ha determinats tipus d'antígens que poden proporcionar directament aquest segon senyal d'activació a la cèl·lula B (mecanisme d'activació independent). Aquests antígens inclouen components de la paret cel·lular bacteriana o que contenen molècules altament repetitives.

Després de l'activació, els limfòcits responen a la unió de CD40 amb un augment de la proliferació [82]. Formen centres germinals on es diferencien en cèl·lules B de memòria o cèl·lules plasmàtiques. Després de la diferenciació en cèl·lules plasmàtiques, es dona un canvi de isotip i es regula la secreció d'anticossos. Cada cèl·lula plasmàtica secreta anticossos amb elevada especificitat contra un antigen determinat.

1.7.3. Canvi d'isotip

La senyalització per CD40 és essencial per la inducció al timus de la síntesis de immunoglobulines i també pel canvi d'isotip de la cadena pesada. Hi ha estudis que demostren que la unió de CD40 sense cap altre estímulo és suficient per induir el canvi d'isotip de IgM cap a IgG o IgA en cèl·lules B humanes [83]. En canvi, altres estudis indiquen que és necessària, per determinats tipus de immunoglobulines, un altre senyal complementari.

1.7.4. Formació de centres germinals

La unió de CD40 amb el seu lligand té un paper directe i alhora indirecte en la formació dels centres germinals. Afecta a la seva formació i supervivència. La transducció del senyal de CD40 té efectes bidireccionals, activa els limfòcits T i la secreció de citocines requerides per la formació del centre.

També indueix als limfòcits B a l'expressió de diferents receptors de citocines i a l'expressió d'immunoglobulines a la superfície de les cèl·lules. En el cas de centres germinals més avançats, es promou el desenvolupament de cèl·lules B memòria [84].

1.7.5. Regulació de mediadors d'inflamació

Inicialment es pensava que el paper de la interacció de CD40-CD40L estava restringit a la immunitat humoral dependent de les cèl·lules T. S'ha vist que a part d'intervenir en processos importants de la immunitat humoral com són l'activació dels limfòcits B, el control del canvi d'isotip, la formació del centres germinals i el desenvolupament de cèl·lules B memòria; la interacció de CD40 també participa en el desenvolupament de la resposta immune cel·lular.

La unió de CD40 en altres tipus cel·lulars com són els macròfags, cèl·lules natural Killers, cèl·lules endotelials, dendrítiques, fibroblasts, etc., activa diferents processos pro inflamatoris induint l'expressió de citocines, quimioquines i molècules d'adhesió, entre d'altres (Taula 2).

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

	FUNCIÓ	TIPUS CEL·LULAR	MEDIADORS
Immunitat humoral	Activació	Limfòcits B	CD23, CD30, CD80, CD86, Fas, MHCII citocines: IL6, IL10, TNF α , TGF β
	Canvi de isotip	Limfòcits B	IgA, IgE, IgG, IgM
	Formació de centres germinals i cèl·lules B memòria	Limfòcits B	IL2, IL10
Immunitat Cel·lular	Citocines pro inflamatòries	Limfòcits B Eosinòfils Monòcits Cèl·lules dendrítiques Cèl·lules epitelials Cèl·lules endotelials Cèl·lules musculars Ilises fibroblasts Queratinòcits	IL1, IL2, IL4, IL8, IL10, IL12, TNF α , TGF β
	Quimiocines	Monòcits Cèl·lules epitelials Fibroblasts Queratinòcits Cèl·lules endotelials.	IL8, MIP-1 α , MIP-1- β , RANTES, MCP1, ABCD1, CCR7
	Molècules d'adhesió	Limfòcits B Cèl·lules endotelials Fibroblasts	LFA-1, ICAM1, VCAM1, E-selectina
	Metal·loproteases	Monòcits Fibroblasts Cèl·lules endotelials Cèl·lules musculars Ilises	MMP1, MMP13, MMP2, MMP9, MMP3, MMP11
	Activitat procoagulant	Monòcits Cèl·lules endotelials Cèl·lules musculars Ilises	Factor tissulars
	Altres	Monòcits Cèl·lules dendrítiques Fibroblasts Cèl·lules endotelials	Cox2, òxid nítric

Taula 2. Funcions biològiques de CD40/CD40L. Modificat de [79].

2. RNA interferència. Silenciament gènic post transcripcional.

2.1. Història

El mecanisme de RNA d'interferència es va observar per primera vegada el 1990 en plantes quan Rich Jorgensen va provar d'incrementar el color púrpura d'unes petúnies augmentant l'expressió del gen de l'enzim xalcona sintasa (CH) (responsable de la fabricació del pigment), introduint transgènicament còpies del gen. Va observar que el resultat final era el contrari de l'objectiu inicial, les petúnies resultants van ser de color blanc o poc pigmentades degut a la reducció de l'expressió del gen unes 50 vegades [85] (Figura 11). Es va observar que els gens introduïts afectaven a l'expressió del locus endogen. Aquest procés es va anomenar co-supressió, és a dir, el transgen inhibia el seu homòleg i a ell mateix. Es va proposar aquest mecanisme com un mecanisme de defensa de les plantes.

En un altre laboratori es va veure que les plantes eren capaces de respondre a la infecció per virus de RNA causant la degradació específica del RNA viral [86].



Figura 11. Petúnies. Planta en la qual es va descobrir el mecanisme de RNAi. Adaptat de [87]

2.2. Teràpia RNAi

La teràpia basada en RNA es pot classificar segons el mecanisme utilitzat, i inclou inhibidors de la traducció (oligonucleòtids *antisense*), interferència de RNA (RNAi), molècules de RNA catalíticament actives (ribozims), i RNA que uneixen proteïnes i altres molècules (aptamers).

La teràpia gènica basada en el mecanisme de RNA d'interferència (RNAi) amb siRNA com a molècules efectores té múltiples avantatges en el tractament de diferents malalties. Tenen un ampli camp d'aplicació. Promouen una silenciació gènica molt precisa, efectiva i alhora reversible.

2.3. Mecanisme d'RNA d'interferència:

És un mecanisme de silenciament gènic innat de defensa que actua a un nivell post-transcripcional. És altament específic contra elements de RNA de doble cadena (dsRNA) i causa la supressió de l'expressió gènica mitjançant la inactivació o degradació del RNA missatger. La supressió dels nivells de la proteïna diana pot ser parcial (*knock-down*) o total (*knock-out*).

El mecanisme de RNAi és iniciat quan una molècula de RNA de doble cadena llarga (dsRNA) entra a la cèl·lula. Aquesta molècula seguidament és processada i tallada en molècules més petites (siRNA) d'entre 21 i 23 nucleòtids per un enzim anomenat *DICER*, aquest enzim està altament conservat al llarg de l'evolució i és un membre de la família de RNAses tipus III [88-90].

Aquests fragments resultants tenen dos nucleòtids que sobresurten a l'extrem 3' de les dues cadenes que seran importants pel següent pas de la via de RNAi. Els siRNAs resultant s'uneixen a un complex silenciador induït per RNA (RISC) que conté dues subunitats; Argonaute 2 (*Ago2*) i RISC. En *Drosophila* i en mamífers la cadena *antisense* és incorporada directament al complex RISC. El siRNA s'uneix al complex quant té complementarietat total de la molècula, és llavors quan la subunitat catalítica del complex, *Ago2*, degrada la cadena *sense* mitjançant un procés ATP-dependent [91].

Aquesta degradació provoca l'activació de RISC. La cadena *antisense* que resta unida al complex és la que el dirigeix cap al mRNA diana i aquest és degradat també per la subunitat catalítica *Ago2*, la degradació té lloc entre els nucleòtids n.10 i 11 complementaris a la cadena *antisense* relatiu a l'extrem 5'. Per tant, el lloc d'unió de l'extrem 5' defineix exactament el punt per on es degradarà el mRNA diana [88, 92].

L'alta especificitat del procés és degut a la complementarietat dels parells de bases entre la cadena *antisense* i el mRNA diana. Un cop iniciada la degradació pels llocs corresponents la molècula és reconeguda per les RNAses nuclears i és degradada ràpidament (Figura 12). La cadena *antisense* i el complex no es veuen alterats per aquesta reacció i aquest pot seguir fent varis cicles de degradació, fet que proporciona una gran efectivitat al mecanisme de RNAi [93, 94]. En la majoria de casos, no s'aconsegueix una supressió total de l'expressió gènica sinó una reducció.

El mecanisme de RNAi també es pot iniciar amb la expressió endògena de RNA petits reguladors, coneguts com microRNAs (miRNAs). Aquests són sintetitzats al nucli en forma de pre-miRNA, i un cop fora del nucli, s'uneixen a l'endonucleasa DICER que els processa a miRNA (també amb una llargada d'entre 21 i 23 nucleòtids). Són incorporats al complex RISC.

A partir d'aquí la via segueix el mateix camí per obtenir el mateix resultat que el siRNA, amb la diferència que la degradació del mRNA diana es fa degut a les unions imperfectes entre les cadenes, i això provoca que la cèl·lula el reconegui com una molècula errònia que no es pot transcriure (Figura 12).

Una altra via és coneguda com a *small hairpin RNA* o *short hairpin RNA*. Consisteix en una seqüència de RNA que té una estructura diferent al siRNA. L'expressió de shRNA en les cèl·lules es realitza generalment mitjançant el lliurament dels plasmidis o mitjançant vectors virals o bacterians.

Existeix una gran varietat de vectors virals que es poden utilitzar per obtenir l'expressió de shRNA a les cèl·lules, incloent virus adeno-associats, adenovirus i lentivirus. L'elecció promotor és essencial per aconseguir una bona expressió de shRNA. Inicialment s'utilitzava el promotor de la polimerasa III com ara U6 i H1, però recentment hi ha hagut un canvi cap a l'ús polimerasa II promotors per regular l'expressió de shRNA.

Utilitzar virus adeno-associats o adenovirus té l'avantatge de que s'evita la mutagènesi per inserció, però té la desavantatge de que el virus es perd ràpidament

a través de la divisió cel·lular. L'ús de lentivirus té l'avantatge que s'integra en seccions de cromatina transcripcionalment activa i per tant es transmet a les cèl·lules descendents. En aquest cas hi ha un major risc de mutagènesi d'inserció, però, aquest es pot reduir mitjançant l'ús d'un lentivirus integrasa deficient [95].

Una vegada que el vector s'ha integrat en el genoma de l'hoste, el shRNA es transcriu després en el nucli pel promotor la polimerasa II o III. La molècula pre-shRNA resultant s'exporta des del nucli per Exportin 5. Aquest producte és processat per Dicer i s'uneix a RISC. Un cop en aquest punt de la via, segueix el mateix camí del mecanisme RNAi que una molècula siRNA.

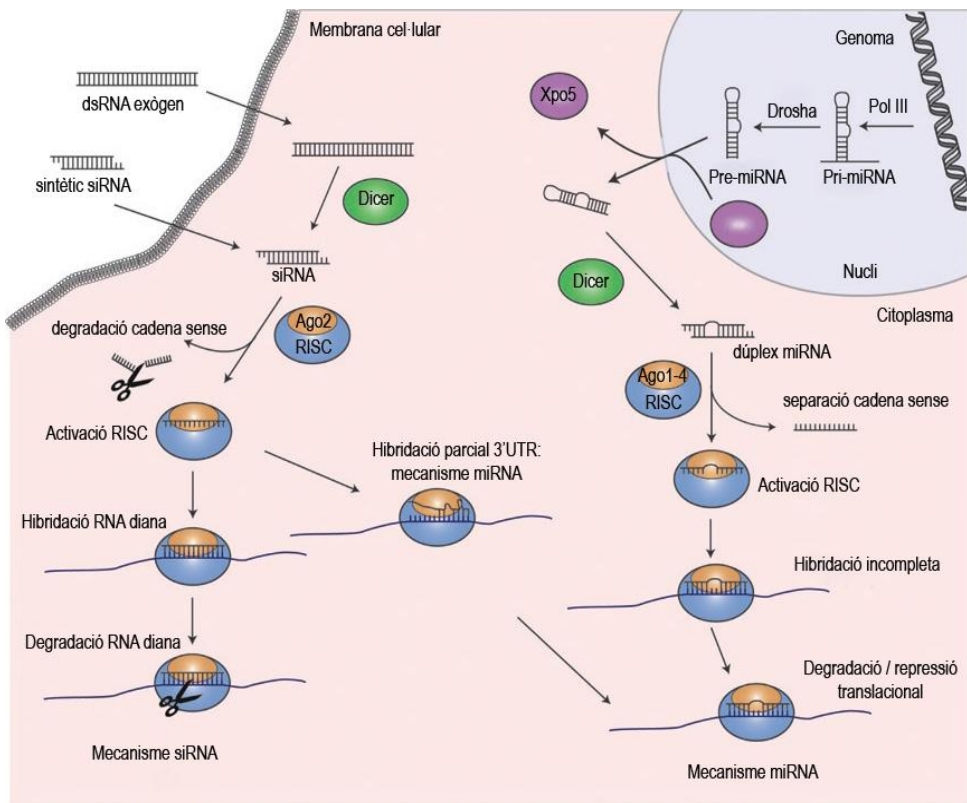


Figura 12. Mecanisme de RNA interferència. Modificat de [96].

2.4. Vies d'administració d'un RNA d'interferència.

Una molècula siRNA es pot administrar de forma local o sistèmica. Hi ha moltes vies i mètodes usats per la seva administració. Hi ha molts exemples d'estudis *in vivo* demostrant l'eficàcia d'aquest tipus de teràpia (Figura 13).

- Algunes de les formes d'administració locals més utilitzades són:
 - Intratumoral
 - Intramuscular
 - Subcutani
 - Intratecal / intracerebral
 - Intratesticular
 - Intranasal
 - Intravíttria
 - Intraarticular
 - Intra traqueal

- Algunes de les formes d'administració sistèmica més utilitzades són:
 - Intravenós (IV)
 - HPTV: injecció a alta pressió o volum per la vena caudal. Consisteix en injectar un gran volum hídic (2,5 vegades la volèmia de l'animal) de forma ràpida per la vena caudal.
 - LPTV: Low Pressure Tail Vein: el mateix procediment però a baixa pressió.
 - Intraperitoneal (IP)

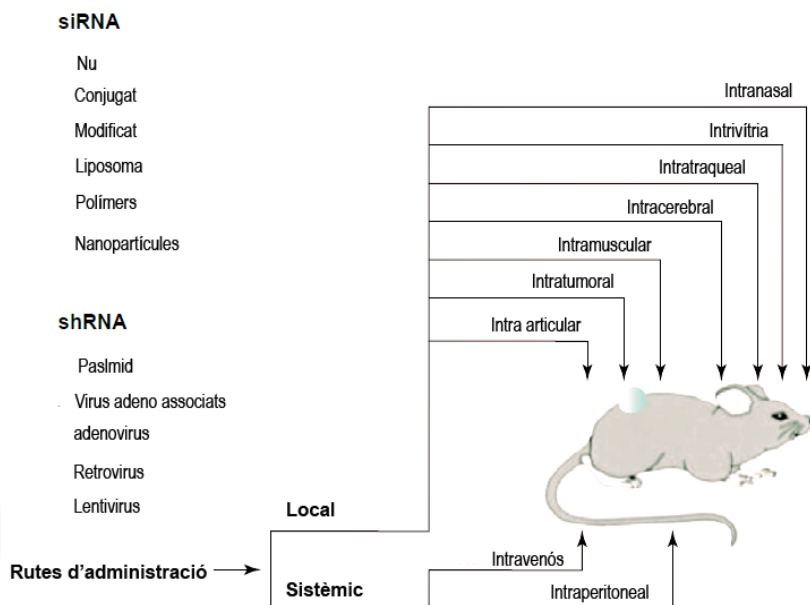


Figura 13 . Estratègies de lliurament de molècules siRNA *in vivo*. Modificat de [97].

2.5. Biodistribució

Les barreres biològiques de l'organisme tenen, entre altres moltes funcions, la funció de prevenció de l'entrada d'agents exògens a l'interior de la cèl·lula. Aquesta funció pot limitar el benefici terapèutic d'un determinat fàrmac.

S'ha descrit que els siRNAs són eliminats ràpidament per filtració glomerular al ronyó degut al seu baix pes molecular (14kDa). S'ha vist que les cèl·lules de Kupffer poden capturar aquestes molècules, eliminant-les així ràpidament de la circulació i disminuir l'accés als hepatòcits. Se sap que també poden passar a través dels capil·lars de les cèl·lules endotelials per difusió simple degut a la seva càrrega negativa.

Se sap que els siRNA amb un disseny de dsRNA són molt més estables que els ssRNA. S'ha vist que després d'una injecció intravenosa en un ratolí els siRNA són

extensament distribuïts pel cos, amb una acumulació preferent a fetge i ronyó [98], i també a cor, melsa i pulmó.

2.6. Limitacions del mecanisme

- El mecanisme de RNA d'interferència pot afectar a un gran nombre de vies de senyalització no desitjades i provocar una activació de la resposta immune, donant lloc a la inducció d'una resposta d'interferó i citocines inflamatòries.
- També pot provocar un silenciament no desitjat d'altres proteïnes diferents a la diana (efectes *off target*). Per això és important saber els mecanismes que activen aquests efectes.
- Se sap que aquest tipus de molècules tenen un aclariment ràpid un cop han entrat al cos, així que la seva efectivitat també depèn de l'entrada i retenció cel·lular de la molècula.

2.6.1. Activació de la resposta immune

Els sistema immune és una de les primeres línies de defensa, reconeixement i resposta front a substàncies foranes. Les cèl·lules immunes expressen molècules de la família de *Toll like receptors* (TLR), que reconeixen patrons associats a patògens (PRR) virals, bacterians i fúngics. La seva principal funció és discriminar entre lo propi i lo no propi. En mamífers hi ha 13 TLR, cada TLR reconeix uns patrons específics. Aquests desenvolupen un paper clau en el reconeixement de microorganismes i en l'activació del sistema immune innat i adaptatiu [99]. Estan localitzats a la membrana cel·lular i en el compartiment endosomal/lisosomal.

En la via de senyalització dels TLR, excepte el TLR3, es dóna majoritàriament mitjançant un adaptador proteic anomenat MyD88, que dóna lloc a l'activació dels transcrits NF- κ B i AP1 i la secreció de citocines inflamatòries. El TLR3 és el receptor que reconeix dsRNA, per tant és el candidat que també reconeix el siRNA en un context d'immunomodulació. S'ha vist que l'activació de la resposta immune es pot donar tant per una cadena *sense*, *antisense*, o per el siRNA complet [100].

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

El reconeixement del siRNA per els TLR es dona als endosomes, abans que el siRNA entri al citoplasma. Es creu que, perquè el siRNA actuï de forma eficient, aquest hauria d'entrar directament al citoplasma, evitant els endosomes i passant per alt l'activació de la resposta immune.

Com es pot observar a la Figura 14, quan un siRNA és reconegut per la cèl·lula, aquesta s'activa i s'expandeix desencadenant l'activació del sistema immune innat per diferents vies de senyalització. S'activen receptors citoplasmàtics com PKR i RIG-I [101].

PKR s'autofosforil·la i s'activa un cop s'ha unit al dsRNA, activa a EIF-2 i produeix una supressió global de la síntesis de proteïnes i indueix la mort cel·lular programada, també activa Nf- κ B i indueix una resposta IFN tipus I [102].

RIG1 és un sensor intracel·lular de dsRNA capaç també d'induir una resposta d'interferó. Hi ha estudis on demostren que ratolins knockout de RIG1 tenen afectada la resposta viral front a dsRNA [102, 103]. RIG1 és un sensor intracel·lular necessari per reconèixer els siRNA que tenen extrems roms, que s'uneixen millor que els que tenen 2 nucleòtids que sobresurten a l'extrem 3' [104].

Els TLR 7, 8 i 9 s'expressen als endosomes i requereixen la maduració endosomal per una senyalització eficient. Quan es reconeix uns siRNA una de les vies alternatives d'activació del sistema immune innat és activant la via de senyalització NF- κ B i IRF, que indueix la producció de citocines inflamatòries i IFN respectivament [100, 105].

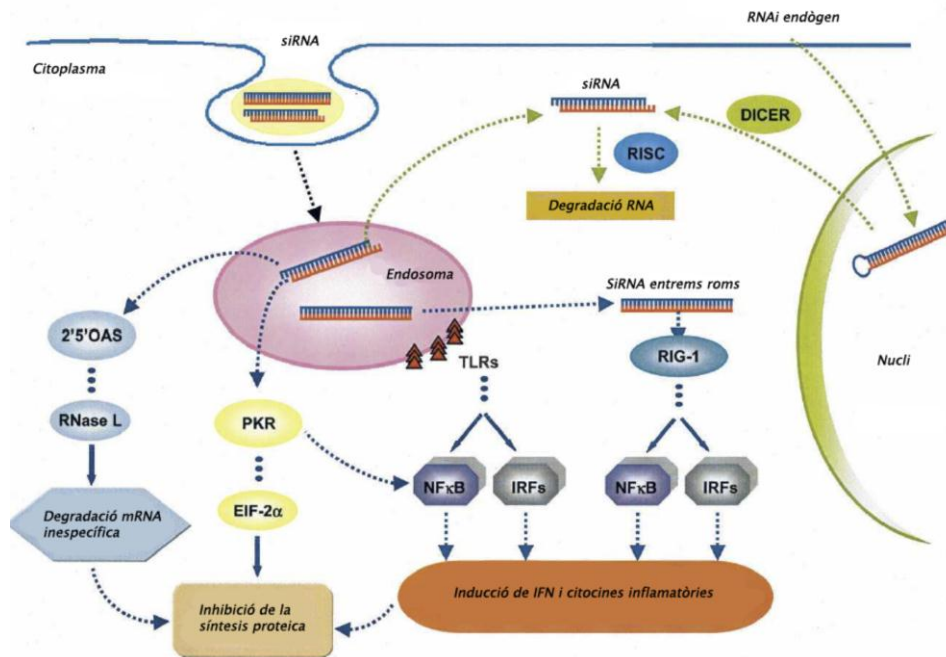


Figura 14. Activació de la resposta immune mitjançada per un RNA d'interferència. Modificat de [96].

El mètode de lliurament del siRNA influeix en l'activitat immunoestimuladora de la molècula (Figura 14). S'ha vist que injeccions de molècules siRNA acomplexades amb un vector liposoma catiònic a ratolins induueix la producció de citocines inflamatòries com IL6 i INF α [106]. En canvi, el lliurament de siRNA nu, sense modificacions o modificat amb colesterol no té un efecte immunoestimulador significatiu [102]. Se sap que els siRNA nus sense modificar tenen una vida mitja molt curta en sèrum ja que són degradats per nucleases abans de ser reconeguts pels receptors corresponents.

La injecció intravenosa d'un siRNA nu en rates mostra una vida mitja de 6 min i un aclariment de 17.6 ml/min [107]. Els siRNA acomplexats amb vectors són més fàcilment reconeguts per les cèl·lules immunes que els siRNAs nus.

2.6.2. Efectes “Off target”

Els efectes “off target” són silenciaments no específics d’altres gens causats per un siRNA dissenyat per una diana concreta. Pot ser degut a la falta de complementarietat entre el siRNA i el mRNA. La especificitat dels siRNAs és molt alta, però a vegades la maquinària del siRNA tolera homologies incompletes localitzades al centre de la molècula siRNA sense perdre l’habilitat d’induir el silenciament gènic.

Una altra raó per la que es poden produir aquest efectes és que, a part de la cadena *antisense*, la cadena *sense* del siRNA també indueix un silenciament de gens no específics. S’ha vist que això pot passar quan hi ha un mínim de 15 pb de complementarietat entre la cadena del siRNA i el mRNA [108].

2.7. Estratègies per millorar l’eficàcia.

Per augmentar l’eficàcia del mecanisme RNAi s’ha de millorar diferents aspectes com són:

- Estabilitat en front a nucleases.
- Captació del siRNA per part de la cèl·lula.
- Propietat farmacocinètiques.
- Reduir efectes “Off-target”.
- Reduir l’activació de la resposta immune.

El disseny de la seqüència del siRNA, la mida i l’estructura del siRNA és important per millorar l’eficàcia i reduir els efectes no desitjats.

2.8. Disseny del siRNA

2.8.1. Seqüència

Per assegurar que la seqüència del siRNA és específica per un sol gen es poden fer servir diferents eines informàtiques com els softwares de disseny de siRNA de les diferents empreses que es dediquen a sintetitzar siRNAs, l’algoritme de Smith-Waterman o la base de dades del BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Se sap que perquè un siRNA sigui potent ha de tenir un contingut de G/C entre 36 i 52%. Si el percentatge és major es dificulta la dissociació entre les cadenes *sense* i *antisense*, mentre que si el percentatge és menor es pot veure afectat el reconeixement del mRNA diana [109].

Per millorar l'entrada del siRNA al complex RISC s'ha de disminuir l'estabilitat termodinàmica de l'extrem 5' de la cadena *antisense*, això s'aconsegueix posant els nucleòtids A/U en aquest extrem [110].

La capacitat immunoestimuladora del siRNA és deguda en part a la seva seqüència. Per tant, s'han d'evitar algunes seqüències ja conegudes riques en G/U com UGUGU o GUCCUCAA, que se sap que són potencialment estimuladores [106].

2.8.2. Longitud

Els siRNAs d'entre 21 i 23 pb són capaços de induir amb eficiència el mecanisme de RNAi. S'ha descrit que siRNAs d'entre 25 i 30 pb són unes 100 vegades més potents i requereixen de concentracions més baixes. Aquests tipus de siRNA es creu que són més efectius perquè són substrats directes de DICER [111]. Se sap que siRNAs de més de 30 pb són capaços d'induir una activació de la resposta immune via activació de PKR [104, 112].

2.8.3. Estructura

L'estructura d'hèlix tipus A del dúplex format per la cadena *antisense* i el mRNA és necessària per facilitar la interacció entre el mRNA diana i RISC per donar lloc a la degradació del mRNA [113, 114].

Els extrems del siRNA també són importants i determina la seva capacitat de activar la resposta immune. Els extrems roms, és a dir, els que no tenen cap nucleòtid que sobresurt a l'extrem 3', és una estructura més eficaç en activar la senyalització de RNAi a través de PKR, però a la vegada promouen més l'activació de la resposta immune [104, 111]. Els siRNAs asimètrics amb extrem rom a 5' i amb 2nt que

sobresurten a l'extrem 3' són més eficaços que el siRNAs simètrics amb dos nucleòtids que sobresurten tant a 5' com a 3'.

2.9. Lliurament de la molècula siRNA

El lliurament de la molècula siRNA a l'interior de les cèl·lules per aplicacions *in vitro* és una tècnica molt estandarditzada en els laboratoris, però per les aplicacions *in vivo* s'han descrit diferents tècniques. Un bon mecanisme de lliurament *in vivo* hauria de complir els següents requisits:

- Unir la molècula de forma reversible.
- Protegir el siRNA de les nucleases.
- Evitar el compartiment endosomal.
- Ser biocompatible.
- Evitar la ràpida excreció pel fetge i ronyó.

S'han dissenyat diferents mecanismes de lliurament de la molècula per protegir el siRNA. Aquests mecanismes poden ser des d'encapsulació de la molècula, associació a liposomes, modificacions químiques, etc. (Figura 15).

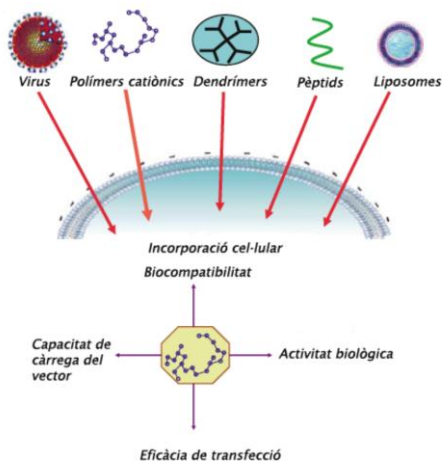


Figura 15. Estratègies de lliurament d'una molècula siRNA. Modificat de [115].

2.10. Modificacions químiques

Es poden introduir modificacions a la part del sucre, als enllaços o a la base del nucleòtid per intentar millorar la farmacocinètica, l'estabilitat del siRNA i reduir efectes no desitjats sense afectar l'activitat biològica.

En principi qualsevol posició de la cadena *sense* del siRNA es pot modificar. És important protegir l'extrem 3' del siRNA ja que és reconegut per la 3'exonucleasa (ERI-1) [116] quan entra a l'organisme. Les modificacions es poden introduir en diferents posicions del siRNA, excepte en l'extrem 5' de la cadena *antisense* ja que en aquesta posició hi ha un grup fosfat necessari per la interacció amb el complex RISC [91, 113, 117].

En els dos extrems de la cadena *sense* s'hi pot introduir un grup marcador per la detecció, com compostos fluorescents o radioactius [98, 118], o que facilitin el transport i l'entrada cel·lular a través de la membrana [107] (Figura 16).

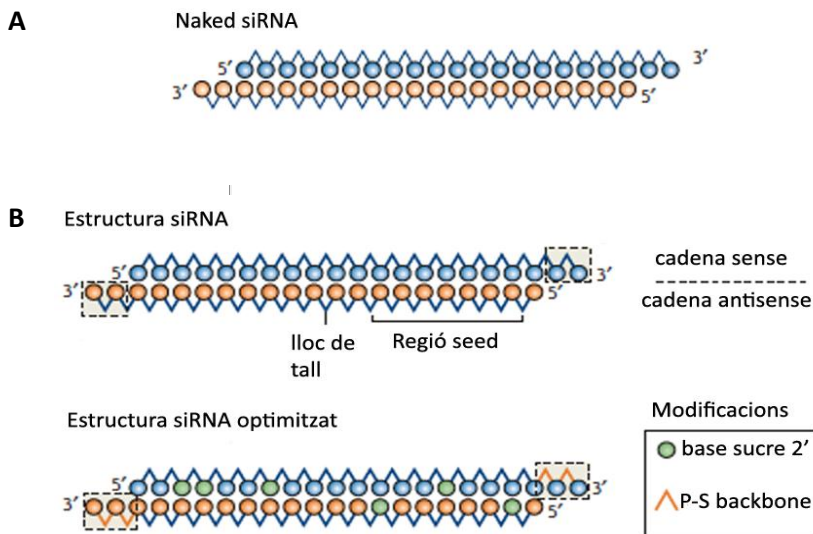


Figura 16. A) Estructura d'un siRNA nu estàndard amb 21 parells de bases i els extrems 3' protuberants, la cadena *sense* i l'*antisense* estan representades en blau i

taronja respectivament. B) Disseny d'un siRNA optimitzat amb modificacions químiques. Modificat de [119].

2.10.1. Modificacions de l'enllaç fosfodièster

Una de les modificacions més simples és la introducció d'un fosforotioat (PS). Consisteix en reemplaçar un dels dos àtoms d'oxigen del fosfat internucleotídic per un àtom de sofre (Figura 17). Se sap que aquesta modificació li proporciona resistència en front a les nucleases i incrementa la vida mitja. S'ha vist, però, que siRNAs amb excés de PS s'uneixen a proteïnes sèriques i poden induir toxicitat a llarg termini [120, 121]. S'ha demostrat que siRNAs amb aquesta modificació entren més fàcilment a la cèl·lula sense afectar la seva activitat [122] i que augmenta la seva biodistribució a diferents òrgans [98].

Una alternativa d'aquesta modificació és el boranofosfat. Aquesta augmenta l'estabilitat. L'àtom d'oxigen és reemplaçat per grup borano ($-BH_3$), això indueix un canvi de la polaritat de la molècula i augmenta la seva hidrofobicitat [123]. No és una modificació molt usada ja que la seva síntesi és difícil i s'ha vist que segons la seva posició pot inhibir l'activitat RNAi (Figura 17).

2.10.2. Modificacions de la posició 2' del sucre

Les modificacions en aquesta posició incrementen l'estabilitat del siRNA front a endonucleases i redueix l'activació de la resposta immune. Les més comunes són: 2'-O-methyl (2'-OMe), 2'-deoxy-2'fluoro (2'F), i *locked nucleic acid* (LNA) (Figura 17).

Les modificacions 2'-OMe i 2'F s'ha vist que conserven la forma de hèlix A necessària per l'activitat del siRNA i augmenten la resistència a nucleases [114]. L'efecte de la modificació 2'-OMe depèn de la quantitat i de la posició en què es troba. S'ha vist que siRNAs amb la cadena *sense* completament modificada són funcionals si la seva estructura és de 20pb amb els extrems roms. En canvi, siRNAs de 19pb amb nucleòtids que sobresurten a 3', no són funcionals [124].

Per altra banda, si el 2'-OMe s'alterna amb bases no modificades o amb modificacions 2'F, l'activitat és semblant a cadenes no modificades. Se sap que aquest tipus de modificacions situades a la regió "seed" de la molècula redueix els efectes off target sense afectar el procés de silenciament [125]. Les modificacions 2'-OMe que impedeixen la degradació de la cadena *sense* també impedeixen l'activitat RNAi, però si aquestes estan situades a la posició 1 i 2 de la cadena *sense* no afecta la seva funcionalitat [126].

S'ha vist que la modificació 2'F no té efectes adversos sobre el silenciament del gen, (ni en l'especificitat) i que augmenta l'estabilitat de la molècula en plasma [127]. Les modificacions LNA més comunes són la connexió mitjançant un pont de metilè de l'oxigen 2' amb el carboni 4' de l'anell de ribosa. Això bloqueja la conformació 3'-endo de la ribosa característica del RNA [128]. Hi ha estudis que demostren que si la modificació LNA està situada a l'extrem 3' de qualsevol de les dues cadenes, o a l'extrem 5' de la cadena *sense*, preserva la integritat de la molècula i augmenta la seva vida mitja. En canvi, si està situat a l'extrem 5' de la cadena *antisense* inhibeix per complet l'efecte i l'activitat del siRNA [129].

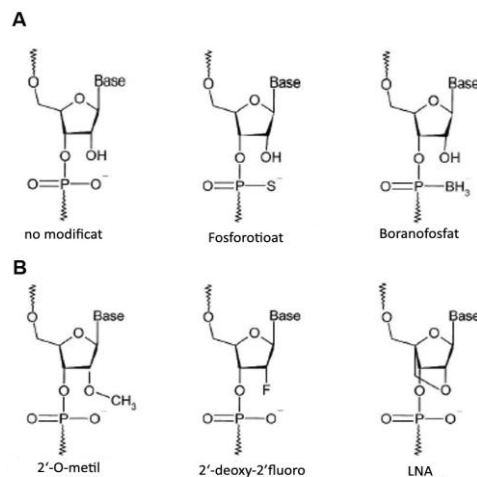


Figura 17. Principals modificacions químiques que poden ser usades en siRNA. A) modificacions a l'enllaç fosfodiester. B) modificacions a la posició 2' del sucre. Modificat de [96].

2.11. Bioconjugació

2.11.1. Conjugació amb lípids

L'objectiu de la conjugació amb lípids és incrementar l'entrada de la molècula a la cèl·lula, ja sigui per endocitosi o incrementant la permeabilitat cel·lular. El colesterol és un lípid present a la membrana cel·lular que no té carregues positives. S'ha demostrat en diversos estudis que la conjugació del colesterol, ja sigui unit a pèptids o siRNAs, incrementa l'entrada de la molècula a la cèl·lula sense afectar la seva eficàcia [107, 130, 131] (Figura 18).

En un d'aquests estudis es va demostrar que l'administració intravenosa d'un siRNA conjugat amb colesterol a l'extrem 3' de la cadena *sense* contra la molècula ApoB, s'aconseguia una inhibició del 50% en fetge i un 70% en intestí, demostrant també que el colesterol augmenta la vida mitja de la molècula en circulació, la fa més resistent a la filtració renal i la protegeix de les nucleases [107].

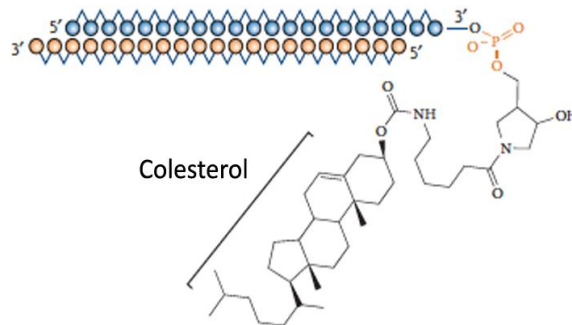


Figura 18. Estructura d'un siRNA conjugat amb el colesterol a l'extrem 3' de la cadena *sense*. Modificat de [119].

2.11.2. Conjugació amb pèptids

Aquest tipus de pèptids permeten una ràpida i eficient alliberació de la molècula siRNA al citoplasma. S'anomenen PTD o MPP, consten d'una seqüència curta d'aminoàcids amb càrrega positiva que són capaços d'interaccionar amb la

membrana plasmàtica, sense necessitat de receptor o de cap procés de pinocitosis o endocitosis, i transferir directament la molècula a l'interior de la cèl·lula [132] (Figura 19).

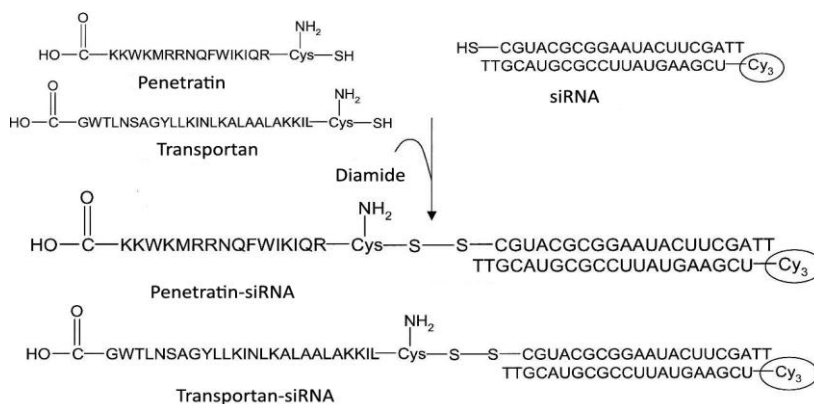


Figura 19. Estructura química d'un siRNA conjugat amb MMP. Exemple de la conjugació d'un siRNA amb dos tipus diferents de MMP: penetratina i transportina. La molècula siRNA és sintetitzada amb un grup tiol, aquest grup és el que catalitza la unió amb els MMP mitjançant la diamida. Modificat de [96].

2.12. Formació de Complexes

2.12.1. Lípids catiónics

Són els vectors més usats per la transfecció d'àcids nucleics. Els lípids catiónics formen un complex electrostàtic amb DNA i RNA. Aquestes interaccions electrostàtiques del siRNA tenen dos inconvenients:

- El complex final és molt gran i poc estable.
- L'encapsulació és incompleta i per tant, el siRNA no acomplexat és degradat abans d'entrar a la cèl·lula.

Els lípids catiónics se sap que interaccionen amb proteïnes sèriques, lipoproteïnes, heparina i glicosaminoglicans de la matriu extracel·lular, donant lloc a agregats i a

una possible alliberació del material abans d'arribar a la cèl·lula. Se sap que també poden activar el sistema del complement, donant lloc a una ràpida eliminació pels macròfags del sistema reticuloendotelial [133]. Per resoldre aquests problemes, els vectors liposomals han estat recoberts de PEG per minimitzar les interaccions amb proteïnes sèriques o activació del complement i per millorar el temps de circulació, també s'estabilitza el complex i es redueix l'aclariment per part del macròfags [134, 135] (Figura 20).

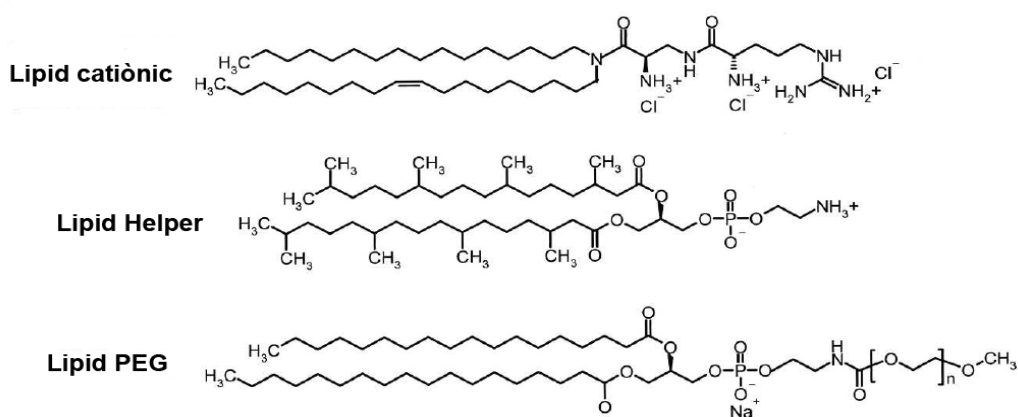


Figura 20. Estructura química de lípid catiònic i la seva formació amb el grup politetilenglicol . Modificat de [96].

2.12.2. Polimers catiònics

Els polímers catiònics també formen complexos de forma espontània amb els àcids nucleics degut a les interaccions electrostàtiques entre el grup amino carregat positivament del polímer i el grup fosfat carregat negativament dels àcids nucleics. La interacció entre aquest complex carregat positivament i la membrana cel·lular permet millorar l'entrada de la molècula a la cèl·lula i incrementar la seva eficiència de transfecció [136].

S'han estudiat varis polímers catiònics com a possibles vectors pel lliurament de la molècula: histones, albúmina, polipèptids com la polilisina, poliamines com PEI,

dendrimers, etc. D'entre tots aquests polímers els més usats han estat els de PEI. Aquests poden tenir diferents mides i modificacions [137] i la seva eficiència és deguda a un efecte tampó degut als seus grups amino. Se sap que la seva citotoxicitat i la capacitat de transfecció és proporcional al seu pes molecular. La conjugació amb el colesterol o PEG s'ha fet servir per disminuir aquesta toxicitat [138].

2.12.3. Liposomes

Moltes molècules han estat introduïdes a l'interior del liposomes per millorar les seves propietats farmacocinètiques i disminuir la seva toxicitat. Els liposomes són vesícules amb un compartiment aquós, format per una bicapa fosfolipídica que es fusiona amb la membrana cel·lular i allibera la molècula a l'interior de la cèl·lula.

És un mecanisme de rutina en molts laboratoris, però s'ha vist que algunes cèl·lules com els limfòcits són resistents a aquest tipus de transfecció. Es va dissenyar una variant del liposomes més completa per solucionar aquest problema, les partícules SNALP (Figura 21). Aquestes consten d'una bicapa lipídica que conté una barreja de lípids fusogènics i catiónics que permeten l'entrada cel·lular i l'alliberació endosomal dels àcids nucleics. Estan recoberts d'un lípid conjugat amb grups PEG que li proporciona unes característiques hidrofíliques neutres per la part externa que estabilitza la partícula i frena la ràpida eliminació sistèmica [139].

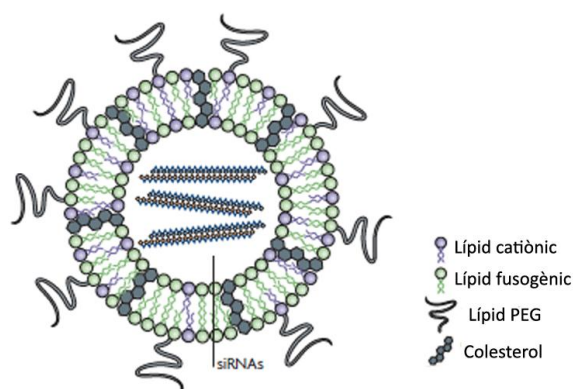


Figura 21. Composició química dels SNALPs. Adaptat de [119].

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

2.13. Aplicacions terapèutiques

La teràpia basada en siRNA té un interès i creix de forma exponencial per desenvolupar nous mètodes contra un ampli ventall de malalties, com són el càncer, malalties autoimmunes, trasplantament, infeccions, malalties neurodegeneratives, xoc sèptic, degeneració macular, etc.

Estudis recents amb aquest tipus de teràpia han demostrat que la inhibició de la replicació vírica és efectiva en una àmplia varietat de virus de RNA com el VIH, virus d'influenza, hepatitis C, virus respiratori sincitial, Dengue, i altres virus de DNA com el papil·loma virus humà, hepatitis B, Herpes símplex, etc.

TEIXIT	MALALTIA	DIANA	FORMULACIÓ	MÈTODE LLIURAMENT	REF
Fetge	Hepatitis B	HBsAg	siRNA	Hidrodinàmic iv	[140]
		Gens virals	shRNA	Hidrodinàmic iv	[141]
		Gens virals	siRNA estabilitzat	Hidrodinàmic iv	[142]
		Gens virals	siRNA estabilitzat i acomplexat amb lipid	Hidrodinàmic iv	[143]
	Hepatitis fulminant	Fas	siRNA estabilitzat	Hidrodinàmic iv	[144]
	Hipercolesterolèmia	ApoB	siRNA estabilitzat i acomplexat amb colesterol	Hidrodinàmic iv	[107]
Pulmó	Influenza	Gens virals	siRNA acomplexat amb polietileneimine	iv	[145]
		Gens virals	shRNA	Intranasal, iv	[145]
	Virus respiratori sincitial	NS1	shRNA	intranasal	[146]
CNS	Atàxia espinocerebel·lar	Ataxin 1	shRNA	Intracerebel·lar	[147]
	Dolor neuropàtic	Canal catiònic	siRNA	Ith	[148]
Ull	CNV induït per làser	VEGF	siRNA	Subretinal	[149]
	CNV induït per làser	VEGF	siRNA	Intravitreal	[150]
Tumors	Cèl·lules germinals	FGF-4	siRNA amb atelocol·lagèn	Intratumoral	[151]
	Glioblastoma	MMp9 i catepsina B	shRNA	Intratumoral	[152]
	Carcinoma pancreàtic	CEACAM6	siRNA	Iv	[153]
	Càncer colon	CEACAM6	Oligofectamine	ip	[154]
Ronyó	Isquèmia-reperfusió	Fas	Sali	Iv	[155]
Reumatologia	Artritis induïda per col·lagen	TNF	PEI	Local electroporació	[156]
Malalties infeccioses	Influenza virus		PEI	iv	[145]

Taula 3. Estudis i mètodes d'administració i formulació d'un RNA d'interferència en diferents models.

3. Transplantament renal

L'acceptació de l'empelt amb una mínima immunosupressió és una dels principals objectius del trasplantament. El rebuig immunològic juntament amb els efectes secundaris produïts pels fàrmacs immunosupressors són els principals problemes clínics en transplantament. La incidència de rebuig després d'un transplantament renal ha millorat molt en els darrers anys ja que s'ha investigat en els mecanismes moleculars i cel·lulars relacionats amb el rebuig. S'ha introduït diferents teràpies immunosupressores, aquestes indueixen un estat de tolerància farmacològica que en general, desapareix un cop retirat el tractament, produint-se la posterior pèrdua de l'empelt. Tot i així, encara que no es retiri la immunosupressió hi ha un percentatge elevat d'empelts que es perden a llarg termini a causa de la nefropatia crònica de l'empelt (NCA).

Equilibrar la necessitat d'immunosupressió per prevenir el rebuig de l'empelt, reduir al mínim la toxicitat del fàrmac, el risc d'infeccions i càncer continua essent una tasca difícil en el trasplantament d'òrgan sòlid.

3.1. Epidemiologia i prevalença

La introducció de potents fàrmacs immunosupressors en les últimes tres dècades ha donat lloc a una dramàtica reducció en la incidència de rebuig agut en receptors de trasplantament renal. No obstant això, la manca de biomarcadors no invasius de rebuig fa que sigui difícil optimitzar la teràpia.

L'aparició de fàrmacs com els inhibidors de la calcineurina i altres agents antiproliferatius han disminuït dràsticament la taxa de rebuig agut. Actualment la incidència en el primer any del transplantament és del 15%. En canvi, al 1980 amb la azatioprina la incidència era entre el 50-60%.

3.2. Fisiopatologia del trasplantament. Resposta immune innata

En el trasplantament la manifestació més habitual en rebuig de l'empelt és l'existència d'una inflamació persistent. Les vies d'inflamació activen molècules de la

immunitat innata, que alhora s'ha vist que activen les vies de la immunitat adaptativa [157] i agreugen el rebuig. A part també hi ha tota una sèrie de factors externs que també influeixen en l'evolució de l'òrgan, com són l'edat del donant i del receptor, malalties prèvies, etc. Tots aquests elements poden coincidir de forma sinèrgica i influir en el rebuig o la tolerància de l'empelt (Figura 22).

Hi ha estudis que demostren que l'empelt d'un receptor que ha tingut un donant viu té una millor evolució que un empelt d'un receptor d'un donant mort [158, 159]. Així doncs s'ha demostrat que altres factors externs com són el dany provocat per la isquèmia reperfusió i la mort cerebral també influeixen en l'evolució de l'òrgan i en la activació de la resposta immune del receptor.

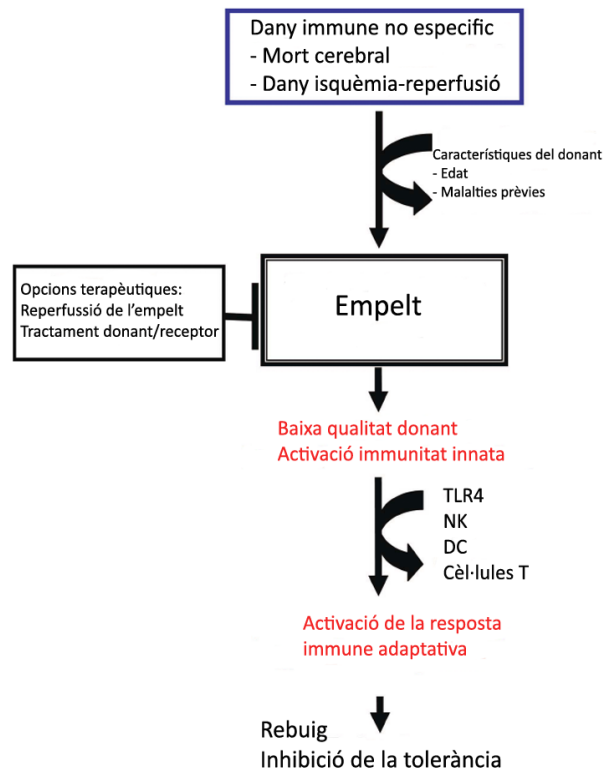


Figura 22. Factors que influeixen en l'activació de la resposta immune i l'evolució de l'empelt. Modificat de [160].

La isquèmia és una conseqüència inevitable del trasplantament i s'ha associat a un augment en la incidència del rebuig tant agut com crònic [161]. El temps d'isquèmia que pateix l'empelt, un cop s'extreu del donant i abans de ser trasplantat al receptor, s'ha vist que activa els TLR, regula l'expressió d'antígens HLA i també que indueix una cascada de secreció de citocines, quimioquines inflamatòries i molècules d'adhesió a l'empelt, augmentant així el risc de rebuig [160]. Durant la reperfusió les cèl·lules dendrítiques del donant residents a l'òrgan són activades, les cèl·lules T CD4+ del receptor, juntament amb els monòcits i macròfags infiltren l'empelt donant lloc a una gran cascada de citocines i quimioquines, producció de radicals lliures d'oxigen, etc. Tots aquest factors donen lloc a l'activació de la immunitat innata.

Les cèl·lules dels empelts danyats poden expressar molècules lligands de TLR. Aquests normalment detecten patrons moleculars associats a patògens, però també poden detectar teixits i molècules foranes. S'ha vist que un dels principals TLR responsables de la resposta inflamatòria deguda al dany per isquèmia reperfusió és el TLR4 [162, 163]. En altres estudis amb ratolins mutants per TLR4, es demostra que, després d'un temps d'isquèmia llarg, la secreció de citocines inflamatòries com TNF, IL6, MCP1 en aquests ratolins és menor que en ratolins normals [164].

3.3. Immunologia del trasplantament. Complex major d'histocompatibilitat

Una bona compatibilitat és fonamental per un bon pronòstic inicial de l'empelt. Les proteïnes del complex major d'histocompatibilitat tenen com a una de les seves funcions principals unir fragments peptídics derivats d'agents patogènics i presentar-los a la superfície cel·lular perquè siguin reconeguts per les cèl·lules T. La diferència fonamental entre la via de presentació que segueixen els gens de classe I o els de classe II és que les molècules de classe I presenten pèptids derivats de proteïnes internes (per exemple proteïnes virals) als limfòcits T CD8+, aquests antígens endògens són degradats en pèptids més petits pel proteasoma. En canvi les molècules de classe II presenten pèptids derivats de proteïnes extracel·lulars (per exemple proteïnes de bacteris) als limfòcits T CD4+, els antígens exògens són degradats als endosomes. La unió dels pèptid amb les molècules de MHC es dona al

reticle endoplasmàtic i després són transportats a través de l'aparell de Golgi cap a la membrana cel·lular on seran presentats als limfòcits T CD4+ o CD8+ (Figura 23).

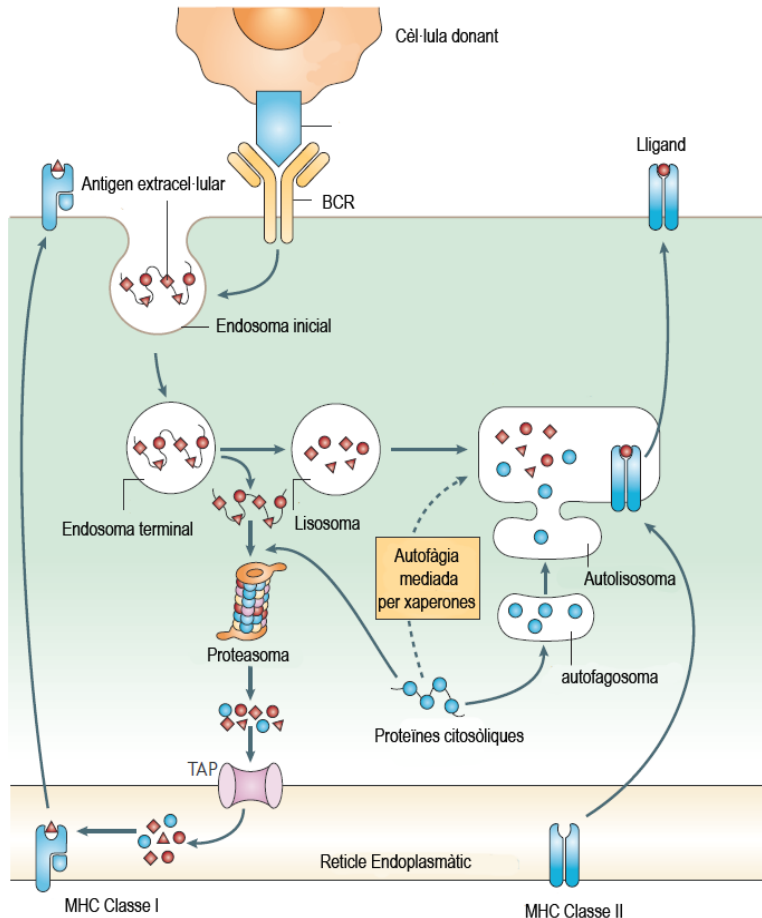


Figura 23. Presentació de l'antigen pel complex major d'histocompatibilitat. Modificat de [81].

3.4. Mecanismes efectors de la resposta al·logènica. Rebuig

Un cop ja s'ha efectuat l'expansió clonal en la fase d'estimulació, les cèl·lules efectores derivades ataquen a l'empelt mitjançant mecanismes cel·lulars i humorals. Els mecanismes cel·lulars són més sensibles als immunosupressors clàssics que els mecanismes humorals.

El rebuig agut, que pot aparèixer al cap de pocs dies del trasplantament, es caracteritza per una pèrdua ràpida de la funció renal. És un factor immunològic de risc important per al desenvolupament de la disfunció de l'empelt. L'aparició d'episodis de rebuig agut també té un impacte negatiu en la supervivència de l'empelt a llarg termini. El rebuig agut és un element predictiu de la nefropatia crònica de l'empelt, que és responsable de la pèrdua de l'empelt després del primer any post trasplantament. No obstant això, no tots els episodis de rebuig agut tenen el mateix impacte en la funció de l'empelt a llarg termini. Factors com ara el moment del rebuig, la gravetat i el nombre de rebuigs aguts, i el grau de recuperació de la funció després del tractament influeix en el resultat a llarg termini.

Les dues principals formes histològiques de rebuig agut són:

- Rebuig agut cel·lular: es caracteritza per la infiltració de l'empelt pels limfòcits i altres cèl·lules inflamatòries.
- Rebuig agut humoral: hi ha evidència morfològica de lesió tissular aguda, anticossos circulants contra el donant específics, i l'evidència immunològica d'activació de processos mediat per anticossos (C4d +).

3.5. Rebuig agut cel·lular

3.5.1. Mecanismes patològics

El rebuig agut cel·lular és mediat per cèl·lules T. És la forma més comuna de rebuig agut. S'inicia quan els antígens del donant són presentats per les APC als limfòcits T del receptor, les cèl·lules dendrítiques immadures de l'empelt porten antígens de l'òrgan trasplantat cap als nòduls limfàtics i cap a la melsa del receptor.

Quan aquestes cèl·lules dendrítiques immadures maduren, activen les cèl·lules T del receptor, que es diferencien en varis subgrups i retornen a l'empelt, on s'inicia el rebuig cap a l'òrgan trasplantat.

Les cèl·lules dendrítiques i macròfags presenten l'antigen a les cèl·lules T, però les cèl·lules B, cèl·lules tubulars epitelials, cèl·lules endotelials també poden presentar

l'antigen capturant i presentant l'antigen mitjançant les seves molècules de superfície MHC [165, 166]. Els limfòcits T citotòxics utilitzen dos mecanismes diferents per activar l'apoptosis de la cèl·lula diana, la perforina i la granzima B, que permeabilitzen la membrana cel·lular i la interacció de Fas (CD95) amb el seu lligand (CD178).

Histològicament es caracteritza principalment per un cúmul de cèl·lules mononuclears a l'interstici, acompanyat per una inflamació tubular i arterial. Les cèl·lules mononuclears penetren a l'espai intersticial, on inicien una cascada d'inflamació donant lloc a la producció de IFN γ , secreció de quimioquines, alteració de la permeabilitat capil·lar i deteriorament de la estructura del parènquima (Figura 24).

3.5.2. Diagnòstic i classificació

Els criteris de diagnòstic d'un rebuig agut cel·lular es determinen segons la classificació de Banff [167]. Es pot classificar en 5 tipus diferents segons el grau d'afectació i les característiques patològiques:

- **Tipus IA:** Presència de inflamació intersticial > 25% i focus de tubulitis moderada.
- **Tipus IB:** Presència de inflamació intersticial > 25% i focus de tubulitis severa.
- **Tipus IIA:** Arteritis (endarteritis) intimal lleu o moderada.
- **Tipus IIB:** Arteritis (endarteritis) intimal severa, que s'associa a una obstrucció de les llums superior al 25%.
- **Tipus III:** Arteritis transmural, necrosis fibrinoide de la paret arterial acompanyada d'inflamació limfocítica.

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

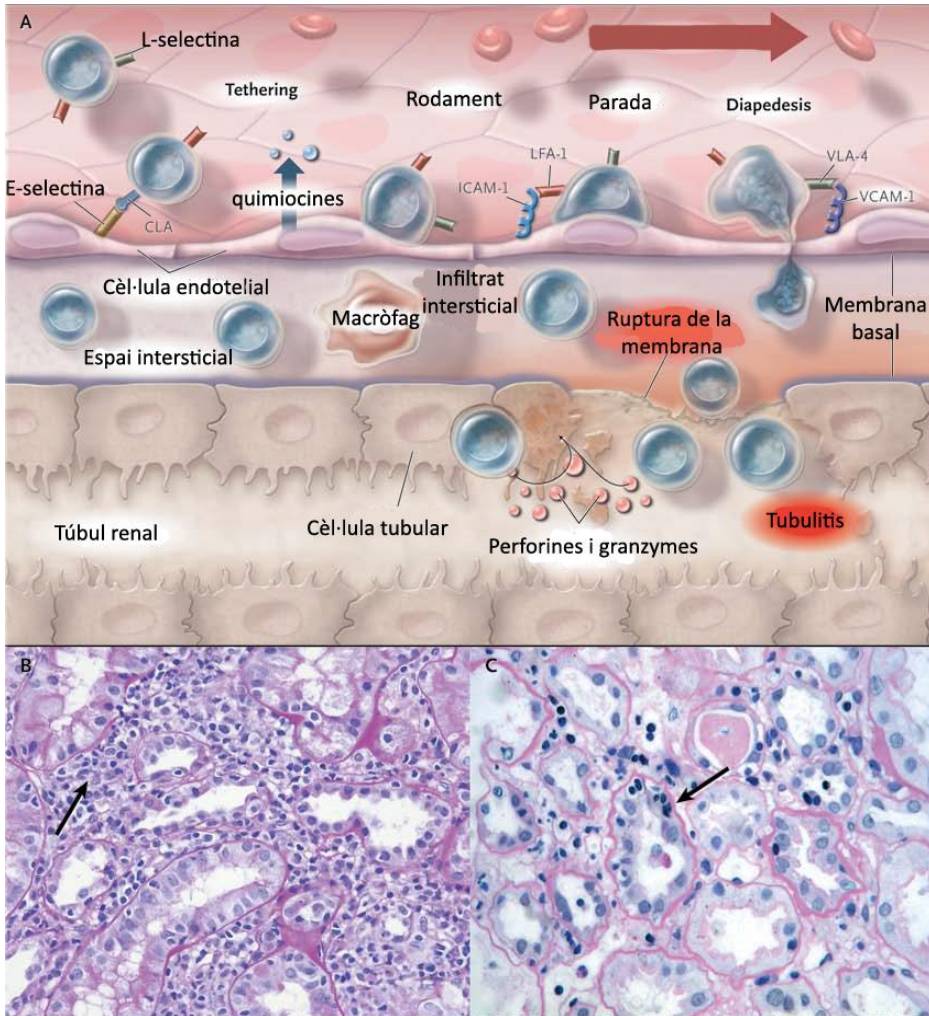


Figura 24. Rebuig agut cel·lular. Després d'un procés d'adhesió, rodament, unió i diapedesis mitjançat per selectines, integrines i altres molècules d'adhesió. Els limfòcits T i altres cèl·lules immunes entren a l'espai intersticial i envaeixen els túbuls, causant inflamació i destrucció tissular (A). Una de les característiques d'aquest tipus de rebuig és l'infiltrat intersticial (B) i la tubulitis (C). Modificat de [81].

3.6. Rebuig agut humoral

El rebuig humoral és mediat per anticossos, és un rebuig vascular amb presència de dipòsits de immunoglobulines i molècules de complement. Els anticossos contra el donant poden ser contra diferents molècules com són HLA, antígens de superfície de les cèl·lules endotelials, antígens del grup sanguinis ABO, etc. El rebuig humoral té un pitjor diagnòstic i requereix d'una teràpia diferent al rebuig cel·lular. La majoria de receptors no tenen anticossos contra HLA ja que no han estat prèviament sensibilitzats. La sensibilització es pot donar en el cas d'embaràs, transfusió sanguínia o per un trasplantament previ. Aquest fet és un dels majors factors de risc per desenvolupar un rebuig humoral.

3.6.1. Mecanismes patològics

Els anticossos contra el donant tenen com a diana preferent les molècules MHC, tant de classe I com de classe II, expressades a l'endoteli dels capil·lars glomerulars peritubulars. Aquesta unió indueix una activació del complement i adhesió cel·lular que dona lloc a necrosis cel·lular, activació plaquetària i coagulació. L'endoteli danyat allibera molècules pro inflamatòries que promouen l'agregació plaquetària, la secreció de citocines, quimioquines com la IL1, IL8, CCL2, que indueix adhesió cel·lular dels leucòcits al glomèrul (glomerulitis), dilatació dels capil·lars peritubulars i la secreció dels quimioattractans C3a i C5a (Figura 25).

El C4d, marcador clàssic d'activació de complement, es localitza preferentment als capil·lars peritubulars. L'activació del complement i la formació de complex d'atac a membrana donen lloc a la necrosis endotelial local i apoptosi cel·lular. La detecció de C4d i anticossos circulants són una de les principals evidències d'un rebuig humoral, encara que a vegades no les podem detectar les dues alhora (Figura 25). El C4d és un fragment del C4b que conté un grup sulfhídric que forma un pont covalent tioèster amb les proteïnes i queda unit al teixit durant varis dies [168].

Altres característiques són la presència de neutròfils als capil·lars peritubulars, tubulitis, endarteritis, els capil·lars peritubulars perden les fenestracions, etc. [169].

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

Un 90% dels pacients que tenen anticossos contra antígens del donant tenen també C4d, però hi ha un 10% de pacients que són C4d negatius, [170]. Hi ha pacients als quals no es detecten anticossos circulants però sí que tenen dipòsit de C4d. Hi ha estudis que demostren que aquests anticossos que no es detecten circulants són absorbits per l'empelt, ja que s'han aconseguit eluir aquests anticossos en aquells empelts que han fet rebuig [171].

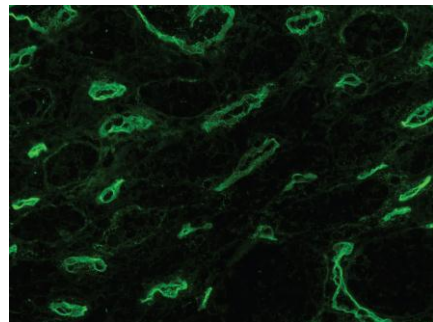
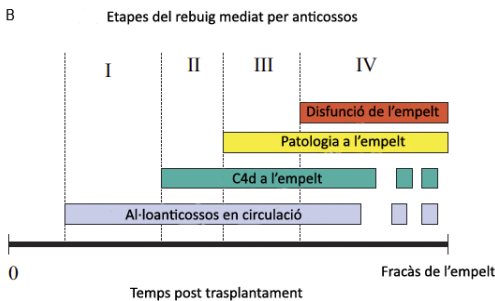
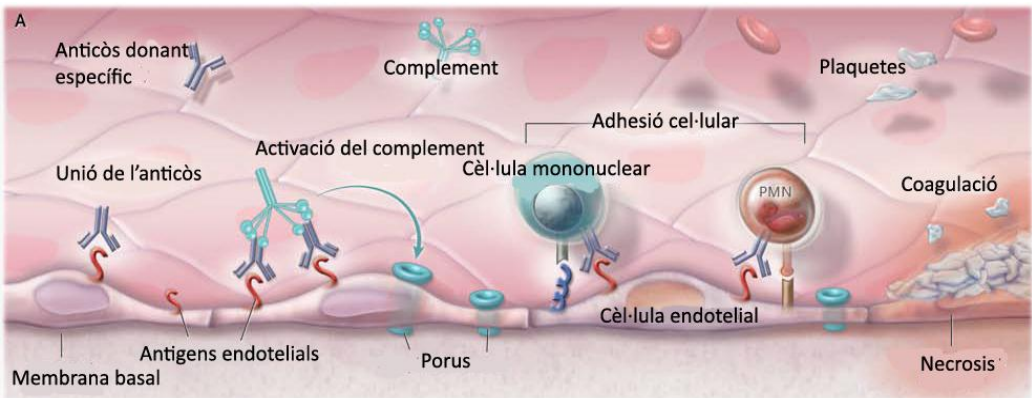


Figura 25. A) Patologia en el rebuig agut humoral. B) Estadis de l'evolució del rebuig humoral. Fotografia representativa dels dipòsits de C4d. Modificat de [81]

3.6.2. Diagnòstic i classificació

Els criteris de diagnòstic d'un rebuig agut humoral es determinen segons la classificació de Banff [167] i són:

- Dipòsit de C4d i/o més rarament immunoglobulines en capil·lars peritubulars.
- Anticossos circulants contra HLA de donant o altres antígens endotelials.
- Dany tissular indicatiu de lesions agudes.
 - Necrosis tubular aguda.
 - Presència de neutròfils i/o cèl·lules mononuclears a capil·lars peritubulars, glomèruls.
 - Trombosis.
 - Inflamació capil·lar o glomerular.
 - Lesions arterials, inflamació transmural o intramural.
 - Necrosis fibrinoide.

La classificació del rebuig humoral agut determina quatre estadis que es diferencien segon les característiques patològiques (Figura 25):

- **Grau I:** Presència de necrosis tubular aguda i inflamació mínima.
- **Grau II:** Inflamació capil·lar i glomerular i trombosis.
- **Grau III:** Lesions arterials.
- **Grau IV:** Rebuig humoral crònic

3.7. Paper de la coestimulació en el rebuig agut

Molts estudis han investigat el paper del senyal de coestimulació en el rebuig agut. S'ha vist que el bloqueig d'aquest senyal, ja sigui amb anticossos, receptors solubles, deleció genètica o teràpia gènica, generalment prolonga la supervivència de l'empelt en el rebuig agut.

Hi ha estudis però, on veuen que el bloqueig d'aquest senyal no té efectes suficients per prevenir el rebuig crònic, on es requereix la intervenció de més d'una via de coestimulació (Taula 4).

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

MOLÈCULA DIANA	RECEPTOR	DONANT	REBUIG AGUT	REBUIG CRÒNIC	REF
B7	CTLA4	-	↓	-	[172, 173]
CD28	KO	-	↓	-	[174]
CD40	KO	KO	↓	-	[175] [176]
CD40	KO	-	↓	-	[177]
CD40	-	KO	↓	-	[177]
CD40L	KO	-	↓	-	[178]
CD40L	-	KO	↓	-	[178]
CD28+CD40L	CTLA4/mAb	-	↓	↓	[179]
CD28+CD70	KO/mAb	-	↓	↓	[180]
CD40L+B7-3H	mAb/ KO	-	↓	↓	[174]
CD28+CD137	DKO		↓		[181]

Taula 4: Efectes del bloqueig del senyal de coestimulació en models de trasplantament de cor murins. Modificat de [182].

4. Lupus Eritematós Sistèmic

4.1. Concepte

El lupus eritematós sistèmic (LES) és una malaltia autoimmunità multisistèmica caracteritzada per la alteració de la resposta immune, producció d'autoanticossos dirigits contra diferents antígens cel·lulars. Afecta a múltiples òrgans i sistemes, evoluciona clínicament en forma de brots, combinant períodes d'activitat i d'inactivitat.

4.2. Epidemiologia i prevalença

El LES és una malaltia considerada rara reconeguda per la Federació Espanyola de Malalties Rares (FEDER). La seva prevalença depèn molt de la població estudiada, edat, sexe i procedència ètnica. Se sap que en dones nord-americanes de raça negra i xineses, tenen una major prevalença que, per exemple, les africanes o asiàtiques, on s'han descrit molts pocs casos.

A la nostra regió la seva prevalença és entre 4 i 50 casos per cada 100.000 habitants (FEDER). La simptomatologia acostuma a aparèixer entre els 15 i 40 anys, amb una edat mitja dels 29-32 anys [183]. Hi ha un percentatge petit de població en la qual els símptomes poden aparèixer durant la pubertat o després dels 55 anys (8-15%).

Aquest fet influeix en l'aspecte clínic i immunològic en la que posteriorment es manifestarà la malaltia. Si aquesta es manifesta a edats inicials, s'ha descrit una major incidència de simptomatologia, neuropatia, etc. En canvi, si es manifesta a edats avançades la incidència dels símptomes i afectacions és menor [183].

El LES, igual que altres malalties autoimmunitàs, afecta amb més freqüència a les dones en edat fèrtil que els homes (relació dona/home: 9/1). El sexe també pot influir en la manifestació dels símptomes, s'ha descrit que hi ha una major incidència de serositis com a manifestació inicial de la malaltia en els homes [183].

4.3. Epidemiologia de les manifestacions clíniques i serològiques

Les taules 5 i 6 reflecteixen les diferents manifestacions clíniques i immunològiques del LES. L'astènia és la manifestació sistèmica més habitual, l'afectació cutània i articular són les manifestacions orgàniques més freqüents. Les afectacions potencialment més greus com l'afectació renal, serosítica, neurològica i hematològica són també relativament freqüents.

MANIFESTACIÓ CLÍNICA	PREVALENÇA (%)
Artritis	84
Eritema malar	58
Febre	52
Foto sensibilitat	45
Nefropatia	39
Serositis	36
Fenomen de Raynaud	34
Afectació neurològica	27
Ulceres orals	24
Trombocitopènia	22
Síndrome sec	16
Livedo reticularis	14
Trombosis	14
Limfadenopatia	12
Lesions discoides	10
Miositis	9
Anèmia hemolítica	8
Afectació pulmonar	7
Lesions cutànies subagudes	6
Corea	2

Taula 5. Prevalença de les manifestacions clíniques associades al lupus eritematós sistèmic.

MANIFESTACIÓ IMMUNOLÒGICA	PREVALENCIA (%)
Ab antinuclears (ANA)	96
Abanti-DNA nadiu	78
Abanti-Ro (SSA)	25
Abanti-La (SSB)	19
Abanti-RNP	13
Abanti-Sm	10
Factor reumatoide	18
Abanti-cardiolipina IgG	24
Abanti-cardiolipina IgM	13
Anticoagulant lúpic	15

Taula 6. Prevalença de les manifestacions immunològiques associades al lupus eritematós sistèmic.

4.4. Etiologia

L'etiologia del LES és molt complexa ja que s'ha vist que hi participen diversos factors. Entre ells podem destacar els factors hormonals, genètics i ambientals. S'ha vist que també hi participen factors epigenètics, immune reguladors, etc., que poden actuar de forma seqüencial o simultània. L'acció d'aquests factors dona lloc a la generació d'autoanticossos, formació d'immuno complexes, generació de cèl·lules T auto reactives i secreció de citocines inflamatòries. Tots aquests elements inicien i amplifiquen una inflamació que provoca danys a diferents òrgans.

4.4.1. Factors hormonals

Se sap que els estrògens tenen un paper molt important en la etiologia d'aquesta malaltia degut a les següents consideracions:

- Hi ha major incidència en dones [183].
- Aquest predomini del gènere femení desapareix en èpoques on no hi ha nivells d'estrògens elevats, abans de la menarquia i després de la menopausa [184].

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

- Estudis amb models animals (ratolins NZB/NZW) confirmen que l'administració d'estrògens accelera la malaltia a les femelles, mentre que la testosterona la retarda [185].

Aquests resultats suggereixen que les malalties lúpiques tenen un augment de producció d'estrògens. Alguns estudis demostren que els homes afectats de LES tenen els estrògens elevats i, en canvi, els andrògens disminuïts. El mecanisme exacte de modulació immunològica de les hormones sexuals no està del tot establert.

El cromosoma X també pot contribuir d'una forma independent a les hormones en el desenvolupament de la malaltia. En ratolins modificats genèticament s'ha vist que la presència de dos cromosomes X incrementen la severitat [186].

4.4.2. Factors genètics

Se sap que hi ha una predisposició genètica per el desenvolupament del LES [187]. Es postula que la malaltia pot ser resultat de certs gens que actuen de forma additiva. Tot i així, la penetrància del LES és relativament baixa, és a dir, encara que es tinguessin totes les variants genètiques possibles per desenvolupar la malaltia, podria ser que aquesta no es manifestés [188].

En estudis familiars amb bessons homozigots s'ha descobert que la incidència de la malaltia és superior a l'esperada per l'atzar i vuit vegades superior a la incidència en bessons dizigòtics. Per tant, hi ha un important component genètic. No obstant, la freqüència en altres familiars és molt baixa, entre un 3 i un 8% [188, 189].

Encara no s'han determinats tots els gens i variants genètiques i al·lèliques que determinen el desenvolupament de la malaltia. Diferents estudis han confirmat l'existència de gens que predisposen a una susceptibilitat a patir la malaltia (Figura 26), altres que comporten una gravetat addicional, ja sigui per una efecte accelerador o modificador de la malaltia. S'ha vist que la deficiència en C4 està associada a una menor eliminació de les cèl·lules B auto reactives (procés que es dona durant la selecció negativa) [190]. En canvi, deficiències en C1q indueix una mala eliminació de material necròtic [191].

La majoria de polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNPs) associats a LES estan situats a regions no codificants de gens relacionats amb la resposta immune [192]. Altres que han estat associats estan situats en gens que contribueixen a una funció anormal de les cèl·lules T (CD3 ζ i PP2Ac) [193, 194].

La epigenètica també juga un paper important en la regulació i expressió de diferents gens implicats en la malaltia. L'accessibilitat del DNA als factors de transcripció és regulada pel grau de metilació del DNA i les modificacions de les histones (acetilacions i metilacions).

S'han descrit defectes en la metilació (hipo metilació) d'alguns gens involucrats en la malaltia, com per exemple ITGAL, CD40L, CD70 i PP2CA.

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

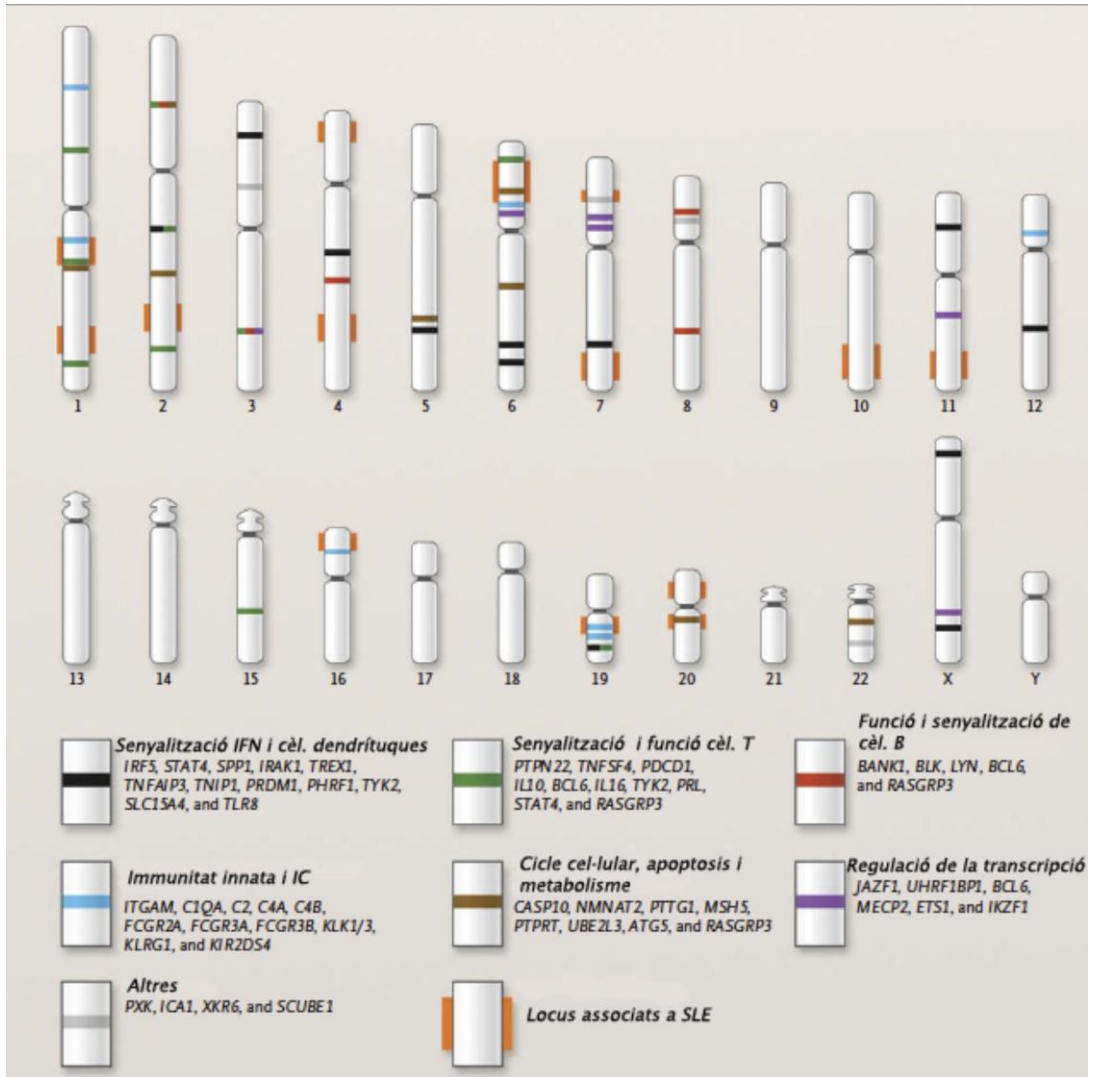


Figura 26. Localització cromosomal dels locus i gens associats amb el lupus. Els gens estan dividits en sis categories segons la seva funció, cada categoria correspon a un color. Hi ha una categoria addicional (gris) que són gens que no estan relacionats amb les altres categories. Els cromosomes amb barres de color taronja pel voltant indica un gran locus general associat a la malaltia. Modificat de [195].

4.4.3. Factors ambientals

Els factors mediambientals es creu que poden ajudar a agreujar la malaltia. La majoria de pacients tenen foto sensibilitat al raigs ultraviolats (UV). Les ones electromagnètiques de rang patològic (UV-B, 280-320nm) estan presents a les radiacions solars. Se sap que els queratinòcits de la epidermis sintetitzen i alliberen citocines pro inflamatòries com per exemple IL1, TNF α , IL6 degut a la exposició a raig UV [196, 197]. Tot això pot acabar en el desenvolupament d'un eritema fotosensible característic. Els raigs UV també poden alterar l'estructura de l'ADN i provocar la formació erràtica d'anticossos (Figura 27). S'han descrit alguns fàrmacs associats a la inducció de l'aparició de la malaltia i que posteriorment han estat retirats del mercat [198].

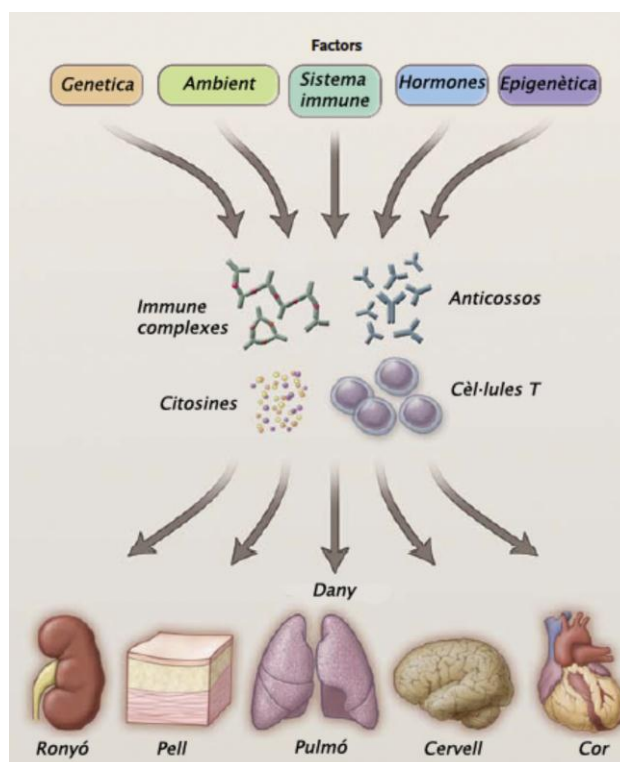


Figura 27. Visió general de la patogènia del lupus eritematós sistèmic. Modificat de [195].

4.5. Mecanismes patogènics.

4.5.1. Apoptosis i autoimmunitat

Alguns estudis correlacionen la presència d'autoanticossos amb dues principals alteracions; l'increment de la apoptosis en els limfòcits circulants i monòcits; i el mal reconeixement dels autoantígens alliberats durant l'apoptosis. *In vivo* els nucleosomes s'alliberen durant la apoptosis degut a la digestió de la cromatina per endonucleases [199], per tant, l'increment de la apoptosis i el mal aclariment dels cossos apoptòtics, aporten un mecanisme per trencar la barrera de la tolerància.

Al timus es dona el procés en el qual els timòcits capaços de reaccionar contra antígens propis són eliminats per apoptosis. És per això que es postula que aquest procés està involucrat en la selecció del repertori de limfòcits T i en el manteniment de la tolerància, ja que és el mecanisme pel qual s'eliminen les cèl·lules que podrien donar lloc a la resposta autoimmune [200].

En individus sans també hi trobem cèl·lules B autoreactives, però la seva quantitat es regula per la apoptosis. Es creu que un defecte en la regulació de les molècules implicades en la apoptosis com Bcl-2 i Fas poden provocar un augment en la vida mitja de les cèl·lules auto reactives i, com a conseqüència, una concentració d'auto anticossos per sobre el dintell patogènic [201].

4.5.2. Epigenètica

L'accessibilitat del DNA als factors de transcripció, i la posterior expressió gènica, estan regulades per la metilació del DNA i les modificacions de les histones (acetilació i metilació). Els canvis epigenètics poden influir al desenvolupament del lupus en diferents nivells, poden alterar la regulació de gens que contribueixen o activen la apoptosis, o poden contribuir a la hiper activació dels limfòcits T i B. Hi ha estudis que demostren que les regions reguladores d'alguns gens involucrats en la malaltia, com són ITGAL, CD40L, CD70, o PPP2CA, estan hipo metilats en pacients amb lupus [202-204].

4.5.3. Alteració del limfòcits T

Els limfòcits T presenten alteracions estructurals i bioquímiques que podem implicar respostes anòmales. S'han trobat alteracions en les proteïnes de membrana, en els sistemes de transducció de senyals d'activació, vies metabòliques, mecanismes de regulació de l'expressió gènica. Alteracions en la migració polar de proteïnes de superfície com CD3, CD4 i CD8.

També s'han trobat alteracions epigenètiques. S'ha vist que les cèl·lules T de pacient amb la malaltia activa tenen el DNA hipometilat [205]. S'ha descrit que aquestes cèl·lules T desmetilades de pacients amb lupus tenen un augment de l'expressió de receptors d'adhesió d'integrines com LFA-1, i que la sobreexpressió de LFA-1 està demostrat que està directament relacionat amb l'auto reactivitat [206].

S'ha demostrat que en pacients amb LES l'activació del complex CD3 està associada a un increment de calci citoplasmàtic i alteracions en la fosforilació de molècules implicades en la transducció de senyals d'activació. El receptor de la cèl·lula T (TCR) és modificat estructuralment, la cadena CD3 ζ és substituïda per una cadena FcR- γ i el senyal es transmet cap a una tirosina quinasa "Syk".

Aquest fet es dona en zones de lípids rafts, zones en la membrana cel·lular metabòlicament actives i riques en colesterol, on convergeixen el TCR i vies de senyalització. CD44 és una molècula d'adhesió que facilita la migració de les cèl·lules T als llocs d'inflamació i que s'ha vist incrementada en pacients amb LES [207]. Un cop el TCR ha enviat el senyal, l'increment de calci citoplasmàtic induïx la supressió de l'expressió de IL2 i promou l'expressió de IL17 (Figura 28).

La disminució de l'expressió de IL2 redueix l'activitat de les cèl·lules T citotòxiques, fet que incrementa el risc a patir infeccions, una de les majors causes de malaltia i fins i tot mort de les persones amb LES. També es veu afectada l'activació de la mort cel·lular, fet que perllonga la vida mitjana de les cèl·lules T auto reactives [208].

La IL17 és expressada en cèl·lules T activades i juga un paper important en la resposta immune contra bacteris i fongs [209]. L'elevada presència de cèl·lules CD3+CD4-CD8-

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

en sang provoca un augment de IL17 i IFN γ i s'ha comprovat que també hi ha una infiltració d'aquestes cèl·lules cap al ronyó [210].

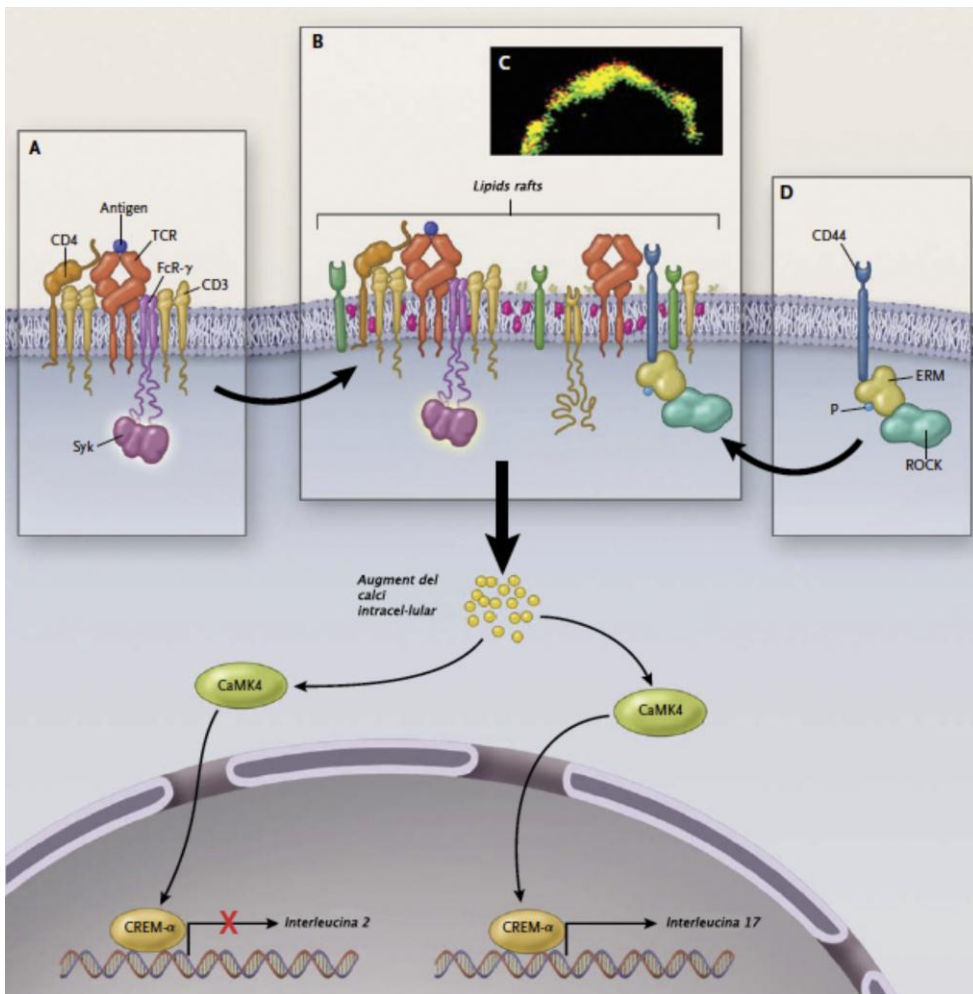


Figura 28. Visió general de les alteracions en els limfòcits T del pacients amb SLE Modificat de [195].

4.5.4. Hiperactivació dels limfòcits B

Les cèl·lules B tenen un paper fonamental en la malaltia LES. S'han descrit múltiples alteracions dels limfòcits B. Els limfòcits B a part de participar com a productors d'autoanticossos tenen altres funcions efectores com la captació de l'antigen i el seu transport, presentació de l'antigen a la cèl·lula T, producció de citocines i quimioquines, migració als llocs d'inflamació on participen en el reclutament de cèl·lules inflamatòries.

Durant els períodes actius de la malaltia hi ha una correlació entre l'activitat de la malaltia i el nombre de cèl·lules B, hi ha un augment de cèl·lules plasmàtiques en sang perifèrica [211]. Existeixen nombroses evidències d'una hiperactivació i hiperproducció policlonal d'immunoglobulines per part dels limfòcits B inclús en les fases poc actives o inactives de la malaltia [212].

Aquestes cèl·lules proliferen excessivament quan són exposades a un estímul mitogènic o a citocines produïdes pels limfòcits T [213]. Un estudi demostra que hi ha una sobre expressió d'antígens d'activació en els limfòcits B de pacients amb LES inactiu en comparació amb controls sans. Aquesta intensitat d'expressió es correlaciona amb nivells circulants de IgG i IgM totals, suggerint una sobre activació persistents del sistema immune dels pacients amb LES [214].

S'ha descrit un augment en la concentració sèrica de IL6 en pacients amb LES [215]. També hi ha un augment de l'expressió del receptor de la IL6 i augment de síntesis de IL6 per part del limfòcits B perifèrics que es considera una activació autocrina. Les causes d'aquest increment d'expressió, tant del receptor com de la citocina IL6 no es coneixen.

En un estudi amb ratolins deficientes per cèl·lules B s'ha demostrat que es preveu completament la malaltia, mentre que l'absència absoluta de anticossos solubles només atenua l'aparició de la malaltia [216].

Tots el subtipus de cèl·lules B (B1 i B2 tant en el fol·licle com a la zona marginal) contribueixen a la producció d'autoanticossos.

4.5.5. Producció d'autoanticossos contra antígens

A part de tots els factors esmentats que influeixen en la malaltia, el LES es comporta com una malaltia mitjançada per immunocomplexes. Si analitzem el repertori de la resposta d'anticossos front a antígens endògens i exògens en pacients amb LES i sans, podem deduir que aquesta híper producció d'anticossos és deguda a un mecanisme d'activació general dels limfòcits B seguida d'una expansió de subtipus B seleccionats [217]. Aquesta sobre producció d'anticossos és la que posteriorment causarà inflamació i dany a diferents òrgans (Figura 29). Els anticossos contra components nuclears, com el nucleosoma, DNA o histones, s'ha vist que hi són presents anys abans del diagnòstic i que la seva acumulació progressiva precedeix els brots característics de la malaltia [218].

4.5.6. Anticossos anti DNA

La detecció en plasma d'anticossos anti DNA és un factor diagnòstic en el LES, es detecten en un 60-70% del pacients amb LES. Aquest anticossos són IgG d'alta afinitat, catiònica i capaços de fixar el complement [219]. Hi ha anticossos de baixa afinitat que apareixen en altres malalties reumàtiques, però que no tenen tan valor diagnòstic [220]. Aquests anticossos contra el DNA es poden dividir en tres grups: aquells que reaccionen contra el DNA, contra les histones o contra estructures de la cromatina. Tots aquests elements es troben al nucleosoma (Figura 29).

Els anticossos anti IgG DNA produïts per limfòcits de pacients amb LES tenen major reactivitat creuada que els produïts per pacients sans, mentre que els IgM tenen una afinitat normal semblant en ambdós grups. El grau de reactivitat creuada correlaciona amb el grau d'activitat de la malaltia i amb la concentració sèrica d'anti DNA [221].

No es coneix la causa de l'aparició d'anticossos anti DNA. Es creu que els limfòcits B, després d'una fase d'activació inespecífica inicial, desenvolupen una síntesis més selectiva d'auto anticossos amb canvi de classe i repertori, guiats per un senyal antigènic inductor de mutació somàtica i expansió clonal.

4.5.7. Immunocomplexes

Els immunocomplexes (IC) circulants juguen un paper molt important en la patogènia del LES. Tot i així, mesurar les concentracions de IC no serveix per monitoritzar la malaltia. Això és degut a la gran heterogeneïtat, tant fisico-química com d'especificitat, a la dificultat per identificar tots els antígens corresponents, a l'escassa correlació entre les concentracions sèriques i tissulars, etc.

Els nucleosomes alterats durant l'apoptosis coincideixen amb altres autoantígens en les vesícules apoptòtiques a la superfície de les cèl·lules. En condicions normals, aquestes cèl·lules en apoptosis són ràpidament eliminades per les cèl·lules fagocítiques que les envolten. En la patologia del lupus hi ha un increment de material apoptòtic i una alteració en l'aclariment o eliminació de les cèl·lules apoptòtiques.

Aquest fet pot donar lloc a una resposta immune contra el contingut d'aquestes vesícules. És a dir, els immunocomplexes formats per anticossos anti nucleosoma (majoritàriament IgG 2 i 3) i nucleosoma poden provocar la majoria de les lesions tissulars. Aquests immunocomplexes es poden unir a components de la membrana basal de diferents òrgans amb càrrega negativa i desencadenar una reacció inflamatòria.

Un cop els immunocomplexes són dipositats, no poden ser fagocitats per les cèl·lules mesangials i es dipositen al subendoteli, això provoca la primera onada de migració i infiltració de cèl·lules efectores i polimorfonucleades. La reacció inflamatòria és iniciada a través de receptors gamma Fc dels macròfags, cèl·lules dendrítiques, neutròfils, cèl·lules mesangials, etc. i també per la secreció de mediadors pro inflamatoris, com són IL6, IL1, TNF, MCP1, per part de les cèl·lules mesangials i epitelials [222].

La presència d'immunocomplexes també promou la immunitat adaptativa que indueix la maduració de les cèl·lules dendrítiques, secreció de IFN, presentació d'antígens a la cèl·lula T, etc. (Figura 29).

4.5.8. Complement

El sistema del complement està implicat en la patogènia del LES [191, 223], es considera que té un paper dual, ja que per una banda exerceix una funció protectora ajudant en l'eliminació d'immune complexes i cossos apoptòtics, i per altra banda pot contribuir a la inflamació i dany tissular (Figura 29).

Gran part dels pacients amb LES tenen baixa activitat del complement i disminució dels nivells de C3 i C4. Se sap que la deficiència d'alguna de les proteïnes de la via clàssica del complement, que és la que domina en la patologia de LES i la que interacciona amb els immunocomplexes, està associada a la susceptibilitat de desenvolupar la malaltia, especialment les proteïnes inicials de la cascada d'activació.

L'aparició d'anticossos anti C1q estan associats a una evolució més severa de la malaltia, que acostuma a incloure la glomerulonefritis.

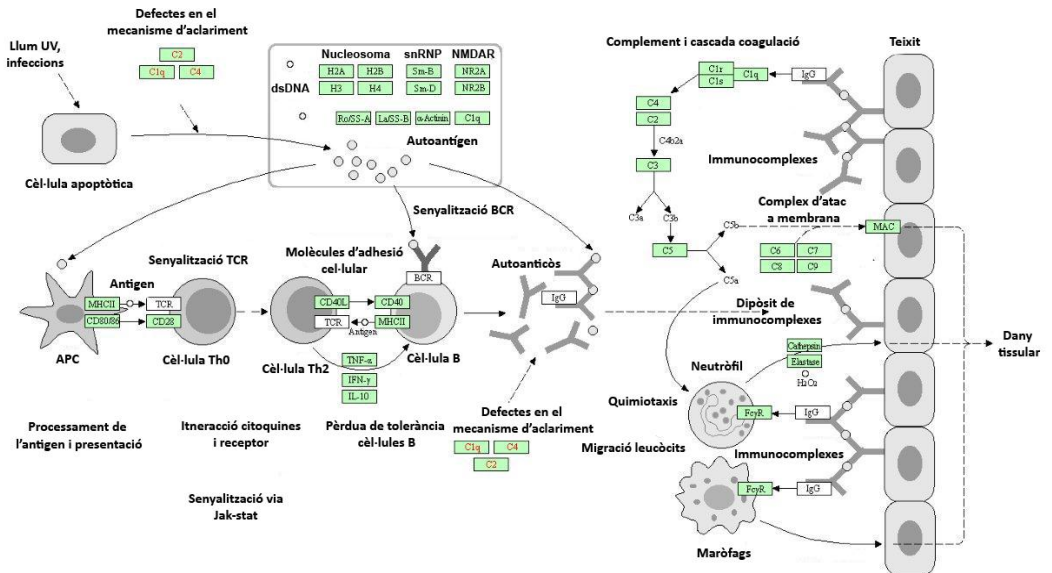


Figura 29. Visió general de la patologia SLE Modificat de KEGG.

4.6. Nefritis lúpica (LN)

L'afectació renal en el LES és una causa important de morbiditat i mortalitat [224]. La seva incidència es dona entre un 30 i un 60%. És major en la població asiàtica (55%), africana (51%), o hispana (43%) que la caucàsica (14%). Són situacions clíniques freqüents que tenen un mal pronòstic si no són diagnosticades i tractades de manera adequada.

Hi ha estudis que calculen que amb una teràpia immunosupressora d'ampli espectre la remissió completa pot arribar al 50% [225], mentre que el percentatge de recaiguda és del 30% després de 2 anys [226], també poden aparèixer efectes tòxics.

El curs desfavorable de la LN pot conduir a insuficiència renal (IR) i a la necessitat de tractament substitutiu: diàlisi i trasplantament de l'òrgan. Es calcula que un 25% dels pacients desenvoluparà IR en els deu anys de l'inici de la malaltia. La supervivència dels pacients amb nefropatia lúpica ha augmentat considerablement en els últims 25 anys.

En la LN tots els compartiments anatòmics del ronyó es poden veure afectats (Figura 30), encara que destaca el dany glomerular, els mecanismes etiopatogènics són variats i això explica les diferents varietats anatomo patològiques. La nefritis lúpica és iniciada pels dipòsits al glomèrul de auto anticossos i immuno complexes que promouen l'activació de la cascada inflamatòria, que inclou també el complement [227].

S'indueix el reclutament de cèl·lules inflamatòries, les cèl·lules del parènquima renal són activades a través de TLRs i produeixen mediadors inflamatoris, que augmenten la síntesi de molècules d'adhesió per part de les cèl·lules endotelials. Aquesta cadena d'esdeveniments produeixen un dany podocitari que acaba provocant proteïnúria i disminució de la síntesi de membrana basal glomerular.

Se sap que els podòcits tenen un paper molt important en el dany renal ja que el dany podocitari en malalties cròniques acaba provocant glomerulosclerosi [228]. La possible trombosi de la microvasculatura i la mort de cèl·lules endotelials

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

contribueix a la hipòxia renal que, causa estrès, mort cel·lular, atrofia tubular i indueix la síntesi de molècules que activen receptors de la resposta innata [229].

Tota aquest cadena d'inflamació es va auto activant i amplifica el dany renal [230] (Figura 31). Hi ha activació de cèl·lules musculars llises i fibroblasts que indueixen fibrosis i són un factor predictiu negatiu per el pronòstic de la nefritis lúpica. S'ha demostrat la presència de teixit limfoide secundari en el parènquima renal [231].

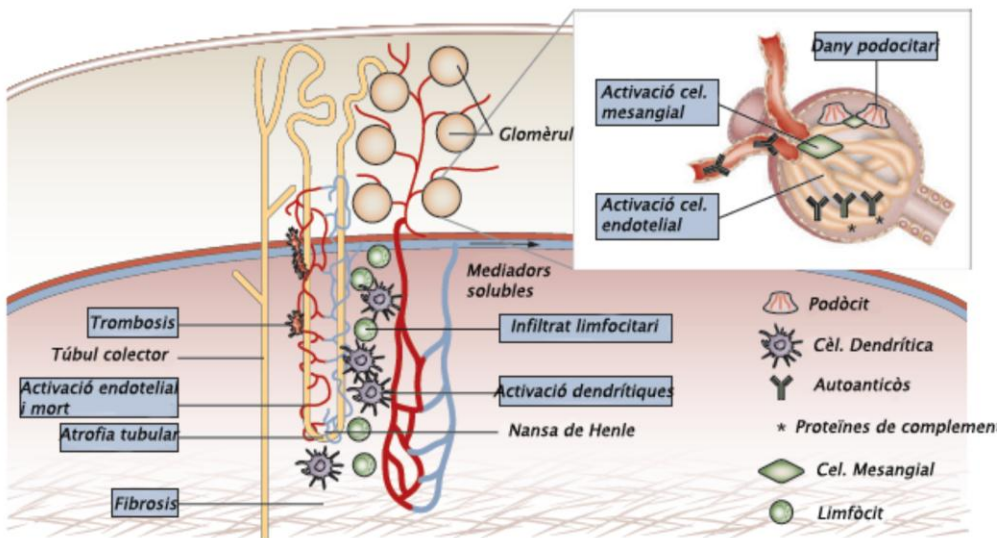


Figura 30. Patogènesis de la nefritis lúpica. Modificat de [232]

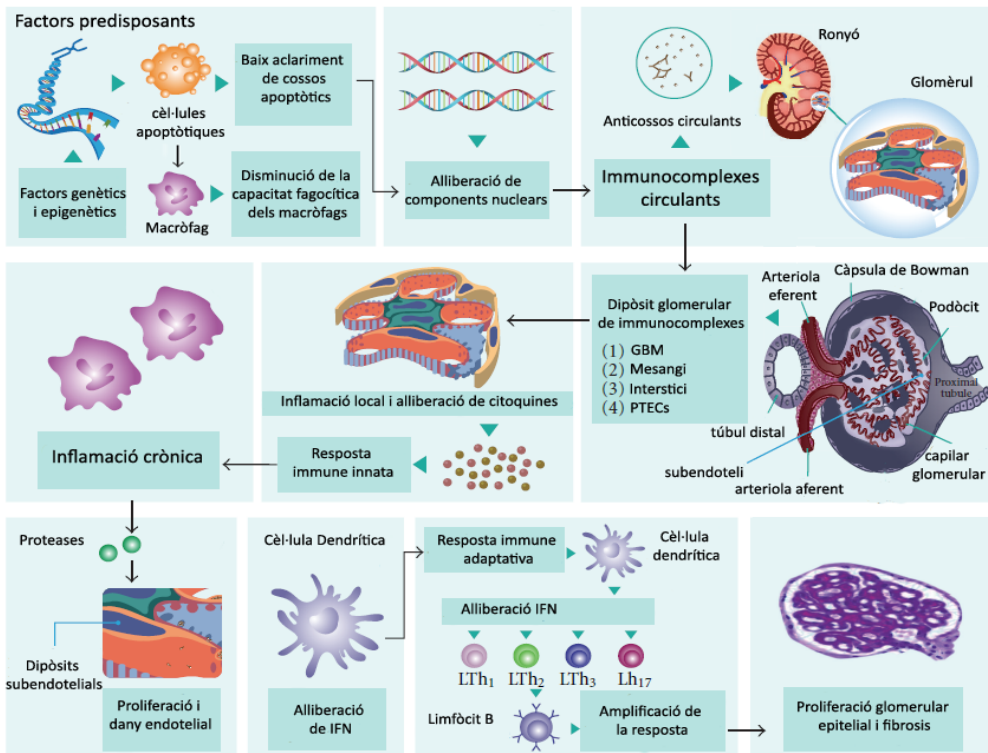


Figura 31. Alteracions en la regulació de la resposta immune en SLE. Modificat de [233].

4.6.1. Classificació de la nefritis lúpica

Per valorar la LN a partir de la biòpsia renal s'han aplicat històricament una successió de classificacions, que han anat evolucionant al llarg dels últims 40 anys gràcies a la identificació i definició de diferents tipus de lesions.

La classificació histològica de la nefropatia lúpica va ser proposada per l'Organització Mundial de la Salut el 1974 i va ser revisada els anys 1982, 1995 i el 2003. L'última revisió, actualment vigent, és proposada per la *International Society of Nephrology and Renal Pathology Society* (ISN/RPS).

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

Aquesta agrupa les lesions en 6 classes que van des de la classe I, amb mínimes lesions, fins a la classe VI, en la que el teixit renal està esclerosat com a conseqüència d'una lesió inflamatòria crònica (Taula 7) (Figura 32).

També s'ha definit un índex histològic d'activitat i cronicitat en les lesions glomerulars en la nefritis lúpica:

- Índex d'activitat:
 - Proliferació cel·lular, hipercel·lularitat endocapilar amb o sense infiltrat leucocitari i reducció de les llums tubulars.
 - Cariorrexis / necrosis fibrinoide.
 - Necrosi fibrinoide.
 - Trencament de la membrana basal glomerular.
 - Semi llunes cel·lulars o fibrocel·lulars
 - Dipòsits subendotelials identificables per microscòpia òptica.
 - Agregats intraluminals. Trombus hialins
- Índex de cronicitat:
 - Esclerosi glomerular (segmental o global)
 - Adhesions fibroses
 - Semi llunes fibroses
 - Atrofia tubular
 - Fibrosis intersticial

TIPUS	SUBTIPUS	MO	IF
Tipus I. Mesangial mínima		Glomèrul normal	Dipòsits immunes mesangial
Tipus II. Mesangial proliferativa		HiperCel·lularitat mesangial de qualsevol grau o expansió de la matriu mesangial	Dipòsits immunes mesangials. Poden existir dipòsits subendotelials o subepitelials aïllats visibles per IF o per ME però no per MO.
Tipus III. Focal ^a		Glomerulonefritis focal activa o inactiva, segmentària o global, endo o extracapilar que afecta <50% de tots els glomèruls	Dipòsits immunes subendotelials focals, amb o sense alteracions mesangials.
	A	Lesions actives: proliferació focal	
	A/C	Lesions actives i cròniques: proliferació focal i esclerosi	
	C	Lesions cròniques inactives amb cicatrius: esclerosi focal	
Tipus IV. Difusa ^b		GN difusa activa o inactiva, segmentària o global, endo o extracapilar que afecta a ≥50% de tots els glomèruls.	Dipòsits immunes subendotelials difusos, amb o sense alteracions mesangials.
	IV-S (A)	Lesions actives: Proliferació segmentària	
	IV-G (A)	Lesions actives: Proliferació global	
	IV-S (A/C)	Lesions actives i cròniques: Proliferació segmentària i esclerosi	
	IV-G (A/C)	Lesions actives i cròniques: Proliferació global i esclerosi	
	IV-S (C)	Lesions actives inactives amb cicatrius: esclerosi segmentària	
	IV-G (C)	Lesions actives inactives amb cicatrius: esclerosi global	
Tipus V. Membranosa		Dipòsits immunes subepitelials globals o segmentaris o seqüeles morfològiques, amb o sense alteracions mesangials, tant per MO, com ME, o IF. Pot combinar-se amb Tipus III o IV	
Tipus VI. Esclerosi avançada		Esclerosi global superior al 90% dels glomèruls amb o sense activitat residual.	

Taula 7. Resum de la classificació histopatològica de la nefritis lúpica. MO: microscòpia òptica, ME: microscòpia electrònica, IF: immunofluorescència. Adaptat de [234]. ^a Indicar la proporció de glomèruls amb lesions actives i/o escleròtiques. ^b Indicar la proporció de glomèruls amb necrosi fibrinoide i/o semillunes. Indicar i graduar l'atròfia tubular, inflamació intersticial i fibrosi, gravetat de l'arteriosclerosi o altres lesions vasculares.

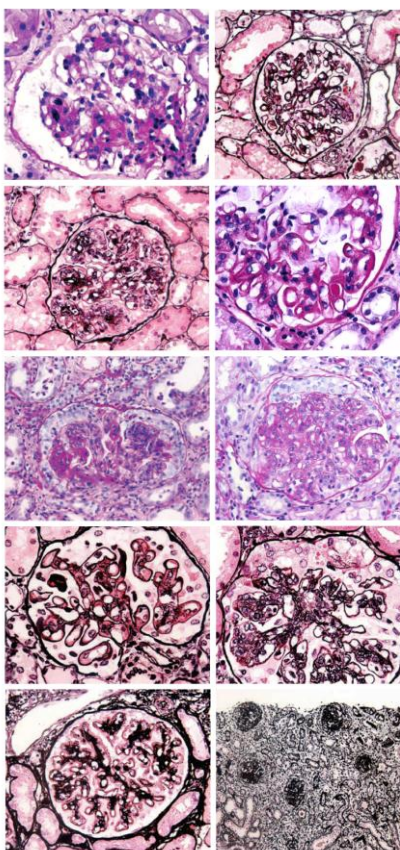


Figura 32. Fotografies representatives de lesions corresponents als diferents tipus de nefritis lúpica. De dalt a baix i d'esquerra a dreta: LN classe II, LN classe III (A), LN classe IV-S (A), LN classe IV-G (A), LN classe IV-G, LN classe IV-G (A/C), LN classe IV-G (A), LN classe IV AND V, LN classe V, LN classe VI.

4.6.2. Models murins experimentals del LES

L'estudi en soques murines capaces de desenvolupar de forma espontània malalties autoimmunes similars a les humanes ha permès la comprensió de l'etiopatogènia i ha aconseguit realitzar importants avenços. En el cas del LES existeixen diferents models murins que presenten manifestacions clíniques i analítiques similars a la malaltia humana, ja sigui desenvolupant la malaltia de forma espontània, induïda per alguna substància o per modificacions del material genètic (Taula 8).

Esponatnis	Induïts	Genèticament modificats	
MRL lpr/lpr	EICH	Knock-out	Transgènics
NZB	Transferència d'anticossos patogènics	C1q	Bcl-2
NZB/NZWF1	Transferència de limfòcits B	TGFβ1	INFδ
NOD	Activació cadenes Id	IL2	
SWRxNZB/WF1	Immunització amb DNA	IL10	
BXSB	Pristane	CTL4	
C3H/gld		TCR	
		CD40L	

Taula 8. Models murins experimentals per la nefritis lúpica

New Zealand Black / New Zealand White F1 (NZB/NZWF1)

La primera generació (F1) obtinguda del creuament entre els ratolins NZB i NZW és considerada com el model murí més semblant a la patologia LES humana. La malaltia és més greu i apareix més precoçment en femelles, també apareixen en elevades quantitats els anticossos anti dsDNA, ANA, etc. La mort és deguda a l'aparició de glomerulonefritis [235, 236].

Ambdues soques parentals, tant la NZB com la NZW, contribueixen genèticament a les alteracions immunes pròpies de la malaltia [237, 238]. Els animals NZB/WF1 hereten una sèrie de gens, aproximadament uns sis de la soca NZB i dos de la soca NZW. Aquest fet comporta una gran variabilitat en el fenotip autoimmune de cada animal [239-241] (Figura 33).

Algunes de les característiques de la soca NZB/WF1 heretades de la soca NZB són:

- Hiperactivitat dels limfòcits B, en NZB és detectable a partir del primer mes de edat, però a NZB/WF1 apareix més tardanament.
- Secreció elevada d'immunoglobulines [238].
- Limfadenopatia lleu i esplenomegàlia [242, 243].

La proteïnúria apareix entre els 5 i 7 mesos i l'azotèmia entre els 6 i 12 mesos. La mortalitat depèn del sexe, les femelles tenen un promig de supervivència menor a la dels mascles (35 i 58 setmanes respectivament). El dany histològic renal apareix tant en els compartiment vascular, tubular i intersticial. Inclou des de proliferació mesangial, proliferació extracapil·lar i endocapil·lar, aparició de dipòsits glomerulars, esclerosi glomerular, atrofia tubular, infiltració per diferents tipus cel·lulars (limfòcits mononuclears, monòcits, macròfags), fibrosi intersticial, etc.

Els anticossos anti DNA són els més característics i contribueixen a la nefritis [243]. Hi ha altres tipus d'anticossos contra dsDNA, ssDNA, dsRNA, tRNA, polinucleòtids, histones, ubiquitines, cromatina, crioglobulines, etc [244]. Els anti DNA IgM apareixen entre els 3 i 5 mesos d'edat i els anti DNA IgG apareixen entre els 5 i 7 mesos d'edat en les femelles.

Aquests últims tenen subgrups antigènics que són responsables, en part, de la nefritis. S'ha vist que la transferència de certs anticossos anti dsDNA IgG2 de ratolins NZB/WF1 a BALB/c inicialment sans, indueixen nefritis [245, 246]. També s'han detectat anticossos contra eritròcits, encara que pocs animals acaben desenvolupant anèmia hemolítica [247], anticossos anti fosfolípids IgM i IgG i anti cardiolípinia [248].

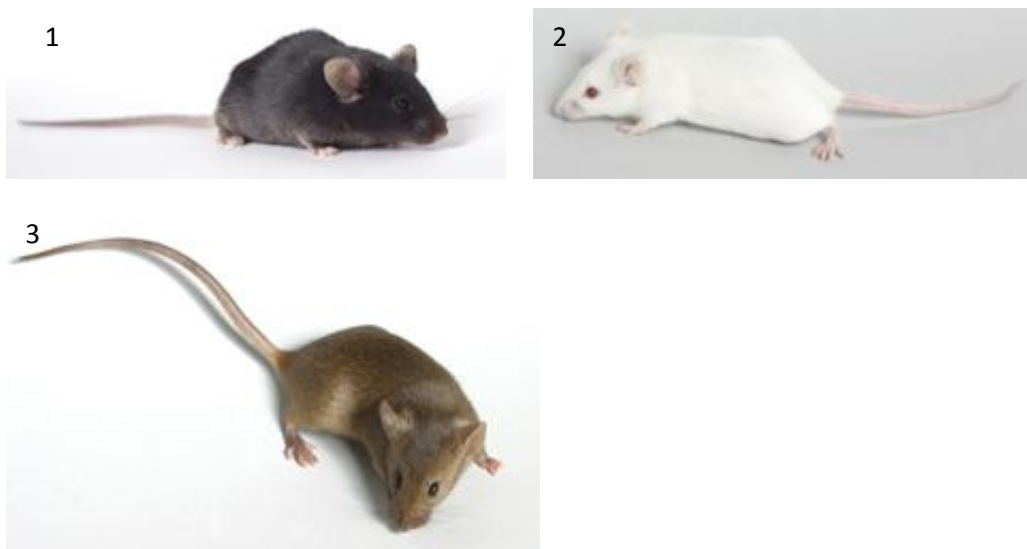


Figura 33. Fotografies de models murins experimentals de ratolins de nefritis lúpica.
1) Soca NZB. 2) Soca NZW. 3) Soca NZB/NZWF1.

III. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

El senyal de coestimulació de CD40-CD40L juga un paper molt important en l'activació del sistema immunitari. S'ha demostrat que s'activa en un context d'estímul antigènic, ja sigui autoimmune o al·loimmune, on inicia una cascada de processos i senyals que finalment donen lloc a una resposta immune inflamatòria.

En el cas del trasplantament renal se sap que CD40 juga un paper molt important en el reconeixement de l'al·loantigen i la inflamació provocada per la isquèmia reperfusió. En el cas de la nefropatia lúpica es dona un reconeixement autoimmune que també inicia una cascada inflamatòria.

S'ha vist que el bloqueig d'aquest senyal de coestimulació, generalment utilitzant anticossos específics, com a estratègia terapèutica per evitar el rebuig ha estat efectiva en molts models experimentals animals. En models autoimmunes s'ha aconseguit reduir la incidència de la malaltia, perllongar la supervivència i disminuir la inflamació associada i el dany crònic.

Alguns estudis descriuen els efectes adversos de problemes tromboèmolics que s'han observat derivats de l'ús d'anticossos contra CD40L, fet que ha limitat la utilització d'aquests i altres fàrmacs dirigits a aquesta diana. Aquest efecte es va relacionar amb l'activació de les plaquetes.

En les últimes dècades també hi ha hagut un augment de compostos basats en àcids nucleics que tenen un gran potencial per ser usats com a agents terapèutics. Aquestes molècules són utilitzades per inhibir l'expressió de gens específics, bloquejant la traducció del mRNA i provocant la seva degradació. Aquesta tecnologia gaudeix d'una gran efectivitat, precisió i alhora pot ser un efecte reversible.

L'abordatge de la molècula CD40 és un nou enfoc del bloqueig d'aquesta via. La diana no és la cèl·lula T si no la cèl·lula presentadora d'antigen o la interacció entre la cèl·lula T i la cèl·lula B. La teràpia gènica contra CD40 permetrà un tractament més específic i eficient d'aquesta diana, amb una

tecnologia d'aplicació futura probablement més efectiva que les teràpies convencionals.

Basats en totes aquestes evidències, la teràpia gènica contra CD40 utilitzant la tecnologia de RNA interferència, ja sigui local o sistèmica, permetria evitar la sobre activació del sistema immunitari tant en un context al·loimmune com autoimmune i controlar el dany inflamatori derivat.

A.- OBJECTIUS PRINCIPALS DEL MODEL AL-LOIMMUNE:

Objectius del primer estudi

- Estudiar el paper de la isquèmia freda en el model de rebuig agut mediat per anticossos.
- Analitzar com afecta la isquèmia freda a l'estructura molecular, histològica i bioquímica de l'empelt en el model de rebuig agut.
- Veure quin paper hi juga el CD40 en aquest procés.

Objectius del segon estudi

- Evitar el rebuig i perllongar la supervivència de l'empelt renal bloquejant el senyal de coestimulació CD40 mitjançant teràpia gènica local en un model experimental de rebuig agut.
- Estudiar l'eficàcia i l'efecte funcional del bloqueig del senyal de coestimulació. Estudi a nivell molecular del paper de CD40-CD40L. Estudi funcional, histopatològic, bioquímic i molecular de mediadors de lesió.

B.- OBJECTIUS PRINCIPALS DEL MODEL AUTOIMMUNE:

- Provar l'eficàcia del siRNA anti CD40 de ratolí *in vitro* en un cultiu de cèl·lules dendrítiques, entrada cel·lular i bloqueig d'expressió de CD40.
- Posta a punt de l'administració sistèmica del siRNA en un model de ratolí. Estudi de distribució i quantificació de la molècula en els diferents òrgans. Avaluat l'eficàcia de la inhibició de CD40.
- Estudiar l'impacte del silenciament gènic del senyal CD40-CD40L en un model de nefritis lúpica experimental. Estudi funcional, histopatològic, bioquímic i molecular de mediadors de lesió.

IV. RESULTATS

LLISTA D'ARTICLES:

A) Articles publicats inclosos en la tesis:

Article 1: E Ripoll, V Nacher, A Vidal, E Herrero, N Bolaños, J Torras, JM Grinyó, J Ruberte and I Herrero-Fresneda. **Cold ischemia, innate immunity and deterioration of the glomerular filtration barrier in antibody mediated acute rejection.** Nephrol Dial Transplant. 2012 Aug;27(8):3296-305. doi: 10.1093/ndt/gfs003. Epub 2012 May 3.

Article 2: E Ripoll, R Pluvinet, J Torras, R Olivar, A Vidal, M Franquesa, L Cassis, JM Cruzado, O Bestard, JM Grinyó, JM Aran and I Herrero-Fresneda. **In vivo therapeutic efficacy of intra-renal CD40 silencing in a model of humoral acute rejection.** Gene Ther. 2011 Oct;18(10):945-52. doi: 10.1038/gt.2011.39. Epub 2011 Apr 7.

B) Article en revisió inclòs en la tesis:

Article 3: E Ripoll, A Merino, M Goma, JM Aran, N Bolaños, I Herrero-fresneda, L de Ramon O Bestard, JM Cruzado, JM Grinyó, J Torras. **Silencing CD40 slows the progression of experimental autoimmune nephritis**

C) Articles publicats no inclosos en la tesis:

- Franquesa M, Herrero E, Torras J, Ripoll E, Flaquer M, Goma M, Lloberas N, Anegón I, Cruzado JM, Grinyó JM, Herrero-Fresneda I. **Mesenchymal stem cell therapy prevents IFTA in a rat kidney allograft model.** Stem Cells Dev. 2012 Nov 20;21(17):3125-35. doi: 10.1089/scd.2012.0096. Epub 2012 May 18.

ARTICLE 1

Cold ischemia, innate immunity and deterioration of the glomerular filtration barrier in antibody mediated acute rejection

E. Ripoll, V. Nacher, A. Vidal, E. Herrero, N. Bolaños, J. Torras, JM. Grinyó, J. Ruberte, I. Herrero-Fresneda

NDT Nephrol Dial Transplant. 2012 Aug;27(8):3296-305. Epub 2012 May 3.

Article 1: Cold ischemia, innate immunity and deterioration of the glomerular filtration barrier in antibody mediated acute rejection. NDT

Objectius:

L'objectiu principal d'aquest treball era estudiar el paper de la isquèmia freda en aquest tipus de rebuig, caracteritzar les lesions histològiques bioquímiques i moleculars degudes al procés i veure quin paper juga CD40.

Per això es va plantejar grups de treball amb trasplantament singènic, model Wistar Agouti/Wistar Agouti amb i sense isquèmia freda (CI); i al·logènic, model Brown Norway/Wistar Agouti amb i sense isquèmia freda; per veure les diferències entre els grups que farien rebuig i els que no, i com influïa la isquèmia en l'evolució dels grups.

Resultats:

Model de rebuig agut humoral mediat per anticossos (AbAR).

El grup prèviament havia demostrat, com era d'esperar, que la supervivència i funció renal eren diferents entre rates amb un trasplantament singènic (Model WA/WA i CI-WA/WA) o al·logènic (BN/WA i CI- BN/WA). Mentre que la isquèmia no modificava aquests resultats en els grups singènics, aquesta sí que era important en el grups al·logènics, on augmentava molt la mortalitat (material suplementari S5). Es pot observar el desenvolupament d'una insuficiència renal severa en els grups al·logènics, mentre que els grups singènics (tinguin o no isquèmia) recuperaven els nivells basals de creatinina sèrica pre-trasplantament (Taula 2).

Els resultats de les histologies convencionals mostren un teixit preservat en el grup singènic sense isquèmia (WA/WA), mentre que es mostra un dany moderat tubulo-intersticial en el grup en el qual se li ha afegit isquèmia (CI-

WA/WA). Els ronyons dels grups al·logènics mostren un dany característic de rebuig vascular cel·lular, mentre que els que se li ha sumat el dany isquèmic tenen un clar patró de dany tubulo intersticial causat per la isquèmia, amb signes de rebuig vascular, inflamació, àrees on hi ha denudació endotelial, i per tant, un clar patró característic de rebuig agut humoral (Figura 1).

Els dipòsits de C4d i IgG en el capil·lars peritubulars incrementen significativament en resposta a la isquèmia tant en els grups singènics, com en els al·logènics. La isquèmia, per tant, influeix en el dipòsit de C4d i IgG però no als anticossos específics contra el donant (DSA), que sembla que depèn més de l'ambient al·logènic. Els DSA són presents en tots els grups al·logènics i absents en els grups singènics. Algunes rates amb trasplantament al·logènic sense isquèmia i que mostren un anticossos contra el donant positius no mostren una histologia típica de rebuig humoral, però en canvi, si que totes les rates amb trasplantament al·logènic amb isquèmia i amb anticossos positius si que desenvolupen rebuig humoral. Per tant, tenint en compte la classificació de Banff, trobem diferències significatives entre els grups al·logènics i els grups singènics, corroborant així el patró histològic de rebuig agut mitjançat per anticossos (Taula 2).

Activació de la immunitat innata i adaptativa.

Per determinar la resposta immune innata es van quantificar la expressió gènica de diferents gens relacionats com són TLR4, MyD88 i factors endògens com HSP70 i fibronectina. Aquest dos últims es va observar que la seva expressió augmentava en els grups al·logènics amb isquèmia. Els valors més alts de TLR4 i MyD88 es van veure en aquells grups en el quals el component immune i no immune van convergir sinèrgicament en l'activació de la resposta innata. (Taula2)

La microscòpia confocal de TLR4 i fibronectina va mostrar una clara colocalització d'ambdues proteïnes en els glomèruls d'empelts isquèmics tant a la setmana 1 com a la 24. Es va observar que les cèl·lules inflamatòries infiltrants eren positives per TLR4 a la superfície (Figura 3).

Pel que fa a les citosines inflammatòries implicades, l'anàlisi d'expressió gènica de TNF α com IFN γ mostrava un augment de la síntesis d'aquests components en els trasplantaments al·logènics. Aquests grups també mostraven alts nivells de TGF β i una baixa expressió de IL12p40. Els nivell de proteïna de IL10 es mostraven incrementats en els grups al·logènics (Taula 2), no es van veure diferències significatives dels nivells de IFN γ , IL2 i IL4.

Per analitzar la via de coestimulació de CD40 es va quantificar el mRNA i l'expressió proteica dels empelts. Els resultats de la immunohistoquímica van mostrar una expressió de CD40 a les cèl·lules epitelials tubulars de tots els grups. En els grups al·logènics també es va localitzar expressió al glomèrul i a les cèl·lules de la paret vascular. Els resultats de l'anàlisi per western blot mostraven un augment de proteïna als grups al·logènics mentre que els valors dels grups singènics eren similars als d'animals no trasplantats.

Podem concloure per tat, que el reconeixement al·logènic és el factor més important per una sobre expressió de CD40 i que la isquèmia freda no l'incrementa en aquesta condicions. No obstant, la isquèmia si que incrementa l'expressió de CD40 en un ambient singènic (Figura 2). També s'ha observat una correlació entre els nivells de CD40 de mRNA i els nivells d'anticossos contra el donant, tant contra MHCI com MHCII (material suplementari 7)

Alteració de la barrera de filtració.

Es va analitzar l'alteració de la barrera de filtració glomerular, quantificant i analitzant el col·lagen IV de la capsula de Bowman i del cabdell glomerular. Per analitzar el paper de la isquèmia i la seva influència en la síntesis de col·lagen IV, es va analitzar l'expressió gènica de HIF i P4H.

La síntesis de col·lagen IV era modulada de forma diferent a la capsula de Bowman i al cabdell glomerular per la isquèmia o al·logenicitat. A la capsula de Bowman la síntesis era menor en el grups on hi havia isquèmia o al·logenicitat. En canvi, la síntesis al cabdell glomerular responia

contràriament augmentant la síntesis en els grups on hi havia isquèmia i al·logenicitat (Figura 4). La expressió gènica de HIF1 α i P4H α 2 era major en aquells empelts on hi convergien els dos factors (Taula 2).

També es va analitzar la síntesis de col·lagen IV en uns grups històrics equivalents d'un estudi amb grups de rebuig crònic (Model Fischer-Lewis amb seguiment de 24 setmanes) també amb trasplantament singènic o al·logènic amb o sense isquèmia. En aquest cas, exceptuant el grup singènic sense isquèmia, tots els altres desenvolupaven una proteïnúria progressiva i diferents graus de glomerulopatia del trasplantament (Material suplementari S8). En els grups al·logènics es van observar dobles contorns a la membrana basal glomerular. La quantificació de la síntesis de col·lagen IV en aquest grups mostra que tant la isquèmia freda com el component al·loreactiu indueixen un grau similar de síntesis de col·lagen IV al cabdell glomerular i a la capsula de Bowman, augmentant així el seu gruix. (Figura 4)

Original Article

Cold ischaemia, innate immunity and deterioration of the glomerular filtration barrier in antibody-mediated acute rejection

Èlia Ripoll^{1,*}, Víctor Nacher^{2,*}, August Vidal³, Esther Herrero¹, Núria Bolaños¹, Juan Torras¹, Josep M. Grinyó¹, Jesús Ruberte² and Immaculada Herrero-Fresneda¹

¹Experimental Renal Transplant, Laboratory of Experimental Nephrology, Bellvitge Biomedical Research Institute, University Hospital of Bellvitge (IDIBELL-HUB), L'Hospitalet, Barcelona, Spain, ²Department of Animal Health and Anatomy, Center of Animal Biotechnology and Gene Therapy (CBATEG), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain and ³Pathology Service, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet, Barcelona, Spain

Correspondence and offprint requests to: Immaculada Herrero-Fresneda; E-mail: iherrero@idibell.cat

*These authors contributed equally to this work.

Abstract

Background. In renal transplantation, cold ischaemia (CI) determines acute rejection through innate immunity among others. Acute rejection episodes are a risk factor for late allograft dysfunction and proteinuria. This implies some alteration of the glomerular filtration barrier (GFB). Besides its effects on acute rejection, we hypothesized that CI might somehow damage the GFB being directly responsible for late proteinuria.

Methods. On rat kidney allografts suffering from antibody-mediated acute rejection with or without CI and compared with syngeneic grafts, we quantified the gene expression of innate and adaptive immune mediators and assessed the capillary glomerular basement membranes (CapBM) by immunostaining collagen-IV (ColIV). ColIV was also assessed in equivalent groups from a previous chronic study followed up for 24 weeks.

Results. CI up-regulated enzymes critical in the stabilization of collagen chains, increasing ColIV deposition and thickening the CapBM. CI increased the C4d and IgG deposits within grafts, amplified innate immunity (heat shock protein 70, fibronectin, Toll-like-receptor-4 and MyD88) and synergized with alloreactivity in triggering adaptive response through CD40.

Conclusions. Initial CI increased the ColIV deposition in CapBM, damaging the GFB and being responsible for part of the proteinuria associated with late allograft dysfunction. This deterioration of the GFB is related to the early innate immunity activation and subsequent up-regulation of CD40 in acute rejected grafts. In chronic rejected allografts, thickened CapBM may be a consequence of an unresolved immune-inflammatory response worsened by CI.

Keywords: AbAR CD40; cold ischaemia; collagen-IV; GFB; TLR4

Introduction

Cold ischaemia (CI) synergizes with allrecognition during the rejection process, providing an immune-stimulatory signal that lowers the threshold for activation of the immune response and increases the immunogenicity of the graft [1, 2]. This synergism seems to be caused, at least in part, by the activation of innate immune mechanisms through Toll-like-receptor (TLR) signalling [3]. TLRs induce the transcription of inflammatory cytokines and stimulate the costimulatory signals [4, 5], which besides being activated by innate defence mechanisms, are central players in the adaptive immune response.

Initial CI also affects late allograft outcome [6]. In kidney, late allograft dysfunction is characterized by renal insufficiency and progressive proteinuria, with histological interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF/TA) and transplant glomerulopathy (TGP). Proteinuria reflects some structural alteration of the glomerular filtration barrier (GFB) [7]. The GFB is made up of the fenestrated capillary endothelial cell, its basement membrane (CapBM) and the podocyte. The glomerular basement membrane (GBM) is a specialized part of the extracellular matrix containing type IV collagen (ColIV), fibronectin and heparansulphate among others. ColIV—the main constituent among the collagenous components of the GBM—has different alpha chains configuring its distinct triple helical isoforms [8, 9]. Two main isoforms can be found within the GBMs: the epithelial isoform ($\alpha3\alpha4\alpha5(IV)$) located in the CapBM and the endothelial isoform ($\alpha1\alpha1\alpha2(IV)$) found both in the CapBM and in the Bowman's capsule (BowBM) [10]. Thus, the CapBM is composed of the $\alpha1\alpha1\alpha2(IV)$ and the $\alpha3\alpha4\alpha5(IV)$ isoforms. Alterations in any of these alpha chains are known to result in pathological syndromes characterized by haematuria and varying degrees of proteinuria [11, 12].

In a previous kidney transplant model with highly responding rat strains, we observed a humoral rejection

pattern aggravated by CI [13, 14]. Additionally, CI also intensified late proteinuria in chronically damaged allografts [14]. It seems obvious that initial CI would consequently affect late allograft outcome because CI determines acute rejection, and acute rejection episodes are a risk factor for late renal allograft dysfunction [1, 6]. However, we wondered whether CI *per se* might be responsible for the late proteinuria observed in previous studies [14, 15].

We hypothesized that CI would somehow modify the CapBM during the acute rejection process by the intensification of the innate immunity, and this would probably be reflected in its late outcome. To assess this hypothesis, we considered the expression of some innate and adaptive immune mediators and evaluated the deposition of ColIV in the GBMs. All these parameters were determined on acute rejecting renal allografts from a preceding study [13] that underwent either CI or not, and they were compared with syngeneic grafts with or without previous CI. In addition, ColIV was also assessed in chronically rejected kidney allografts from another previous study followed up for 24 weeks [14].

We found that CI augments the complement and antibody deposits within grafts, up-regulates the gene expression of innate mediators and thickens the CapBM by the direct accumulation of ColIV. This deterioration of the GFB is related to the early innate immunity activation and subsequent up-regulation of CD40 in acute rejected grafts. In chronic rejected allografts, thickened CapBM may be a consequence of an unresolved immune-inflammatory response worsened by initial CI.

Materials and methods

Animals and surgical technique

Renal transplants were performed between inbred male rats (250 g body weight): Wistar-Agouti (WA) rats as recipients of Brown Norway (BN) or Wistar-Agouti kidneys for allogeneic or syngeneic transplants, respectively. For CI, kidneys were preserved in Euro-Collins (4°C, 2.5 h). Surgical technique was as previously described (www.renal-transplantation.com). Recipient rats were bi-nephrectomized at the moment of transplantation. Animals (Charles River by Harlan UK Limited) did not receive any immunosuppressant and were maintained in accordance with the Guidelines of the Committee on Care and Use of Laboratory Animals and Good Laboratory Practice.

Groups and follow-up

'WA/WA' ($n = 10$): immediate syngeneic transplant; 'CI-WA/WA' ($n = 12$): syngeneic transplant with CI; 'BN/WA' ($n = 14$): immediate allogeneic transplant and 'CI-BN/WA' ($n = 10$): allogeneic transplant with CI. Serum creatinine (sCr, $\mu\text{mol/L}$) was determined on blood samples collected from the tail vein every 2 days beginning the day after surgery. Allogeneic rats were followed up until their clinical appearance and sCr values recommended sacrifice. Syngeneic rats, with indefinite mean survival time, were sacrificed at the 7th day after transplantation to compare their grafts with those in the allogeneic groups. At sacrifice, plasma and serum samples were collected. Grafts were processed for histological and immunohistochemical studies and a part was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for western blot (WB) and gene expression assays.

Histological studies

Coronal graft slices (1–2 mm) were fixed in buffered formalin, dehydrated and embedded in paraffin. For light microscopy, tissue sections (3–4 μm) were stained with haematoxylin–eosin and periodic

acid-Schiff. A pathologist blinded to the treatment groups assessed all sections following the Banff criteria [16].

Immunohistochemistry

Representative tissue sections were immunoperoxidase-stained for CD40 and C4d and immunofluorescence-stained for C3, IgG, TLR4, fibronectin and ColIV in paraffin-embedded sections as detailed in Supplementary material S1. C3 and IgG were directly observed under fluorescence light microscopy. Positive C4d, C3 and IgG samples were semiquantitatively scored from 0 to 4+. CD40 immunostaining was only utilized to localize the CD40 protein expression.

ColIV fluorescence was examined with confocal microscopy (Leica TCS-SL spectral) and quantified with the AnalySIS® software (Soft Imaging System). At least 10 glomeruli were measured in each specimen (See details in figure legends).

Quantification of circulating donor-specific antibodies

The presence of circulating donor-specific antibodies (DSA) Class I and Class II were quantified as described in Supplementary material S2. A fluorescence increase of 15% with respect to the negative control was considered as positive. Results were expressed as percentage of positive cells with respect to the total CD3+ spleen cells.

Quantification of plasmatic cytokines

For the quantitative measurement of interferon (INF)- γ , interleukin (IL)-2, IL-4 and IL-10 in rat plasma, the SearchLight® Rat Cytokine/Chemokine Array and SuperSignal® ELISA Femo Chemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology Inc.) were used following the manufacturer's instructions. The protein quantification is made by an enzyme-substrate reaction that produces a luminescent signal. This signal is proportional to the amount of each cytokine in the original sample and is detected with a cooled CCD camera. Results are expressed in pg/mL.

Western blot (WB)

To detect CD40 protein in kidney grafts, WB was performed incubating membranes with 1:50 anti-CD40 antibody (see details in Supplementary material S3). Control non-transplanted kidneys were used to normalize results. The membranes were exposed for 1 min to reveal the spots. The intensity of every spot was quantified on scanned films with the Quantity One quantification software (Biorad). Since WB was used as estimation, results were only normalized by the mean value of control non-transplanted kidney spots.

Quantification of gene expression in renal grafts

Total RNA was extracted and reverse transcribed to complementary DNA (cDNA). Tissue cDNA for CD40 (Table 1), HIF-1 α , prolyl-4-hydroxylase (P4H)- $\alpha 2$, heat shock protein (HSP70), fibronectin, tumour growth factor- β (TGF- β), IL-12p40, tumour necrosis factor (TNF)- α , INF- γ , TLR4, MyD88 and 18S was amplified and quantified by real-time polymerase chain reaction as previously described [14] and detailed in Supplementary material S4. Pooled values of healthy non-transplanted kidneys were used as the reference value. Results were expressed as 'many fold of the unknown sample' with respect to the reference value (arbitrary units).

Statistical analysis

Overall survival was analysed using the Kaplan–Meier and log-rank methods. sCr differences at any time point, DSA, gene expression and plasma proteins were analysed by analysis of variance and subsequent Scheffe's test. For histological comparison of Banff classification, IgG, C3 and C4d deposits, chi-square P-value was calculated from the contingency table. Values of $P < 0.05$ were considered as statistically significant. Data are presented as mean \pm SEM.

Results

A model of antibody-mediated humoral acute rejection (AbAR)

As we previously showed [13], survival and renal function differed between syngeneic non-rejecting (WA/WA and

Deterioration of the GFB in renal transplantation

3

CI-WA/WA) and allogeneic rejecting groups (BN/WA and CI-BN/WA). While CI did not modify survival in syngeneic conditions, it increased mortality when added to a strong allogeneic background (Supplementary material S5). In this line, severe renal insufficiency developed from the 5th post-transplant day in rejecting groups, while serum creatinine in WA/WA and CI-WA/WA animals recovered

pre-transplant baseline values (sCr = 53 ± 9 μmol/L) (Table 2).

Conventional histology showed well-preserved renal architecture in all WA/WA kidneys and only moderate tubulointerstitial damage in CI-WA/WA animals. The BN/WA kidneys showed characteristic features of cellular vascular rejection. CI-BN/WA kidneys displayed clear

Table 1. Rat CD40 oligonucleotides^a

Rat CD40 oligonucleotide	Fluorescent reporter and quencher dyes	Sequence
Forward primer	FAM	5'-CCGGGAAACCGACTAGTTAGC-3'
Reverse primer	FAM	5'-CGGTTGGCATTGGGCTTCT-3'
Probe	NFQ	5'-CACTGCACAGCTCTTG-3'

^aThe primers and probe to detect the target sequence of rat CD40 (Gene Bank: AF241231.2) were designed with the File Builder software (Applied Biosystems).

Table 2. Determined parameters^a

	WA/WA	CI-WA/WA	BN/WA	CI-BN/WA
Renal function and survival				
sCr1	137 ± 33 ₍₁₀₎	233 ± 21 ₍₁₂₎	168 ± 33 ₍₁₄₎	223 ± 28 ₍₁₀₎
sCr3	127 ± 50 ₍₁₀₎	244 ± 52 ₍₁₂₎	142 ± 58 ₍₁₂₎	246 ± 100 ₍₇₎
sCr5	91 ± 28 ₍₁₀₎	119 ± 39 ₍₁₂₎	139 ± 13 ₍₁₂₎	121 ± 15 ₍₅₎
sCr7	62 ± 3 ₍₁₀₎	68 ± 4 ₍₁₂₎	440 ± 44 ₍₁₂₎	456 ± 79 ₍₅₎
sCr9	NA	NA	669 ± 68 ₍₉₎	697 ± 0 ₍₂₎
MST	NA	NA	8.6 ± 0.9 ^{b,c}	5.8 ± 1.3 ^{b,c,d}
Surv d7	100%	100%	85% ^{b,c}	50% ^{b,c}
AbAR markers				
C4d+/n	2/10	10/12 ^b	14/14 ^b	10/10 ^b
IgG+/n	0/9	5/10 ^b	10/12 ^b	6/6 ^{b,d}
C3+/n	0/9	2/10	11/14 ^b	9/9 ^{b,c}
DSA+/n	0/4	0/7	7/7 ^{b,c}	6/6 ^{b,c}
%DSA-I	0.05 ± 0.07	0.19 ± 0.11	98.5 ± 1.2 ^{b,c}	79.4 ± 2.3 ^{b,c}
%DSA-II	0.10 ± 0.17	0.03 ± 0.13	92.4 ± 9.3 ^{b,c}	89.7 ± 15.6 ^{b,c}
hum/cell/n	0/0/10	3/0/12	11/1/14 ^{b,c}	10/0/10 ^{b,c}
CI-induced ColIV synthesis				
HIF1α	1.49 ± 0.40	1.68 ± 0.50	2.77 ± 0.36	3.96 ± 0.86 ^{b,c}
P4Hα2	1.57 ± 0.34	1.40 ± 0.53	2.94 ± 0.74	6.52 ± 1.34 ^{b,c,d}
Innate response related				
Fibronectin	1.75 ± 0.61	2.89 ± 0.53	3.01 ± 0.55	14.22 ± 7.06 ^{b,c,d}
HSP70	0.18 ± 0.05	0.27 ± 0.05	0.18 ± 0.04	0.54 ± 0.28 ^{b,d}
TLR4	0.32 ± 0.1	1.56 ± 0.1 [*]	32.2 ± 17.4	1846 ± 794 ^{b,c,d}
MyD88	0.15 ± 0.05	0.37 ± 0.18	2.67 ± 1.15	111 ± 47 ^{b,c,d}
Cytokines				
IL12p40	3.5 ± 1.1	3.3 ± 1.2	0.78 ± 0.4	0.82 ± 0.3
TGFβ	0.8 ± 0.3	0.5 ± 0.1	11.1 ± 2.6 ^{b,c}	14.4 ± 3.4 ^{b,c}
IL10	4.3 ± 0.5	3.8 ± 0.4	13.7 ± 1.5 ^{b,c}	11.8 ± 1.5 ^{b,c}

^aSurvival and renal function: (n) indicates the number of surviving rats at each time point. Serum creatinine (sCr) is expressed in μmol/L. Syngeneic rats with and without CI were sacrificed at day 7 after transplantation in order to compare their grafts with those in allogeneic groups. For the statistical analysis, the mean survival time (MST, days) of these groups was estimated from our previous experience in 100 days. Antibody-mediated acute rejection: 'n' indicates the number of assessed samples for each parameter in each group. DSA+ (both Class I and Class II) was determined on recipient (Wistar-Agouti) serum samples incubated with donor (Brown Norway) spleen cells and measured by flow cytometry. Donor splenocytes were isolated by Ficol® density gradient and used when fresh. Different controls were added: serum from non-transplanted WA rats as naive; serum from a transplanted WA rat with high anti-HLA antibody titre as positive and splenocytes from Lewis rats as negative. Serum from non-transplanted WA rats did not present preformed DSA against BN splenocytes. From the histological examination and humoral markers determined, rejecting grafts were classified as humoral AbAR (hum) or cellular (cell), and they are shown with respect to the total number of samples in each group. Gene expression of CI- and innate immunity-related mediators: mRNA (fold/not transplanted kidneys) is expressed as mean ± SEM. Cytokines: the mRNA of IL12p40 and TGF-β was quantified by quantitative real-time polymerase chain reaction (fold/non-transplanted kidneys). Protein levels of IL-10 were quantified in plasma samples and expressed as pg/mL. NA, not applicable.

^bP_{ANOVA} < 0.05 versus WA/WA.

^cP_{ANOVA} < 0.05 versus CI-WA/WA.

^dP_{ANOVA} < 0.05 versus BN/WA.

^{*}P_{t-test} < 0.05 versus WA/WA.

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

4

È. Ripoll *et al.*

ischaemic tubulointerstitial damage and early vascular rejection with swollen endothelial cells and/or extensive areas of total endothelial denudation, suggesting humoral acute rejection (Figure 1).

The C4d and IgG deposits within peritubular capillaries significantly increased in response to CI in syngeneic rats. In the allogeneic combination, both the complement and especially the IgG deposits were augmented by CI. Ischaemia influenced the intragraft deposition of C4d and IgG but did not affect the incidence of DSA, which seems to depend on the allogeneic milieu. DSA were present in all the allografted animals but absent in the isografted rats. Some DSA + BN/WA animals did not show histological features of humoral rejection. However, all CI-BN/WA grafts were DSA+ and displayed histological humoral rejection. Thus, the Banff classification resulted in significant differences between allogeneic and syngeneic groups, corroborating the AbAR pattern of the model (Table 2).

Activation of innate and adaptive immunity

To consider the innate immune response, we quantified the gene expression of TLR4 and MyD88 as well as the endogenous triggering factors HSP70 and fibronectin. Both HSP70 and fibronectin were up-regulated in the CI-BN/WA grafts with a trend towards an increase in HSP70 under the sole influence of CI. Accordingly, the maximum values of TLR4 and MyD88 were found in those kidneys, in which both immune and non-immune factors showed a synergistic effect on the innate response activation (Table 2).

The confocal evaluation of TLR4 and fibronectin immunostaining showed a clear colocalization of both proteins within the glomeruli of cold ischaemic grafts either at 1 or 24 weeks. In addition, there is a clear mark of TLR4 on the surface of infiltrated inflammatory cells (Figure 2 and Supplementary material S6). With respect to the cytokines involved in the immune-inflammatory reaction, both TNF- α

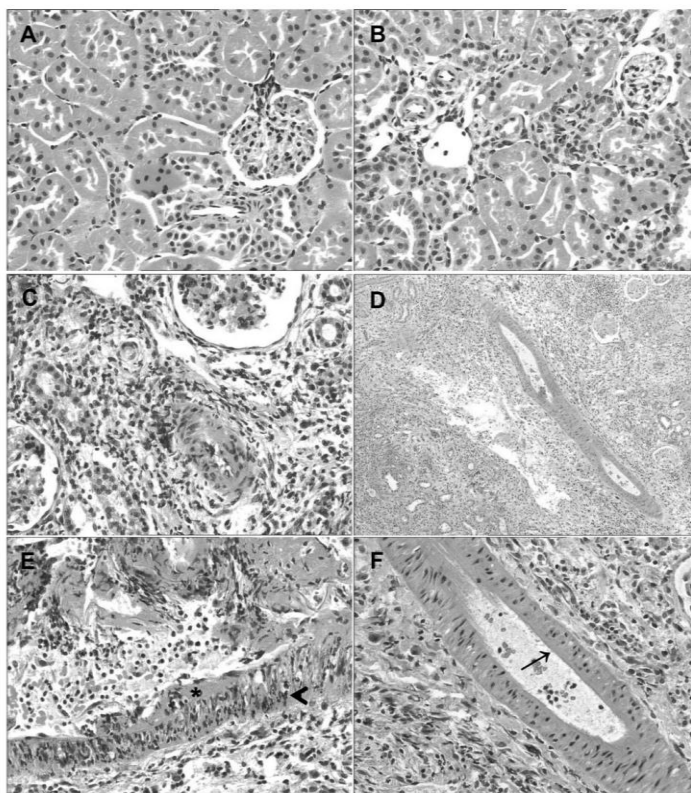


Fig. 1. Haematoxylin and eosin representative photomicrographs. (A) WA/WA ($\times 200$), (B) CI-WA/WA ($\times 200$), (C) BN/WA ($\times 200$), (D) CI-BN/WA ($\times 200$). Details ($\times 400$) of fibrinoid necrosis (asterisk) and apoptotic nuclei remain (arrowhead) in the vessel wall of BN/WA (E) and denuded endothelium (arrow) in the vessel wall of CI-BN/WA (F).

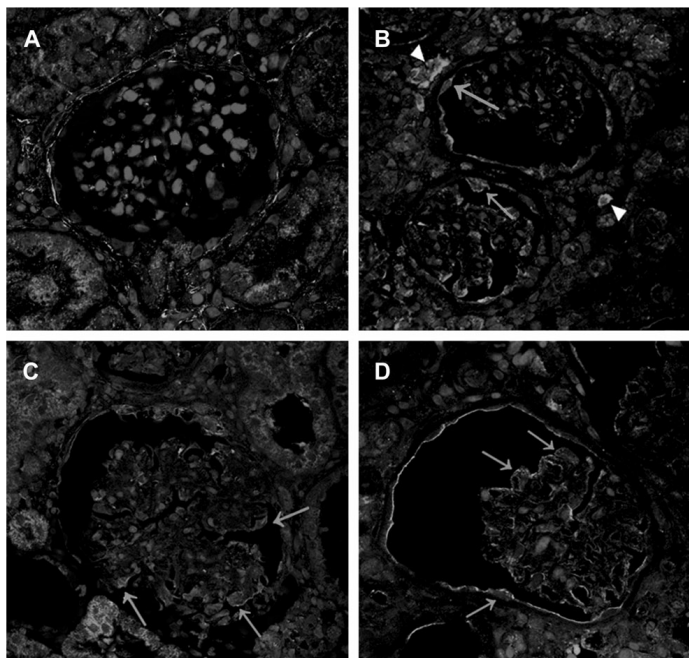


Fig. 2. Fibronectin and TLR4 colocalization. Confocal photomicrographs ($\times 630$) of fibronectin (green), TLR4 (red) and nuclei (blue) in samples of the acute [(A) WA/WA, (B) CI-WA/WA] and chronic models [(C) Syn1, (D) Allo1]. Within the glomerulus of syngeneic animals, TLR4 was scarcely expressed in the epithelial cells of the Bowman's capsule (A). Contrarily, in cold ischaemic kidneys, TLR4 was expressed in glomerular cells of the capillary tuft (podocytes, mesangial and even endothelial cells) and in the epithelial cells of the Bowman's capsule where it clearly colocalizes with fibronectin (arrows in B to D). Some of these epithelial cells seem to express additional fibronectin as it is notably seen in D, where it forms an extra line surrounding the Bowman's capsule by its urinary space. In addition, TLR4 is also specifically expressed by infiltrated inflammatory cells (arrow heads in B). Other representative images can be seen in Supplementary material S6.

and especially $\text{INF-}\gamma$ messenger RNA (mRNA) were significantly elevated in the BN/WA and CI-BN/WA groups (results not shown). Interestingly, these rejecting groups also displayed high levels of $\text{TGF-}\beta$ and low expression of IL12p40 . The plasmatic protein levels of IL-10 showed a significant increase in both rejecting groups (Table 2), but there were no significant differences between plasmatic levels of $\text{INF-}\gamma$, IL-2 and IL-4 (results not shown).

To assess the activation of the CD40 costimulatory pathway, we evaluated its mRNA and protein expression in tissue grafts. Immunohistochemistry located CD40 in tubular epithelial cells in all samples. In rejecting BN/WA and CI-BN/WA kidneys, it was also found in glomerular and wall vascular cells. The WB analysis showed larger spots in both BN/WA and CI-BN/WA samples while WA/WA and CI-WA/WA marks were similar to control non-transplanted kidneys. As corroborated by CD40 gene expression, allorecognition as the main factor over-expressing CD40 and CI did not further enhance it. However, CI increased CD40 expression under syngeneic conditions (Figure 3). Finally, there was a positive

correlation between CD40 mRNA and both DSA-I and -II (Supplementary material S7).

Alteration of the GFB

We assessed the possible alteration of the GFB, focussing on the changes in CollIV deposition in the CapBM. Since CollIV isoforms are different in the BowBM, we also assessed deposition there. To consider the role of CI on CollIV changes, we studied the HIF-P4H axis as well.

The CollIV deposition in the BowBM showed a non-significant trend towards thinning with ischaemia and allogenicity. In contrast, the CapBM became significantly thicker with ischaemia, especially in the CI-BN/WA grafts (Figure 4). In addition, the higher gene expression of HIF- 1α and P4H- $\alpha 2$ in those grafts confirmed the relationship between ischaemia and CollIV synthesis (Table 2).

We also assessed the CollIV in equivalent groups from a previous chronic study made with the well-known Fischer-to-Lewis model followed up for 24 weeks in which, except for the syngeneic non-ischaemic group (Syn), all the

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

6

È. Ripoll *et al.*

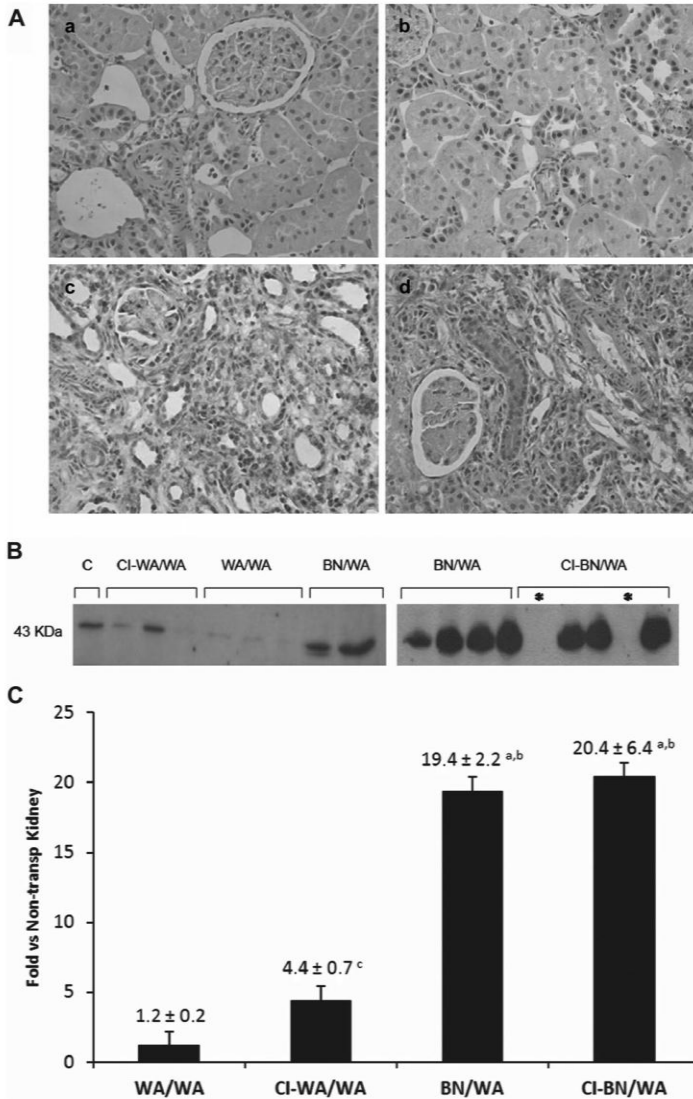


Fig. 3. CD40 analysis. (A) Immunohistochemistry. Representative photomicrographs ($\times 200$) of each group; (a) WA/WA, (b) CI-WA/WA, (c) BN/WA, (d) CI-BN/WA. (B) WB. Representative spots of samples and control non-transplanted kidney. Asterisks correspond to post-mortem graft samples. CD40 spots appeared between Bands 5 and 6 of the protein ladder, corresponding to 43 kDa. The estimated quantification of spots was made by Quantity One quantification software (Biorad). The absolute intensity values for each spot were normalized with respect to the mean value of control non-transplanted spots. Results were expressed as the normalized mean intensity value \pm SEM: $1.13 \pm 0.12_{WA/WA}$; $0.93 \pm 0.02_{CI-WA/WA}$; $1.77 \pm 0.07^{ab}_{BN/WA}$; $1.94 \pm 0.10^{ab}_{CI-BN/WA}$; $^a P_{ANOVA} < 0.05$ versus WA/WA, $^b P_{ANOVA} < 0.05$ versus CI-WA/WA. (C) Gene expression. The graft CD40 mRNA was quantified by quantitative real-time polymerase chain reaction. Results (fold/non-transplanted kidneys) are expressed as mean \pm SEM. $^a P_{ANOVA} < 0.05$ versus WA/WA, $^b P_{ANOVA} < 0.05$ versus CI-WA/WA. $^c P_{t-test} < 0.05$ versus WA/WA.

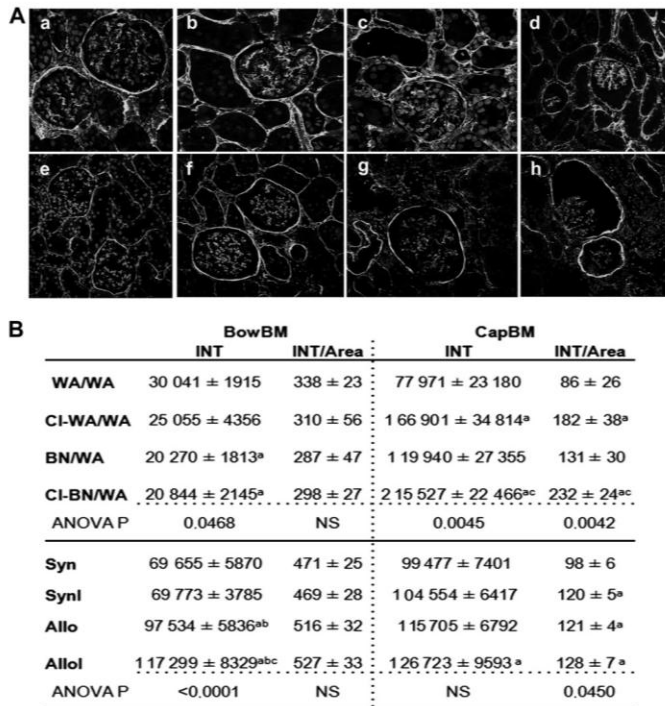


Fig. 4. Collagen IV deposition in basal membranes. (A) Confocal photomicrographs ($\times 400$) of collagen IV (green) and iodine propide (red) in samples of the acute (a to d) and chronic (e to h) models. (a) WA/WA, (b) CI-WA/WA, (c) BN/WA, (d) CI-BN/WA, (e) Syn, (f) SynI, (g) Allo, (h) AlloI. (B) Image analysis of the basal membranes of the Bowman's capsule (BowBM) and capillary tuft (CapBM). ColIV fluorescence was quantified with the AnalysisIS® software. To ensure that differences observed in levels of fluorescence intensity could not be attributed to changes in the sensitivity of detectors, the confocal parameters were kept constant throughout all measurements (pinhole, gains and offset values). On $\times 400$ photomicrographs, the perimeter of each glomerulus and its capillary tuft were manually delineated in each sample and areas were calculated (mm^2). Ten to 15 glomeruli were measured in each specimen. The ColIV fluorescent intensity was normalized to the background intensity of each sample. The normalized intensities within each area were obtained (INT) and expressed in arbitrary units. To compare between distinct glomeruli, the intensity was normalized with respect to the glomerular area (INT/area) and expressed in arbitrary units as mean \pm SEM. ^a $P < 0.05_{\text{ANOVA}}$ versus WA/WA, ^b $P < 0.05_{\text{ANOVA}}$ versus CI-WA/WA, ^c $P < 0.05_{\text{ANOVA}}$ versus BN/WA.

animals (SynI, Allo and AlloI) displayed progressive proteinuria and different degrees of TGP (14 and Supplementary material S8). In both chronically rejected groups Allo and AlloI, disruptions and double contours were observed at high resolution in the GBM. The examination of those samples from the chronic model revealed that both CI and alloreactivity induced a similar degree of ColIV accumulation within the CapBM, thickening the GFB (Figure 4).

Discussion

Little is known about the exact mechanisms by which ischaemia accelerates acute rejection and aggravates late graft outcome. The activation of innate immunity has been

suggested as one of the possible mechanisms [17–20]. Here, we provide more evidence in that direction and point to the deterioration of the GFB as another possible mechanism.

Goldstein [21] postulated that the acute antigen-independent injury that occurs during organ transplantation releases innate immune ligands, the nature of which remains to be elucidated. Our results confirm prior data reporting HSP70 and fibronectin as being among these released TLR4 ligands. Following stress, the HSP70 could act as an endogenous 'danger signal' [22] and interact with TLR4 to stimulate inflammatory cytokine production [19, 23–25]. Cellular fibronectin, produced in response to tissue injury and implicated in inflammation-associated tissue remodeling, also binds to TLR4 [26] as showed here for the first

time within glomeruli of ischaemic grafts. TLR4 and MyD88 are required for initiation of ischaemia/reperfusion injury and both increase in response to it [27, 28]. It has been said [29] that stimulation of TLRs might not be essential when sufficient antigen is present, as is the case in transplant. However, our results show that the TLR4/MyD88 pathway is over-activated only in ischaemic allografts, suggesting that even in a strong allogeneic context, the effect of CI on innate immunity may have more consequences than was originally thought.

One of the pathways activated by TLRs is the costimulatory signal. It is accepted that HSPs can interact with antigen-presenting cells through different putative receptors including CD40 [25]. Wang *et al.* [30] suggested that HSP70 induces the proliferation of memory T cells through the indirect regulation of CD40/CD40L expression in dendritic and T cells. Czapiga *et al.* [31] established a link between endogenous danger signals and acquired immune activation, pointing to CD40/CD40L as a bridge between alloantigen-independent injury and cell-mediated immune response. The nuclear staining of CD40 found in our grafts would reflect the previous binding of the CD40L to the CD40 receptor in the plasma membrane, which is required for CD40 accumulation in the nucleus [32, 33]. Other studies correlate TLRs with costimulatory signals [34, 35] connecting ischaemia/reperfusion injury with either CD40 [36] or TLR4 [28]. Ours is the first in which both CD40 and TLR4 are reported to be up-regulated in response to CI. However, in contrast to innate mediators, CI might not be decisive in CD40 expression when alloantigens are present.

Our results also demonstrate a positive correlation between CD40 mRNA and circulating DSA. This does not necessarily imply a cause-effect relationship. Rather, it may suggest a simple association between CD40 and the humoral AbAR pattern of the model.

The complement system, which plays a central role in the humoral response, is another regulator of innate immunity. Cross-talk between complement and TLR connects innate and adaptive responses [37]. The C3 fragment is also known to promote TH2 responses [38]. Accordingly, our rejected grafts displayed higher levels of IL-10 and TGF- β and a reduction in the pro-inflammatory TH1 subunit IL12p40, similar to what happens in liver dendritic cells following ischaemia [39]. At early post-transplant, TGF- β and IL-10 act as regulatory cytokines, reducing graft inflammation and subsequent IF/TA [40, 41].

The 'counter-regulation hypothesis' [42] states that continuous stimulation induces the production of 'anti-danger' signals, such as IL-10 and TGF- β . Rieger and Bar-Or [43] propose that memory B cells that integrate sufficiently strong stimulatory signals, such as combined engagement of TLR, B-cell receptor and CD40, produce IL-10 to down-regulate the local immune response. Thus, the gene expression profile of our ischaemic allografts, added to their circulating DSA and IL-10, would reflect a 'self-protecting response' designed to limit excessive tissue damage.

There is a proven relationship between DSA and TGP [44]. Both in patients and in the F344 to Lew model, Joosten *et al.* [45, 46] support the idea that it is mediated by humoral immune responses against GBM's components.

Other data related complement, antibody-mediated cell injury and CD40 with regulation of matrix metabolism and glomerular damage [38, 44, 47, 48]. Given the convergence of these factors in our allografts, it seemed interesting to hypothesize that their GFB might be damaged. We found that CI increased ColIV in the CapBM. This is in agreement with other studies, in which thickened BM was described following acute renal damage. In human renal graft biopsies, Utsumi *et al.* [49] found increased ColIV in BM, suggesting that changes in ColIV during acute rejection were also due to ischaemic damage and might be a defence mechanism to protect the kidney from the immune attack. Moreover, they suggested that such changes still remain after graft function recovery. Wieczorek *et al.* [50] showed progressive synthesis of collagens in the evolution from acute to chronic rejection. In this line, ColIV was also increased here in chronically rejected grafts, linking proteinuria [14] with the alteration of the CapBM. De Heer *et al.* [51] have already shown the presence of anti-GBM antibodies in the same F344 to Lew model of chronic allograft nephropathy. Taking into account that the F344-to-Lew model is highly reproducible, one can assume the presence of such circulating anti-GBM antibodies in our chronically followed animals. Ivanyi *et al.* [52], in chronic renal allografts, reported thickening of the glomerular capillaries related with antigen-independent factors. Here, the influence of CI *per se* on the CapBM thickening was supported by the ColIV increase in CI-WA/WA and SynI grafts. The up-regulation of HIF-1 α and P4H- α 2 in CI-BN/WA kidneys confirms the impact of ischaemia in the allograft synthesis of ColIV. The P4H is a critical enzyme for the stabilization of collagen chains [53]. Exposure to hypoxia increases the P4H gene through HIF, enhancing the formation of 4-hydroxyproline, and thereby increasing the ColIV protein levels [53]. In glomerular capillaries, the endothelial and the epithelial ColIV isoforms are in close contact [12, 54]. Because the endothelial isoform is more prone to proteolysis [12], the endothelial-rich BM (such as that of cerebral microvessels [55] or BowBM) becomes softer under the metalloproteases (MMP) attack [56]. In contrast, thickening of CapBM results from the accumulation of ColIV promoted by CI directly through HIF and P4H. It is also possible that ColIV is indirectly increased here by tissue repair. Since ColIV accumulation in basal lamina is sufficient to stimulate the restoration of injured cells [57], and, together with fibronectin, it is up-regulated after injury and localized to the regenerating cells [58], the elevated fibronectin and ColIV found here may well be a marker of damage/repair. Moreover, this tissue damage/repair cycle would be consistent with the 'self-protecting response' exhibited by ischaemic allografts.

Our results point to CI as causative agent of ColIV deposition in the CapBM. It activates innate immunity and up-regulates CD40. The inflammatory mediators thus induced are further amplified by the subsequent adaptive response. Increase in many of these mediators could be an attempt at self-protection as a reaction to cell damage, but it may also be its cause, perpetuating a cycle of self-damage/repair that would eventually lead to late allograft dysfunction. In chronically rejected allografts, thickened CapBM could be a consequence of an unresolved initial immune-inflammatory response.

Deterioration of the GFB in renal transplantation

Supplementary data

Supplementary data are available online at the NDT website. Colour versions of Figures 1–4 are available online as supplementary data.

Acknowledgements. We thank the Serveis Científico-Tècnics (UB, Bellvitge) and David Ramos (Morphological Analysis Unit, CBATEG, UAB) for technical support.

Conflict of interest statement. E.R. is the recipient of a fellowship from IDIBELL. I.H.-F. is a researcher from 'Programa Estabilización Investigadores' financed by ISCIII and Departament de Salut Generalitat Catalunya. This work was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III/FIS (PI03/0082, FIS06/0630 and PS09/00107).

References

- Paul LC. Chronic allograft nephropathy: an update. *Kidney Int* 1999; 56: 783–793
- Kouwenhoven EA, de Bruin RW, Bajema IM *et al*. Cold ischemia augments allogeneic-mediated injury in rat kidney allografts. *Kidney Int* 2001; 59: 1142–1148
- Land WG. The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation. *Transplantation* 2005; 79: 505–514
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17: 1–14
- Alegre ML, Leemans J, Le Moine A *et al*. The multiple facets of toll-like receptors in transplantation biology. *Transplantation* 2008; 86: 1–9
- Mikhalski D, Wissing KM, Ghisidali L *et al*. Cold ischemia is a major determinant of acute rejection and renal graft survival in the modern era of immunosuppression. *Transplantation* 2008; 85 (7 Suppl): S3–S9
- Jarad G, Miner JH. Update on the glomerular filtration barrier. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009; 18: 226–232
- Miner JH, Sanes JR. Collagen IV alpha 3, alpha 4, and alpha 5 chains in rodent basal laminae: sequence, distribution, association with laminins, and developmental switches. *J Cell Biol* 1994; 127: 879–891
- Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG. Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech* 2008; 71: 357–370
- Revert F, Merino R, Monteagudo C *et al*. Increased Goodpasture antigen-binding protein expression induces type IV collagen disorganization and deposit of immunoglobulin A in glomerular basement membrane. *Am J Pathol* 2007; 171: 1419–1430
- Hudson BG, Reeders ST, Tryggvason K. Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J Biol Chem* 1993; 268: 26033–26036
- Heidet L, Cai Y, Guicharnaud L *et al*. Glomerular expression of type IV collagen chains in normal and X-linked Alport syndrome kidneys. *Am J Pathol* 2000; 156: 1901–1910
- Herrero-Fresneda I, Franquesa M, Torras J *et al*. Role of cold ischemia in acute rejection: characterization of a humoral-like acute rejection in experimental renal transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 3712–3715
- Herrero-Fresneda I, Torras J, Cruzado JM *et al*. Do alloreactivity and prolonged cold ischemia cause different elementary lesions in chronic allograft nephropathy? *Am J Pathol* 2003; 162: 127–137
- Herrero-Fresneda I, Torras J, Vidal A *et al*. Reduction of postischemic immune inflammatory response: an effective strategy for attenuating chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2005; 79: 165–173
- Racusen LC, Colvin RB, Solez K *et al*. Antibody-mediated rejection criteria—an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2003; 3: 708–714
- Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 114–119
- Kim BS, Lim SW, Li C *et al*. Ischemia-reperfusion injury activates innate immunity in rat kidneys. *Transplantation* 2005; 79: 1370–1377
- Andrade CF, Waddell TK, Keshavjee S *et al*. Innate immunity and organ transplantation: the potential role of toll-like receptors. *Am J Transplant* 2005; 5: 969–975
- Fletcher JT, Nankivell BJ, Alexander SI. Chronic allograft nephropathy. *Pediatr Nephrol* 2009; 24: 1465–1471
- Goldstein DR. Toll like receptors and acute allograft rejection. *Transpl Immunol* 2006; 17: 11–15
- Chen T, Cao X. Stress for maintaining memory: HSP70 as a mobile messenger for innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol* 2010; 40: 1541–1544
- Dybdahl B, Wahba A, Lien E *et al*. Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation* 2002; 105: 685–690
- Andrade CF, Kaneda H, Der S *et al*. Toll-like receptor and cytokine gene expression in the early phase of human lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25: 1317–1323
- Joly AL, Wettstein G, Mignot G *et al*. Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *J Innate Immun* 2010; 2: 238–247
- Okamura Y, Watari M, Jerud ES *et al*. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001; 276: 10229–10233
- Pulsikens WP, Teske GJ, Butter LM *et al*. Toll-like receptor-4 coordinates the innate immune response of the kidney to renal ischemia/reperfusion injury. *PLoS One* 2008; 3: e3596
- Wu H, Chen G, Wyburn KR *et al*. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2007; 117: 2847–2859
- Samstein B, Johnson GB, Platt JL. Toll-like receptor-4 and allograft responses. *Transplantation* 2004; 77: 475–477
- Wang Y, Seidl T, Whittall T *et al*. Stress-activated dendritic cells interact with CD4+ T cells to elicit homeostatic memory. *Eur J Immunol* 2010; 40: 1628–1638
- Czapiga M, Kirk AD, Lektrom-Himes J. Platelets deliver costimulatory signals to antigen-presenting cells: a potential bridge between injury and immune activation. *Exp Hematol* 2004; 32: 135–139
- Lin-Lee YC, Pham LV, Tamayo AT *et al*. Nuclear localization in the biology of the CD40 receptor in normal and neoplastic human B lymphocytes. *J Biol Chem* 2006; 281: 18878–18887
- Zhou HJ, Pham LV, Tamayo AT *et al*. Nuclear CD40 interacts with c-Rel and enhances proliferation in aggressive B-cell lymphoma. *Blood* 2007; 110: 2121–2127
- Reiser J, von Gersdorff G, Loos M *et al*. Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 2004; 113: 1390–1397
- Hummel M, Kurian SM, Lin S *et al*. Intra-graft TNF receptor signaling contributes to activation of innate and adaptive immunity in a renal allograft model. *Transplantation* 2009; 87: 178–188
- Shen X, Wang Y, Gao F *et al*. CD4 T cells promote tissue inflammation via CD40 signaling without de novo activation in a murine model of liver ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2009; 50: 1537–1546
- Hawlich H, Kohl J. Complement and Toll-like receptors: key regulators of adaptive immune responses. *Mol Immunol* 2006; 43: 13–21
- Boros P, Bromberg JS. New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant* 2006; 6: 652–658
- Loi P, Paulart F, Pajak B *et al*. The fate of dendritic cells in a mouse model of liver ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc* 2004; 36: 1275–1279
- Guan Q, Nguan CY, Du C. Expression of transforming growth factor-beta1 limits renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2010; 89: 1320–1327
- Khan F, Sar A, Gonul I *et al*. Graft inflammation and histologic indicators of kidney chronic allograft failure: low-expressing interleukin-10 genotypes cannot be ignored. *Transplantation* 2010; 90: 630–638

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

10

È. Ripoll *et al.*

42. Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 69–75
43. Rieger A, Bar-Or A. B-cell-derived interleukin-10 in autoimmune disease: regulating the regulators. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 486–487
44. Fotheringham J, Angel CA, McKane W. Transplant glomerulopathy: morphology, associations and mechanism. *Nephron Clin Pract* 2009; 113: c1–c7. discussion c7
45. Joosten SA, van Dixhoorn MG, Borrias MC *et al.* Antibody response against perlecan and collagen types IV and VI in chronic renal allograft rejection in the rat. *Am J Pathol* 2002; 160: 1301–1310
46. Joosten SA, Sijpkens YW, van Kooten C *et al.* Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations. *Kidney Int* 2005; 68: 1–13
47. Abbate M, Zoja C, Corna D *et al.* Complement-mediated dysfunction of glomerular filtration barrier accelerates progressive renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 1158–1167
48. Shimizu A, Yamada K, Sachs DH *et al.* Mechanisms of chronic renal allograft rejection. II. Progressive allograft glomerulopathy in miniature swine. *Lab Invest* 2002; 82: 673–686
49. Utsami K, Shimizu A, Yamato M *et al.* Alteration of collagen IV in acutely deteriorated renal allografts. *Transplantation* 2001; 71: 1757–1765
50. Wieczorek G, Bigaud M, Menninger K *et al.* Acute and chronic vascular rejection in nonhuman primate kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 1285–1296
51. de Heer E, Davidoff A, van der Wal A *et al.* Chronic renal allograft rejection in the rat. Transplantation-induced antibodies against basement membrane antigens. *Lab Invest* 1994; 70: 494–502
52. Ivanyi B, Kemeny E, Szederkenyi E *et al.* The value of electron microscopy in the diagnosis of chronic renal allograft rejection. *Mod Pathol* 2001; 14: 1200–1208
53. Takahashi Y, Takahashi S, Shiga Y *et al.* Hypoxic induction of prolyl 4-hydroxylase alpha (I) in cultured cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 14139–14146
54. Harvey SJ, Zheng K, Sado Y *et al.* Role of distinct type IV collagen networks in glomerular development and function. *Kidney Int* 1998; 54: 1857–1866
55. Urabe N, Naito I, Saito K *et al.* Basement membrane type IV collagen molecules in the choroid plexus, pia mater and capillaries in the mouse brain. *Arch Histol Cytol* 2002; 65: 133–143
56. Hamann GF, Okada Y, Fitridge R *et al.* Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 1995; 26: 2120–2126
57. Nony PA, Schnellmann RG. Mechanisms of renal cell repair and regeneration after acute renal failure. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304: 905–912
58. Basile DP, Martin DR, Hammerman MR. Extracellular matrix-related genes in kidney after ischemic injury: potential role for TGF-beta in repair. *Am J Physiol* 1998; 275(6 Pt 2):F894–F903

Received for publication: 1.3.11; Accepted in revised form: 2.1.12

MATERIAL SUPLEMETARI

Figura S5

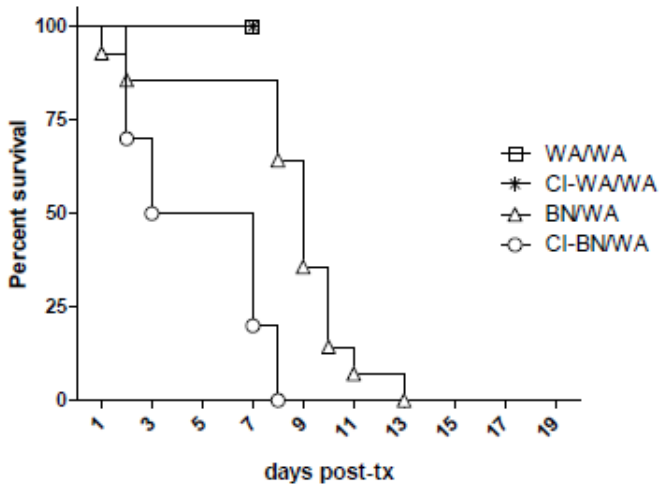
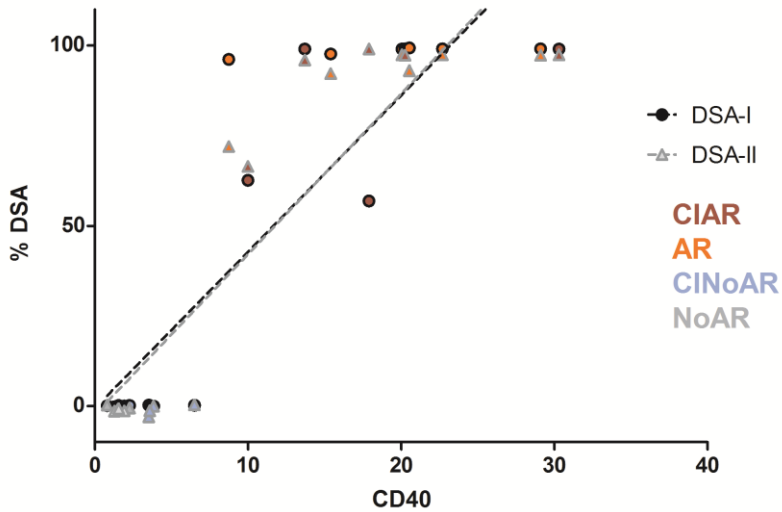


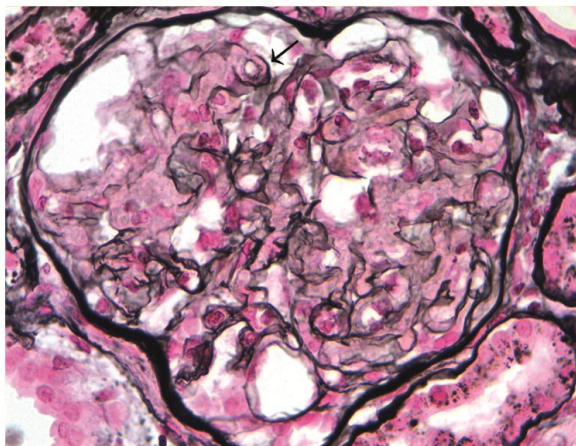
Figura S7



Correlation	DSA-I	DSA-II
P value (two-tailed)	< 0,0001	< 0,0001
R square	0,7695	0,8183

Figura S8

Transplant Glomerulopathy (TGP) at 24w in the CAN model



Representative photomicrograph (Methenamine silver PAS stain, x630) of an allogeneic ischemic (AlloI) kidney at 24 weeks showing characteristic histological lesions of transplant glomerulopathy: endocapillary hypercellularity and segmentary double contours of the glomerular basement membrane (arrow).

ARTICLE 2

**In vivo therapeutic efficacy of intra-renal
CD40 silencing in a model of humoral
acute rejection**

E. Ripoll, R. Pluvinet, J. Torras, R. Olivar, A. Vidal, M.
Franquesa, L. Cassis, JM. Cruzado, O. Bestard, JM. Grinyó, JM.
Aran, I. Herrero-Fresneda

Gene Ther. 2011 Oct;18(10):945-52. doi: 10.1038/gt.2011.39. Epub
2011 Apr 7.

Article 2: In vivo therapeutic efficacy of intra-renal CD40 silencing in a model of humoral acute rejection. Gene Therapy 2011 Oct; 18(10): 945-52.

Objectius:

Tenint en compte l'experiència anterior del grup en el disseny del siRNA anti CD40 humà, i el paper del senyal de coestimulació CD40 en l'activació de la resposta immune; l'objectiu principal d'aquest treball és dissenyar un siRNA anti CD40 de rata, i provar la seva eficàcia per prevenir el rebuig i augmentar la supervivència de l'empelt, en un model de trasplantament renal de rata amb rebuig agut humoral.

Inicialment es va dissenyar un estudi *in vitro* per seleccionar el siRNA més eficient dels possibles siRNAs dissenyats. A l'estudi de trasplantament el model de rebuig agut humoral es va fer amb una combinació de rates Brown Norway com a donants i rates Wistar Agouti com a receptores. Es van fer diferents grups de tractament, NoTreat: grup tractat amb 30µg siRNA scrambled com a control, Rp: grup tractat amb rapamicina 05 mg/kg durant els 15 primers dies després del trasplantament, SiCD40: grup tractat amb 30µg siRNA anti CD40, siCD40-Rp: grup de combinació del dos tractaments. El siRNA es va administrar localment acomplexat amb un vector, intra-arterialment al ronyó, prèviament extret de l'animal donant i rentat, i seguit de la electroporació de l'òrgan.

Resultats:

Selecció i caracterització dels siRNAs anti CD40 de rata.

Es van dissenyar i sintetitzar nou siRNAs que tenien com a diana diferents posicions de la regió codificant de la molècula mRNA de CD40 de rata (Taula1). La seva eficàcia es va provar en cèl·lules HEK-293 amb el sistema Gene Eraser TM Luciferase Suppression-Test. Es va transfectar un constructe de

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflammatòria en models animals.

la fusió entre el siRNA CD40 i la luciferasa. L'activitat luciferasa es va determinar dos dies després de la transfecció (Figura 1).

Cinc dels siRNAs eren eficaços en inhibir l'expressió de CD40, l'activitat més eficaç la van assolir els TNFRSF5-1 i TNFRSF5-2 amb un 82-84 % d'inhibició. Es va escollir el siRNA TNFRSF5-2 com a futur candidat pels futurs estudis i es va anomenar siCD40.

Efectes del silenciament de CD40 en la supervivència i funció renal.

Els animals no tractats van desenvolupar insuficiència renal severa després de 5 dies post transplantament i amb una supervivència mitja de entre 7 i 9 dies. El tractament amb 0.5 mg/Kg/dia de rapamicina no va evitar la insuficiència renal ni millorar la supervivència (Figura 2). Hi va haver set rates que van tenir una supervivència elevada, aquestes pertanyien al grup tractat amb siCD40. Cinc d'aquestes van tenir una insuficiència renal estable durant l'estudi (sCr al voltant de 250-300 $\mu\text{mol/L}$), les altres dues van assolir una supervivència indefinida amb una funció renal estable al llarg de l'estudi (sCr100=69 i 130 $\mu\text{mol/L}$)

Efecte del silenciament de CD40 en el patró de rebuig.

La histologia dels animals no tractats mostra una afectació variable de dany tubulo-intersticial, edema perivascular, hemorràgia, necrosis fibrinoide, tant a la paret dels vasos com al glomèrul, denudació endotelial i infiltrat majoritàriament compost per polimorfonuclears i limfòcits. Totes aquestes característiques indiquen un rebuig de tipus humoral (Figura 3A). Els animals tractats amb dosis sub-terapèutiques de rapamicina desenvolupen un patró de rebuig mixt, és a dir, tenen característiques tant de rebuig humoral com cel·lular, hi ha infiltració cel·lular a tot el parènquima renal, trobem cariorrexis i activació de l'endoteli (Figura 3B). Respecte els animals tractats amb siRNA anti CD40, un 12 % tenen característiques de rebuig humoral, un 49% tenen un patró de rebuig cel·lular (Figura 3C i D).

La majoria dels animals no tractats el seu empelt era positiu per C4d i IgG en

els capil·lars peritubulars, mentre que en els animals tractats amb siRNA CD40 es reduïa aquesta positivitat (Taula 2).

Els anticossos específics contra el donant (DSA) eren presents en un 83% dels animals no tractats, en canvi, el tractament amb rapamicina o siRNA CD40 redueix l'aparició dels anticossos, i el grup de doble tractament a part de reduir la presència també redueix la positivitat. (Taula 2)

Expressió local i sistèmica de CD40.

Tots els empelts renals presentaven un grau variable d'expressió de CD40, és present en cèl·lules tubulars epitelials (TECs), als vasos, a les cèl·lules musculars llises (SMCs) i al glomèrul. En els grups on CD40 és silenciada, l'expressió proteica desapareix en TECs, en glomèruls i vasos.

En els empelts renals d'animals no tractats s'observa una sobre expressió de CD40 unes 20 vegades superior respecte a empelts sans no trasplantats. La rapamicina redueix parcialment aquesta expressió. El silenciament de CD40 amb el siRNA provoca una reducció de l'expressió de CD40 semblant a valors d'empelts singènics (unes 3 vegades). El doble tractament amb siRNA CD40 i rapamicina no va provocar una reducció major de l'expressió (Taula 3).

Per avaluar altres efectes del silenciament local de CD40 a nivell sistèmic es va quantificar dins la població limfocitària de la melsa el percentatge de cèl·lules B (CD45 RA+) i l'expressió CD40. Els dos grups tractats amb siRNA CD40 tenen reduïda la població de cèl·lules B respecte als no tractats i un percentatge d'expressió de CD40 menor (Taula 2)

Expressió gènica renal de mediadors d'inflamació.

L'expressió gènica renal de TLR3, TLR4 i MyD88 està disminuïda en els grups tractats amb siRNA, particularment al grup de doble tractament respecte al grup no tractat, aquests resultats indiquen que el siRNA no activa la resposta innata. Les molècules reguladores de complement, CFI i CFH, també estan disminuïdes en tots els grups de tractament. En un estudi anterior en cèl·lules

endotelials *in vitro* ja havíem vist un augment d'expressió de l'apalina com a conseqüència del silenciament de CD40, en aquest estudi confirmem una disminució de l'expressió d'apalina en el grup no tractat, que mostra un grau de dany vascular elevat (Figura 4).

L'anàlisi de factors locals pro inflamatoris en els animals no tractats ens indica una sobre expressió d'aquests (Taula 3). Citocines anti inflamatòries com a IL11 estan augmentades en els grups tractats amb siRNA CD40. La IL15 també està disminuïda en els grups on CD40 és silenciada. El receptor de la IL7 està disminuït en tots els grups de tractament (Taula 4).

La immunohistoquímica de IL7R mostra una expressió preferent a cèl·lules tubulars epitelials i cèl·lules vasculares endotelials (Figura 3E). En el grup tractat amb rapamicina s'evidencia una lleu disminució de l'expressió del receptor (Figura 3F) mentre que els grups tractats amb siRNA mostren una clara reducció en túbuls una expressió quasi bé nul·la en vasos (Figura 3G i H).

L'expressió de NF κ B és reduïda en tots els grups de tractaments amb siRNA, particularment quan el silenciament de siRNA es combinava amb dosis sub terapèutiques de rapamicina (Taula 3). A favor d'aquests resultats, la translocació de NF κ B del citoplasma a nucli és reduïda en els grups tractats amb siRNA (Taula 4), en canvi és augmentada en el grup no tractat o tractat amb rapamicina, sobre tot evidenciat en les cèl·lules de l'infiltrat intersticial i en les cèl·lules endotelials vasculares.



ORIGINAL ARTICLE

***In vivo* therapeutic efficacy of intra-renal CD40 silencing in a model of humoral acute rejection**E Ripoll^{1,5}, R Pluvinet^{2,4,5}, J Torras¹, R Olivar², A Vidal³, M Franquesa¹, L Cassis¹, JM Cruzado¹, O Bestard¹, JM Grinyó^{1,6}, JM Aran^{2,6} and I Herrero-Fresneda¹

The humoral branch of the immune response has an important role in acute and chronic allograft dysfunction. The CD40/CD40L costimulatory pathway is crucial in B- and T- alloresponse. Our group has developed a new small interfering RNA (siRNA) molecule against CD40 that effectively inhibits its expression. The aim of the present study was to prevent rejection in an acute vascular rejection model of kidney transplant by intra-graft gene silencing with anti-CD40 siRNA (siCD40), associated or not with sub-therapeutic rapamycin. Four groups were designed: unspecific siRNA as control; sub-therapeutic rapamycin; siCD40; and combination therapy. Long-surviving rats were found only in both siCD40-treated groups. The CD40 mRNA was overexpressed in control grafts but treatment with siCD40 decreased its expression. Recipient spleen CD40+ B-lymphocytes were reduced in both siCD40-treated groups. Moreover, CD40 silencing reduced donor-specific antibodies, graft complement deposition and immune-inflammatory mediators. The characteristic histological features of humoral rejection were not found in siCD40-treated grafts, which showed a more cellular histological pattern. Therefore, the intra-renal effective blockade of the CD40/CD40L signal reduces the graft inflammation as well as the incidence of humoral vascular acute rejection, finally changing the type of rejection from humoral to cellular.

Gene Therapy advance online publication, 7 April 2011; doi:10.1038/gt.2011.39

Keywords: CD40 silencing; costimulation blockade; renal transplant; humoral rejection

INTRODUCTION

The humoral branch of the immune response has an important role in both acute and chronic allograft rejection.^{1,2} The appearance of alloantibodies after renal transplantation is a critical setback that results in allograft loss.³ Ligation of CD40 on B-cells is crucial for antibody production,³ which can be inhibited or delayed by the blockade of the CD40/CD40L pathway.^{2,4,5}

The costimulatory molecule CD40 is constitutively expressed on a wide variety of cells.^{3,6–9} Its ligand, CD40L, is also expressed more broadly than initially believed^{5,6}. In renal transplantation, CD40 is overexpressed on tubular epithelial cells (TECs), macrophages and T-cells.¹⁰ CD40 expression is homogeneous in the tubulo-interstitium in all grades of acute rejection, whereas in grafts suffering acute vascular rejection, grades II and III, it is strongly expressed on endothelial cells.¹¹ Vascular damage involves strong activation of the endothelium and it is well known that CD40 actively participates in these processes.^{6,12}

Systemic blockade of the co-stimulatory signal has been shown to reduce rejection and improve survival.^{5,13–16} Exciting results using

monoclonal antibody against CD40L, leading to long-term acceptance of renal allograft in non-human primates, have been reported. However, thromboembolic complications with this antibody have impeded its clinical development.^{17,18}

Our group has developed a human small interfering RNA (siRNA) molecule against CD40 that effectively inhibits its expression. *In vitro* silencing of CD40 combined with transcriptional profiling has demonstrated its participation in several downstream cellular processes involved in acute humoral rejection, such as coagulation, endothelial cell activation and inflammation.^{12,19} The aim of the present study was to assess the *in vivo* therapeutic efficacy of intra-renal graft silencing of CD40 with a newly developed siRNA anti-rat CD40 in a model of humoral-like acute vascular rejection.²⁰ Aware of the need for combined therapy in studies blocking the CD40/CD40L pathway, we also assessed the effects of the addition of sub-therapeutic doses of rapamycin.

The *in vivo* results shown in this study demonstrate the effectiveness of pre-transplant local silencing of CD40, blocking the CD40/CD40L

¹Experimental Renal Transplantation, Laboratory of Experimental Nephrology, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Laboratori 4122, 4^a Pl. Pavelló Govern, Campus Bellvitge, Barcelona, Spain; ²Medical and Molecular Genetics Center, IDIBELL, Hospital Duran i Reynals, Barcelona, Spain and ³Pathology Department, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Larga s/n, Barcelona, Spain

Correspondence: Dr JM Aran, Centre de Genètica Mèdica i Molecular, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Hospital Duran i Reynals, Gran Via s/n km 2,7, E-08907, L'Hospitalet, Barcelona, Spain.

E-mail: jaran@icibell.cat or

Dr I Herrero-Fresneda, Laboratori 4122 Experimental Renal Transplantation, 4^a Pl. Pavelló Govern, Campus Bellvitge, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), E-08907, L'Hospitalet, Barcelona, Spain.

E-mail: iherrero@icibell.cat

⁴Current address: Institute of Predictive and Personalized Medicine of Cancer, Crta Can Ruti, Camí de les Escoles s/n 08916 Badalona, Barcelona, Spain.

⁵These authors contributed equally to this work.

⁶Shares credit for senior authorship.

Received 10 July 2010; revised 28 December 2010; accepted 15 February 2011



Table 1 Sequence composition and target localization of the siRNAs designed to screen for efficient rat CD40 mRNA silencing

siRNA anti-rat CD40	Rat CD40 mRNA targeted region	Sequence
siRNA 2	124–145	5' ACAGUACUCCCAAGGUGGCUU 3' 3' UUUUGUCAUGGAGGUUCCACCG 5'
siRNA 4	171–192	5' ACCGACUAGUJAGCCACUUGU 3' 3' UUUUGGUGAUCAAUCGGUGAC 5'
siRNA 6	212–233	5' UGCAACCGUGCGACUCAGUU 3' 3' UUACGGUUGCCAGCCUGAGUC 5'
siRNA 10	290–251	5' CUCAAUCAGGGCUUCAGUU 3' 3' UUGAGUUAUUCGGAAGUCC 5'
siRNA 12	299–320	5' GGGCUUCAGGUUAGAAGUU 3' 3' UUCCCGAAGUCAAUUCUCC 5'
siRNA 21	517–538	5' GUGUACUUAUGGACAACUU 3' 3' UUCACAGUAGGUACCUUUGUC 5'
siRNA TNFRSF5-1	157–175	5' GCUCUUGAGAAGACCAAUUU 3' 3' GTCGAGAUCUUCUUGGGUUA 5'
siRNA TNFRSF5-2	193–211	5' GGCGAAUUCUCAGCUCACUU 3' 3' GTCCGCUUAAAGAGUCGAGUGA 5'
siRNA TNFRSF5-3	66–84	5' GUGUGUACGUCGAGUACUU 3' 3' GTCACAAAGCAGCUCAGUC 5'
siRNA-C	—	5' ACUACAAGACUCGUGACCAU 3' 3' UUUUGAUGUUCUGAGCAGCUGU 5'

Abbreviation: siRNA, small interfering RNA.

co-stimulatory signal, as a strategy to prevent humoral rejection switching to a more cellular pattern.

RESULTS

Selection and characterization of effective anti-rat CD40 siRNAs

Nine siRNAs were designed and generated to target different positions within the coding region of rat CD40 mRNA (Table 1).

The RNA interference efficacy of each of the nine synthesized siRNAs was tested in HEK-293 cells using the GeneEraser Luciferase Suppression-Test System (Stratagene, La Jolla, CA, USA). These siRNAs were co-transfected into HEK-293 cells along with a luciferase/CD40 fusion construct. Luciferase activity was determined at 2 days post-transfection (Figure 1).

Five of the designed siRNAs had significant knockdown efficacy, although the most potent silencing efficiency (82–84%) was achieved with the siRNAs TNFRSF5-1 and TNFRSF5-2 (Figure 1). Thereby, we chose siRNA TNFRSF5-2 (renamed as siCD40) for the subsequent *in vivo* study.

Effect of CD40 silencing in renal function and survival

NoTreat animals developed severe renal insufficiency from the 5th day post-transplantation dying before 9 days. Treatment with 0.5 mg kg⁻¹ per day of rapamycin was unable neither to avoid renal insufficiency nor to increase survival (Figure 2). Seven long-surviving rats were found in both siCD40-treated groups. Five out of those (three in the siCD40 group and two in the siCD40-Rp group) displayed stable chronic renal insufficiency (sCr around 250–300 μmol l⁻¹), surviving for 39, 48, 53, 57 and 57 days. The remaining two rats (siCD40-Rp group) achieved indefinite survival with stable renal function throughout the study (sCr₁₀₀=69 and 130 μmol l⁻¹) (Supplementary Figure SI-4).

Effect of CD40 silencing in the rejection pattern

Conventional histology of *NoTreat* grafts showed a variable degree of tubule-interstitial damage, perivascular edema and hemorrhage, fibroid necrosis either in the vessel wall or in glomeruli, endothelial denudation and cell infiltration mainly composed by polymorphonuclear cells but few lymphocytes; all these features were indicative of acute vascular humoral rejection (Figure 3a).

Grafts treated with sub-therapeutic rapamycin displayed mixed features of both cellular and humoral rejection: there was mixed cell infiltration in all renal parenchyma including the vessels, with the characteristic humoral signs of karyorrhexis and activated endothelium in vessel walls (Figure 3b).

Only 12% of both siCD40-treated groups displayed features of acute vascular humoral rejection. In all, 49% of grafts presented

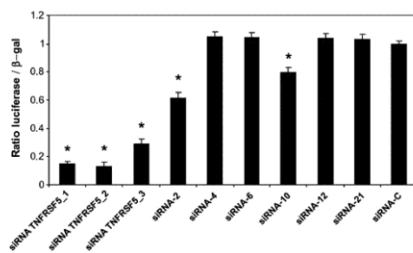


Figure 1 Knockdown efficiency of siRNA sequences against rat CD40. The synthesized siRNAs were assayed in HEK293 cells overexpressing a luciferase-rat CD40 partial complementary DNA gene fusion (see Materials and methods for details). Results are given as mean values ± s.d. from three independent experiments performed in triplicate. analysis of variance, **P*<0.05 vs siRNA-C.

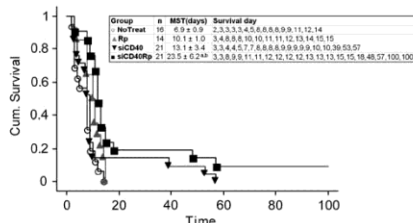


Figure 2 Cumulative survival. The siCD40 group doubled the mean survival time of *NoTreat* group. The combination of both treatments significantly prolonged mean survival time. In both siRNA-treated groups, seven rats survived more than the mean survival time. Log Rank test, *P*=0.0009. ^a vs *NoTreat*, ^b vs Rp.

cellular rejection, occasionally affecting vessels and more frequently displaying slight tubulitis and interstitial infiltrate mainly composed by lymphocytes (17% grade III, 3% grade IIA, 5% grade IA and 24% borderline). Altogether, under light microscopy the siCD40-treated

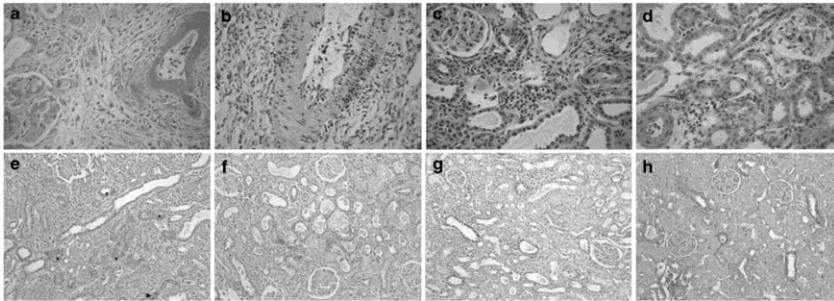


Figure 3 Representative photomicrographs. (a-d) Haematoxylin/Eosin, $\times 40$; (e-h) IL-7R immunostaining, $\times 20$. (a) Grafts treated with unspecific siRNA (*NoTreat*); (b) Grafts treated with sub-therapeutic rapamycin (*Rp*); (c) Grafts treated with rat anti-CD40 siRNA (*siCD40*); (d) Grafts treated with the combination therapy (*siCD40-Rp*); (e) *NoTreat* graft showing intense IL-7R expression in tubuli (asterisk) and vessels (arrow); (f) *Rp*; (g) *siCD40*; (h) *siCD40-Rp*.

Table 2 Rejection pattern

Group	Humoral/cellular/n	C4d+/n	IgG+/n	DSA+/n	% DSA+	% CD40+	% CD45RA+	% CD40+ CD45RA+
NoTreat	9/1/14	7/9	7/7	5/6	81.7 \pm 16.1	54.8 \pm 1.4	20.7 \pm 3.6	17.2 \pm 3.3
Rp	3/7/14	3/10	7/10	5/10	34.3 \pm 12.3 ^a	43.4 \pm 1.7	23.8 \pm 3.4	19.0 \pm 3.9
siCD40	3/7/20	2/16	11/15	10/14	63.5 \pm 11.6	41.3 \pm 7.5	9.9 \pm 1.5 ^b	6.1 \pm 1.2 ^b
siCD40Rp	2/13/21	2/18	8/18	3/12	24.6 \pm 10.1 ^{a,c}	43.4 \pm 4.8	14.5 \pm 2.0	10.1 \pm 1.5 ^b
P	0.0025	0.0011	0.0512	0.0475	0.0149	0.6559	0.0452	0.0098

Abbreviations: DSA, donor-specific antibodies; IgG, immunoglobulin G. 'n' indicates the number of assessed samples for each parameter in each group. The percentages of DSA-positive cells, splenocytes expressing CD40, CD45RA (B cells) and double staining with respect to the total number of spleen cells were analyzed by ANOVA and Scheffe's test. χ^2 for the rest of the parameters. $P < 0.005$.
^avs NoTreat.
^bvs Rp.
^cvs siCD40.

animals presented a more cellular and apparently chronic pattern of rejection (Figures 3c and d).

Five out of the seven long-surviving rats, treated with siCD40, displayed only grade 1 tubulitis and interstitial infiltrate with some degree of fibrosis. The other two rats, which achieved indefinite survival, displayed a normal histology in one case, and only grade 2 tubulitis with interstitial infiltrate in the other.

In the *NoTreat* group, most of the grafts were C4d⁺ and IgG⁺ in peritubular capillaries, while CD40 silencing reduced the positivity for these humoral parameters (Table 2).

In addition, donor-specific antibodies (DSA) were evident in 83% of *NoTreat* animals whereas serum from non-transplanted WA rats did not present pre-formed DSA against BN splenocytes (1.77 \pm 0.53% DSA+ cells). Treatment with either rapamycin or siCD40 partially reduced the DSA. Importantly, the combination of both treatments reduced not only the presence of DSA but also the percentage of positive cells (Table 2 and Supplementary Figures SI-1 and SI-3).

Some DSA-positive animals did not show histological features of humoral rejection. However, all grafts displaying a histological pattern of antibody-mediated acute humoral rejection were DSA-positive. Most of the DSA-negative animals presented cellular rejection.

Local and systemic CD40 expression

All renal structures expressed variable CD40+ immunostaining: TECs, vessel SMCs and glomeruli. When CD40 was silenced, protein

expression disappeared in glomeruli and vessels, and TEC immunostaining diminished (not shown).

CD40 gene expression in *NoTreat* grafts was overexpressed 20-fold compared with control non-transplanted kidneys. Rapamycin partially reduced CD40 expression. Intra-graft gene silencing effectively reduced CD40 expression to syngeneic values (3.45 \pm 0.75). The addition of siCD40 plus rapamycin did not further reduce CD40 gene expression (Table 3)

To evaluate the effect of intra-graft CD40 silencing on the systemic B-cell response, we used FACS to quantify the percentage of CD45RA+ (B-cells), CD40+ and double labelled splenocytes at the moment of sacrifice. Results showed that both groups treated with siCD40 had fewer B+ splenocytes than the *NoTreat* group. Furthermore, the siCD40-treated group expressed the lowest percentage of CD40+/CD45RA+ splenocytes, and supplementation with rapamycin did not reduce this cell population further (Table 2 and Supplementary Figure SI-2).

Intra-graft expression of mediators

Intra-graft gene expression of TLR3, TLR4 and the downstream intermediate MyD88 was reduced in both siCD40-treated groups, particularly in the siCD40-Rp group. In contrast, its expression was strongly activated in the *NoTreat* group. Complement regulators CFH and CFI were also downregulated in all treated groups, especially in the combined therapy (Table 3 and Supplementary Figure SI-3). Therefore local injection of siRNA does not seem to activate innate immune responses.



Table 3 Gene expression of immune-inflammatory mediators in renal grafts

	TLR3	TLR4	MyD88	CFI	CFH
NoTreat	0.49 ± 0.17	9.52 ± 1.78	7.65 ± 0.92	4.73 ± 1.51	2.63 ± 0.39
Rp	0.19 ± 0.03 ^a	6.48 ± 0.98	10.53 ± 1.63	1.48 ± 0.38 ^a	0.99 ± 0.17 ^a
siCD40	0.26 ± 0.05 ^a	5.42 ± 1.18	5.94 ± 1.86 ^b	2.26 ± 0.68 ^a	1.28 ± 0.27 ^a
siCD40Rp	0.19 ± 0.03 ^a	4.71 ± 1.57 ^a	3.52 ± 0.72 ^b	0.58 ± 0.13 ^{a,c}	0.59 ± 0.14 ^{a,c}
P	0.024	0.2162	0.0177	0.0022	<0.0001
	NFκBp65	IL15	IL7-R	IL11	CD40
NoTreat	27.72 ± 3.8	2.15 ± 0.43	5.47 ± 1.07	4.18 ± 0.58	19.8 ± 3.0
Rp	13.22 ± 1.6 ^a	1.60 ± 0.34	0.91 ± 0.27 ^a	2.92 ± 0.69	11.0 ± 4.4 ^a
siCD40	13.42 ± 2.6 ^a	1.18 ± 0.25 ^a	1.89 ± 0.48 ^a	7.66 ± 2.34 ^{b,d}	4.1 ± 1.0 ^a
siCD40Rp	9.28 ± 1.6 ^a	1.21 ± 0.14 ^a	1.90 ± 0.52 ^a	2.72 ± 0.61	2.3 ± 0.7 ^a
P	0.0002	0.1074	0.0011	0.0254	0.0091

Abbreviation: NFκB, nuclear factor κB.

At sacrifice, the grafts were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Gene expression was quantified by TaqMan real-time PCR and expressed as fold time with respect to non-transplanted kidney tissue. ANOVA, Scheffe's test P < 0.005.

^avs NoTreat.

^bvs Rp.

^cvs siCD40.

^dvs siCD40Rp.

We previously showed a clear upregulation of apelin in endothelial cells as a consequence of siRNA-mediated CD40 silencing *in vitro*.¹² In the present *in vivo* study we confirm a downregulation of apelin gene expression in *NoTreat* animals which, as shown, had severe acute vascular damage. Upon CD40 silencing, apelin expression returned to values similar to syngeneic rats, but this effect was not observed in rapamycin treatment (Figure 4).

Analysis of the local pro-inflammatory status in *NoTreat* rats showed the expected cytokine overexpression (Table 3). The anti-inflammatory IL-11 was overexpressed by CD40 silencing, following a similar expression pattern to apelin in the treated groups. In contrast, IL15 expression was specifically downregulated upon CD40 silencing; whereas IL-7R expression was reduced in all treated grafts (Table 4). Further staining of grafts for IL-7R expression showed preferential localization in tubular epithelial and vascular endothelial cells (Figure 3e). In Rp group there was a slight decrease in IL-7R expression (Figure 3f), while both siCD40-treated groups showed a clear reduction in tubuli and almost null expression in the vessels (Figures 3g and h).

Finally, downstream of the inflammatory cascade, the gene expression of the nuclear factor κB was reduced by all treatments, particularly when CD40 silencing was combined with the sub-therapeutic dose of rapamycin (Table 3 and Supplementary Figure S1-3). Accordingly, nuclear factor κB nuclear translocation was reduced in siCD40-treated grafts (Table 4). In contrast, it was translocated from cytoplasm to nuclei in the *NoTreat* and Rp groups, especially in interstitial infiltrate and vascular endothelial cells.

DISCUSSION

The present study was designed as proof of concept to assess the potential intra-graft role of our CD40-siRNA molecule. Local silencing of CD40 through a single dose at recovery of organs, in a model of kidney transplantation with severe humoral vascular damage, caused a shift in the rejection pattern, reduced circulating DSA and improved rat survival. Moreover, this local treatment was clearly effective blocking graft CD40 gene expression, leading to a changed immunological environment in the graft. We wanted to know whether modulating locally the immune graft state redounded in better

acceptance. The 14% (3 out of 21) of graft viability gives a nice positive answer to this question. It was not the aim of this study to avoid acute rejection and achieve 100% survival. If this was the case, then we would have assayed a more sustained CD40 silencing and/or we would have probably employed a weaker model. In fact, the present is a virulent model of acute rejection and the treatment utilized is too punctual. We knew in advance that a single intra-graft pre-transplant injection would not be sufficient to prevent mortality. However, we made use of this approach to test the potential power of our siCD40 molecule.

We added a sub-therapeutic dose of a well-known immunosuppressant to synergize with the CD40/CD40L co-stimulatory pathway blockade. This dose of rapamycin used here in monotherapy was clearly sub-optimal for preventing rejection. However, its combination with CD40 silencing was sufficient to significantly delay rejection and to prolong survival. Indeed, two rats achieved indefinite survival with this combined therapy. Our interpretation is that intra-graft CD40 silencing switched the strong graft rejection to one more easily controlled with conventional immunosuppression. Thus, combining CD40 intra-graft silencing with reduced doses of mTOR inhibitors might constitute a useful immunosuppressive strategy in the future.

In the early phase after transplantation, rapid recognition and adequate treatment of the diverse mechanisms of allograft immune-inflammatory response are decisive.²¹ As Sacks and Zhou suggested²², donor kidney pre-treatment appears as a valid strategy to modify the sensitivity of donor kidneys, and may have application in human renal therapy. Our present strategy using intra-graft CD40 silencing reduces the humoral vascular acute rejection incidence, shifting towards a cellular rejection pattern. Under light microscopy, *NoTreat* kidneys evidenced a typical pattern of humoral vascular rejection. In both siCD40-treated groups, not only inflammation was prevented but also the type of rejection had changed. This rejection shift was also evidenced by the reduction in complement deposits in the peritubular capillaries of siCD40-silenced groups. In addition, the expression of the complement regulatory proteins CFH and CFI was reduced inside the treated kidneys, indicating a lower local activation of complement as a consequence of CD40 silencing. It is well known that intra-graft

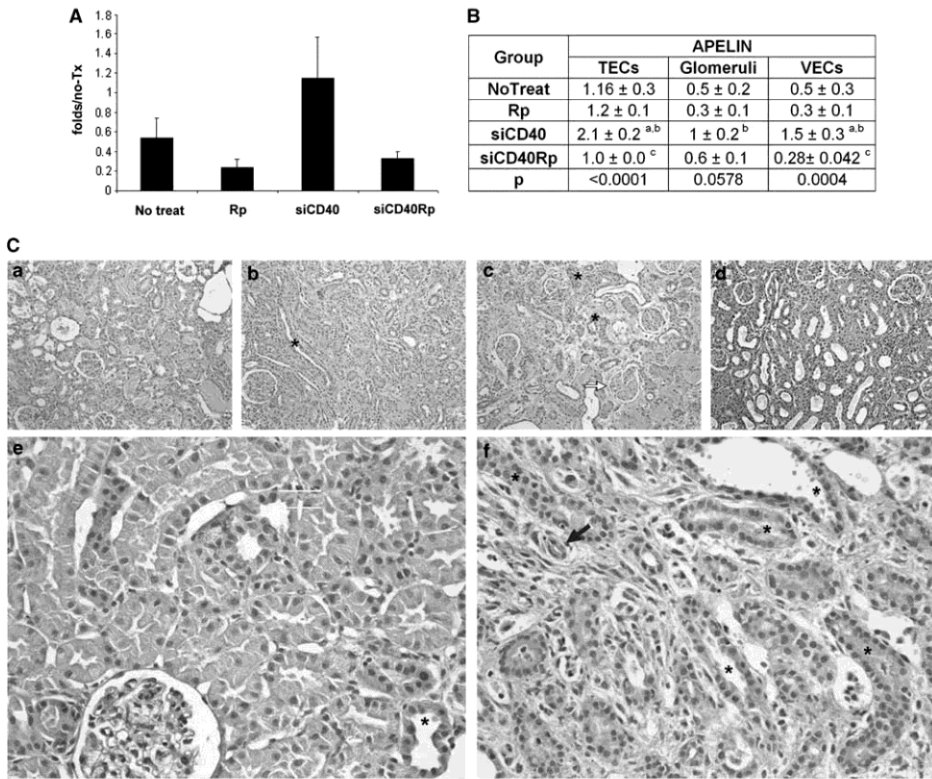


Figure 4 Apelin expression. (A) mRNA quantification of apelin expression in the kidney. Values are expressed as fold time respect to non-transplanted kidney tissue. Analysis of variance, Scheffe's test $P=0.0626$, ^b vs Rp, ^c vs siCD40. (B) Semi-quantification of apelin expression in TECs, glomeruli and vascular epithelial cells, graded from 0 to 4+. Kruskal–Wallis test, $P<0.005$ ^a vs NoTreat, ^b vs Rp, ^c vs siCD40. (C) Representative photomicrographs of apelin immunostaining (x20). Apelin expression was detected in a variable degree in TECs (asterisk), glomeruli (arrow head) and vascular epithelial cells (arrow). Apelin was slightly positive in NoTreat group with severe acute vascular damage (a), Rp group (b) and siCD40-Rp group (d); siCD40 group showed an intense immunostaining in the vessels and glomeruli (c). Detail (x40) of NoTreat (e) and siCD40 (f) groups. Note the intense staining of the vessel (arrow) in the siCD40 group.

Table 4 Evaluation of IL-7R and NFκB protein location by immunostaining

	IL-7R		NFκB		
	TECs	VECs	TECs	Cell infiltrate	VECs
NoTreat	2.2 ± 0.4	1.0 ± 0.3	4/4	3/4	2/3
Rp	1.4 ± 0.3	0.7 ± 0.2	1/4	2/4	1/3
siCD40	0.9 ± 0.2 ^b	0.5 ± 0.1	1/5	0/4	0/4
siCD40Rp	0.9 ± 0.2 ^b	0.2 ± 0.1 ^{a,b}	1/4	1/4	0/4
P	0.0251	0.0312	0.0574	0.0487	NS

Abbreviations: IL, interleukin; NFκB, nuclear factor κB.
IL-7R was semi-quantitatively graded from 0 to 4+ and analyzed by Kruskal–Wallis test, $P<0.005$.
NFκB was considered positive when nuclei were immunostained. Results are expressed as number of positive samples vs number of assessed samples. Results were analyzed by χ^2 -test.
^avs NoTreat.
^bvs Rp.

synthesis of complement can have a profound effect on acute allograft rejection.^{23,24}

Alloantibody-mediated humoral rejection results from high-titer *de novo* DSA formation, leading to a high risk of early graft loss.¹ Our model was previously described as 'humoral-like' as it displays vascular damage with fibrinoid necrosis and perivascular edema.²¹ Now we confirm that in this model, in which pre-transplant DSA were not present in WA rats, there was a massive formation of DSA probably due to early peri-transplant B-cell activation.^{25–27} In this highly stringent model, intra-graft CD40 silencing was unable *per se* to reduce circulating DSA, as expected from local treatment. However, when combined with a sub-therapeutic dose of rapamycin, an additive systemic reduction was found. A similar outcome has recently been reported with a high sensitization skin grafting mouse model, in which selective systemic blockade for CD154 predominantly impaired the generation of humoral immunity.²⁸



Interactions between costimulatory ligands and their receptors are crucial for the induction and regulation of innate and adaptive immune responses. As a consequence of cell damage, injured cells release certain molecules that act as endogenous ligands for TLR4, which, upon activation, signal through MyD88.^{29–31} Moreover, it is well known that double-stranded RNA molecules are exogenous ligands for TLR3. In our grafts, locally injected with the siCD40, TLR3 expression was reduced, which seems to discard the possibility that either this molecule or the methodology used activated the innate immune response. Furthermore, the lower expression of TLR4 and MyD88 is consistent with a modulation of the innate immune response and indeed would favor the reduction in tissue damage.

The graft inflammatory background was locally modulated toward an anti-inflammatory situation by CD40 silencing. IL15 and IL7R act as pro-inflammatory cytokines that support lymphocyte proliferation and activation. IL15 expression in TECs is upregulated by CD40L and correlates with acute graft rejection.³² As expected, CD40 silencing reduced IL15 production, probably influenced by the direct blockade of CD40/CD40L signalling and the consequent reduced activation of NFκB.³² On the other hand, we observed a higher local expression of the anti-inflammatory IL-11. There is *in vivo* evidence that IL-11 treatment enhanced recipient survival by suppressing cytokine production.^{33–35} This anti-inflammatory effect is mediated by its ability to block the nuclear translocation of NFκB. In our siCD40-treated grafts, NFκB expression was downregulated and its translocation to the nucleus was blocked. This could be an indirect consequence of CD40 silencing through IL-11, or a direct effect of this silencing on NFκB, as we previously showed in our *in vitro* study.¹²

A plausible explanation for the benefits of our local CD40 silencing could be its targeting of the direct pathway. Local silencing of the donor kidney may involve not only dendritic cells but also non-professional resident APC participating in the direct pathway. Both T- and B-cell adaptive immune responses must be controlled to prevent sensitization to alloantigen and to prolong graft survival.²⁸ Although CD40-CD40L blockade predominantly impairs B-cell responses, it is not sufficient to completely block T-cell activation.²⁸ This might explain why a single local dose of siCD40, even when combined with the sub-therapeutic dose of rapamycin, was insufficient to induce indefinite survival in most of the treated rats. Clearly, our local treatment with siCD40 only blocks intra-graft CD40 expression. However, this local treatment had a systemic effect on splenocytes, reducing the number of B-cells and, particularly, the number of CD40+ B-cells. It could be hypothesized that the primary lymphoid organs produce fewer B-cells and consequently fewer circulating B-cells and antibodies²⁸ as a consequence of the reduced intra-graft immune-inflammatory response induced by local siCD40 treatment.

We previously showed that the CD40/CD40L dyad influences a myriad of pathways involved in graft vasculopathy.¹² One of the most strikingly downregulated mediators was the vasoactive peptide apelin. In this study, we corroborate the relationship between CD40, apelin and graft vascular immune-inflammation. Thus, *NoTreat* animals showed inhibition of apelin expression, but its expression levels were similar to those in non-transplanted kidneys when CD40/CD40L was blocked. Apelin is expressed at various sites within the cardiovascular system and in kidney endothelium.^{36–40} Malyszko *et al.*³⁶ recently showed low apelin amounts in allograft recipients. Those patients showed pronounced endothelial damage together with an increase in inflammatory markers, suggesting that apelin may be associated with inflammation. Interestingly, when CD40 silencing was

associated with rapamycin, it failed to maintain normal apelin levels. Though rapamycin did not modify the effect of exogenously administered apelin in experimental myocardial reperfusion injury,³⁷ it did inhibit apelin in our model. This may be due to the fact that rapamycin and apelin have opposite actions on intracellular signalling, whereas apelin activates the phosphorylation of p70S6K,³⁸ through the phosphorylation of STAT3,³⁹ rapamycin inhibits apelin-mediated phosphorylation.^{38,41} A similar effect could account for the siCD40-induced gene overexpression of IL11, which was also inhibited by rapamycin.

Present *in vivo* results show the effectiveness of pre-transplant local silencing of CD40 as a strategy to prevent antibody-mediated rejection, changing it into a more cellular pattern. In terms of clinical importance, strategies of cellular rejection treatment are generally well controlled with conventional immunosuppression, whereas humoral rejection continues to be an unresolved drawback. Yet this local treatment may require systemic siCD40 delivery to achieve indefinite survival, as that would block both the direct and indirect antigen-presentation pathways. These initial results open the door to clinical trials silencing CD40 not only in the transplantation setting, but also in other autoimmune and inflammatory diseases where CD40, B-cells and antibodies have a key role.

MATERIALS AND METHODS

siRNA design and screening

siRNA duplexes targeting the partial rat CD40 mRNA sequence (GenBank NCBI, Bethesda, MD, USA, Accession no. AF241231) were designed as previously described (www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/100/105/sirna.html). For the initial screening, six siRNAs were synthesized by *in vitro* transcription (Silencer TM siRNA construction kit, Ambion, Austin, TX, USA), and three more (TNFRSF5-1, TNFRSF5-2 and TNFRSF5-3) were chemically synthesized (Genix BioScience; Silencer pre-designed siRNAs, Ambion). A scrambled non-silencing siRNA was used as control for off-target effects.

To assess the rat CD40 mRNA silencing efficiency of siRNA molecules, we employed the GeneEraser Luciferase Suppression-Test System (Stratagene, La Jolla, CA, USA). A 547pb CD40 partial coding sequence was cloned into the 3'UTR of the luciferase gene to form the targeting vector pTarget-luc-CD40. *In vitro* transfection of siRNAs (100 nM) was performed in HEK-293 cells using Oligofectamine (Invitrogen, Paisley, UK). After 6 h, the cells were transfected with pTarget-luc-CD40 (400 ng DNA; Polyfect Transfection Reagent, Qiagen, Hilden, Germany). After 48 h of incubation, the luciferase activity from lysates was determined (Luciferase Assay System, Promega, Madison, WI, USA; Luminometer TD-20/20, Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA). For normalization of transfection efficiency, co-transfected pCMV-βgal was determined (up to 500 ng DNA).

Protocol of siRNA transfer to renal tissue

To set up the siRNA transfer protocol we performed preliminary studies evaluating the siRNA dose, carrier vector and administration procedure. The protocol that offered optimal tissue transfer was as follows. Chemically synthesized siRNA duplexes (Qiagen) were dissolved in diethylpyrocarbonate water. Following renal washing with 1 ml of EuroCollins solution at 4 °C, donor kidneys were intra-arterially infused with 30 µg of either siCD40 or control unspecific siRNA duplex in a final 1 ml volume of isotonic saline solution. Immediately after siRNA infusion, kidneys underwent electroporation held with a tweezers-type electrode. The electroporation protocol (six pulses of 20 ms for each, 1 Hz frequency, at 100 V cm⁻¹) was applied twice per kidney to ensure that the whole tissue was covered by the tweezers-type electrode. (See Supplementary information).

Animals and surgical transplantation technique

For functional assessment of CD40 silencing, inbred male Wistar-Agouti rats (250 g BW) received an allogeneic kidney from Brown-Norway rats (250 g BW) (Charles River by Harlan UK Limited, Bicester, UK). Kidneys were preserved

in EuroCollins solution while the recipient was prepared for transplantation. The surgical technique has been described previously²⁰ (<http://www.renal-transplantation.com>). Recipient rats were bi-nephrectomized at the moment of transplantation. Animals did not receive any immunosuppressant and were maintained in accordance with the Guidelines of the Committee on Care and Use of Laboratory Animals and Good Laboratory Practice.

Treatments and groups. Follow-up

NoTreat group: unspecific siRNA as control ($n=16$); *Rp* group: daily oral sub-therapeutic rapamycin (0.5 mg Kg⁻¹, Sirolimus, Wyeth, Madrid, Spain) for the first 15 days after transplantation ($n=14$); *siCD40* group: *siCD40* ($n=21$); and *siCD40-Rp* group: *siCD40* and sub-therapeutic rapamycin ($n=21$).

Serum creatinine (sCr, $\mu\text{mol l}^{-1}$) was determined by Jaffe's reaction (Olympum Autoanalyzer, Hamburg, Germany) every 2 days beginning the day after surgery. For the survival study, rats were ideally followed for 100 days. The indefinite survival was established at this time point. Upon sacrifice, grafts were excised and processed for histological and molecular studies.

Histological studies

Coronal 1–2 mm thick slices of graft kidneys were fixed in buffered formalin, dehydrated and embedded in paraffin. For light microscopy, 3–4 μm -thick tissue sections were stained with hematoxylin-eosin and periodic acid-Schiff. A pathologist blinded to the treatment groups assessed all sections for tubulitis, interstitial infiltration, vasculitis, glomerulitis, mesangiolysis, acute tubular necrosis, peritubular capillary infiltration, capillary thrombosis, intimal arteritis, fibrinoid necrosis, transmural infiltration, endothelial denudation and hemorrhage, following the Banff criteria for acute/active lesion scoring.⁴²

Immunohistochemistry

Representative paraffin-embedded tissue sections were immunoperoxidase-stained for CD40 (1:50; Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ, USA), NF κ B p65 subunit (1:1000; Abcam PLC, Cambridge, UK), apelin (1:500; Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA, USA), IL-7R (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and C4d (1:30; Biomedica Gruppe, Vienna, Austria) and immunofluorescence-stained for IgG (1:300; Sigma, Madrid, Spain). Negative controls were performed by immunostaining-matched serial sections without the primary antibodies. The immunoperoxidase-stained samples were revealed with diaminobenzidine (D. 5637, Sigma) and counterstained with hematoxylin. For IgG, samples were directly observed under fluorescence light microscopy.

C4d and IgG (assessed in peritubular capillaries), apelin and IL-7R were semi-quantitatively scored: 0 denoted negative staining, 1 positive staining in <25% of the sample, 2 positive staining in 25–50%, 3 positive staining in 50–75%, and 4 positive staining in 75–100%. NF κ B p65 immunostaining was considered positive when it was located inside the nuclei of different cells (TECs, VECs and interstitial infiltrate). CD40 immunostaining was only used to localize the protein expression without further semi-quantification.

Quantification of gene expression in renal grafts

For molecular studies, the kidney was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Total RNA was extracted and reverse-transcribed to complementary DNA as previously described.⁴³ Negative controls for reverse transcription were carried out using distilled water. Tissue expression levels for CD40 and other immune-inflammatory mediators were quantified by TaqMan real-time PCR (ABI Prism 7700, Applied Biosystems, Madrid, Spain) using the comparative C_T method (Applied Biosystems).

PCR reactions and amplification were performed as previously described.⁴³ Pooled values of healthy non-transplanted kidneys were used as the reference value. Results were expressed as 'many fold of the unknown sample' with respect to the reference value (arbitrary units).

Quantification of circulating donor-specific antibodies

The presence of circulating DSA class-I was quantified on recipient serum samples incubated with donor spleen cells and measured by flow cytometry. Plasma samples were collected at the moment of sacrifice. Donor splenocytes were isolated from a Brown-Norway rat spleen by Ficoll (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) density gradient and freshly used. Different controls were

added: serum from non-transplanted Wistar Agouti rat as naive; serum from a transplanted WA rat with high anti-human leukocyte antigens antibody titer as positive control, and splenocytes from Lewis rat as negative control.

Briefly, 5×10^5 splenocytes were incubated with 25 μl of recipient serum for 30 min at room temperature, washed in phosphate-buffered saline, incubated in the dark (30 min, 4°C) with a 1:25 mix of anti-CD3 (eBioscience, Ltd, Hatfield, UK) and anti-IgG Fc portion (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA), fixed with 1% paraformaldehyde and analyzed by flow cytometry. Fluorescence increase of 15% with respect to the negative control was considered as positive. Results were expressed as percentage of positive cells with respect to the total number of CD3+ spleen cells.

Quantification of the CD40- and CD45RA-positive population in the spleen

At sacrifice, the recipient's spleen was harvested in phosphate-buffered saline. The splenocytes were isolated by Ficoll density gradient and cryo-preserved at -180°C .

To quantify the percentage of CD40+ and CD45RA+ splenocytes, cells were thawed and recovered by standard methods. In all, 5×10^5 splenocytes were incubated in the dark (20 min, 4°C) with antibodies (5 μl CD40 and 2 μl CD45RA, BD Pharmingen, Madrid, Spain). After washing with phosphate-buffered saline, 7-amino-actinomycin D (1:10) was added to control cell viability. Cells were analyzed by flow cytometry. Results are expressed as mean percentage of positive cells to the total number of splenocytes.

Statistical analysis

Overall survival was analyzed using the Log Rank test. Serum creatinine differences at any time point, gene expression, plasma cytokine levels and DSA titers were analyzed by analysis of variance followed by Scheffé's test. For histological parameters and DSA presence, χ^2 *P*-value was calculated from the contingency table. Semi-quantitative immunostaining was analyzed through the non-parametric Kruskal–Wallis test. Values of $P < 0.05$ were considered as statistically significant. Data are presented as mean \pm s.e.m.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III/FIS (PI03/0082, PI03/0516, PI06/0230, PS09/00107) and Fundación SENEPRO 2007. Immaculada Herrero-Fresneda and Josep M. Aran are researchers from 'Programa Estabilización Investigadores' financed by ISCIII and Dpt. Salut Generalitat Catalunya. Elia Ripoll is the recipient of a fellowship from IDIBELL. We thank Núria Bolaños and Esther Herrero and Serveis Científic Tècnics (UB, Bellvitge) for technical support.

- 1 Turgeon NA, Kirk AD, Iwakoshi NN. Differential effects of donor-specific alloantibody. *Transplant Rev (Orlando)* 2009; **23**: 25–33.
- 2 Gilligan BJ, Woo HM, Kosieradzki M, Torrealba JR, Southard JH, Mangino MJ. Prolonged hypothermia causes primary nonfunction in preserved canine renal allografts due to humoral rejection. *Am J Transplant* 2004; **4**: 1266–1273.
- 3 Van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 2000; **67**: 2–17.
- 4 Shoker AS, Lun ZR, Choudry R, Saxena A. Analysis of the CD40/CD40L role in the sustenance of alloreactive antibody production. *Transpl Immunol* 2001; **8**: 219–228.
- 5 Li XL, Menoret S, Le Mauff B, Angin M, Anegón I. Promises and obstacles for the blockade of CD40-CD40L interactions in allotransplantation. *Transplantation* 2008; **86**: 10–15.
- 6 Rizvi M, Pathak D, Freedman JE, Chakrabarti S. CD40-CD40 ligand interactions in oxidative stress, inflammation and vascular disease. *Trends Mol Med* 2008; **14**: 530–538.
- 7 Vowinkel T, Wood KC, Stokes KY, Russell J, Kriegelstein CF, Granger DN. Differential expression and regulation of murine CD40 in regional vascular beds. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; **290**: H631–H639.
- 8 van Kooten C, Wolman AM, Daha MR. Immunological function of tubular epithelial cells: the functional implications of CD40 expression. *Exp Nephrol* 2000; **8**: 203–207.
- 9 Yellin MJ, D'Agati V, Parkinson G, Han AS, Szema A, Baum D *et al*. Immunohistologic analysis of renal CD40 and CD40L expression in lupus nephritis and other glomerulonephritides. *Arthritis Rheum* 1997; **40**: 124–134.

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.



- 20 Gaweco AS, Mitchell BL, Lucas BA, McClatchey KD, Van Thiel DH. CD40 expression on graft infiltrates and parenchymal CD154 (CD40L) induction in human chronic renal allograft rejection. *Kidney Int* 1999; **55**: 1543-1552.
- 21 Mengel M, Mueller I, Behrend M, von Wasieleski R, Radermacher J, Schwarz A *et al*. Prognostic value of cytotoxic T-lymphocytes and CD40 in biopsies with early renal allograft rejection. *Transpl Int* 2004; **17**: 293-300.
- 22 Pluvinet R, Olivari R, Krupinski J, Herrero-Fresneda I, Luque A, Torras J *et al*. CD40: an upstream master switch for endothelial cell activation uncovered by RNAi-coupled transcriptional profiling. *Blood* 2008; **112**: 3624-3637.
- 23 Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, Ritchie SC, Hendrix R, Tucker-Burden C *et al*. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 1996; **381**: 434-438.
- 24 Kirk AD, Harlan DM, Armstrong NN, Davis TA, Dong Y, Gray GS *et al*. CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 8789-8794.
- 25 Kirk AD, Burkly LC, Batty DS, Baumgartner RE, Berning JD, Buchanan K *et al*. Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat Med* 1999; **5**: 686-693.
- 26 Ossevoort MA, Ringers J, Kuhn EM, Boon L, Lorre K, van den Hout Y *et al*. Prevention of renal allograft rejection in primates by blocking the B7/CD28 pathway. *Transplantation* 1999; **68**: 1010-1018.
- 27 Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD *et al*. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 2006; **355**: 1018-1028.
- 28 Kawai T, Andrews D, Colvin RB, Sachs DH, Cosimi AB. Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. *Nat Med* 2000; **6**: 114.
- 29 Pluvinet R, Petriz J, Torras J, Herrero-Fresneda I, Cruzado JM, Grinyo JM *et al*. RNAi-mediated silencing of CD40 prevents leukocyte adhesion on CD154-activated endothelial cells. *Blood* 2004; **104**: 3642-3646.
- 30 Herrero-Fresneda I, Franquesa M, Torras J, Vidal A, Aran J, Pluvinet R *et al*. Role of cold ischemia in acute rejection: characterization of a humoral-like acute rejection in experimental renal transplantation. *Transplant Proc* 2005; **37**: 3712-3715.
- 31 Herrero-Fresneda I, Torras J, Vidal A, Lloberas N, Cruzado JM, Grinyo JM. Reduction of postischemic immune inflammatory response: an effective strategy for attenuating chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2005; **79**: 165-173.
- 32 Sacks SH, Zhou W. Locally produced complement and its role in renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2003; **3**: 927-932.
- 33 Pratt JR, Basheer SA, Sacks SH. Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection. *Nat Med* 2002; **8**: 582-587.
- 34 Sacks S, Zhou W. New boundaries for complement in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**: 1865-1869.
- 35 Linfert D, Chowdhry I, Rabb H. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. *Transplant Rev (Orlando)* 2009; **23**: 1-10.
- 36 Jang HR, Ko GJ, Wasowska BA, Rabb H. The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney. *J Mol Med* 2009; **87**: 859-864.
- 37 Burne-Taney MJ, Ascon DB, Daniels F, Racusen L, Baldwin W, Rabb H. B cell deficiency confers protection from renal ischemia reperfusion injury. *J Immunol* 2003; **171**: 3210-3215.
- 38 Xu H, Yan J, Huang Y, Chilton PM, Ding C, Schanie CL *et al*. Costimulatory blockade of CD154-CD40 in combination with T-cell lymphodepletion results in prevention of allogeneic sensitization. *Blood* 2008; **111**: 3266-3275.
- 39 Andreaskos E, Foxwell B, Feldmann M. Is targeting Toll-like receptors and their signaling pathway a useful therapeutic approach to modulating cytokine-driven inflammation? *Immunol Rev* 2004; **202**: 250-265.
- 40 Andrade CF, Waddell TK, Keshavjee S, Liu M. Innate immunity and organ transplantation: the potential role of toll-like receptors. *Am J Transplant* 2005; **5**: 969-975.
- 41 Land WG. The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation. *Transplantation* 2005; **79**: 505-514.
- 42 Weiler M, Kachko L, Chaimovitz C, Van Kooten C, Douvdevani A. CD40 ligation enhances IL-15 production by tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**: 80-87.
- 43 Kirkiles-Smith NC, Mahboubi K, Plescia J, McNiff JM, Karras J, Schechner JS *et al*. IL-11 protects human microvascular endothelium from alloinjury *in vivo* by induction of survivin expression. *J Immunol* 2004; **172**: 1391-1396.
- 44 Lai PC, Smith J, Bhangal G, Chaudhry KA, Chaudhry AN, Keith Jr JC *et al*. Interleukin-11 reduces renal injury and glomerular NF-kappa B activity in murine experimental glomerulonephritis. *Nephron Exp Nephrol* 2005; **101**: e146-e154.
- 45 Curti A, Ratta M, Corinti S, Girolomoni G, Ricci F, Tazzari P *et al*. Interleukin-11 induces Th2 polarization of human CD4(+) T cells. *Blood* 2001; **97**: 2758-2763.
- 46 Malyszko J, Malyszko JS, Pawlak K, Wolczynski S, Mysliwiec M. Apelin, a novel adipocytokine, in relation to endothelial function and inflammation in kidney allograft recipients. *Transplant Proc* 2008; **40**: 3466-3469.
- 47 Klein MJ, Baxter GF. Apelin reduces myocardial reperfusion injury independently of PI3K/Akt and P70S6 kinase. *Regul Pept* 2008; **146**: 271-277.
- 48 Masri B, Morin N, Cornu M, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB J* 2004; **18**: 1909-1911.
- 49 Han S, Wang G, Qi X, Englander EW, Greeley Jr GH. Involvement of a Stat3 binding site in inflammation-induced enteric apelin expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; **295**: G1068-G1078.
- 50 Tiani C, Garcia-Pras E, Mejias M, de Gottardi A, Berzigotti A, Bosch J *et al*. Apelin signaling modulates splanchnic angiogenesis and portosystemic collateral vessel formation in rats with portal hypertension. *J Hepatol* 2009; **50**: 296-305.
- 51 Kim SH, Zukowski K, Novak RF. Rapamycin effects on mTOR signaling in benign, premalignant and malignant human breast epithelial cells. *Anticancer Res* 2009; **29**: 1143-1150.
- 52 Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T *et al*. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; **55**: 713-723.
- 53 Herrero-Fresneda I, Torras J, Cruzado JM, Condom E, Vidal A, Riera M *et al*. Do alloreactivity and prolonged cold ischemia cause different elementary lesions in chronic allograft nephropathy? *Am J Pathol* 2003; **162**: 127-137.

Supplementary Information accompanies the paper on Gene Therapy website (<http://www.nature.com/gt>)

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

ARTICLE 3

**Silencing CD40 slows the progression of
experimental autoimmune nephritis**

E. Ripoll, A. Merino, M. Goma, JM. Aran, N. Bolaños, I.
Herreo-fresneda, L. de Ramon, O. Bestard, JM.
Cruzado, JM. Grinyó, J.Torras.

Article 3: Silencing CD40 slows the progression of experimental autoimmune nephritis

Objectius:

L'objectiu d'aquest article era posar a punt l'administració sistèmica del siRNA, i avaluar el paper de CD40 en un model de nefropatia crònica i de caràcter autoimmune com és el cas de la nefropatia lúpica. Per fer-ho es va dissenyar prèviament un model de sobre expressió de CD40 administrant LPS per posar a punt l'administració sistèmica. Es va canviar la formulació del siRNA utilitzat prèviament, al tractar-se d'una malaltia sistèmica que afecta varis òrgans es va dissenyar un siRNA modificat químicament amb modificacions que li proporcionaven protecció a la degradació i se li va conjuguar una molècula de colesterol, fet que millorava l'entrada a la cèl·lula. En el model de nefritis lúpica es van utilitzar ratolins NZB/W F1 i es van fer diferents grups de tractament: *untreated* (no tractat), CYP: grup tractat amb ciclofosfamida 50mg/kg cada 10 dies, CTLA4: grup tractat amb CTLA4 i.p 50µg 3 cops per setmana, siCD40-1w: grup tractat amb siRNA anti CD40 50µg 1 cop per setmana i siCD40-2w: grup tractat amb siRNA anti CD40 50µg 2 cops per setmana. Els animals es van començar a tractar als sis mesos i es van sacrificar als nou mesos.

Resultats *in vitro*:

Transfecció del siRNA a cèl·lules dendrítiques (DC).

El cultiu de cèl·lules dendrítiques derivades del moll d'os té una durada de 8 dies obtenint un 90% de puresa. Per establir un protocol de transfecció del siRNA i introduir-lo a les cèl·lules dendrítiques es va utilitzar un siRNA marcat amb Cy5.5. Es va comparar dues formulacions diferents de la molècula (ambdues a una concentració de 2 µM), la primera consisteix en un siRNA nu (siRNA-Cy5.5), i l'altre serà la molècula modificada químicament, se li afegixen modificacions per millorar l'entrada cel·lular (unió a un colesterol) i

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

modificacions de protecció en front a les RNAses (fosforotioat i 2'O Metil RNA) (Chol-siRNA-Cy5.5)

L'expressió de CD40 a les cèl·lules dendrítiques és inhibida per la molècula siRNA.

Un cop establerta la millor formulació es va avaluar la capacitat d'inhibició del siRNA a DC estimulades amb LPS (12h). Els resultats mostren que les DC no estimulades, independentment del siRNA administrat, no modifiquen l'expressió de CD40, en canvi, quan les cèl·lules són estimulades amb LPS augmenten aquesta expressió. Les que van ser tractades amb siRNA anti CD40 observem una reducció del 35% de l'expressió d'aquest gen respecte a les cèl·lules control o tractades amb siRNA scrambled

Determinació del mecanisme del siRNA. 5'RACE PCR.

Es va determinar mitjançant la tècnica 5'RACE PCR que la molècula siRNA induïa el seu efecte degut a la degradació del mRNA diana, i no per altres possibles efectes *off-target*. Es va obtenir cDNA a partir de 5ug de mRNA de ronyons tractats amb siRNA amb un primer *primer* específic dissenyat (GSP1:5'GCCGACTGGGCAGGGATGACAGACG3'). Posteriorment es va afegir una cua TdT als fragments resultants de la primera PCR, per detectar els productes resultants de la activitat de la molècula siRNA es va utilitzar un segon *primer* (GSP2:5'AGCCAGGGATACAGGGCGTGTGC3') i un *primer* complementari a la cua TdT. Mitjançant un gel d'agarosa del 2% tenyit amb bromur d'etidi es van revelar els fragments amplificats. Es va poder demostrar, doncs que el siRNA degrada el mRNA diana pel lloc indicat (se sap que una molècula siRNA inicia el tall del mRNA diana entre els nucleòtids 10 i 11 de la cadena *antisense*).

Resultats model LPS:

Cinètica d'expressió renal i hepàtica de CD40 induït per LPS i avaluació de la capacitat d'inhibició del siRNA anti CD40.

Es va administrar 5ug de LPS ip. (O111:B4) a diferents animals i es van sacrificar diferents grups en diferents dies per analitzar la cinètica d'expressió de CD40 en front a aquest estímul (Figura 1a). Es va observar un augment de

l'expressió de CD40 tant a ronyó com a fetge (20 i 35 vegades més respectivament) passades 4 hores de l'administració de LPS, i aquesta expressió retornava a valors normals en ronyó al cap de 24 hores; es va observar que en fetge l'expressió de CD40 es mantenia elevada fins 48h després de l'administració. Un cop caracteritzada la cinètica de CD40 es van fer grups d'animals tractats amb 50µg de siRNA anti CD40 o siRNA scrambled i.p, aquest es va administrar una hora abans d'administrar LPS i el animals es van sacrificar quatre hores després. Els resultats mostraven que l'expressió de CD40 en ronyó es mantenia reduïda un 65% aproximadament els tres primers dies i aquesta reducció es perllongava progressivament fins als 5-7 dies (Figura 1b). A nivell hepàtic s'observava un patró similar amb un reducció del 60%. Com a control es va analitzar l'expressió de TLR4 en els dos grups d'animals i es va veure que l'administració de LPS induïa un augment en l'expressió de 30 vegades i que l'administració del siRNA anti CD40 reduïa aquesta a 12.

Biodistribució del siRNA anti CD40.

Per veure quina distribució tenia aquest siRNA un cop administrat a l'organisme es va sintetitzar conjugat amb un fluorocrom, el Cy5.5. Es van fer diferents grups d'animals als quals se'ls hi va injectar o bé 50µg de siRNA o el fluorocrom sol, tant ip. com iv.; els animals es van sacrificar a diferents temps i es va analitzar la intensitat mitja de fluorescència (MFI) del ronyó, fetge i melsa a un microscopi confocal (Figura 2 i Figura S2). En tots els teixits i punts analitzats es veia un clar augment de la MFI en animals als quals es va administrar siRNA front als que només se'ls va administrar el fluorocrom. Fetge i melsa mostraven una captació major del siRNA que el ronyó, encara que tots tres eren significatius en front al control. Passades 24h de l'administració els nivells de fluorescència ja disminuïen, el pic màxim s'assolia passats 30 minuts o una hora de l'administració i es mantenia estable durant quatre hores. No es van veure diferències significatives entre l'administració intravenosa o intraperitoneal (Figura 2). Un grup reduït de ratolins lúpics

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

també se'ls va injectar el siRNA marcat amb el fluorocrom una hora abans del sacrifici, aquests van mostrar un patró de biodistribució similar (Figura 2b).

Resultats model nefropatia lúpica:

Supervivència animal, proteïnúria, albuminúria i anticossos anti dsDNA: La supervivència es va analitzar pel mètode Kaplan Meier i va ser del 100 % pels grups de CYP, CTLA4 siCD40-2w, 88% per siCD40-1w i 70% pel grup LES al final del tractament. La proteïnúria i albuminúria va augmentar progressivament al grup no tractat, els grups tractats amb CTLA4 i siCD40-1w van mostrar una reducció parcial d'aquest augment progressiu, i els grups tractats amb CYP o siRNA dos cops per setmana mostraven una reducció pràcticament total adquirint valors pràcticament normals de funció renal (Figura 3a). La evolució dels nivells d'anticossos en el grup no tractat també va mostrar un patró similar, va augmentar progressivament amb el temps, el tractament amb CYP va frenar aquest augment des del inici del tractament, els grups tractats amb siRNA mostraven una reducció dosi depenent del nivells d'anticossos, el grup de tractament amb siRNA un cop per setmana va assolir valors similars al grup tractat amb CTLA4, mentre que el grup tractat amb siRNA dos cops per setmana va assolir valors similars als de CYP, significatius tot dos grups comparat al control (Figura 3c).

Histologia i biodistribució.

La histologia del animals supervivents va ser analitzada per un patòleg expert en patologia renal el qual no sabia a quin grup pertanyia cada mostra. Es van analitzar semi-quantitativament (score de 0-3) lesions típiques de nefritis lúpica com són: expansió mesangial, proliferació endocapilar i extracapilar, dipòsits glomerulars, infiltrat intersticial, atrofia tubular i fibrosis intersticial. Els animals no tractats mostraven lesions típiques de la malaltia, com són glomerulonefritis, inflamació intersticial, agregats proteics tubulars, presència d'infiltrat, etc. Tots els grups de tractament presentaven un grau menor de dany histològic (Figura 4). El valor mig de cada grup va ser LES=8, CYP=4.3, CTLA4=1.6, siCD40-1w=3.8; i siCD40-2w=1.6. Cal destacar l'absència de

proliferació extracapilar, infiltrat intersticial, atrofia tubular o fibrosis intersticial al grup tractat amb siRNA dos cops per setmana, que presentava una histologia molt millor que el grup tractat un cop per setmana.

El silenciament de CD40 redueix els dipòsits glomerulars de IgG i C3

Tots els tractaments van reduir els dipòsits glomerulars de IgG respecte al grup no tractat. El grup de CTLA4 i siCD40-2w van tenir valors similars de reducció de dipòsits, que eren inferiors al grup de CYP. Els dipòsits de C3 també van ser reduïts en tots els grups de tractament, en aquest cas els resultats dels grups de CYP i siCD40-2w van ser similars i inferiors als grups tractats amb CTLA4 i siCD40-1w (Figura 5a).

Expressió gènica renal de CD40 i quantificació proteica.

Els resultats mostren una reducció significativa dels valors d'expressió CD40 als grups tractats amb CYP i siCD40-2w comparat amb el grup control i CTLA4 (Taula1). L'expressió de CD40L va disminuir significativament en tots els grups de tractament. La síntesis local del factor del complement C3 va ser reduïda significativament en tots els grups de tractament excepte siCD40-1w. No es mostrava activació significativa de TLR3, TLR4 i TLR9. L'expressió de citosines pro inflamatòries com és IL6 va ser significativament reduïda en tots els grups excepte siCD40-1w. Els components de l'inflamasoma AIM2, NALP3 i IL1b també van ser significativament reduïts en tots els tractaments. L'expressió de FOXP3 i IL10 es va reduir en tots els grups respecte al grup no tractat i particularment al grup CYP. L'apelinina es va veure augmentada només en el grup de siCD40-2w.

Es va semi quantificar l'expressió de la proteïna CD40 als diferents compartiments del ronyó i es va veure una clara reducció en tots els grups de tractament a l'interstici, al glomèrul i al compartiment vascular (Figura 6a).

CD40 soluble iIDO.

La malaltia lúpica provoca un augment de CD40 circulant, al grup de no tractament es veu un clar augment de proteïna CD40 circulant (319 ± 98 versus 76 ± 12 pg/ml en un ratolí sa) que es redueix significativament en tots els grups de tractament (Figura 6b). Els nivells de la proteïna immune moduladora IDO també es van veure reduïts en tots els tractament excepte al grup siCD40-2w (Figura 6c).

Anàlisi de les poblacions limfocitàries a la melsa.

La caracterització de les poblacions limfocitàries es va fer per citometria de flux (Taula 2), es va observar una disminució significativa de la població CD3+ en tots els tractaments, la ratio de les subpoblacions CD4+/CD8+ es va veure reduïda als grups CYP i siCD40-2w. Respecte a la població de cèl·lules B, només el tractament amb CYP va reduir la població (CD19+), tot i que cal destacar que el tractament amb siRNA va provocar una disminució de l'activació (CD19+CD25+CD69+/CD19+CD69+). Aquest fet suggereix que amb el tractament amb CYP aconseguim una reducció de la població general de cèl·lules B, mentre que el bloqueig del senyal de coestimulació redueix la seva activació.

Caracterització de l'infiltrat inflamatori i localització de cèl·lules plasmàtiques secretores de IgG a ronyó.

Es va semi-quantificar i localitzar la presència de cèl·lules plasmàtiques i CD3+. L'infiltrat inflamatori CD3+ al tubulo-interstici es va veure disminuït en tots els grups de tractament excepte en siCD40-1w (Figura 7a), en els grups de CYP i siCD40-2w aquesta disminució era estadísticament significativa respecte el grup no tractat.

La presència de cèl·lules secretores d'anticossos anti dsDNA a ronyó es va analitzar i localitzar amb una tinció contra col·lagen IV i IgG (Figura 7). Al grup sense tractar es van localitzar cèl·lules plasmàtiques a la zona tubulointersticial del còrtex renal, on es localitzen majoritàriament també les

cèl·lules dendrítiques, macròfags i altres cèl·lules inflamatòries. En tots els grups de tractament es va observar una disminució significativa de la presència d'aquestes cèl·lules, particularment els grups tractats amb CTLA4 i siRNA.

SILENCING CD40 SLOWS THE PROGRESSION OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE NEPHRITIS

ABSTRACT

Lupus nephritis (LN) is an autoimmune disorder in which co-stimulatory signals have been involved. Here we tested a cholesterol-conjugated-anti-CD40-siRNA in a model of LPS to check its *in vivo* potency, tissue distribution, and biological effects. Then, we report the effects of Chol-siRNA in an experimental model of mice with established lupus nephritis. Our results show an evident delivery of the compound to renal, spleen and hepatic tissues regardless of administration route (I.V/I.P). The CD40-mRNA suppressive effects of our Chol-siRNA on renal and hepatic tissue were remarkably sustained over a 5-7 days after a single preliminary dose of Chol-siRNA. The intra-peritoneal administration of Chol-siRNA to NZB/WF1 mice resulted in a reduction of anti-DNA antibody titers, and histopathological renal scores as compared to untreated animals. The higher dose of Chol-siRNA prevented the progression of proteinuria as effectively as cyclophosphamide, whereas the lower dose was as effective as CTLA4. Chol-siRNA markedly reduced interstitialCD3+ and plasma cell infiltrates as well as glomerular deposits of IgG and C3. Circulating soluble CD40 and activated splenic lymphocyte subsets were also strikingly reduced by Chol-siRNA. Our data show the potency of our compound for the therapeutic use of anti-CD40-siRNA in human LN and other autoimmune disorders.

1. INTRODUCTION

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a complex autoimmune disorder affecting multiple organ systems including the kidney, skin, lung, heart, hematopoietic system, and the brain. Type IV glomerulonephritis leading to severe proteinuria, chronic renal failure and end-stage renal disease (ESRD) remains one of the most dreaded complications of SLE and is associated with significant morbidity and mortality (1,2).

In lupus nephritis insufficient clearance of apoptotic nucleosomes has been postulated as the likely trigger of a T-cell response leading to the formation of autoantibodies which then bind to the glomerular basement membrane and promote inflammation (3,4). Renal infiltration by B and T-cells, macrophages, and dendritic cells is a prominent feature of progressive LN leading to renal failure (1). Some studies have highlighted the importance of T-cells in stimulating the production of autoantibodies by B-cells in SLE (5). Such stimulatory role by T-cells requires the presence of co-stimulatory signaling dyads, such as CD28/B7 or CD40/CD154, without which B-cells may fail to proliferate or even undergo apoptosis (6,7).

Among the therapeutic armamentarium available to treat LN, cyclophosphamide (CYP) and steroids can effectively delay the progression of renal disease (8,9), although failure to achieve remission has been reported in 18–57% of patients. Furthermore, the long term toxicity of CYP and high-dose steroids discourages their chronic use to maintain disease remission (10).

NZB/W F1 mice spontaneously develop an autoimmune disorder which resembles human SLE (11,12), including the formation of auto-antibodies against multiple epitopes of chromatin and nucleosomes and the presence of haemolytic anemia, proteinuria, and overt nephritis (13,14), thus providing a suitable experimental model in which to test potential new therapeutic

agents. For example, treatment with CTLA4 and a suboptimal dose of CYP has been shown to significantly prolong survival, although without evidence of reduced glomerular immune-complex deposition. Therefore, blocking co-stimulatory signals necessary for T cell activation appears to prevent disease progression in these animals (1,15,16). The co-stimulatory dyad CD40/CD154 (CD40-ligand) has been previously implicated in the pathogenesis of LN and other autoimmune disorders (17,18).

The administration of LPS is known to dramatically enhance CD40 expression (19,20). LPS, a Gram-negative cell wall component recognized by the specific receptor TLR4, is an adjuvant for the adaptive immune response, which up-regulates costimulatory molecules on antigen presenting cells (19). It has been demonstrated that LPS induces CD40 mRNA and protein expression in both murine and human kidney, heart, brain, small intestine and circulating macrophages (19,20) thus providing a uniquely challenging experimental model where to test the potency and durability of effect of our specifically designed CD40-siRNA.

RNA-interference (RNAi) is an evolutive innate cell mechanism of post-transcriptional gene silencing, which has been successfully replicated by the administration of synthetic double-stranded small inhibitory RNA (siRNA). Rapid degradation by exo/endonucleases constitutes a serious challenge to the successful intracellular delivery of siRNAs in vivo and their ultimate biological activity. The in vivo potency of a siRNA is thus largely predicated upon sequence specificity and its stability against nucleases (21,22). The latter can be achieved through chemical stabilization of the backbone with phosphorothioate (PS) and 2'-O-methyl sugar modifications on the sense and antisense strands (23,24), or other chemical modifications. The conjugation of cholesterol to the 3' end of the sense strand by a pyrrolidine linker is also critical to improve cellular uptake. Addition of cholesterol prolongs circulating half live but it does not influence its silencing activity (25). Chemically stabilization or cholesterol conjugation of siRNAs has improved in vitro and in vivo pharmacological and pharmacokinetic properties.

Our group has developed a small inhibitory RNA (siRNA) molecule against murine CD40-mRNA which effectively inhibits its translation into CD40 receptor protein (26). Therefore we here report our experience with a chemically stabilized, cholesterol-conjugated anti-CD40 siRNA (Chol-siRNA) in a model of LPS-induced CD40 up-regulation to assess its potency, distribution and durability of effect following systemic administration. We also focus on the inhibitory effects of our Chol-siRNA CD40 in NZB/W F1 mice with established autoimmune nephritis.

2. METHODS

2.1. CD40-siRNA properties

The CD40-siRNA sequence used in this study has been previously described by our group (siRNA TNFRSF5-3) (26). It consists of a 21-nucleotides sense strand and antisense strand resulting in a two nucleotides overhang at the 3' end of the antisense strand (sense 5'-GUGUGUUACGUGCAGUGACUU-3', antisense 3'-GTCACACAAUGCACGUCACUG-5').

Cholesterol siRNA (Chol-siRNA): The siRNA was chemically stabilized with partial phosphorothioate backbone and 2'-O-methyl sugar modification on the sense and antisense strand, as previously described (25). And, conjugation of a cholesterol molecule to the 3' end of the sense strand of the siRNA molecule by means of a pyrrolidine linker was done (25). Scrambled siRNA (SC) was used as control. The synthesis was carried out by an external manufacturer (Microsynth, Switzerland). To generate siRNAs from RNA single strands, equimolar amounts of complementary sense and antisense strands were mixed and 100% annealed.

Melting point of siRNA molecules was determined using a Jasco V-650 spectrophotometer (Easton, MD, USA) equipped with a Peltier unit. Oligonucleotides strands were annealed at 90°C for 3 minutes and then cooling to 20°C prior to the melting experiment. Samples were heated at linear temperature ramp of 0.5°C/min. Melting temperature was obtained as

the maxima of the first derivative. The melting point of the siRNA without modifications is 79°C and for the Chol-siRNA is 71°C.

2.2. 5'RACE

5' RACE PCR was performed using the 5' RACE system for rapid amplification of cDNA ends kit (Invitrogen, Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions. Total (5µg) mRNA from kidney samples of siRNA treated groups was converted into cDNA using reverse transcriptase and a specific primer (GSP1:5'GCCGACTGGGCAGGGATGACAGACG3'). To detect cleavage products specific cDNA is then directly amplified by PCR using a specific primer (GSP2: 5'AGCCAGGGATACAGGGCGTGTGC3') and an adapter primer complementary to the RNA adaptor that targets the tail region. Amplification products were resolved by agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining.

2.3. Bone marrow preparation and dendritic cell culture

Femurs and tibiae of ICR mice were left in RPMI-1640 medium (Biological Industries, Kibbutz BeitHaemek, Israel). 5×10^6 cells were grown in 5 ml complete medium: RPMI supplemented with Penicillin (100U/ml, Reactiva, Almeria, Spain), Streptomycin (100 µg/ml, Reactiva), L-glutamin (2µM, Reactiva), 10% heat inactivated and filtered FBS and 20ng/ml GM-CSF (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. On day 3, 5 and 8 medium was removed and fresh complete medium was added. The percentage of immature dendritic cells was 15%, 48% and 90% respectively.

2.4. DC activation and siRNA transfection

At day 8 two sets of independent experiments were done; one of them to evaluate the transfection of CD40 siRNA molecules: dendritic cells were incubated with nude unmodified siRNA-Cy5.5 or Chol-siRNA-Cy5.5 at 2 µM.

The other set aimed to evaluate siRNA in vitro activity: cells were incubated with nude Chol-siRNA or scrambled siRNA at 2 μ M. At day 9 DCs were stimulated with 10ng/ml LPS (serotype O111:B4, Sigma, Madrid, Spain). After 12h of LPS stimuli, cells were analyzed by flow cytometry using a BD FACS Cantoll Cytometer and analyzed by FACS DIVA software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). To characterize the phenotype we used the following antibodies: anti-CD11c (clone HL3) and anti-CD11b (clone M1/70) and anti CD40 (clone HM40-3) and their respective isotype controls. All antibodies were provided by BD Biosciences, conveniently titrated, mixed together and formulated for optimal staining performance.

2.5. Mice, study design and follow up

For biodistribution analysis, six to eight week old male ICR animals (experimental protocols are detailed in Supplementary materials), and for lupus studies, NZB/NZW F1 female mice were used (The Jackson Laboratory, Charles River, Spain). The experiments were carried out in accordance with current EU legislation on animal experimentation and were approved by our institutional Ethics Committee for Animal Research. Mice were housed in a constant temperature room with a 12-hour dark/12-hour light cycle, and were given free access to water and a standard laboratory diet.

Six-month old NZB/NZW F1 mice were divided into the following five groups: CYP (n=9) intraperitoneal CYP, 50mg/kg every 10 days; CTLA4 (n=9) intraperitoneal CTLA4 (ORENCIA, abatacept, Bristol Myers Squibb, Spain) 50 μ g thrice weekly; siCD40-1w (n=9) intraperitoneal CD40-siRNA 50 μ g once weekly; siCD40-2w (n=8) intraperitoneal CD40-siRNA (Microsynth, Switzerland) 50 μ g twice weekly. Untreated (n=11) untreated. No scrambled siRNA was used in this part of the study because we previously demonstrated its no effect either in in vitro and LPS in vivo studies. Mice were treated for 12 weeks.

Body weight was determined twice monthly from the beginning to the end of follow-up. Mice were placed in metabolic cages to collect 24h urine

specimens before the onset of treatment and monthly thereafter. Blood was obtained from the tail vein at monthly intervals. Kidneys were processed for histological and biochemical studies at the end of the study or at death. The spleen was collected, weighted and used to extract splenocytes.

Six additional animals from the untreated group were administered I.P and I.V with Chol-SiRNA Cy5.5 labeled to determine organ biosdistribution of our siRNA in lupus disease.

2.6. Proteinuria, albuminuria and renal function

24h-urinary protein was determined by pyrogallol red and creatinine concentration was determined by Jaffe's reaction (Olympum Autoanalyzer AU400, Hamburg, Germany) in the Veterinary Clinical Biochemistry Laboratory of Universitat Autònoma de Barcelona.

24h-urinary albumin was determined using a commercially available ELISA KIT (Active motif, Carlsbad, California, USA) according to the manufacturer's instructions. The intensity of the fluorescent signal is directly proportional to the albumin concentration in the sample.

2.7. Anti-DNA antibodies

Levels of anti-DNA antibodies were measured, using a commercially available ELISA kit (Alpha Diagnostic International, San Antonio, Texas, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.8. RNA extraction, RT and gene expression analysis: Quantitative real-time PCR (qPCR):

For molecular studies, the kidney was immediately snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. RNA was extracted from kidney animals with PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, Spain) according to the manufacturer's instructions. All samples had an $A_{260/280}$ ratio < 1.8 purity. RNA was stored at -80°C. A total amount of 500ng of RNA was used to do the reverse transcription using the High-Capacity cDNA reverse Transcription Kit (Applied

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

Biosystems) following the manufacturer's instructions. Negative controls for reverse transcription were carried out using distilled water.

Tissue expression of immune-inflammatory mediators were quantified by TaqMan real-time PCR (ABI Prism® 7700, Applied Biosystems, Spain) using the comparative CT method (Applied Biosystems, Spain). Taqman gene expression assays used were purchased from Applied Biosystems: CD40 (Mm_00441891_m1), IL1b (Mm_01336189_m1), NLRP3 (Mm_00840904_m1), Apelin (Mm00443562_m1), C3 (Mm01232779_m1), CD40L (Mm00441911_m1), CD55 (Mm00438377_m1), FOXP3 (Mm00475165_m1), IL6 (Mm99999064_m1), IL10 (Mm00439614_m1), MCP1 (Mm00441242_m1), RANTES (Mm01302428_m1) TLR3 (Mm00628112_m1), TLR4 (Mm00445273_m1), TLR9 (Mm00446193_m1), AIM2 (Mm01295719_m1) and Eukaryotic 18S (431941E) as endogenous control. Controls, which were composed of distilled water, were negative for target and reference genes.

2.9. Plasma ELISA for CD40 and IDO in lupus nephritis

CD40 protein and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) was determined in plasma samples at the end of the study using the commercially available ELISA kit RayBio® Mouse CD40/TNFRSF5 (Raybiotech, Norcross, Atlanta, GA, USA) and ELISA kit for IDO (Uscn Life Science, Wuhan, China) according to manufacturer's instructions.

2.10. Phenotypic spleen population analysis by flow cytometry

Spleen was collected in PBS, the splenocytes isolated by Ficoll® (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) density gradient and cryo-preserved at -180°C. For quantifying the percentage of different populations, cells were thawed, washed and recovered by standard methods. 2×10^5 splenocytes for tube were incubated in the dark (25 min, RT) with antibodies. Study of populations was performed by using a BD FACS Cantoll Cytometer and analyzed by FACS DIVA software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). To characterize the different cell

populations we used an anti-CD19 (clone 1D3), anti-CD69 (clone H1.2F3), anti-CD25 (clone PC61), anti-CD3 (clone145-2C11); anti-CD4 (clone RM4-5), anti-CD8 (clone 53-6.7), anti-CD11c (clone HL3) and anti-CD11b (clone M1/70). All antibodies were provided by BD Biosciences, conveniently titrated, mixed together and formulated for optimal staining performance.

2.11. Renal lupus histopathology

For histopathological studies, 1–2mm thick coronal slices of kidney were fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin. For light microscopy 3–4µm thick tissue sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and periodic acid-Schiff.

For determine the extent of renal damage, all renal biopsies were analyzed by two blinded pathologists. Typical glomerular active lesions of lupus nephritis were evaluated: mesangial expansion, endocapillary proliferation, glomerular deposits, extracapillary proliferation and interstitial infiltrates, as well as tubulo-interstitial chronic lesions: tubular atrophy and interstitial fibrosis. Lesions were graded semi-quantitatively using a scoring system from 0 to 3 (0 _ no changes, 1 _ mild, 2 _ moderate, 3 _ severe). Finally, a total histological score (HS) was derived from the sum of all the described items.

Paraffin tissue sections were stained for CD40 (Abcam, Cambridge, UK) and CD3 (Abcam, Cambridge, UK). Sections were de-parafined and hydrated. The sections were blocked and immunoperoxidase-labelled using a Vectastain ABC kit and the avidin biotin blocking kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) according to manufacturer's protocol. Peroxidase conjugated antibodies staining was followed by diaminobenzidine substrate development (Sigma, Madrid, Spain). To quantify CD40 expression a semi quantitative score from 0 to 3 in the different compartments of the kidney (glomeruli, vessels and interstitium) was used. For quantifying CD3 expression at least 15 high-power fields were counted and the mean value was expressed.

2.12. Renal immunofluorescence in biodistribution studies and lupus nephritis

Slices of kidney were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in Tissue Tec OCT compound (Sakura, Netherlands) and stored at -80°. Five-micrometer cryostat sections were used for confocal microscopy to quantify the mean fluorescence intensity of siRNA-Cy5.5 or Cy5.5 fluorochrome with Leica software. At least 10 high power fields from each organ were counted.

For analysis of IgG and C3 deposition, fluorescent staining of cryo-sections were used. Sections were directly stained with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich, Spain), and FITC conjugated C3 (Nordic Immunology, Netherlands). For analysis of C3 and IgG deposition at least 10 glomeruli were visualized and photographed with an immunofluorescence confocal microscope (Leica TCS-SL spectral). Fluorescence was quantified with Leica software and expressed as mean fluorescence intensity.

For the localization and quantification of interstitial plasma cells paraffin sections were stained with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich, Spain) and rabbit anti mouse collagen-IV (Chemicon international, Temecula, CA). Sections were incubated with primary antibodies Col-IV and IgG in goat serum overnight. Staining was visualized with a secondary chicken anti goat Alexa 488 and a goat anti rabbit Alexa 546 (Invitrogen, Madrid, Spain). For quantification of plasma cells at confocal microscopy, a semi quantitative score of distribution from 0 to 3 was used.

2.13. Statistical analysis

Data are expressed as mean±SEM. Overall survival was analyzed by the Kaplan-Meier method. One-way analysis of variance (ANOVA) with *post hoc* tests was performed to compare proteinuria and anti-dsDNA antibodies throughout the follow up. To compare histological data, the non parametric Kruskal-Wallis test was used. P value <0.05 was considered significant.

3. RESULTS

3.1. Determination of siRNA CD40 in vivo mechanism of cleavage

To prove that the in vivo activity was due to siRNA-directed cleavage, we characterized specific mRNA cleavage products using a 5'-RACE technique. As it relates to the specific cleavage of CD40 mRNA by Chol-siRNA, total RNA from mice was isolated from renal tissue, and then PCR and agarose gel were used to reveal fragments of the predicted length in those animals with lupus nephritis receiving chol-siRNA (Figure S1). This demonstrates that cleavage occurred at the predicted position for the siRNA duplex, ten nucleotides downstream of the 5' end of the siRNA antisense strand.

3.2. The DCs were efficiently transfected by siRNA.

The efficacy of siRNA was examined using Cy5.5 labeled siRNAs to establish a protocol for siRNA transfection in DCs. siRNA molecules had a 100% of bioavailability in dendritic cells (data not shown); and as seen in figure S2, Chol-siRNA-Cy5.5 had a significantly higher MFI (mean fluorescence intensity) than unmodified siRNA. To evaluate cell viability after gene transfection, DCs were stained with propidium iodide. No mortality was found due to the siRNA transfection.

3.3. Chol-siRNA inhibited CD40 expression in DCs.

To investigate the effect of siRNA transfection on the expression of CD40 gene, we used LPS to induce DC maturation and CD40 overexpression. The cell surface CD40 was analyzed by flow cytometry 12h after LPS stimuli. The results showed that the unstimulated DC, independently of the siRNA treatment, does not change CD40 expression. When cells were stimulated with LPS, only DC treated with Chol-siRNA decreased 35% the CD40 expression respect to the control and SC group. (Fig.1).

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

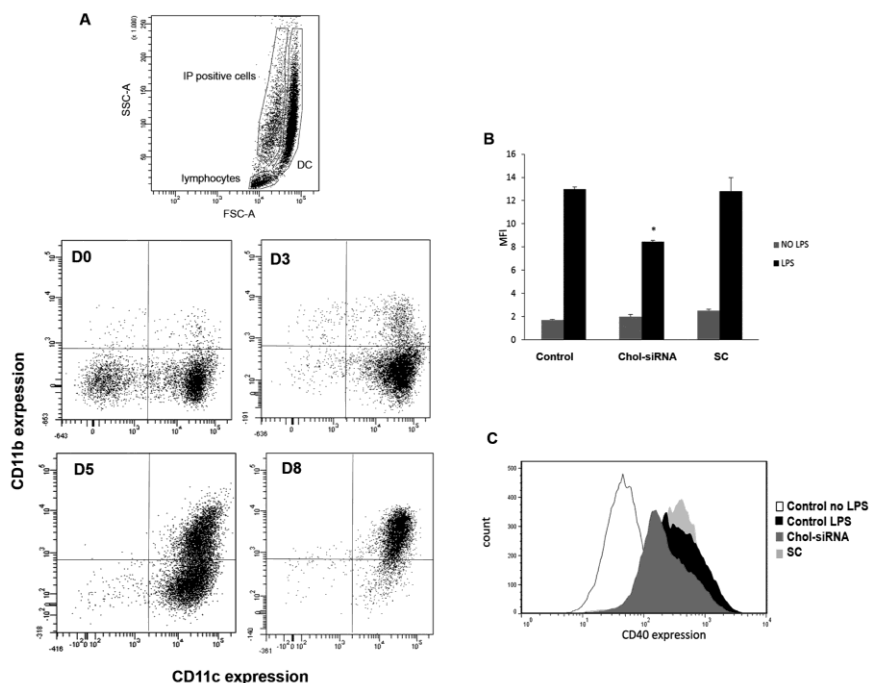


Fig1. Representative flow cytometry analysis of DC culture. A) DC culture development. Lymphocytes (CD3+) and death cells (IP positive) were discarded. DC were backgated using a FSC-A/SSC-A dot plot. Subsequently, CD11c and CD11b expression were assessed in DC population using CD11c APC/CD11bPE dot plot. B) Dendritic cells with and without LPS stimuli and transfected with Chol-siRNA or SC siRNA were analyzed by flow cytometry (MFI). C) Representative histograms for each group of treatment. Data are expressed as mean \pm SEM of four separate experiments. *p<0.05 vs control.

3.4. Kinetics of renal and hepatic CD40-mRNA expression after LPS injection and inhibitory effects of Chol-siRNA.

Fig.2a illustrates the time-course and magnitude of CD40-mRNA over expression after LPS injection in kidney and liver. Groups of animals received an injection of 5 μ g of LPS I.P. at day zero and were sacrificed at the indicated time points. Renal and hepatic CD40-mRNA expression was nearly 20 and 35-fold higher than control, respectively, 4 hours after LPS injection. Renal CD40-

mRNA expression returned towards control values within 24 hours after LPS injection, whereas it remained elevated for approximately 48 hours in the liver.

Animals received 50µg of Chol-siRNA or SC I.P. on day zero and then received LPS injections 4hr, 1, 3, 5, 7, 9, 11, and 14 days afterwards. Animals were sacrificed 4 hours after the LPS injection. Mice receiving 50µg of SC siRNA and no-siRNA animals served as control.

Renal CD40-mRNA expression was reduced by approximately 65% during 3 days post Chol-siRNA administration compared to both controls (no siRNA and SC group), and persisted for up to 5-7 days (Fig.2b), so SC siRNA had no effect on CD40 gene expression. Hepatic CD40-mRNA expression was maximally reduced for 4h and 1 day (60%) but a reduction from control values persisted for 5-7 days following Chol-siRNA administration. As a control, TLR4 mRNA was activated by LPS injection. Chol-siRNA reduced over-expression of TLR4 LPS-induced (30,1 and 12,1 folds respectively). Additional delivery and safety siRNA properties are detailed in supplementary material.

Silenciament gènic de CD40 en al-lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

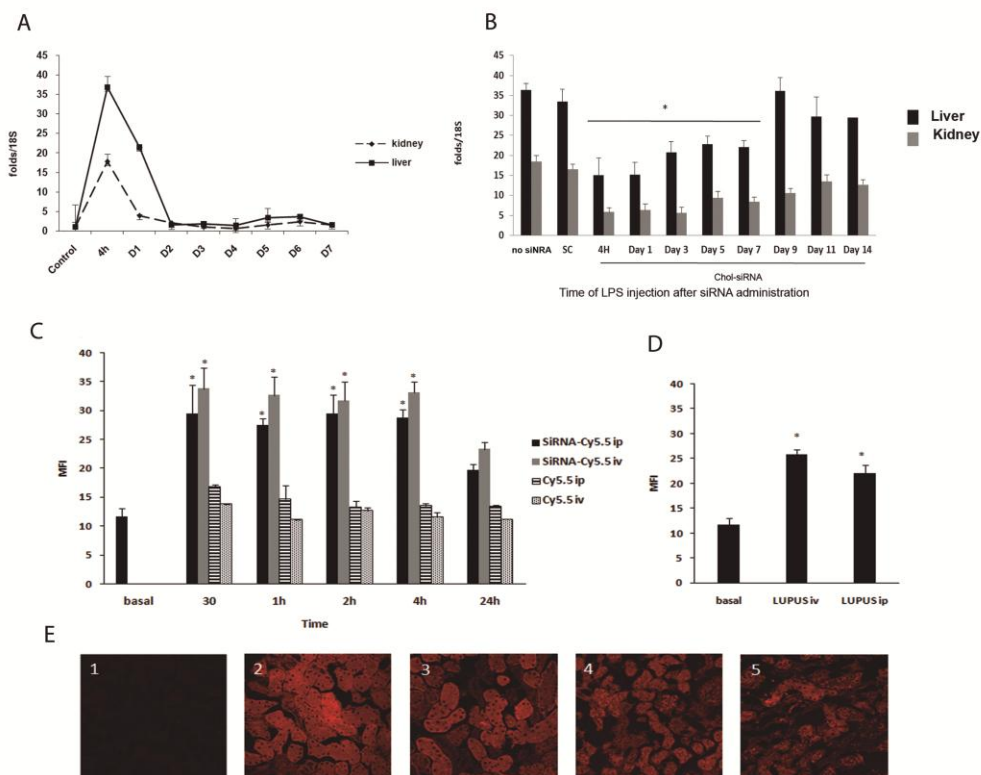


Fig2. Experiments with LPS to set up systemic siRNA administration. A) Kinetic of CD40 expression in liver and kidney after LPS injection. B) Pharmacodynamic evaluation of Chol-siRNA. Two control groups using LPS, with and without scrambled siRNA, are shown. Data are expressed as mean \pm SEM of four separate experiments. * $p < 0.05$ vs LPS. C) Quantification of renal internalization of Chol-siRNA administered I.V/I.P in ICR mice and D), in lupus mice. E) Representative kidney photomicrographs (x400) of 1- Basal auto fluorescence, 2- ICR mice I.V, 3- ICR mice I.P, 4- lupus mice I.V, 5- lupus mice I.P. Data are expressed as mean \pm SEM of four separate experiments. * $p < 0.05$ vs basal.

3.5. Tissue biodistribution of CD40 Chol-siRNA

Renal tissue fluorescence at the indicated time-points following the administration of Chol-siRNA-Cy5.5 or Cy5.5 alone I.V. and I.P are depicted in Fig.2c. In all tissues, and at all time-points up to 24 hours, fluorescence intensity was higher with Cy5.5-labelled Chol-siRNA-Cy5.5 than with Cy5.5 alone. Notably, the liver showed higher fluorescence intensity than kidney and spleen (Fig. S4). Renal and spleen fluorescence remained stable over a 4 h period with a decrease at 24 h, whereas it decreased over time in liver following peak values at 30 minutes to 1 hr. Renal fluorescence was also higher after I.V. than I.P. administration at 30 minutes and 1hr time-points whereas the reverse was seen in the liver. No discernible difference between the two routes of administration was observed in the spleen. Renal fluorescence was predominantly localized in the whole kidney early on (30 minutes to 1h) but followed a more tubular distribution pattern thereafter (Fig.2e)

3.6. Animal survival, proteinuria and albuminuria, anti dsDNA antibodies in lupus nephritis

Cumulative survival analyzed by Kaplan-Meier method was 100% for the CYP, CTLA4 and CD40-2w groups; 88% for the CD40-siRNA-1w group, and 72% for the untreated group at the end of the follow up.

Proteinuria and albuminuria (not shown) increased progressively in untreated mice to levels of heavy proteinuria (around 300 mg/kg) though the mortality, proteinuria levels continued to increase; (Fig.3a). The CTLA4 and siCD40-1w groups showed no increase in proteinuria or albuminuria until week 28, but to a lesser extent than the untreated group. Mice treated with CYP or siCD40-2w showed no increase in either parameter, or even a mild reduction in proteinuria over time to levels almost physiological.

IgG anti-dsDNA antibody levels increased steadily in untreated group (Fig.3b). As expected, CYP slowed down the production of antibodies. Chol-siRNA

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

produced a dose dependent reduction of antibodies. Treatment of mice with siRNA once per week partially reduced antibodies, similarly as CTLA4 treatment. The levels in the CYP and siCD40-2w groups were significantly lower from untreated at week 36 ($p < 0.05$).

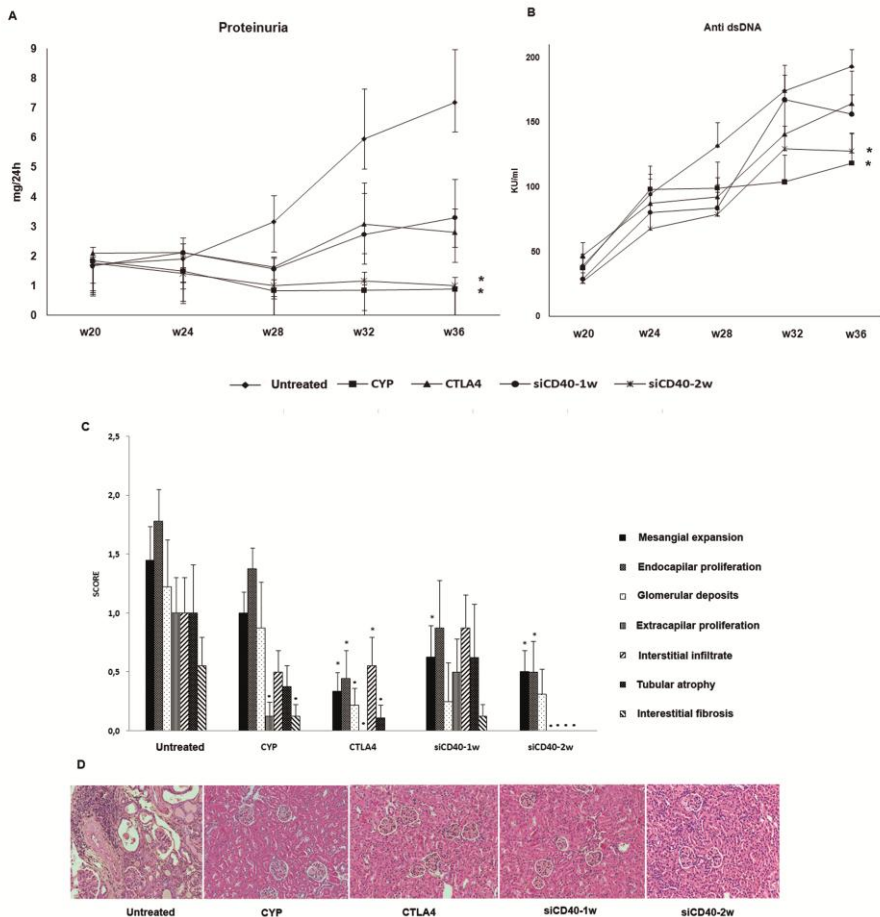


Fig3. Proteinuria, anti dsDNA antibodies and renal histopathology. A) 24h-Proteinuria increased progressively in non treated mice to levels of heavy proteinuria. Treatment with CYP or siRNA anti CD40 twice per week induced a progressive reduction of proteinuria to levels almost physiological. B) Anti dsDNA antibodies

increased progressively in non treated mice; siRNA anti CD40 twice per week reduced this production more effectively than CTLA4 or siCD40-1w group. C) Costimulatory blockade reduced the elementary histological lesions of lupus nephritis. D) Representative photomicrograph (x200) of renal histology for each group. n=9 per group. Data are expressed as mean±SEM * p<0.05 vs untreated, · p<0.01 vs untreated.

3.7. Renal structural effects of CD40 Chol-siRNA in lupus nephritis. CD40 Chol-siRNA biosdistribution

Renal histological analysis was performed in all surviving animals at the end of the study (Fig.3c). Untreated mice kidneys showed lesions consistent with proliferative lupus nephritis, including severe glomerulonephritis, interstitial inflammation, and widespread proteinaceous tubular casts as expected from their severe proteinuria. Histological lesions were less severe in all treated groups. Mean histological scores were as follow: Untreated= 8; CYP= 4.3; CTLA4= 1.6; siCD40-1w= 3.8; and siCD40-2w= 1.6. With regards to individual histological lesions, the siCD40-2w group was remarkable for the absence of extracapillary proliferation, interstitial infiltrates, tubular atrophy, or interstitial fibrosis. This effect was clearly better than mice receiving siRNA once a week.

Additional lupus mice that received Chol-siRNA Cy5.5 labeled one hour before the sacrifice, showed a similar biodistribution than in the LPS study (Fig.2d). Thus in the kidney the fluorescence intensity doubled the basal value.

3.8. CD40 silencing reduces IgG and C3 glomerular deposits

IgG glomerular immunostaining was reduced by all treatments as compared to untreated untreated animals (Fig. 4a). Both CTLA4 and siCD40-2w produced similar reductions in IgG immune-fluorescence scores, which were lower than in the CYP group. C3 deposits were also reduced in all treatment groups, although in this case scores in the CYP and siCD40-2w were lower than in the CTLA4 and siCD40-1wgroup. (Fig.4a)

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

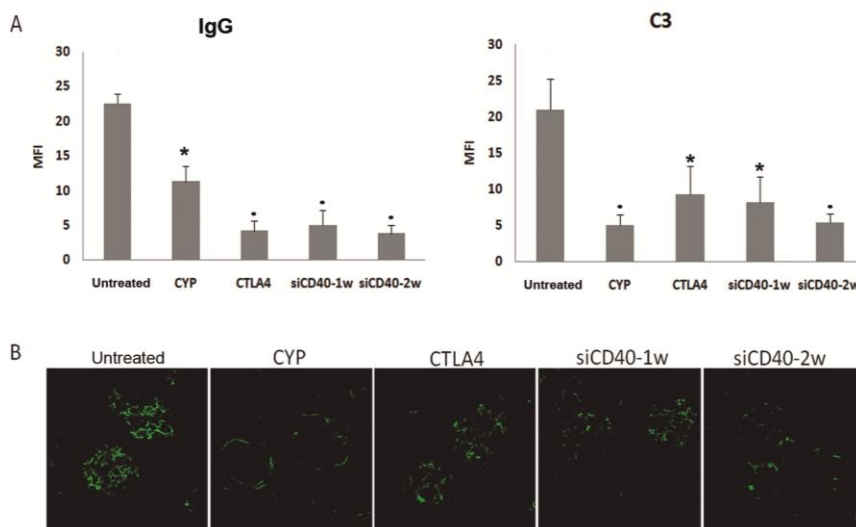


Fig4. Immunohistochemical analysis for renal IgG and C3. A) Deposits of renal IgG and C3 were quantified with confocal microscopy (MFI). All treatments reduced glomerular deposits. B) Representative photomicrographs of C3 deposits (x630) for each group. n=9 per group. Data are expressed as mean±SEM. * p<0.05 vs untreated, · p<0.01 vs untreated.

3.9. Renal gene expression and CD40 protein analysis after silencing in lupus nephritis

Gene expression analysis (Table1) showed a statistically significant reduction in CD40 expression with CYP and siCD40-2w compared to the untreated and CTLA4 groups. All treatment groups produced a significant reduction in CD40L compared to untreated (except siCD40-1w).

CD3 gene expression, as a manifestation of local complement synthesis, was significantly reduced by in all treatment groups except siCD40-1w and mirrored the results of glomerular C3 deposition analysis. There was no evidence of activation of TLR3, TLR4 and TLR9 expression in any treatment group as compared to untreated values. Pro-inflammatory cytokine gene expression, such as IL6, was again significantly reduced in all treatment

groups except siCD40-1w. Gene expression of the inflammasome components AIM2, NALP3 and IL1b was significantly reduced in all treatment groups. AIM2 is an inflammasome component known to be a sensor for dsDNA and an activator of caspase 1. Gene expression corresponding to the immunomodulatory mediators FOXP3 and IL10 was significantly reduced in all treatment groups, particularly CYP. However siCD40-2w did not reduce its gene expression as strongly as CYP. siCD40-2w was the only treatment which up-regulated the expression of apelin, as previously shown by our group (27).

The presence of CD40 protein in various renal tissue compartments was quantified by immune-staining (Fig.5a). Significant reductions were observed in the interstitial, glomerular, and vascular compartments in all treatment groups as compared to untreated, where high amounts were present in all three compartments. siCD40-2w especially reduced CD40 protein in interstitial cells and vessels.

Fold/18S	CD40	CD40L	C3	CD55	TLR3	TLR4	TLR9	FOXP3
LES	1,37 ± 0,1	5,3 ± 1,4	47,3 ± 14,1	1,02 ± 0,08	1,7 ± 0,1	2,9 ± 0,4 ^b	8,2 ± 1,1 ^b	34,8 ± 6,4
CYP	0,55 ± 0,1 ^{a,c}	1,7 ± 0,3 ^a	10,5 ± 0,9 ^a	0,74 ± 0,04 ^a	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,7 ± 0,1	7,2 ± 1,3 ^a
CTLA4	1,17 ± 0,2	2,8 ± 0,5 ^a	18,8 ± 4,8 ^a	0,79 ± 0,08 ^a	1,4 ± 0,1	1,9 ± 0,2 ^a	5,1 ± 1,1 ^b	20,3 ± 5,6 ^{a,b}
siCD40-1w	1 ± 0,3	3,8 ± 0,3 ^b	38,8 ± 14,6 ^b	0,81 ± 0,04 ^a	1,6 ± 0,1	2,5 ± 0,3 ^b	7,1 ± 0,9 ^b	24,6 ± 2,6 ^b
siCD40-2w	0,6 ± 0,2 ^{a,c}	2,2 ± 0,4 ^a	16,3 ± 3 ^a	0,62 ± 0,07 ^a	1,7 ± 0,1	2,5 ± 0,3 ^b	7,4 ± 1,6 ^b	20,9 ± 3,8 ^{a,b}
P	0,0251	0,004	0,03	0,01	0,17	0,02	0,0009	0,0034
Fold/18S	IL10	IL6	MCP1	RANTES	AIM2	NLRP3	IL1b	APELIN
LES	90,9 ± 20,5	9,3 ± 3,6	9,3 ± 1,9 ^b	9,3 ± 1,3 ^b	11,3 ± 2,2	2,7 ± 0,4	11,9 ± 2,1	6,2 ± 0,9 ^d
CYP	6,1 ± 2,1 ^a	0,7 ± 0,15 ^a	2 ± 0,2	1,9 ± 0,3	1,4 ± 0,2 ^a	0,6 ± 0,2	1,8 ± 0,3	6,3 ± 0,4 ^d
CTLA4	34,8 ± 9,3 ^a	3,3 ± 0,9 ^a	5,9 ± 1,7	7,4 ± 2,5	4,6 ± 1,1 ^a	2,08 ± 0,3	6,5 ± 1,7	6,2 ± 0,4 ^d
siCD40-1w	44,1 ± 9,6 ^{a,b}	6,1 ± 2,5 ^b	7,3 ± 1,9 ^b	9,6 ± 3 ^b	7,9 ± 1,9 ^{a,b}	1,5 ± 0,4	8,8 ± 1,6	5,5 ± 0,4 ^d
siCD40-2w	35,45 ± 12,9	1,8 ± 0,3 ^a	6,5 ± 1,2 ^b	7,8 ± 1,7	4,9 ± 1,0 ^a	1,3 ± 0,7	1,9 ± 1,0	12,1 ± 1,1
P	0,0005	0,024	0,039	0,09	0,0046	0,019	0,0007	0,0001

Table 1. Kidney gene expression. Our Chol-siRNA specifically knocked-down CD40 expression. Complement activation, inflammasome and innate immunity gene expression was reduced. a vs control, n=9 per group. Data are expressed as mean ± SEM. a vs control, b vs CYP, c vs CTLA4, d vs siCD40-2w. p<0,05.

3.10. Circulating CD40 and IDO protein in lupus nephritis

Lupus nephritis induced an increase in circulating CD40 protein (319 ± 98 versus 76 ± 12 pg/ml in ICR mice). Circulating levels of CD40 protein (Fig.5b) were significantly reduced ($P=0.019$) in all treatment groups as compared to the high levels observed in the untreated group. Circulating levels of the adaptive immune-modulatory IDO protein (Fig.5c) were also significantly reduced ($P=0.035$) in all treatment groups except siCD40-2w where the difference from untreated did not reach statistical significance.

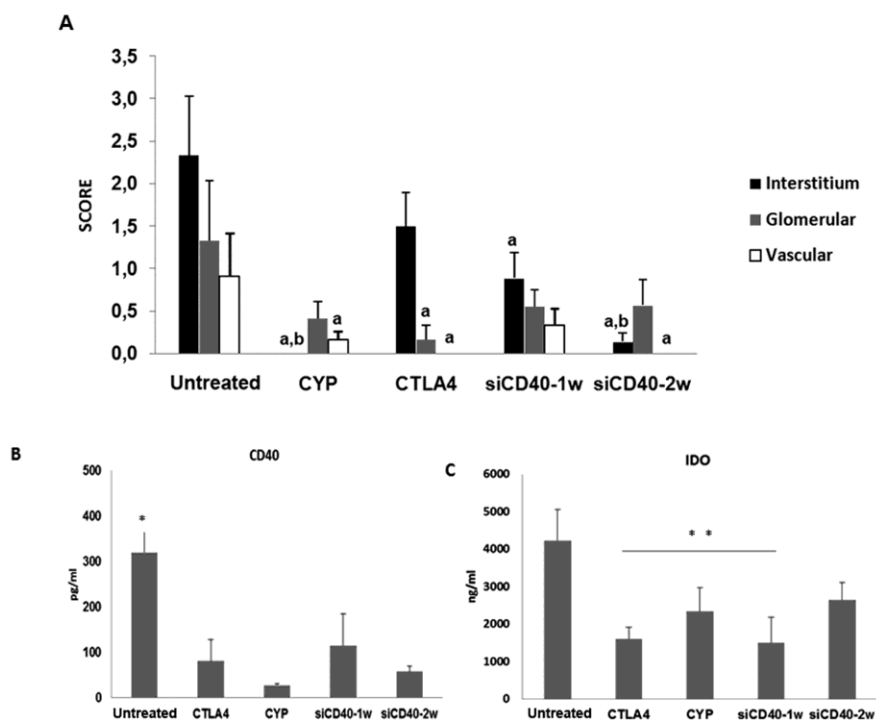


Fig. 5. Local CD40 immunostaining and circulating CD40 and IDO proteins. A) Immune localization and quantification of CD40 protein in different kidney compartments, Chol-siRNA reduced CD40 protein, especially in interstitial cells and vessels. B) CD40 serum quantification, lupus nephritis promoted over-expression of CD40 protein C) IDO serum quantification, this immune modulatory protein was

reduced in all therapies. n=9 per group. Data are expressed as mean±SEM. * p<0.05 vs all treatments; ** p<0,05vs untreated.

3.11. Analysis of splenic lymphoid cell subsets in lupus nephritis

Spleen weight was higher than normal in untreated group animals and was significantly reduced in the CYP and siCD40-2w treatment groups (data not shown).

Phenotypic characterization of splenic lymphocytes by flow cytometry (Table2) showed a significant reduction in CD3+ cells in all treatment groups, whereas activated CD3 subpopulations, as well as the CD4+/CD8+ ratio, where significantly reduced only by CYP and siCD40-2w.

With regards to CD19+ B-cells, only CYP caused a reduction whereas early B-cell activation markers (CD19+CD25+CD69+ & CD19+CD69+) showed a significant reduction only in both CD40-siRNA groups. This suggests that, while CYP can reduce overall B-cell populations, it does not affect their activation process whereas costimulation blockade reduces early B cell activation but not overall B cell population.

%GROUP	CD3+	CD3+CD25+	CD3+CD69+	CD4+	CD8+	CD4/CD8
LES	42,6 ± 2,1	15,1 ± 1,1 ^b	24,3 ± 2,7 ^b	74,4 ± 2,4 ^b	18,6 ± 2,1 ^b	4,2 ± 0,6
CTLA4	31,1 ± 1,2 ^a	15,1 ± 1,4 ^b	24,6 ± 3,3 ^b	73,8 ± 2,2 ^b	16,6 ± 1,5 ^b	4,7 ± 0,6 ^b
CYP	34,2 ± 1,6 ^a	10,4 ± 0,5	16,1 ± 1,3	63,5 ± 2,3	28,1 ± 2,6	2,4 ± 0,3
siCD40-1w	32,1 ± 1,9 ^a	14,9 ± 1,4 ^b	26 ± 2,5 ^b	74,4 ± 2,2 ^b	16,9 ± 2,1 ^b	4,8 ± 0,6 ^b
siCD40-2w	31,1 ± 1,5 ^a	12,4 ± 1,4	20,8 ± 2,8	69,3 ± 2,4	21,9 ± 2,6	3,6 ± 0,5
P	0,0011	0,0034	0,004	0,017	0,011	0,037
%	CD11b+	CD11c+	CD19+	CD19+CD25+	CD19+CD69+	CD19+CD25+CD69+
LES	10,5 ± 1,1	10,1 ± 1,1	39,5 ± 3,7	9,8 ± 0,9	10,6 ± 2,5	3,2 ± 0,7
CTLA4	13 ± 0,9 ^b	10,6 ± 0,6	43,2 ± 0,8 ^b	7,8 ± 0,5	7,2 ± 0,4	2,3 ± 0,2
CYP	8,3 ± 0,5	11,8 ± 0,7	31,7 ± 2,1	10 ± 0,8	7,2 ± 1,1	2,7 ± 0,5
siCD40-1w	12,8 ± 1,7 ^b	11,8 ± 1,7	37,8 ± 4,6	8 ± 0,7	6,2 ± 1,1	1,6 ± 0,3 ^a
siCD40-2w	9,8 ± 0,8 ^c	9,4 ± 0,6	39,7 ± 2,1	8,1 ± 1,5	4,1 ± 1,1 ^a	1,1 ± 0,3 ^{a,b}
P	0,02	NS	NS	NS	NS	NS

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

Table 2. Immunomodulation of spleen cell population (%). The frequency of auto reactive B cell was diminished with CYP treatment, CD40 silencing reduced early B cell activation but not overall B cell population. n=9 per group. Data are expressed as mean±SEM. a vs control, b vs CYP, c vs CTLA4, p <0,05.

3.12. Characterization of cell infiltrates and localization of IgG-secreting plasma cells in the kidney

Infiltrating CD3+ cells in the tubule-interstitium space were significantly reduced in all treatment groups except siCD40-1w (Fig.6a); more particularly in the CYP and siCD40-2w groups where scores were significantly lower than in the CTLA4 and siCD40-1w groups.

The presence of anti-dsDNA antibody secreting plasma cells in the kidneys of patients with lupus nephritis has been previously reported (28). Thus, we performed a double immune-staining of renal tissue with anti-collagen-IV (red in Fig.6c) and anti-IgG (green in Fig.6c). In untreated animals, plasma cells were mainly observed in the tubule-interstitium of the renal cortex where dendritic cells, macrophages, and other inflammatory cells are commonly found (28). A significant reduction in IgG immune-fluorescence was observed in all treatment groups, particularly in the CTLA4 and both CD40-siRNA groups (Fig. 6b).

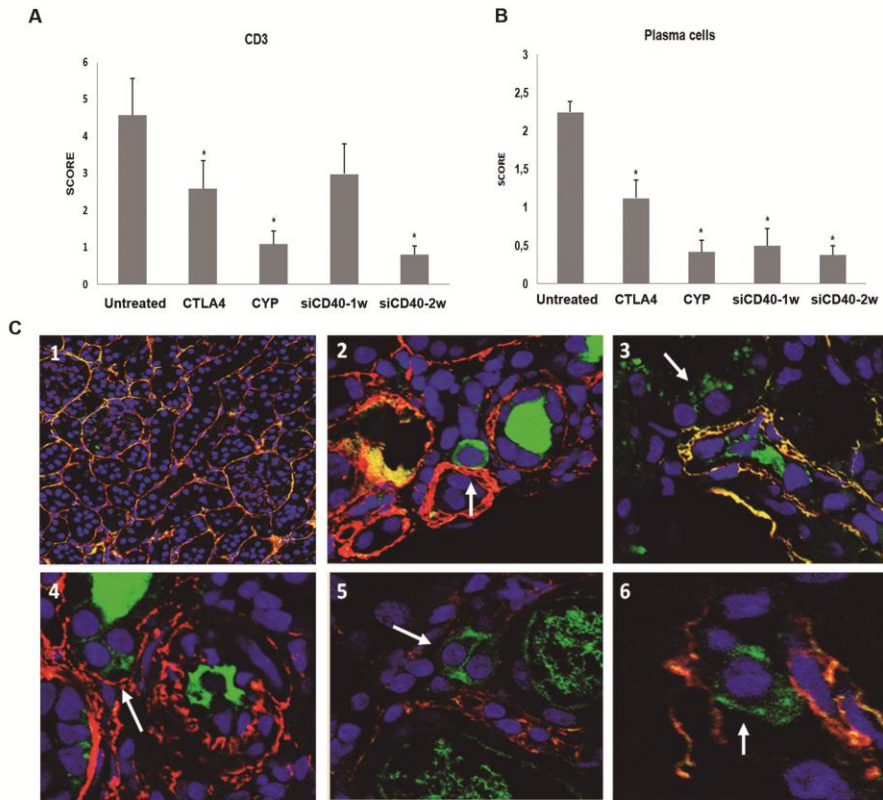


Fig. 6. Kidney cell infiltrate characterization and plasma cell localization. A) CD3 presence was semi quantitatively graded B) Plasma cells were semi quantitatively graded and localized in the tubule-interstitium of renal cortex. C) 1. Representative photomicrograph (x400) of siCD40-2 group. Note the absence of plasma cells. 2-6. Photomicrographs (x630) of plasma cell localization in untreated group (arrows). n=9 per group. Data are expressed as mean±SEM. * p < 0.05 vs untreated.

4. DISCUSSION:

Our data from a well-recognized experimental murine model of autoimmune nephritis shows that interfering with the expression of the co-stimulatory molecule CD40 with a selective siRNA results in improved animal survival and halting of the disease process, as illustrated by the complete absence of progressive proteinuria. These clinical-like effects in mice were accompanied

by significantly reduced circulating anti-dsDNA antibody titers, a hallmark of the disease, and renal histo-pathological lesions to a degree which was surprisingly comparable to those obtained with cyclophosphamide. Our data also show highly concordant reductions in intra-renal cellular (T-cells, plasma cells) and non-cellular (CD40 protein expression, IgG and C3 deposits) inflammatory components with obvious pathogenesis implications.

First of all we chose LPS-induced CD40-mRNA up-regulation as a particularly challenging model where to test the potency of our Chol-siRNA. There, our data show that LPS induces large increases in CD40-mRNA expression in both liver and kidney tissue which can be significantly reduced by a single dose of Chol-siRNA. Its suppressive effect is remarkably long-lasting in both liver and kidney (5-7 days), particularly so in the latter where it remains unabated for the first 3 days. Interestingly, the biodistribution fluorescence studies showed an excellent internalization into those parenchyma where to exert an anti CD40 modulation, like kidney, liver and spleen. Even though the I.V. route of administration appears to provide higher early peaks of fluorescence intensity in the parenchyma, there is no discernible difference with the I.P. route with regards to its persistence over time. The I.P. route offers, of course, many practical advantages over the I.V. route of administration.

The CD40-CD154 co-stimulatory dyad plays a central role in the development of immune-inflammatory disease processes (6,29) and it has been clearly implicated in experimental and human sepsis (30). Even though our LPS-induced experimental model of CD40 up-regulation is not a sepsis model in itself, our data suggest that, at a minimum, CD40 RNA-interference through the use of a powerful and selective CD40-siRNA may approach the pathogenesis of septic syndromes. Finally, the absence of stimulatory effects on the innate immune response through TLR activation on animals receiving the Chol-siRNA, further shows the safety of siRNA administration.

Disruption of CD40 signaling offers the potential of being therapeutically useful in autoimmune inflammatory disorders or in the prevention of allograft

rejection (26). Blocking monoclonal antibodies against CD40L have reached the clinical testing stage but their development has been halted due to athero-thrombotic complications in study subjects (17,18). CTLA4 has been previously tested in NZB/W F1 mice with autoimmune nephritis where it was shown to be able to prevent the appearance of the disease (15,16,31) but not induced its remission (9,10). Cyclophosphamide has been in use for decades to treat SLE and LN, but its short and long term toxicity and relatively low effectiveness in preventing disease relapse (10) has made its use progressively less prevalent, as more than 50% of patients with lupus nephritis relapse within two years after cessation of therapy.

Besides cyclophosphamide, we included in our experimental design CTLA4, a blocker of B7-mediated co-stimulatory pathways, which in spite of showing various degrees of activity in several assays, was only as powerful as a single weekly dose of CD40-siRNA in halting the progression of proteinuria, clearly a sub-therapeutic dose when compared to the effects of the bi-weekly CD40-siRNA dosing regimen.

SLE is characterized by excessive activation of both B and T lymphocytes, as well as abnormalities in B-cell activation, signaling, and migration (32, 33). In this study we found a decrease in the frequency of spleen auto reactive B cells in mice treated with CYP compared with aged untreated mice. Costimulatory blockade with our siRNA anti CD40 did not modify the frequency of B cells, but in contrast, it prevented early activation of spleen autorreactive B and T cells. It could be speculated that reduction of dsDNA antibodies in siRNA treated mice is probably due to the modulation of B-cell rather than an antiproliferative effect. Effective CD40 RNA-interference appears also to produce systemic effects consistent with reduced overall immune system reactivity as illustrated by reductions in circulating CD40 and IDO proteins or activated splenic B-cell sub-populations.

Recently, antibody secreting cells were found within the inflamed kidneys in experimental as well as human SLE (28, 34, 35). In our study we confirmed the

presence of plasma cell within the renal interstitium of lupus non treated mice; their presence was diminished in siRNA CD40 treated groups. These data may suggest that our siRNA exerts an intense local effect on plasma cell nidation, added to the systemic benefit on B-cell activation.

The complement system plays a dual role in the pathogenesis of LN (36, 37). On the one hand, it exerts a protective function by helping the removal of immune complexes and apoptotic cells; on the other, it can be a significant contributor to renal inflammation and tissue injury. It is known that kidney contributes to the circulating pool of C3, approximately for 9% of the total circulating protein (38). In our study siRNA anti CD40 treated mice showed an important down regulation of glomerular C3 deposits. In addition the reduction of C3 gene expression in the kidney in siRNA twice per week informs that CD40 gene silencing also reduces the local synthesis of complement. In vitro studies with HUVEC stimulated with Jurkat cells showed that siRNA CD40 modulates complement regulatory proteins as well as pro-inflammatory cytokines (27). Apart from complement modulation, pro-inflammatory cytokine IL6 as well infiltrating T-cells were reduced as an effect of CD40 silencing thus suggesting a modulation of subsequent local inflammatory response.

Gene expression analysis corroborated the reduced CD40 and inflammatory cytokines in renal tissue without evidence of toll-like receptor activation. This is a pathway for innate immune system activation of potential concern with the use of siRNAs, particularly with regards to TLR3 which normally becomes activated in the presence of extracellular dsRNA and induces the secretion of IFN and inflammatory cytokines (39-43). Our transcriptional profiling data in *in vitro* studies suggested that T-lymphocyte–HUVEC cross-talk through CD40 signalling alerts the endothelial cells viral innate immune surveillance system by up-regulating key sensors of viral infection: TLR3, recognizing extracellular dsRNA (27). In our study, the expression of TLR9 was expectedly increased in non treated animals, and was dramatically reduced by cyclophosphamide but not CTLA4 or CD40-siRNA, suggesting that, in contrast to cyclophosphamide,

co-stimulatory blockade does not impair innate immunity through this pathway in spite of the observed decrease in renal T-cells, plasma cells, and inflammatory cytokines.

Neither CTLA4 nor CD40-siRNA significantly reduced the expression of the immune-modulatory tissue mediator FOXP3 or IL10, both of which were markedly reduced by cyclophosphamide. Nowadays there is still controversy concerning the role of immunomodulatory mechanisms, regularly assessed by IL10, FOXP3 or IDO. In this sense, FoxP3 has been found to be up-regulated in renal acute rejection, with a minimal modulatory effect. However that FoxP3⁺Treg within tubulointerstitial infiltrates in clinically stable renal grafts is indicative of harmless and tolerance rather than detrimental effect (44). Thus, we may argue that CD40 silencing apart to reduce the CD3 infiltration it leads to a sort of local and circulating milieu of tolerance.

5. CONCLUSIONS:

In conclusion, our data strongly supports the potential therapeutic effects of selective CD40 blockade as a powerful form of immune deactivation in the inflamed kidney of animals with spontaneous autoimmune nephritis akin to human lupus nephritis, particularly when treatment is instituted during the early phases of the disease. It remains to be seen whether disease remission could be achieved through CD40 RNA-interference initiated during the established phase of the disease, since patients with lupus nephritis often present with established proteinuria and severe renal inflammation.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III/FIS (PS09/00897, PS09/00107, PI10/2991), European Union Grant SYSKID Framework Programme 7 (FP7). Nuria Bolaños is a technician from 'Contratos de tecnico de apoyo en el sistema nacional de la salud' financed by ISCIII. Elia Ripoll was a fellowship from IDIBELL. Josep M. Aran is a researcher from 'Programa Estabilización Investigadores' financed by ISCIII and Dpt. Salut Generalitat Catalunya, and Ana Merino was supported by a contract from

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

Instituto de Salud Carlos III, programa Sara Borrell. We thank Cristian Varela and Serveis Científico-Tècnics (UB, Campus Bellvitge) for technical support. Dr. Ramon Eritja kindly performed the melting point study. We are especially indebted to Placid Grino for his valuable reading of the manuscript. The authors declare no conflict of interest.

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Biodistribution Experimental protocols

We conducted four series of experiments as follows:

In the first set of experiments we analyzed the kinetics of CD40-mRNA expression in various tissues after I.P. LPS injection (5µg in 200 µl normal saline, Escherichia Coli LPS serotype O111:B4, Sigma Aldrich, Madrid, Spain). Animals were euthanized at various time points: 4h, day 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7.

In a second group of experiments, we compared the efficacy of scrambled siRNA I.V, Chol-siRNA (administered either I.V. or I.P) and Jet-Pei siRNA I.V two hours before administering LPS. We analyzed CD40-mRNA expression in various tissues 4 hours after LPS injection.

Thirdly, we assessed the effects of single I.P dose of CD40 Chol-siRNA on kidney and liver CD40-mRNA levels. Animals were sacrificed at the following time points: 4h, days 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 14, after 4 hours of I.P. administration of LPS.

Fourthly, we examined the biodistribution of Cy5.5-labelled CD40-siRNA (Chol-siRNA-Cy5.5) in kidney, liver and spleen after I.V. and I.P. administration. Control animals were injected with Cy5.5 fluorochrome and evaluated at the same intervals.

SUPPLEMENTARY RESULTS***Effects of Chol-siRNA or Jet-Pei-SiRNA on renal and hepatic LPS-induced CD40-mRNA expression***

Jet-Pei-siRNA: 50ug of the siRNA molecule without chemical modification was formulated with the cationic polymer transfection reagent jet-PEI.

Chol-siRNA (either I.V. or I.P.) and jet-PEI-siRNA (I.V.) were injected two hours before LPS administration. Animals were sacrificed four hours after LPS administration and their tissues were snap-frozen. Chol-siRNA was effective in reducing CD40-mRNA levels through the I.P. and I.V (70% reduction in kidney, 60% in liver) route, predominantly in the kidney (Figure S3). Thus, we selected Chol-siRNA for further distribution and lupus experiments.

Tissue biodistribution of CD40 Chol-siRNA

Renal (see results), hepatic and splenic tissue fluorescence at the indicated time-points following the administration of Chol-siRNA-Cy5.5 or Cy5.5 alone I.V. and I.P are depicted in Figure S4. In all tissues, and at all time-points up to 24 hours, fluorescence intensity was higher with Cy5.5-labelled Chol-siRNA-Cy5.5 than with Cy5.5 alone.

SUPPLEMENTARY FIGURES

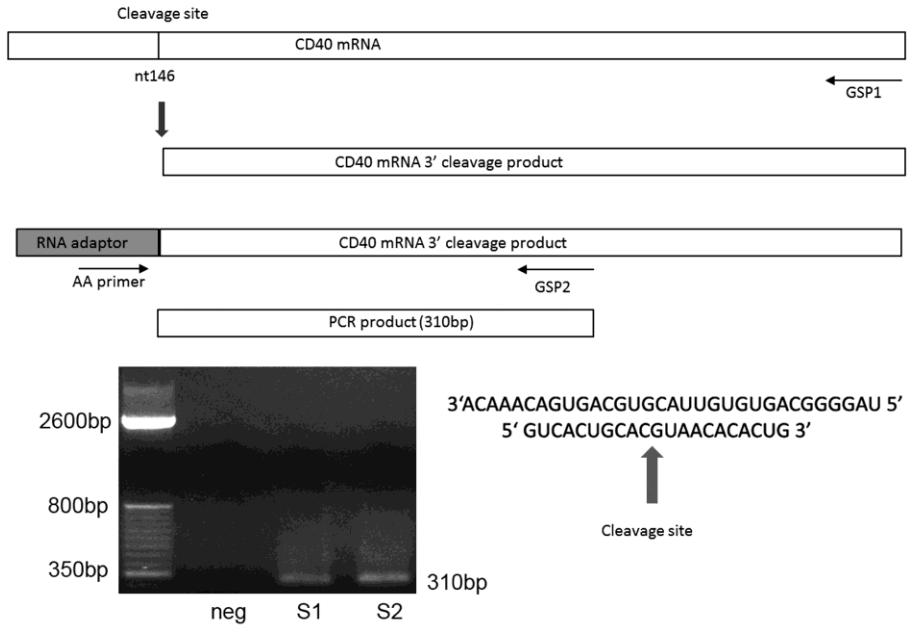


Figure S1

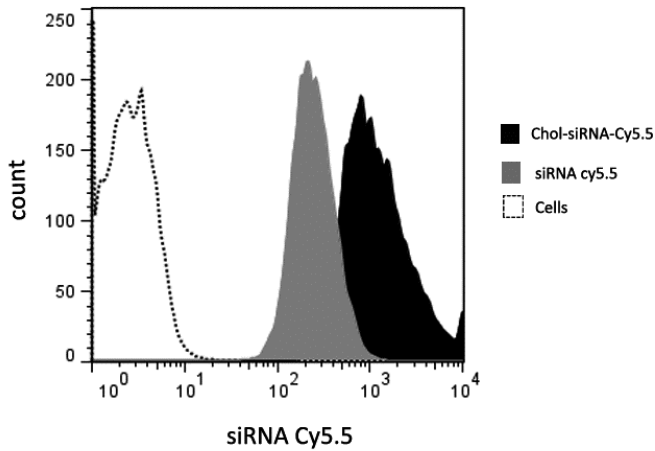


Figure S2

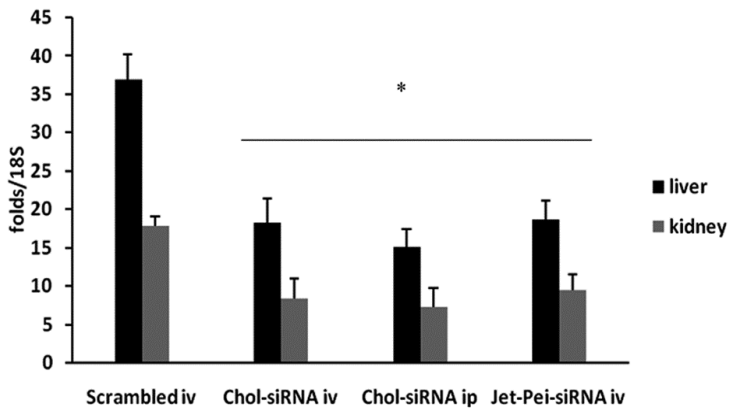


Figure S3

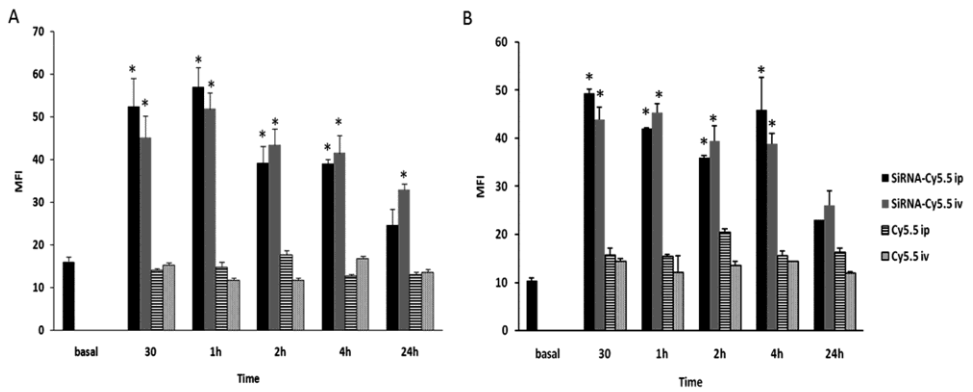


Figure S4

REFERENCES

1. Bagavant, H., Fu, S.M. 2009. Pathogenesis of kidney disease in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*, 21: 489-94.
2. Robson, M.G., Walport, M.J. 2001. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Allergy*, 31: 678-85.
3. Berden, J.H. 2003. Lupus nephritis: consequence of disturbed removal of apoptotic cells? *Neth J Med*, 61: 233-8.
4. Davidson, A., Aranow, C. Lupus nephritis: lessons from murine models. *Nat Rev Rheumatol*, 6: 13-20.
5. Connolly, K., Roubinian, J.R., Wofsy, D. 1992. Development of murine lupus in CD4-depleted NZB/NZW mice. Sustained inhibition of residual CD4+ T cells is required to suppress autoimmunity. *J Immunol*, 149: 3083-8.
6. Grewal, I.S., Flavell, R.A. 1998. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol*, 16: 111-35.
7. Davidson, A., Wang, X., Mihara, M., Ramanujam, M., Huang, W., Schiffer, L., Sinha, J. 2003. Co-stimulatory blockade in the treatment of murine systemic lupus erythematosus (SLE). *Ann N Y Acad Sci*, 987: 188-98.
8. Russell, P.J., Hicks, J.D., Burnet, F.M. 1966. Cyclophosphamide treatment of kidney disease in (NZB x NZW) F1 mice. *Lancet*, 1: 1280-4.
9. Cunnane, G., Chan, O.T., Cassafer, G., Brindis, S., Kaufman, E., Yen, T.S., Daikh, D.I. 2004. Prevention of renal damage in murine lupus nephritis by CTLA-4lg and cyclophosphamide. *Arthritis Rheum*, 50: 1539-48.
10. Ioannidis, J.P., Boki, K.A., Katsorida, M.E., Drosos, A.A., Skopouli, F.N., Boletis, J.N., Moutsopoulos, H.M. 2000. Remission, relapse, and re-remission of proliferative lupus nephritis treated with cyclophosphamide. *Kidney Int*, 57: 258-64.
11. Sang, A., Yin, Y., Zheng, Y.Y., Morel, L. Animal models of molecular pathology systemic lupus erythematosus. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 105: 321-70.
12. Huston, D.P., Steinberg, A.D. 1979. Animal models of human systemic lupus erythematosus. *Yale J Biol Med*, 52: 289-305.
13. Borchers, A., Ansari, A.A., Hsu, T., Kono, D.H., Gershwin, M.E. 2000. The pathogenesis of autoimmunity in New Zealand mice. *Semin Arthritis Rheum*, 29: 385-99.
14. Hahn, B.H. 2001. Lessons in lupus: the mighty mouse. *Lupus*, 10: 589-93.
15. Schiffer, L., Sinha, J., Wang, X., Huang, W., von Gersdorff, G., Schiffer, M., Madaio, M.P., Davidson, A. 2003. Short term administration of costimulatory blockade and cyclophosphamide induces remission of systemic lupus erythematosus nephritis in NZB/W F1 mice by a mechanism downstream of renal immune complex deposition. *J Immunol*, 171: 489-97.

16. Wang, X., Huang, W., Mihara, M., Sinha, J., Davidson, A. 2002. Mechanism of action of combined short-term CTLA4lg and anti-CD40 ligand in murine systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 168: 2046-53.
17. Kawai, T., Andrews, D., Colvin, R.B., Sachs, D.H., Cosimi, A.B. 2000. Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. *Nat Med*, 6: 114.
18. Robles-Carrillo, L., Meyer, T., Hatfield, M., Desai, H., Davila, M., Langer, F., Amaya, M., Garber, E., Francis, J.L., Hsu, Y.M. *et al.* Anti-CD40L immune complexes potently activate platelets in vitro and cause thrombosis in FCGR2A transgenic mice. *J Immunol*, 185: 1577-83.
19. Qin, H., Wilson, C.A., Lee, S.J., Zhao, X., Benveniste, E.N. 2005. LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF-kappaB and STAT-1alpha in macrophages and microglia. *Blood*, 106: 3114-22.
20. Vowinkel, T., Wood, K.C., Stokes, K.Y., Russell, J., Kriegelstein, C.F., Granger, D.N. 2006. Differential expression and regulation of murine CD40 in regional vascular beds. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290: H631-9.
21. Layzer, J.M., McCaffrey, A.P., Tanner, A.K., Huang, Z., Kay, M.A., Sullenger, B.A. 2004. In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA*, 10: 766-71.
22. Choung, S., Kim, Y.J., Kim, S., Park, H.O., Choi, Y.C. 2006. Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy. *Biochem Biophys Res Commun*, 342: 919-27.
23. Allerson, C.R., Sioufi, N., Jarres, R., Prakash, T.P., Naik, N., Berdeja, A., Wanders, L., Griffey, R.H., Swayze, E.E., Bhat, B. 2005. Fully 2'-modified oligonucleotide duplexes with improved in vitro potency and stability compared to unmodified small interfering RNA. *J Med Chem*, 48: 901-4.
24. Corey, D.R. 2007. Chemical modification: the key to clinical application of RNA interference? *J Clin Invest*, 117: 3615-22.
25. Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J. *et al.* 2004. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 432: 173-8.
26. Ripoll, E., Pluvinet, R., Torras, J., Olivar, R., Vidal, A., Franquesa, M., Cassis, L., Cruzado, J.M., Bestard, O., Grinyo, J.M. *et al.* In vivo therapeutic efficacy of intra-renal CD40 silencing in a model of humoral acute rejection. *Gene Ther*, 18: 945-52.
27. Pluvinet, R., Olivar, R., Krupinski, J., Herrero-Fresneda, I., Luque, A., Torras, J., Cruzado, J.M., Grinyo, J.M., Sumoy, L., Aran, J.M. 2008. CD40: an upstream master switch for endothelial cell activation uncovered by RNAi-coupled transcriptional profiling. *Blood*, 112: 3624-37.
28. Espeli, M., Bokers, S., Giannico, G., Dickinson, H.A., Bardsley, V., Fogo, A.B., Smith, K.G. Local renal autoantibody production in lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol*, 22: 296-305.
29. Peters, A.L., Stunz, L.L., Bishop, G.A. 2009. CD40 and autoimmunity: the dark side of a great activator. *Semin Immunol*, 21: 293-300.

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

30. Nolan, A., Weiden, M., Kelly, A., Hoshino, Y., Hoshino, S., Mehta, N., Gold, J.A. 2008. CD40 and CD80/86 act synergistically to regulate inflammation and mortality in polymicrobial sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 177: 301-8.
31. Mihara, M., Tan, I., Chuzhin, Y., Reddy, B., Budhai, L., Holzer, A., Gu, Y., Davidson, A. 2000. CTLA4Ig inhibits T cell-dependent B-cell maturation in murine systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*, 106: 91-101.
32. Klinman, D.M. 1990. Polyclonal B cell activation in lupus-prone mice precedes and predicts the development of autoimmune disease. *J Clin Invest*, 86: 1249-54.
33. Odendahl, M., Jacobi, A., Hansen, A., Feist, E., Hiepe, F., Burmester, G.R., Lipsky, P.E., Radbruch, A., Dorner, T. 2000. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 165: 5970-9.
34. Cassese, G., Lindenau, S., de Boer, B., Arce, S., Hauser, A., Riemekasten, G., Berek, C., Hiepe, F., Krenn, V., Radbruch, A. et al. 2001. Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells. *Eur J Immunol*, 31: 2726-32.
35. Starke, C., Frey, S., Wellmann, U., Urbonaviciute, V., Herrmann, M., Amann, K., Schett, G., Winkler, T., Voll, R.E. High frequency of autoantibody-secreting cells and long-lived plasma cells within inflamed kidneys of NZB/W F1 lupus mice. *Eur J Immunol*, 41: 2107-12.
36. Sekine, H., Ruiz, P., Gilkeson, G.S., Tomlinson, S. The dual role of complement in the progression of renal disease in NZB/W F(1) mice and alternative pathway inhibition. *Mol Immunol*, 49: 317-23.
37. Manderson, A.P., Botto, M., Walport, M.J. 2004. The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol*, 22: 431-56.
38. Tang, S., Zhou, W., Sheerin, N.S., Vaughan, R.W., Sacks, S.H. 1999. Contribution of renal secreted complement C3 to the circulating pool in humans. *J Immunol*, 162: 4336-41.
39. Means, T.K., Latz, E., Hayashi, F., Murali, M.R., Golenbock, D.T., Luster, A.D. 2005. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest*, 115: 407-17.
40. Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H., Williams, B.R. 2003. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*, 5: 834-9.
41. Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413: 732-8.
42. Reynolds, A., Anderson, E.M., Vermeulen, A., Fedorov, Y., Robinson, K., Leake, D., Karpilow, J., Marshall, W.S., Khvorova, A. 2006. Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent. *RNA*, 12: 988-93.
43. Leadbetter, E.A., Rifkin, I.R., Hohlbaum, A.M., Beaudette, B.C., Shlomchik, M.J., Marshak-Rothstein, A. 2002. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*, 416: 603-7.

44. Bestard, O., Cruzado, J.M., Rama, I., Torras, J., Goma, M., Seron, D., Moreso, F., Gil-Vernet, S., Grinyo, J.M. 2008. Presence of FoxP3+ regulatory T Cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts. *J Am Soc Nephrol*, 19: 2020-6.

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

V. DISCUSSIÓ

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflamatòria en models animals.

Tots els estudis presentats en aquest treball tenen com a objectiu ampliar el coneixement del gen CD40 i el seu paper en l'activació del sistema immune en malalties amb base inflamatòria. Per estudiar aquest propòsit es va aplicar un silenciament gènic de la via mitjançant la tecnologia RNAi en models experimentals, tant *in vitro* com *in vivo*; en un model de malaltia autoimmune, com la nefritis lúpica, i un de malaltia al·loimmune, com és el cas del rebuig en el trasplantament renal.

Els resultats dels nostres treballs obren una possible futura aplicació terapèutica de la molècula a la clínica. Els resultats obtinguts ens permeten realitzar algunes consideracions, tant de caràcter general com més específicament, que poden facilitar la comprensió dels components inflamatoris que es troben implicats en l'activació del sistema immune i el seu paper en les diferents malalties.

El senyal de coestimulació CD40-CD40L és una via de gran interès en molts estudis ja que se sap que la seva interacció regula diverses altres vies del sistema immunitari [249]. Per tant, és ben conegut que el bloqueig d'aquest senyal com a estratègia terapèutica, per intentar modular l'activació del sistema immune, frena la resposta immunitària i ha servit per tractar diferents malalties.

Des del descobriment del mecanisme RNAi molts estudis experimentals han usat aquesta tecnologia utilitzant siRNAs com a molècules efectores en el tractament de diferents malalties. Actualment hi ha varis estudis clínics basats en siRNA, dirigits contra diverses dianes terapèutiques (<http://clinicaltrials.gov/ct2/home>) que es troben en diferents fases de desenvolupament.

S'estan utilitzant aquest tipus de teràpia contra un ventall de malalties molt ampli, com és el cas de patologies renals, tot tipus de càncer, malalties coronàries, diabetis, dislipèmies, malalties oculars, de la pell, vasculars, congènites, etc. Tot i així, cal destacar que no hi ha cap estudi clínic basat en siRNA contra la molècula CD40. Sí que s'han realitzat diferents assajos clínics

utilitzant anticossos monoclonals contra CD40L, alguns d'aquests assajos es van parar prematurament per problemes trombo-embòlics [250-252].

El nostre primer estudi es va proposar per a veure com afecta la isquèmia freda sobre la funció renal en un model de rebuig agut mediat per anticossos, avaluar com modifica l'estructura molecular, tissular i cel·lular de l'empelt renal. Analitzar també quin paper juga CD40 en aquest procés.

No es saben en profunditat els mecanismes pels quals la isquèmia accelera el rebuig agut i preveu una pitjor evolució de l'empelt. A part dels mecanismes descrits fins ara com són l'activació de TLR, alteració dels antígens HLA, la secreció de citosines inflamatòries i molècules d'adhesió, etc. [160], alguns autors també postulen l'existència d'un dany antígen independent durant el trasplantament d'un òrgan [253]. Els nostres resultats apunten també cap a l'alteració de la barrera de filtració glomerular com a una causa important de deteriorament de l'empelt i la seva evolució.

Es va poder comprovar que la isquèmia provocada en un procés de trasplantament renal augmenta la síntesis de col·lagen IV i el seu dipòsit en la càpsula de Bowman. Altres autors com Utsumi [254] també han observat aquest increment del col·lagen IV a la càpsula de Bowman en mostres humanes després d'un rebuig agut, suggerint també, que aquests canvis es conserven un cop recuperada la funció renal.

Wieczorek [255] va observar una síntesis progressiva de col·lagen en l'evolució del rebuig, tant crònic com agut. La isquèmia també provoca l'activació de la immunitat innata i augmenta l'expressió de CD40. Tots aquests mecanismes i els consecutius mediadors inflamatoris alliberats, indueixen una major amplificació del dany i activació de la resposta immune adaptativa, perpetuant així, el cicle de dany i reparació de l'empelt que podria donar lloc a la seva disfunció crònica.

Un cop posat el model a punt i caracteritzat, tenint en compte el paper del senyal coestimulador CD40 en l'activació de la resposta immune; es va

proposar un segon estudi on es va dissenyar un siRNA anti CD40 específic de rata. L'objectiu principal era estudiar el paper i el potencial terapèutic del fàrmac administrat de forma local, en un model de resposta de tipus al·logènica com és el cas del trasplantament renal. En aquest model en el qual l'administració del fàrmac era local intra-arterial, es va administrar el siRNA acomplexat amb un vector de tipus liposoma (Jet-Pei).

En aquest estudi varem observar que el silenciament local intra-renal, previ al trasplantament, amb siRNA anti CD40 amb una dosi única en un model de rebuig humoral va causar un canvi de patró en el tipus de rebuig. Es va aconseguir reduir els anticossos donant específics de l'hoste després del trasplantament i es va millorar la supervivència. El tractament local de l'òrgan aïllat va aconseguir bloquejar l'expressió gènica de CD40 a l'empelt, donant lloc a un canvi en l'ambient immunològic, els grups de silenciament de CD40 van experimentar un canvi de tipus de rebuig cap a un rebuig cel·lular, més fàcilment abordable des d'un punt de vista terapèutic.

La tecnologia RNAi té múltiples avantatges respecte a altres fàrmacs, ja que és una droga de mida petita i soluble en aigua. La utilització de siRNAs com a molècules efectores s'ha descrit que és més efectiu que altres mecanismes, com ara l'ús d'anticossos o oligonucleòtids anti sentit. L'eficàcia del bloqueig és més potent i el silenciament del gen d'interès és més específic, i alhora reversible [256, 257]. Un altre avantatge és que se sap que la molècula siRNA manté la seva activitat catalítica durant un període llarg de temps [258].

En les fases inicials després d'un trasplantament, es dona un ràpid reconeixement de l'empelt i s'inicien diferents mecanismes de la resposta immuno inflamatòria. En la glomerulopatia del trasplantament es dona un desenvolupament d'anticossos donant específics i també contra els components de la membrana basal glomerular [259, 260].

En el dany tissular també hi convergeixen altres factors com són el complement, dany cel·lular i CD40 [259, 261]. Existeixen diversos estudis experimentals que demostren que el bloqueig del senyal de coestimulació

redueix el grau de rebuig, ja sigui en el trasplantament d'illots pancreàtics [262], de pell, cor [179], de moll d'os [263, 264], etc. Utilitzant anticossos anti CD40L s'han observat efectes notables sobre la supervivència d'empelts i una inducció de tolerància en models de rosegadors.

Altres autors també han observat una reducció de la immunitat humoral amb el bloqueig d'aquest senyal de coestimulació. La resposta immune adaptativa deguda a l'activació de les cèl·lules T i B també és important a l'hora de prevenir la sensibilització als al·loantígens i perllongar la supervivència de l'empelt, Xu H va demostrar que amb el bloqueig sistèmic de CD154 en un model de trasplantament de pell en ratolí, aconseguia modular l'activació de la immunitat humoral [265, 266]. S'ha vist que el bloqueig de CD40 redueix parcialment la resposta de les cèl·lules B, però no és suficient per aturar l'activació de les cèl·lules T [265].

Molts estudis demostren que amb el bloqueig únic de la via CD40/CD40L no s'aconsegueix una supervivència indefinida en models de rebuig, requerint així una altre diana com CD28 [179, 267] o CTLA4 [268-270] per adquirir la supervivència indefinida dels empelts. Tenint en compte que el model que hem utilitzat és un model molt virulent, es va afegir una dosi sub terapèutica de rapamicina, que se sap que per si sola no era suficient per prevenir el rebuig, per intentar millorar la supervivència. Tot i així, la combinació d'aquest fàrmac amb el silenciament de CD40 sí que va ser suficient per retardar significativament el rebuig i perllongar la supervivència en alguns animals.

Cal destacar que alguns ratolins de l'estudi van aconseguir una elevada supervivència amb la combinació dels dos tractaments. Un altre estudi però, demostra una prevenció del rebuig agut en primats no humans bloquejant només el senyal de CD40L [271]. Per tant, podem observar una doble relació de la senyalització de CD40, mitjançant processos dependents o independents d'altres senyals de coestimulació com CD28/B7 [272]. El bloqueig de

Silenciament gènic de CD40 en al·lo i autoimmunitat. Estudi de la resposta immuno inflammatòria en models animals.

CD40/CD40L concomitantment amb el bloqueig de CD28/B7 redueix el rebuig i modula la producció de citosines i la proliferació dels limfòcits T [179, 273].

Molts estudis demostren una reducció dels mediadors inflamatoris, com són la síntesis d'anticossos a limfòcits B, disminució de la sintasa d'òxid nítric a macròfags, derivats del bloqueig de la via CD40.

La histologia dels empelts del grup no tractat mostrava lesions típiques del rebuig humoral com són el dany tubulo intersticial, edema perivascular, hemorràgia, necrosis fibrinoide, denudació endotelial, infiltrat intersticial, etc. La majoria dels empelts del grup de tractament amb siRNA anti CD40 mostraven un patró de rebuig cel·lular. Els animals no tractats tenien dipòsits de complement als capil·lars peritubulars, tant C4d com IgG, mentre que el grup de tractament amb siRNA anti CD40, aquests es van veure reduïts. Una altra evidència de la disminució de l'activació del sistema del complement, a conseqüència del silenciament de CD40, va ser la reducció de l'expressió gènica de proteïnes reguladores de complement, com són CFH i CFI.

Es va confirmar l'aparició d'anticossos donant específics a la majoria d'animals del grup no tractat. Aquests eren absents prèviament al trasplantament, així doncs, hi ha una formació massiva d'aquests degut a una ràpida activació de les cèl·lules B [274-276]. En el nostre estudi, aquest anticossos donant específic es van reduir parcialment en el grup de tractament amb rapamicina, siRNA anti CD40, i al grup de combinació de teràpia.

S'ha descrit que les cèl·lules endotelials de l'òrgan trasplantat presenten un increment de l'expressió de CD40 en una situació de rebuig en comparació amb nivells d'expressió de CD40 d'un teixit normal o en ronyons trasplantats que no han desenvolupat rebuig. Hi ha estudis que demostren l'expressió de CD40 i CD40L en els limfòcits T i macròfags que infiltraven el ronyó, cor i fetge trasplantats durant el rebuig agut [277]. En el nostre estudi vam observar un augment d'expressió de CD40 en cèl·lules tubulars, vasos, i al glomèrul de ronyons no tractats, mentre que en els grups de tractament amb siRNA anti CD40 es va reduir notablement aquesta expressió.

L'estudi d'expressió gènica de CD40 mostra una sobre expressió d'aquest, en els empelts no tractats hi ha un augment 20 vegades superior a un empelt no trasplantat, mentre que els tractats amb siRNA l'expressió es redueix significativament.

La inhibició del senyal de coestimulació CD40, pot interessar diferents tipus cel·lulars. Se sap que el senyal de CD40/CD40L és important en la inducció, activació i funció de les cèl·lules dendrítiques i macròfags, donant lloc a una disminució de la diferenciació de cèl·lules cap a Th1, i augmentant cap a Th2 [257]. Per tant, el bloqueig d'aquesta via pot ser útil en malalties on hi predomina la diferenciació cap a Th1, com és el cas de l'artritis reumàtica [278], l'esclerosi múltiple [279], la diabetis tipus I [280], malalties autoimmunes com és el cas dels lupus eritematos sistèmic [281], la nefritis lúpica [282, 283], etc.

Aquesta via també afecta a l'activació dels fibroblasts, suggerint que la teràpia contra CD40/CD40L pot ser beneficiosa en el tractament de l'esclerodèrmia [284, 285] i sinovitis crònica [286]. Una de les cèl·lules a les quals afecta la unió CD40/CD40L és la cèl·lula endotelial [287]. La teràpia contra aquesta via pot aportar beneficis en malalties vasculares com és la vasculitis [288, 289], granulomatosis de Wegener [290], etc.

Un dels possibles efectes indesitjables derivats de l'ús de molècules siRNA és el fet de que poden activar el sistema immune innat [102, 106]. TLR3 és el receptor que detecta molècules de dsRNA i indueix la secreció de IFN i altres citocines inflamatòries [112, 291, 292]. En els nostres estudis s'ha demostrat que no hi ha una activació de la immunitat innata relacionada amb l'administració del siRNA anti CD40. Descartem llavors que ni la metodologia usada, ni la molècula poden provocar aquesta activació. Per tant, l'absència d'efectes estimulants de la resposta immune innata en els animals que van rebre el siRNA, mostra, la seguretat de l'administració de la molècula.

Així doncs en aquest treball es demostra que el silenciament de CD40 com a tractament local previ a la implantació de l'empelt renal és una estratègia

efectiva i abordable per prevenir el rebuig humoral. Aquest resultat preliminar obren les portes a aplicar aquest tipus de teràpia gènica en altres models de trasplantament o altres malalties inflamatòries o autoimmunes on les cèl·lules B hi tinguin un paper important.

Amb l'interès de modular la resposta immune en una malaltia sistèmica com és el cas del lupus eritematós sistèmic, es va optar per posar a punt l'administració sistèmica del siRNA i amb una formulació diferent, es va decidir no acomplexar la molècula a cap vector de tipus liposoma, sinó que es van introduir un seguit de modificacions químiques a la molècula, per ajudar en l'entrada cel·lular i per protegir-lo de la degradació de les nucleases i fer més resistent el fàrmac.

Així doncs es va proposar un tercer treball l'objectiu del qual era analitzar el paper de CD40 en el model de nefritis lúpica, de caràcter autoimmune. És en la patologia del lupus eritematós sistèmic on les cèl·lules B i la inflamació tenen un paper molt important. Es sap que la malaltia SLE es caracteritza per una activació excessiva del limfòcits T i B, així com per un control, senyalització i migració anormal d'aquests darrers [238].

S'ha vist que els limfòcits de pacients amb malaltia lúpica tenen alts nivells d'expressió de CD40L, donant suport a la hipòtesis que en la patogènesis del SLE, una senyalització inapropiada de CD40-CD40L és un factor important en la patogènesis.

Primerament es va fer un estudi *in vitro* utilitzant un cultiu de cèl·lules dendrítiques derivades de moll d'os. Primer vam comparar l'entrada cel·lular del siRNA modificat químicament amb un siRNA nu sense modificar mitjançant citometria de flux. Vam observar que ambdues molècules tenien un 100% d'entrada, però que el siRNA modificat tenia una MFI més elevada. Per microscòpia confocal vam confirmar una localització citoplasmàtica del siRNA i que l'entrada era ràpida. Posteriorment es va estimular les cèl·lules dendrítiques amb LPS durant 12h i, un cop comprovat que l'estímul fos eficaç, vam observar que el siRNA anti CD40 era capaç d'inhibir de manera evident

l'augment d'expressió de CD40 induït per LPS.

Per conèixer millor l'eficiència de l'administració sistèmica del siRNA, es va escollir un model amb ratolins ICR en el qual vam comprovar la cinètica d'expressió de CD40 després d'un estímul de LPS [293] en diferents teixits. Vam observar que l'estímul de LPS induïa un augment de l'expressió de CD40, tenint un pic màxim passades 4h de la injecció del LPS, i que aquesta tornava a nivells basals en 24-48h. Un cop caracteritzada, es van fer grups de tractament amb el siRNA per valorar el potencial del fàrmac i vam observar que el siRNA era capaç de reduir significativament aquesta expressió durant tres o quatre dies

Es va avaluar la biodistribució del compost injectant un siRNA marcat amb un fluorocrom (Cy5.5) a ratolins ICR i vam observar que la distribució del fàrmac a l'organisme era major en fetge, melsa i ronyó independentment de si l'administració era intravenosa o intraperitoneal, ja que no hi havia diferències entre aquestes. 30 minuts després de l'administració ja vam observar una internalització del siRNA a les cèl·lules dels teixits. Es va comprovar que en un teixit patològic, com és el cas d'un ronyó afectat per nefritis lúpica, la distribució del siRNA era semblant com en el cas d'un teixit sa, per tant, no hi ha diferències entre l'alliberament de la molècula en un teixit sa i patològic. Aquest resultat ens van permetre establir un protocol de tractament dels animals amb nefropatia lúpica, es va decidir administrar el siRNA intraperitonealment i dos cops per setmana.

El model animal que es va escollir per l'experiment de nefritis lúpica va ser NZB/W F1, un dels models més utilitzats i ben establert. En aquest model experimental diferents autors han provat que l'administració de CTLA4, és capaç de prevenir l'aparició de la malaltia [294-296], però no la seva remissió [297]. La ciclofosfamida també ha sigut un dels fàrmacs utilitzats durant dècades en el tractament del lupus eritematós sistèmic i la nefritis lúpica, però la seva toxicitat, tant a curt com a llarg termini, i la seva efectivitat relativa en prevenir una recaiguda de la malaltia [297], han fet el seu ús cada

vegada menys freqüent, ja que més del 50% dels pacients amb nefritis lúpica recauen passats dos anys del final de tractament. Tot i així cal destacar que actualment un dels fàrmacs estàndard per el tractament de la nefritis lúpica és el micofenolat.

En el nostre estudi, els resultats obtinguts van demostrar que el silenciament de CD40 en aquest model muri millora la supervivència i frena l'evolució de la malaltia. Clínicament s'observa una disminució de la proteïnúria, albuminúria i dels anticossos circulants anti dsDNA.

A part del grup tractat amb ciclofosfamida, que és un control positiu de tractament, també es va incloure el CTLA4, com a control de bloqueig de coestimulació. Aquest últim tot i mostrar diversos graus d'activitat en diversos assajos, només va resultar ser tan potent com el tractament amb una dosi única setmanal de siRNA anti CD40 per aturar la progressió de la proteïnúria, clarament una dosi sub-terapèutica en comparació amb els efectes del tractament amb siRNA anti CD40 dos cops per setmana.

També vam observar una millora de les lesions histològiques típiques de la malaltia, els grups de bloqueig de coestimulació van ser els més eficaços en prevenir les lesions histològiques, destacant el grup tractat amb siRNA dos cops per setmana on l'infiltrat intersticial, l'atròfia tubular, i l'infiltrat intersticial eren absents. També es va observar una reducció de la infiltració renal per cèl·lules T i cèl·lules que segreguen immunoglobulines.

Se sap que els mecanismes de la via RNAi poden tenir efectes off-target. Molts estudis han anat introduint modificacions a la molècula siRNA al llarg del temps per intentar-los reduir. Aquestes han sigut crucials per l'avanç d'aquest tipus de fàrmacs [298], han servit per millorar la seva estabilitat *in vivo*, optimitzar les diferents vies d'administració, la seva biodistribució cel·lular, farmacocinètica, farmacodinàmica, especificitat i disminuir la immunogenicitat.

Es va comprovar amb la tècnica 5'RACE PCR que l'escissió del gen CD40 per la

molècula siRNA és seqüència específic, i que es dóna entre el nucleòtid 10 i 11 relatiu a l'extrem 5' de la cadena *antisense*; ja que aquesta és una de les poques maneres de validar que la molècula siRNA està actuant a través de la via RNAi.

El sistema del complement se sap que té un paper molt important en la patologia de la nefritis lúpica [191, 223]. Se sap que per una banda té un paper protector, ajudant en l'eliminació dels immuno complexes i cèl·lules apoptòtiques, i per altra banda pot contribuir significativament en la inflamació renal i el dany tissular. El ronyó és un òrgan que contribueix al total de proteïna C3 circulant, aproximadament és responsable del 9% del total [299]. En els nostres resultats podem veure que els ratolins tractats amb siRNA tenen una important disminució dels dipòsits glomerulars de C3. A més la disminució de l'expressió gènica de C3 al ronyó observada en el grup tractat amb siRNA dos cops per setmana ens indica que el silenciament de CD40 també causa una reducció de la síntesis local del complement.

En la patologia de la nefritis lúpica se sap que el dany renal és iniciat amb els dipòsits glomerulars d'immunocomplexes. Aquests juguen un paper molt important i són predominantment anticossos contra ssDNA, dsDNA, histones, proteïnes de complement, etc. Aquests immunocomplexes localitzats tant al mesangi com de forma subendotelial, contribueixen al reclutament de cèl·lules inflamatòries. En el nostre estudi vam observar que els ratolins no tractats tenien dipòsits d'immunoglobulina G en el parènquima renal, mentre que tots els tractaments aconseguen reduir-los. Cal remarcar que els grups de tractament amb bloqueig de coestimulació van ser més efectius que el grup tractat amb CYP.

L'anàlisi de l'expressió gènica de CD40 demostra, com era previsible, una disminució significativa en el parènquima renal. El silenciament de CD40 també va induir una disminució de citosines pro inflammatòries com és el cas de la IL6. Gens relacionats amb l'inflammosoma es mostren elevats en el grup no tractat, mentre que en els grups de tractament estan disminuïts. Tot això

suggereix també un efecte de modulació local de la resposta inflamatòria.

Se sap que la malaltia lúpica es caracteritza per una activació excessiva del limfòcits T i B, així com per un control, senyalització i migració anormal d'aquests darrers [221]. En el nostre estudi es va observar que la ciclofosfamida induïa una disminució de la població general de cèl·lules B auto reactives, en canvi el bloqueig de coestimulació amb el siRNA anti CD40 va provocar una disminució de l'activació tant de les cèl·lules B com T. Es pot predir que la disminució dels nivells d'anticossos anti dsDNA dels ratolins tractats amb siRNA, és degut a la modulació d'aquest sobre les cèl·lules B i també per la seva acció antiproliferativa.

S'ha vist, tant en humans com a nivell experimental, que les cèl·lules secretores d'anticossos de la nefritis lúpica també es poden trobar en ronyons que han patit un procés inflamatori [300, 301]. En aquest estudi es va confirmar la seva presència a l'interstici renal dels ratolins no tractats, en canvi, en tots els grups de tractament es va veure una disminució de la seva presència. Aquests resultats suggereixen que el siRNA té un potent efecte local en la nidació de les cèl·lules plasmàtiques, afegit a la modulació de l'activació distant de les cèl·lules B en els òrgans limfoides .

Així doncs, podem concloure que els nostres resultats evidencien el potencial terapèutic i els efectes del silenciament específic de CD40 mitjançant el siRNA com una forma de disminuir i modular l'activació del sistema immune en els ronyons inflamats, tant en el cas del trasplantament d'òrgans sòlids com en el cas de malalties autoimmunes.

VI . CONCLUSIONS

1. La isquèmia freda en un model al·logènic altament reactiu provoca una acceleració del rebuig i indueix un patró histològic de rebuig agut humoral. Apareixen dipòsits de C4d i IgG en els capil·lars peritubulars i hi ha una síntesi de novo d'anticossos específics circulants contra el donant, disminuint la supervivència de l'empelt.
2. El dany per isquèmia reperfusió modula la síntesis i dipòsit de col·lagen IV de forma diferent a la càpsula de Bowman i al cabdell glomerular. L'augment del col·lagen al cabdell indueix alteracions a la barrera de filtració glomerular i és responsable de la proteïnúria i la disfunció de l'empelt. Aquesta deterioració pot estar relacionat amb una alteració primerenca de la immunitat innata.
3. En el trasplantament, el reconeixement al·logènic és un dels factors més potents inductors d'expressió de CD40. Tanmateix, afegir isquèmia no és suficient per induir una sobre expressió significativa de CD40. La isquèmia freda, però, provoca un augment significatiu d'aquesta expressió en un ambient singènic, de menor intensitat.
4. La teràpia gènica amb siRNA anti CD40 administrat localment, en aquest model de trasplantament renal, redueix l'expressió gènica de CD40 a l'empelt. Els grups de silenciament de CD40 van experimentar un canvi de tipus de rebuig cap a un rebuig cel·lular, més fàcilment abordable des d'un punt de vista terapèutic. La molècula de siRNA no provoca l'activació de la immunitat innata.
5. Amb aquesta teràpia gènica s'observa una millora de la supervivència dels animals, una disminució del dany tissular i una reducció dels anticossos donant específics. Per tant, el pre acondicionament amb silenciament local de CD40 en un model de rebuig humoral és una estratègia efectiva i abordable.

6. El siRNA anti CD40 modificat químicament té un 100% d'entrada cel·lular i una localització citoplasmàtica. Redueix l'expressió de CD40 en cèl·lules dendrítiques madures induïdes amb LPS.
7. No hi ha diferències en la biodistribució del siRNA administrat de forma intravenosa o intraperitoneal. L'administració sistèmica del siRNA és més efectiva administrat dos cops per setmana, produint un bloqueig efectiu de CD40.
8. El silenciament de CD40 en la nefritis lúpica millora la supervivència, provoca una disminució de la proteïnúria, albuminúria i dels anticossos circulants. Es redueixen les lesions histològiques típiques de la malaltia, els dipòsits glomerulars de C3 i IgG. El silenciament de CD40 causa una disminució de la proteïna a parènquima renal, una reducció de la síntesis local del complement i de la activació de les cèl·lules B i T. Es confirma la presència de cèl·lules plasmàtiques a l'interstici renal i la seva disminució degut al tractament amb siRNA anti CD40. Aquests resultats suggereixen que CD40 té un paper important en la nefropatia lúpica.
9. El silenciament gènic de CD40 amb siRNA evidencia un potencial terapèutic com una forma de disminuir i modular l'activació del sistema immune, tant en el cas del trasplantament d'òrgans sòlids com en el cas de malalties autoimmunes.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Paulie, S., et al., *A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B lymphocytes*. *Cancer Immunol Immunother*, 1985. **20**(1): p. 23-8.
2. Clark, E.A. and J.A. Ledbetter, *Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(12): p. 4494-8.
3. Vinay, D.S. and B.S. Kwon, *TNF superfamily: costimulation and clinical applications*. *Cell Biol Int*, 2009. **33**(4): p. 453-65.
4. Schonbeck, U. and P. Libby, *The CD40/CD154 receptor/ligand dyad*. *Cell Mol Life Sci*, 2001. **58**(1): p. 4-43.
5. Qin, H., et al., *LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF-kappaB and STAT-1alpha in macrophages and microglia*. *Blood*, 2005. **106**(9): p. 3114-22.
6. Vowinkel, T., et al., *CD40-CD40 ligand mediates the recruitment of leukocytes and platelets in the inflamed murine colon*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(3): p. 955-65.
7. Paulie, S., et al., *Monoclonal antibodies to antigens associated with transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. II. Identification of the cellular target structures by immunoprecipitation and SDS-PAGE analysis*. *Cancer Immunol Immunother*, 1984. **17**(3): p. 173-9.
8. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. *J Leukoc Biol*, 2000. **67**(1): p. 2-17.
9. Freudenthal, P.S. and R.M. Steinman, *The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(19): p. 7698-702.
10. Clark, E.A., K.H. Grabstein, and G.L. Shu, *Cultured human follicular dendritic cells. Growth characteristics and interactions with B lymphocytes*. *J Immunol*, 1992. **148**(11): p. 3327-35.
11. Lenz, A., et al., *Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization*. *J Clin Invest*, 1993. **92**(6): p. 2587-96.
12. Mackey, M.F., R.J. Barth, Jr., and R.J. Noelle, *The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells*. *J Leukoc Biol*, 1998. **63**(4): p. 418-28.
13. Banchereau, J., et al., *Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40*. *Science*, 1991. **251**(4989): p. 70-2.
14. Clark, L.B., T.M. Foy, and R.J. Noelle, *CD40 and its ligand*. *Adv Immunol*, 1996. **63**: p. 43-78.

15. van Kooten, C., et al., *B cells regulate expression of CD40 ligand on activated T cells by lowering the mRNA level and through the release of soluble CD40*. Eur J Immunol, 1994. **24**(4): p. 787-92.
16. Saeland, S., et al., *Distribution of surface-membrane molecules on bone marrow and cord blood CD34+ hematopoietic cells*. Exp Hematol, 1992. **20**(1): p. 24-33.
17. Ware, C.F., et al., *Tumor necrosis factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes. Differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells*. J Immunol, 1991. **147**(12): p. 4229-38.
18. Fanslow, W.C., et al., *Recombinant CD40 ligand exerts potent biologic effects on T cells*. J Immunol, 1994. **152**(9): p. 4262-9.
19. Valent, P., et al., *IL-3 promotes basophilic differentiation of KU812 cells through high affinity binding sites*. J Immunol, 1990. **145**(6): p. 1885-9.
20. Ohkawara, Y., et al., *CD40 expression by human peripheral blood eosinophils*. J Clin Invest, 1996. **97**(7): p. 1761-6.
21. Kato, T., et al., *Induction of IL-12 p40 messenger RNA expression and IL-12 production of macrophages via CD40-CD40 ligand interaction*. J Immunol, 1996. **156**(10): p. 3932-8.
22. Zong, Y.S., et al., *Nasopharyngeal carcinoma and lymphoinfiltration*. Oncology, 1991. **48**(4): p. 290-6.
23. Pammer, J., et al., *Expression of the CD40 antigen on normal endothelial cells and in benign and malignant tumours of vascular origin*. Histopathology, 1996. **29**(6): p. 517-24.
24. Kluth, B., et al., *Endothelial expression of CD40 in renal cell carcinoma*. Cancer Res, 1997. **57**(5): p. 891-9.
25. Schonbeck, U., et al., *Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture?* Circ Res, 1997. **81**(3): p. 448-54.
26. Peguet-Navarro, J., et al., *CD40 ligation of human keratinocytes inhibits their proliferation and induces their differentiation*. J Immunol, 1997. **158**(1): p. 144-52.
27. Fries, K.M., et al., *CD40 expression by human fibroblasts*. Clin Immunol Immunopathol, 1995. **77**(1): p. 42-51.
28. Zhang, Y., et al., *CD40 engagement up-regulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human lung fibroblasts*. J Immunol, 1998. **160**(3): p. 1053-7.
29. Sempowski, G.D., P.R. Chess, and R.P. Phipps, *CD40 is a functional activation antigen and B7-independent T cell costimulatory molecule*

- on normal human lung fibroblasts. J Immunol, 1997. 158(10): p. 4670-7.*
30. Graf, D., et al., *A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. Eur J Immunol, 1995. 25(6): p. 1749-54.*
 31. Wykes, M., et al., *Regulation of cytoplasmic, surface and soluble forms of CD40 ligand in mouse B cells. Eur J Immunol, 1998. 28(2): p. 548-59.*
 32. Hsu, Y.M., et al., *Heteromultimeric complexes of CD40 ligand are present on the cell surface of human T lymphocytes. J Biol Chem, 1997. 272(2): p. 911-5.*
 33. Pietravalle, F., et al., *Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes. J Biol Chem, 1996. 271(11): p. 5965-7.*
 34. Singh, J., et al., *The role of polar interactions in the molecular recognition of CD40L with its receptor CD40. Protein Sci, 1998. 7(5): p. 1124-35.*
 35. Bajorath, J. and A. Aruffo, *Construction and analysis of a detailed three-dimensional model of the ligand binding domain of the human B cell receptor CD40. Proteins, 1997. 27(1): p. 59-70.*
 36. Casamayor-Palleja, M., M. Khan, and I.C. MacLennan, *A subset of CD4+ memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex. J Exp Med, 1995. 181(4): p. 1293-301.*
 37. Castle, B.E., et al., *Regulation of expression of the ligand for CD40 on T helper lymphocytes. J Immunol, 1993. 151(4): p. 1777-88.*
 38. Jaiswal, A.I., et al., *Regulation of CD40 ligand expression on naive CD4 T cells: a role for TCR but not co-stimulatory signals. Int Immunol, 1996. 8(2): p. 275-85.*
 39. Pinchuk, L.M., et al., *Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation. J Immunol, 1996. 157(10): p. 4363-70.*
 40. Gauchat, J.F., et al., *Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. Nature, 1993. 365(6444): p. 340-3.*
 41. Gauchat, J.F., et al., *CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils. Eur J Immunol, 1995. 25(3): p. 863-5.*
 42. Gaweco, A.S., et al., *CD40L (CD154) expression in human liver allografts during chronic ductopenic rejection. Liver Transpl Surg, 1999. 5(1): p. 1-7.*
 43. Carbone, E., et al., *A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction. J Exp Med, 1997. 185(12): p. 2053-60.*

44. Devi, B.S., et al., *Peripheral blood lymphocytes in SLE--hyperexpression of CD154 on T and B lymphocytes and increased number of double negative T cells*. J Autoimmun, 1998. **11**(5): p. 471-5.
45. Slupsky, J.R., et al., *Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40*. Thromb Haemost, 1998. **80**(6): p. 1008-14.
46. Reul, R.M., et al., *CD40 and CD40 ligand (CD154) are coexpressed on microvessels in vivo in human cardiac allograft rejection*. Transplantation, 1997. **64**(12): p. 1765-74.
47. Gaweco, A.S., et al., *CD40 expression on graft infiltrates and parenchymal CD154 (CD40L) induction in human chronic renal allograft rejection*. Kidney Int, 1999. **55**(4): p. 1543-52.
48. Aruffo, A., et al., *The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome*. Cell, 1993. **72**(2): p. 291-300.
49. Allen, R.C., et al., *CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome*. Science, 1993. **259**(5097): p. 990-3.
50. Castigli, E., et al., *CD40-deficient mice generated by recombination-activating gene-2-deficient blastocyst complementation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(25): p. 12135-9.
51. Ferrari, S., et al., *Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(22): p. 12614-9.
52. Revy, P., et al., *Normal CD40-mediated activation of monocytes and dendritic cells from patients with hyper-IgM syndrome due to a CD40 pathway defect in B cells*. Eur J Immunol, 1998. **28**(11): p. 3648-54.
53. Notarangelo, L.D., et al., *CD40lbase: a database of CD40L gene mutations causing X-linked hyper-IgM syndrome*. Immunol Today, 1996. **17**(11): p. 511-6.
54. Vazgiourakis, V.M., et al., *A common SNP in the CD40 region is associated with systemic lupus erythematosus and correlates with altered CD40 expression: implications for the pathogenesis*. Ann Rheum Dis, 2011. **70**(12): p. 2184-90.
55. del Rio-Espinola, A., et al., *CD40-1C>T polymorphism (rs1883832) is associated with brain vessel reocclusion after fibrinolysis in ischemic stroke*. Pharmacogenomics, 2010. **11**(6): p. 763-72.
56. Skibola, C.F., et al., *A functional TNFRSF5 gene variant is associated with risk of lymphoma*. Blood, 2008. **111**(8): p. 4348-54.
57. Tian, C., et al., *A common polymorphism in CD40 Kozak sequence (-1C/T) is associated with acute coronary syndrome*. Biomed Pharmacother, 2010. **64**(3): p. 191-4.

58. Yan, J., et al., *Association analysis of CD40 gene polymorphism with acute coronary syndrome*. Clin Exp Med, 2010. **10**(4): p. 253-8.
59. Liu, Y., et al., *Association of CD40 -1C/T polymorphism in the 5'-untranslated region and chronic obstructive pulmonary disease*. Clin Chim Acta, 2009. **408**(1-2): p. 56-9.
60. Pineda, B., et al., *A C >T polymorphism located at position -1 of the Kozak sequence of CD40 gene is associated with low bone mass in Spanish postmenopausal women*. Osteoporos Int, 2008. **19**(8): p. 1147-52.
61. Pineda, B., et al., *Gene-gene interaction between CD40 and CD40L reduces bone mineral density and increases osteoporosis risk in women*. Osteoporos Int, 2011. **22**(5): p. 1451-8.
62. Jacobson, E.M., et al., *A CD40 Kozak sequence polymorphism and susceptibility to antibody-mediated autoimmune conditions: the role of CD40 tissue-specific expression*. Genes Immun, 2007. **8**(3): p. 205-14.
63. Yang, J., et al., *CD40 C/T(-1) and CTLA-4 A/G(49) SNPs are associated with autoimmune thyroid diseases in the Chinese population*. Endocrine, 2012. **41**(1): p. 111-5.
64. Ban, Y., et al., *Association of a C/T single-nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of the CD40 gene with Graves' disease in Japanese*. Thyroid, 2006. **16**(5): p. 443-6.
65. Peters, A.L., et al., *A novel polymorphism of the human CD40 receptor with enhanced function*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1863-71.
66. Park, J.H., et al., *Association analysis of CD40 polymorphisms with asthma and the level of serum total IgE*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(8): p. 775-82.
67. Zervou, M.I., et al., *A CD40 and an NCOA5 gene polymorphism confer susceptibility to psoriasis in a Southern European population: a case-control study*. Hum Immunol, 2011. **72**(9): p. 761-5.
68. Orozco, G., et al., *Association of CD40 with rheumatoid arthritis confirmed in a large UK case-control study*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(5): p. 813-6.
69. Raychaudhuri, S., et al., *Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis*. Nat Genet, 2008. **40**(10): p. 1216-23.
70. Arlestig, L. and S. Rantapaa-Dahlqvist, *Polymorphisms of the genes encoding CD40 and growth differentiation factor 15 and in the 9p21.3 region in patients with rheumatoid arthritis and cardiovascular disease*. J Rheumatol, 2012. **39**(5): p. 939-45.

71. Malarstig, A., et al., *Soluble CD40L levels are regulated by the -3459 A>G polymorphism and predict myocardial infarction and the efficacy of antithrombotic treatment in non-ST elevation acute coronary syndrome*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(7): p. 1667-73.
72. Peitsch, M.C. and C.V. Jongeneel, *A 3-D model for the CD40 ligand predicts that it is a compact trimer similar to the tumor necrosis factors*. *Int Immunol*, 1993. **5**(2): p. 233-8.
73. Fanslow, W.C., et al., *Structural characteristics of CD40 ligand that determine biological function*. *Semin Immunol*, 1994. **6**(5): p. 267-78.
74. Inui, S., et al., *Identification of the intracytoplasmic region essential for signal transduction through a B cell activation molecule, CD40*. *Eur J Immunol*, 1990. **20**(8): p. 1747-53.
75. Sato, T., S. Irie, and J.C. Reed, *A novel member of the TRAF family of putative signal transducing proteins binds to the cytosolic domain of CD40*. *FEBS Lett*, 1995. **358**(2): p. 113-8.
76. Darnell, J.E., Jr., I.M. Kerr, and G.R. Stark, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. *Science*, 1994. **264**(5164): p. 1415-21.
77. Francis, D.A., et al., *Induction of the transcription factors NF-kappa B, AP-1 and NF-AT during B cell stimulation through the CD40 receptor*. *Int Immunol*, 1995. **7**(2): p. 151-61.
78. Yanagihara, Y., et al., *Possible role of nuclear factor-kappa B activity in germline C epsilon transcription in a human Burkitt lymphoma B cell line*. *Cell Immunol*, 1997. **176**(1): p. 66-74.
79. Grewal, I.S. and R.A. Flavell, *CD40 and CD154 in cell-mediated immunity*. *Annu Rev Immunol*, 1998. **16**: p. 111-35.
80. Ford, M.L. and C.P. Larsen, *Translating costimulation blockade to the clinic: lessons learned from three pathways*. *Immunol Rev*, 2009. **229**(1): p. 294-306.
81. Nankivell, B.J. and S.I. Alexander, *Rejection of the kidney allograft*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(15): p. 1451-62.
82. Defrance, T., et al., *Proliferation and differentiation of human CD5+ and CD5- B cell subsets activated through their antigen receptors or CD40 antigens*. *Eur J Immunol*, 1992. **22**(11): p. 2831-9.
83. Zan, H., et al., *CD40 engagement triggers switching to IgA1 and IgA2 in human B cells through induction of endogenous TGF-beta: evidence for TGF-beta but not IL-10-dependent direct S mu-->S alpha and sequential S mu-->S gamma, S gamma-->S alpha DNA recombination*. *J Immunol*, 1998. **161**(10): p. 5217-25.
84. Kindler, V. and R.H. Zubler, *Memory, but not naive, peripheral blood B lymphocytes differentiate into Ig-secreting cells after CD40 ligation*

- and costimulation with IL-4 and the differentiation factors IL-2, IL-10, and IL-3.* J Immunol, 1997. **159**(5): p. 2085-90.
85. Jorgensen, R., *Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes.* Trends Biotechnol, 1990. **8**(12): p. 340-4.
86. Ruiz, M.T., O. Voinnet, and D.C. Baulcombe, *Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing.* Plant Cell, 1998. **10**(6): p. 937-46.
87. Matzke, M.A. and A.J. Matzke, *Planting the seeds of a new paradigm.* PLoS Biol, 2004. **2**(5): p. E133.
88. Hammond, S.M., A.A. Caudy, and G.J. Hannon, *Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA.* Nat Rev Genet, 2001. **2**(2): p. 110-9.
89. Zamore, P.D., et al., *RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals.* Cell, 2000. **101**(1): p. 25-33.
90. Provost, P., et al., *Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer.* EMBO J, 2002. **21**(21): p. 5864-74.
91. Nykanen, A., B. Haley, and P.D. Zamore, *ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway.* Cell, 2001. **107**(3): p. 309-21.
92. Elbashir, S.M., et al., *Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate.* EMBO J, 2001. **20**(23): p. 6877-88.
93. Elbashir, S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl, *RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs.* Genes Dev, 2001. **15**(2): p. 188-200.
94. Meister, G., et al., *Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing.* RNA, 2004. **10**(3): p. 544-50.
95. Lombardo, A., et al., *Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery.* Nat Biotechnol, 2007. **25**(11): p. 1298-306.
96. De Paula, D., M.V. Bentley, and R.I. Mahato, *Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting.* RNA, 2007. **13**(4): p. 431-56.
97. Xie, F.Y., M.C. Woodle, and P.Y. Lu, *Harnessing in vivo siRNA delivery for drug discovery and therapeutic development.* Drug Discov Today, 2006. **11**(1-2): p. 67-73.
98. Braasch, D.A., et al., *Biodistribution of phosphodiester and phosphorothioate siRNA.* Bioorg Med Chem Lett, 2004. **14**(5): p. 1139-43.

99. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. Int Immunol, 2005. **17**(1): p. 1-14.
100. Sioud, M., *Single-stranded small interfering RNA are more immunostimulatory than their double-stranded counterparts: a central role for 2'-hydroxyl uridines in immune responses*. Eur J Immunol, 2006. **36**(5): p. 1222-30.
101. Saunders, L.R. and G.N. Barber, *The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions*. FASEB J, 2003. **17**(9): p. 961-83.
102. Marques, J.T. and B.R. Williams, *Activation of the mammalian immune system by siRNAs*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(11): p. 1399-405.
103. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 730-7.
104. Marques, J.T., et al., *A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(5): p. 559-65.
105. Hornung, V., et al., *Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7*. Nat Med, 2005. **11**(3): p. 263-70.
106. Judge, A.D., et al., *Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(4): p. 457-62.
107. Soutschek, J., et al., *Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 173-8.
108. Jackson, A.L., et al., *Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(6): p. 635-7.
109. Dykxhoorn, D.M. and J. Lieberman, *Running interference: prospects and obstacles to using small interfering RNAs as small molecule drugs*. Annu Rev Biomed Eng, 2006. **8**: p. 377-402.
110. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. Cell, 2003. **115**(2): p. 199-208.
111. Kim, D.H., et al., *Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(2): p. 222-6.
112. Reynolds, A., et al., *Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent*. RNA, 2006. **12**(6): p. 988-93.
113. Chiu, Y.L. and T.M. Rana, *RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA*. Mol Cell, 2002. **10**(3): p. 549-61.
114. Chiu, Y.L. and T.M. Rana, *siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis*. RNA, 2003. **9**(9): p. 1034-48.

115. Akhtar, S., *Non-viral cancer gene therapy: beyond delivery*. Gene Ther, 2006. **13**(9): p. 739-40.
116. Kennedy, S., D. Wang, and G. Ruvkun, *A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in C. elegans*. Nature, 2004. **427**(6975): p. 645-9.
117. Martinez, J., et al., *Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi*. Cell, 2002. **110**(5): p. 563-74.
118. Wolfrum, C., et al., *Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(10): p. 1149-57.
119. de Fougères, A., et al., *Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(6): p. 443-53.
120. Manoharan, M., *RNA interference and chemically modified small interfering RNAs*. Curr Opin Chem Biol, 2004. **8**(6): p. 570-9.
121. Mahato, R.I., K. Cheng, and R.V. Guntaka, *Modulation of gene expression by antisense and antigene oligodeoxynucleotides and small interfering RNA*. Expert Opin Drug Deliv, 2005. **2**(1): p. 3-28.
122. Amarzguioui, M., et al., *Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(2): p. 589-95.
123. Hall, A.H., et al., *RNA interference using boranophosphate siRNAs: structure-activity relationships*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(20): p. 5991-6000.
124. Kravack, B.A. and B.F. Baker, *Small interfering RNAs containing full 2'-O-methylribonucleotide-modified sense strands display Argonaute2/eIF2C2-dependent activity*. RNA, 2006. **12**(1): p. 163-76.
125. Jackson, A.L., et al., *Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing*. RNA, 2006. **12**(7): p. 1197-205.
126. Matranga, C., et al., *Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes*. Cell, 2005. **123**(4): p. 607-20.
127. Layzer, J.M., et al., *In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs*. RNA, 2004. **10**(5): p. 766-71.
128. Braasch, D.A. and D.R. Corey, *Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA*. Chem Biol, 2001. **8**(1): p. 1-7.
129. Elmen, J., et al., *Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(1): p. 439-47.
130. Cheng, K., et al., *Enhanced hepatic uptake and bioactivity of type alpha1(I) collagen gene promoter-specific triplex-forming oligonucleotides after conjugation with cholesterol*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **317**(2): p. 797-805.

131. Lorenz, C., et al., *Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004. **14**(19): p. 4975-7.
132. Muratovska, A. and M.R. Eccles, *Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells*. *FEBS Lett*, 2004. **558**(1-3): p. 63-8.
133. Mahato, R.I., A. Rolland, and E. Tomlinson, *Cationic lipid-based gene delivery systems: pharmaceutical perspectives*. *Pharm Res*, 1997. **14**(7): p. 853-9.
134. Bailon, P. and C.Y. Won, *PEG-modified biopharmaceuticals*. *Expert Opin Drug Deliv*, 2009. **6**(1): p. 1-16.
135. Ryan, S.M., et al., *Advances in PEGylation of important biotech molecules: delivery aspects*. *Expert Opin Drug Deliv*, 2008. **5**(4): p. 371-83.
136. Han, S., et al., *Development of biomaterials for gene therapy*. *Mol Ther*, 2000. **2**(4): p. 302-17.
137. Urban-Klein, B., et al., *RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo*. *Gene Ther*, 2005. **12**(5): p. 461-6.
138. Wang, D.A., et al., *Novel branched poly(ethylenimine)-cholesterol water-soluble lipopolymers for gene delivery*. *Biomacromolecules*, 2002. **3**(6): p. 1197-207.
139. Semple, S.C., et al., *Rational design of cationic lipids for siRNA delivery*. *Nat Biotechnol*, 2010. **28**(2): p. 172-6.
140. Giladi, H., et al., *Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice*. *Mol Ther*, 2003. **8**(5): p. 769-76.
141. McCaffrey, A.P., et al., *Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference*. *Nat Biotechnol*, 2003. **21**(6): p. 639-44.
142. Morrissey, D.V., et al., *Activity of stabilized short interfering RNA in a mouse model of hepatitis B virus replication*. *Hepatology*, 2005. **41**(6): p. 1349-56.
143. Morrissey, D.V., et al., *Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs*. *Nat Biotechnol*, 2005. **23**(8): p. 1002-7.
144. Song, E., et al., *RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis*. *Nat Med*, 2003. **9**(3): p. 347-51.
145. Ge, Q., et al., *Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(23): p. 8676-81.
146. Zhang, W., et al., *Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene*. *Nat Med*, 2005. **11**(1): p. 56-62.

147. Xia, H., et al., *RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia*. *Nat Med*, 2004. **10**(8): p. 816-20.
148. Dorn, G., et al., *siRNA relieves chronic neuropathic pain*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(5): p. e49.
149. Reich, S.J., et al., *Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model*. *Mol Vis*, 2003. **9**: p. 210-6.
150. Tolentino, M.J., et al., *Intravitreal injection of vascular endothelial growth factor small interfering RNA inhibits growth and leakage in a nonhuman primate, laser-induced model of choroidal neovascularization*. *Retina*, 2004. **24**(1): p. 132-8.
151. Minakuchi, Y., et al., *Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing in vitro and in vivo*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(13): p. e109.
152. Lakka, S.S., et al., *Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis*. *Oncogene*, 2004. **23**(27): p. 4681-9.
153. Sumimoto, H., et al., *Gene therapy for human small-cell lung carcinoma by inactivation of Skp-2 with virally mediated RNA interference*. *Gene Ther*, 2005. **12**(1): p. 95-100.
154. Verma, U.N., et al., *Small interfering RNAs directed against beta-catenin inhibit the in vitro and in vivo growth of colon cancer cells*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(4): p. 1291-300.
155. Hamar, P., et al., *Small interfering RNA targeting Fas protects mice against renal ischemia-reperfusion injury*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(41): p. 14883-8.
156. Schiffelers, R.M., et al., *Effects of treatment with small interfering RNA on joint inflammation in mice with collagen-induced arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(4): p. 1314-8.
157. Pasare, C. and R. Medzhitov, *Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity*. *Microbes Infect*, 2004. **6**(15): p. 1382-7.
158. Terasaki, P.I., et al., *High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors*. *N Engl J Med*, 1995. **333**(6): p. 333-6.
159. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system*. *Science*, 2002. **296**(5566): p. 298-300.
160. Kim, I.K., et al., *Impact of innate and adaptive immunity on rejection and tolerance*. *Transplantation*, 2008. **86**(7): p. 889-94.

161. Land, W.G., *The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation*. Transplantation, 2005. **79**(5): p. 505-14.
162. Wu, H., et al., *TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury*. J Clin Invest, 2007. **117**(10): p. 2847-59.
163. Zhai, Y., et al., *Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7115-9.
164. Kaczorowski, D.J., et al., *Toll-like receptor 4 mediates the early inflammatory response after cold ischemia/reperfusion*. Transplantation, 2007. **84**(10): p. 1279-87.
165. Hagerty, D.T. and P.M. Allen, *Processing and presentation of self and foreign antigens by the renal proximal tubule*. J Immunol, 1992. **148**(8): p. 2324-30.
166. Kreisel, D., et al., *Mouse vascular endothelium activates CD8+ T lymphocytes in a B7-dependent fashion*. J Immunol, 2002. **169**(11): p. 6154-61.
167. Mengel, M., et al., *Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection*. Am J Transplant, 2012. **12**(3): p. 563-70.
168. Watschinger, B. and M. Pascual, *Capillary C4d deposition as a marker of humoral immunity in renal allograft rejection*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(9): p. 2420-3.
169. Liptak, P., et al., *Peritubular capillary damage in acute humoral rejection: an ultrastructural study on human renal allografts*. Am J Transplant, 2005. **5**(12): p. 2870-6.
170. Mauiyyedi, S., et al., *Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(3): p. 779-87.
171. Martin, L., et al., *Detection of anti-HLA antibodies with flow cytometry in needle core biopsies of renal transplant recipients with chronic allograft nephropathy*. Transplantation, 2005. **79**(10): p. 1459-61.
172. Sayegh, M.H., et al., *Donor antigen is necessary for the prevention of chronic rejection in CTLA4Ig-treated murine cardiac allograft recipients*. Transplantation, 1997. **64**(12): p. 1646-50.
173. Mandelbrot, D.A., et al., *B7-dependent T-cell costimulation in mice lacking CD28 and CTLA4*. J Clin Invest, 2001. **107**(7): p. 881-7.
174. Wang, G.M., et al., *Blockade of both CD28/B7 and OX40/OX40L costimulatory signal pathways prolongs the survival of islet xenografts*. Transplant Proc, 2005. **37**(10): p. 4449-51.

175. Raisky, O., et al., *CD8(+) T cells induce graft vascular occlusion in a CD40 knockout donor/recipient combination.* J Heart Lung Transplant, 2003. **22**(2): p. 177-83.
176. Ensminger, S.M., et al., *Critical role for IL-4 in the development of transplant arteriosclerosis in the absence of CD40-CD154 costimulation.* J Immunol, 2001. **167**(1): p. 532-41.
177. Bingaman, A.W., et al., *Analysis of the CD40 and CD28 pathways on alloimmune responses by CD4+ T cells in vivo.* Transplantation, 2001. **72**(7): p. 1286-92.
178. Shimizu, K., et al., *Host CD40 ligand deficiency induces long-term allograft survival and donor-specific tolerance in mouse cardiac transplantation but does not prevent graft arteriosclerosis.* J Immunol, 2000. **165**(6): p. 3506-18.
179. Larsen, C.P., et al., *Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways.* Nature, 1996. **381**(6581): p. 434-8.
180. Yamada, A., et al., *CD70 signaling is critical for CD28-independent CD8+ T cell-mediated alloimmune responses in vivo.* J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1357-64.
181. Lee, E.A., et al., *4-1BB (CD137) signals depend upon CD28 signals in alloimmune responses.* Exp Mol Med, 2006. **38**(6): p. 606-15.
182. Cornell, L.D., R.N. Smith, and R.B. Colvin, *Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance.* Annu Rev Pathol, 2008. **3**: p. 189-220.
183. Cervera, R., et al., *Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus.* Medicine (Baltimore), 1993. **72**(2): p. 113-24.
184. Cutolo, M. and R.L. Wilder, *Different roles for androgens and estrogens in the susceptibility to autoimmune rheumatic diseases.* Rheum Dis Clin North Am, 2000. **26**(4): p. 825-39.
185. Carlsten, H., R. Holmdahl, and A. Tarkowski, *Analysis of the genetic encoding of oestradiol suppression of delayed-type hypersensitivity in (NZB x NZW) F1 mice.* Immunology, 1991. **73**(2): p. 186-90.
186. Smith-Bouvier, D.L., et al., *A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease.* J Exp Med, 2008. **205**(5): p. 1099-108.
187. Moser, K.L., et al., *Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus.* Genes Immun, 2009. **10**(5): p. 373-9.
188. Hochberg, M.C., *The application of genetic epidemiology to systemic lupus erythematosus.* J Rheumatol, 1987. **14**(5): p. 867-9.

189. Reichlin, M., J.B. Harley, and M.D. Lockshin, *Serologic studies of monozygotic twins with systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1992. **35**(4): p. 457-64.
190. Roozendaal, R. and M.C. Carroll, *Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity*. *Immunol Rev*, 2007. **219**: p. 157-66.
191. Manderson, A.P., M. Botto, and M.J. Walport, *The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 431-56.
192. Harley, J.B., et al., *The genetics of human systemic lupus erythematosus*. *Curr Opin Immunol*, 1998. **10**(6): p. 690-6.
193. Gorman, C.L., et al., *Polymorphisms in the CD3Z gene influence TCRzeta expression in systemic lupus erythematosus patients and healthy controls*. *J Immunol*, 2008. **180**(2): p. 1060-70.
194. Tan, W., et al., *Association of PPP2CA polymorphisms with systemic lupus erythematosus susceptibility in multiple ethnic groups*. *Arthritis Rheum*, 2011. **63**(9): p. 2755-63.
195. Tsokos, G.C., *Systemic lupus erythematosus*. *N Engl J Med*, 2011. **365**(22): p. 2110-21.
196. Kirnbauer, R., et al., *Regulation of epidermal cell interleukin-6 production by UV light and corticosteroids*. *J Invest Dermatol*, 1991. **96**(4): p. 484-9.
197. LeFeber, W.P., et al., *Ultraviolet light induces binding of antibodies to selected nuclear antigens on cultured human keratinocytes*. *J Clin Invest*, 1984. **74**(4): p. 1545-51.
198. Shakoor, N., et al., *Drug-induced systemic lupus erythematosus associated with etanercept therapy*. *Lancet*, 2002. **359**(9306): p. 579-80.
199. Wu, D., et al., *Apoptotic release of histones from nucleosomes*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(14): p. 12001-8.
200. Fournie, G., *[Cell death and lupus]*. *Ann Med Interne (Paris)*, 1996. **147**(7): p. 472-9.
201. Rose, L.M., D.S. Latchman, and D.A. Isenberg, *Bcl-2 and Fas, molecules which influence apoptosis. A possible role in systemic lupus erythematosus?* *Autoimmunity*, 1994. **17**(4): p. 271-8.
202. Lu, Q., et al., *Demethylation of CD40LG on the inactive X in T cells from women with lupus*. *J Immunol*, 2007. **179**(9): p. 6352-8.
203. Ballestar, E., M. Esteller, and B.C. Richardson, *The epigenetic face of systemic lupus erythematosus*. *J Immunol*, 2006. **176**(12): p. 7143-7.
204. Javierre, B.M., et al., *Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus*. *Genome Res*, 2009. **20**(2): p. 170-9.

205. Richardson, B., et al., *Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1990. **33**(11): p. 1665-73.
206. Yung, R., et al., *Mechanisms of drug-induced lupus. II. T cells overexpressing lymphocyte function-associated antigen 1 become autoreactive and cause a lupuslike disease in syngeneic mice*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(12): p. 2866-71.
207. Li, Y., et al., *Phosphorylated ERM is responsible for increased T cell polarization, adhesion, and migration in patients with systemic lupus erythematosus*. *J Immunol*, 2007. **178**(3): p. 1938-47.
208. Crispin, J.C., et al., *Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances*. *Trends Mol Med*, 2010. **16**(2): p. 47-57.
209. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 485-517.
210. Crispin, J.C., et al., *Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys*. *J Immunol*, 2008. **181**(12): p. 8761-6.
211. Odendahl, M., et al., *Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus*. *J Immunol*, 2000. **165**(10): p. 5970-9.
212. Blaese, R.M., J. Grayson, and A.D. Steinberg, *Increased immunoglobulin-secreting cells in the blood of patients with active systemic lupus erythematosus*. *Am J Med*, 1980. **69**(3): p. 345-50.
213. Suzuki, N. and T. Sakane, *Induction of excessive B cell proliferation and differentiation by an in vitro stimulus in culture in human systemic lupus erythematosus*. *J Clin Invest*, 1989. **83**(3): p. 937-44.
214. Spronk, P.E., et al., *B cell activation in clinically quiescent systemic lupus erythematosus (SLE) is related to immunoglobulin levels, but not to levels of anti-dsDNA, nor to concurrent T cell activation*. *Clin Exp Immunol*, 1993. **93**(1): p. 39-44.
215. Linker-Israeli, M., et al., *Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis*. *J Immunol*, 1991. **147**(1): p. 117-23.
216. Chan, O.T., et al., *A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus*. *J Exp Med*, 1999. **189**(10): p. 1639-48.
217. Zouali, M., G.J. Fournie, and J. Theze, *Quantitative clonal analysis of the B cell repertoire in human lupus*. *Cell Immunol*, 1991. **133**(1): p. 161-77.

218. Arbuckle, M.R., et al., *Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus*. N Engl J Med, 2003. **349**(16): p. 1526-33.
219. Pisetsky, D.S., *Anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus*. Rheum Dis Clin North Am, 1992. **18**(2): p. 437-54.
220. Smeenk, R., et al., *Antibodies to DNA in patients with systemic lupus erythematosus. Their role in the diagnosis, the follow-up and the pathogenesis of the disease*. Clin Rheumatol, 1990. **9**(1 Suppl 1): p. 100-10.
221. Klinman, D.M., et al., *Cross-reactivity of IgG anti-DNA-secreting B cells in patients with systemic lupus erythematosus*. Eur J Immunol, 1994. **24**(1): p. 53-8.
222. Yung, S., et al., *Effect of human anti-DNA antibodies on proximal renal tubular epithelial cell cytokine expression: implications on tubulointerstitial inflammation in lupus nephritis*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(11): p. 3281-94.
223. Sekine, H., et al., *The dual role of complement in the progression of renal disease in NZB/W F(1) mice and alternative pathway inhibition*. Mol Immunol, 2011. **49**(1-2): p. 317-23.
224. Cervera, R., et al., *Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 5-year period. A multicenter prospective study of 1,000 patients. European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus*. Medicine (Baltimore), 1999. **78**(3): p. 167-75.
225. Appel, G.B., et al., *Mycophenolate mofetil versus cyclophosphamide for induction treatment of lupus nephritis*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(5): p. 1103-12.
226. Mok, C.C., *Therapeutic options for resistant lupus nephritis*. Semin Arthritis Rheum, 2006. **36**(2): p. 71-81.
227. Turnberg, D. and H.T. Cook, *Complement and glomerulonephritis: new insights*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2005. **14**(3): p. 223-8.
228. Shankland, S.J., *The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis*. Kidney Int, 2006. **69**(12): p. 2131-47.
229. Ferraccioli, G. and G. Romano, *Renal interstitial cells, proteinuria and progression of lupus nephritis: new frontiers for old factors*. Lupus, 2008. **17**(6): p. 533-40.
230. Schlondorff, D.O., *Overview of factors contributing to the pathophysiology of progressive renal disease*. Kidney Int, 2008. **74**(7): p. 860-6.
231. Segerer, S. and D. Schlondorff, *B cells and tertiary lymphoid organs in renal inflammation*. Kidney Int, 2008. **73**(5): p. 533-7.
232. Davidson, A. and C. Aranow, *Lupus nephritis: lessons from murine models*. Nat Rev Rheumatol, 2009. **6**(1): p. 13-20.

233. de Zubiria Salgado, A. and C. Herrera-Diaz, *Lupus nephritis: an overview of recent findings*. *Autoimmune Dis*, 2012. **2012**: p. 849684.
234. Weening, J.J., et al., *The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited*. *J Am Soc Nephrol*, 2004. **15**(2): p. 241-50.
235. Dubois, E.L., et al., *NZB/NZW mice as a model of systemic lupus erythematosus*. *JAMA*, 1966. **195**(4): p. 285-9.
236. Drake, C.G., et al., *Genetic analysis of the NZB contribution to lupus-like autoimmune disease in (NZB x NZW)F1 mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(9): p. 4062-6.
237. Yoshida, S., J.J. Castles, and M.E. Gershwin, *The pathogenesis of autoimmunity in New Zealand mice*. *Semin Arthritis Rheum*, 1990. **19**(4): p. 224-42.
238. Klinman, D.M., *Polyclonal B cell activation in lupus-prone mice precedes and predicts the development of autoimmune disease*. *J Clin Invest*, 1990. **86**(4): p. 1249-54.
239. Kotzin, B.L. and E. Palmer, *The contribution of NZW genes to lupus-like disease in (NZB x NZW)F1 mice*. *J Exp Med*, 1987. **165**(5): p. 1237-51.
240. Knight, J.G. and D.D. Adams, *Three genes for lupus nephritis in NZB x NZW mice*. *J Exp Med*, 1978. **147**(6): p. 1653-60.
241. Raveche, E.S., et al., *Genetic studies in NZB mice. I. Spontaneous autoantibody production*. *J Exp Med*, 1978. **147**(5): p. 1487-1502.
242. Andrews, B.S., et al., *Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains*. *J Exp Med*, 1978. **148**(5): p. 1198-215.
243. Ebling, F.M. and B.H. Hahn, *Pathogenic subsets of antibodies to DNA*. *Int Rev Immunol*, 1989. **5**(1): p. 79-95.
244. Elouaai, F., et al., *Autoimmunity to histones, ubiquitin, and ubiquitinated histone H2A in NZB x NZW and MRL-lpr/lpr mice. Anti-histone antibodies are concentrated in glomerular eluates of lupus mice*. *Nephrol Dial Transplant*, 1994. **9**(4): p. 362-6.
245. Tsao, B.P., et al., *Structural characteristics of the variable regions of immunoglobulin genes encoding a pathogenic autoantibody in murine lupus*. *J Clin Invest*, 1990. **85**(2): p. 530-40.
246. Raz, E., et al., *Anti-DNA antibodies bind directly to renal antigens and induce kidney dysfunction in the isolated perfused rat kidney*. *J Immunol*, 1989. **142**(9): p. 3076-82.
247. Theofilopoulos, A.N. and F.J. Dixon, *Etiopathogenesis of murine SLE*. *Immunol Rev*, 1981. **55**: p. 179-216.

248. Adachi, Y., et al., *Effect of bone marrow transplantation on antiphospholipid antibody syndrome in murine lupus mice*. Immunobiology, 1995. **192**(3-4): p. 218-30.
249. Pluvinet, R., et al., *CD40: an upstream master switch for endothelial cell activation uncovered by RNAi-coupled transcriptional profiling*. Blood, 2008. **112**(9): p. 3624-37.
250. Kawai, T., et al., *Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand*. Nat Med, 2000. **6**(2): p. 114.
251. Kanmaz, T., et al., *Monotherapy with the novel human anti-CD154 monoclonal antibody ABI793 in rhesus monkey renal transplantation model*. Transplantation, 2004. **77**(6): p. 914-20.
252. Weaver, T.A., A.H. Charafeddine, and A.D. Kirk, *Costimulation blockade: towards clinical application*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 2120-39.
253. Goldstein, D.R., *Toll like receptors and acute allograft rejection*. Transpl Immunol, 2006. **17**(1): p. 11-5.
254. Utsumi, K., et al., *Alteration of collagen IV in acutely deteriorated renal allografts*. Transplantation, 2001. **71**(12): p. 1757-65.
255. Wieczorek, G., et al., *Acute and chronic vascular rejection in nonhuman primate kidney transplantation*. Am J Transplant, 2006. **6**(6): p. 1285-96.
256. Bertrand, J.R., et al., *Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **296**(4): p. 1000-4.
257. Karimi, M.H., et al., *Comparison of three techniques for generation of tolerogenic dendritic cells: siRNA, oligonucleotide antisense, and antibody blocking*. Hybridoma (Larchmt), 2010. **29**(6): p. 473-80.
258. Castanotto, D., et al., *Combinatorial delivery of small interfering RNAs reduces RNAi efficacy by selective incorporation into RISC*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(15): p. 5154-64.
259. Joosten, S.A., et al., *Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations*. Kidney Int, 2005. **68**(1): p. 1-13.
260. Joosten, S.A., et al., *Antibody response against perlecan and collagen types IV and VI in chronic renal allograft rejection in the rat*. Am J Pathol, 2002. **160**(4): p. 1301-10.
261. Fotheringham, J., C.A. Angel, and W. McKane, *Transplant glomerulopathy: morphology, associations and mechanism*. Nephron Clin Pract, 2009. **113**(1): p. c1-7; discussion c7.
262. Parker, D.C., et al., *Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(21): p. 9560-4.

263. Funakoshi, S., et al., *Immunologic and hematopoietic effects of CD40 stimulation after syngeneic bone marrow transplantation in mice.* J Clin Invest, 1997. **99**(3): p. 484-91.
264. Blazar, B.R., et al., *Blockade of CD40 ligand-CD40 interaction impairs CD4+ T cell-mediated alloreactivity by inhibiting mature donor T cell expansion and function after bone marrow transplantation.* J Immunol, 1997. **158**(1): p. 29-39.
265. Xu, H., et al., *Costimulatory blockade of CD154-CD40 in combination with T-cell lymphodepletion results in prevention of allogeneic sensitization.* Blood, 2008. **111**(6): p. 3266-75.
266. Badell, I.R., et al., *CTLA4Ig prevents alloantibody formation following nonhuman primate islet transplantation using the CD40-specific antibody 3A8.* Am J Transplant, 2012. **12**(7): p. 1918-23.
267. Elwood, E.T., et al., *Prolonged acceptance of concordant and discordant xenografts with combined CD40 and CD28 pathway blockade.* Transplantation, 1998. **65**(11): p. 1422-8.
268. Kirk, A.D., et al., *CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(16): p. 8789-94.
269. Sun, H., et al., *Prevention of chronic rejection in mouse aortic allografts by combined treatment with CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand monoclonal antibody.* Transplantation, 1997. **64**(12): p. 1838-43.
270. Saito, K., et al., *Involvement of CD40 ligand-CD40 and CTLA4-B7 pathways in murine acute graft-versus-host disease induced by allogeneic T cells lacking CD28.* J Immunol, 1998. **160**(9): p. 4225-31.
271. Kirk, A.D., et al., *Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates.* Nat Med, 1999. **5**(6): p. 686-93.
272. Larsen, C.P. and T.C. Pearson, *The CD40 pathway in allograft rejection, acceptance, and tolerance.* Curr Opin Immunol, 1997. **9**(5): p. 641-7.
273. Hancock, W.W., et al., *Costimulatory function and expression of CD40 ligand, CD80, and CD86 in vascularized murine cardiac allograft rejection.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 13967-72.
274. Linfert, D., T. Chowdhry, and H. Rabb, *Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury.* Transplant Rev (Orlando), 2009. **23**(1): p. 1-10.
275. Jang, H.R., et al., *The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney.* J Mol Med (Berl), 2009. **87**(9): p. 859-64.
276. Burne-Taney, M.J., et al., *B cell deficiency confers protection from renal ischemia reperfusion injury.* J Immunol, 2003. **171**(6): p. 3210-5.

277. Denton, M.D., et al., *Central role for CD40/CD40 ligand (CD154) interactions in transplant rejection*. *Pediatr Transplant*, 1998. **2**(1): p. 6-15.
278. Durie, F.H., R.A. Fava, and R.J. Noelle, *Collagen-induced arthritis as a model of rheumatoid arthritis*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1994. **73**(1): p. 11-8.
279. Gerritse, K., et al., *CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(6): p. 2499-504.
280. Lajer, M., et al., *Soluble CD40 ligand is elevated in type 1 diabetic nephropathy but not predictive of mortality, cardiovascular events or kidney function*. *Platelets*, 2010. **21**(7): p. 525-32.
281. Ma, J., et al., *Autoimmune lpr/lpr mice deficient in CD40 ligand: spontaneous Ig class switching with dichotomy of autoantibody responses*. *J Immunol*, 1996. **157**(1): p. 417-26.
282. Mohan, C., et al., *Interaction between CD40 and its ligand gp39 in the development of murine lupus nephritis*. *J Immunol*, 1995. **154**(3): p. 1470-80.
283. Sidiropoulos, P.I. and D.T. Boumpas, *Lessons learned from anti-CD40L treatment in systemic lupus erythematosus patients*. *Lupus*, 2004. **13**(5): p. 391-7.
284. Komura, K., et al., *Increased serum soluble CD40 levels in patients with systemic sclerosis*. *J Rheumatol*, 2007. **34**(2): p. 353-8.
285. Jun, J.B., et al., *High expression of CD40 on skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis*. *Rheumatol Int*, 2007. **28**(1): p. 95-7.
286. Harigai, M., *[Involvement of CD40-CD154 interaction in immunopathogenesis of collagen diseases and its application to a novel therapeutic strategy]*. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 2004. **27**(6): p. 379-88.
287. Henn, V., et al., *CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells*. *Nature*, 1998. **391**(6667): p. 591-4.
288. Tamura, N., et al., *Soluble CD154 in rheumatoid arthritis: elevated plasma levels in cases with vasculitis*. *J Rheumatol*, 2001. **28**(12): p. 2583-90.
289. Urbich, C. and S. Dimmeler, *CD40 and vascular inflammation*. *Can J Cardiol*, 2004. **20**(7): p. 681-3.
290. Tomasson, G., et al., *Relationship between markers of platelet activation and inflammation with disease activity in Wegener's granulomatosis*. *J Rheumatol*, 2011. **38**(6): p. 1048-54.
291. Sledz, C.A., et al., *Activation of the interferon system by short-interfering RNAs*. *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(9): p. 834-9.

292. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. *Nature*, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
293. Vowinkel, T., et al., *Differential expression and regulation of murine CD40 in regional vascular beds*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **290**(2): p. H631-9.
294. Schiffer, L., et al., *Short term administration of costimulatory blockade and cyclophosphamide induces remission of systemic lupus erythematosus nephritis in NZB/W F1 mice by a mechanism downstream of renal immune complex deposition*. *J Immunol*, 2003. **171**(1): p. 489-97.
295. Wang, X., et al., *Mechanism of action of combined short-term CTLA4Ig and anti-CD40 ligand in murine systemic lupus erythematosus*. *J Immunol*, 2002. **168**(4): p. 2046-53.
296. Mihara, M., et al., *CTLA4Ig inhibits T cell-dependent B-cell maturation in murine systemic lupus erythematosus*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(1): p. 91-101.
297. Ioannidis, J.P., et al., *Remission, relapse, and re-remission of proliferative lupus nephritis treated with cyclophosphamide*. *Kidney Int*, 2000. **57**(1): p. 258-64.
298. Corey, D.R., *Chemical modification: the key to clinical application of RNA interference?* *J Clin Invest*, 2007. **117**(12): p. 3615-22.
299. Tang, S., et al., *Contribution of renal secreted complement C3 to the circulating pool in humans*. *J Immunol*, 1999. **162**(7): p. 4336-41.
300. Espeli, M., et al., *Local renal autoantibody production in lupus nephritis*. *J Am Soc Nephrol*, 2011. **22**(2): p. 296-305.
301. Cassese, G., et al., *Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells*. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(9): p. 2726-32.

VIII. ANNEX

Mesenchymal stem cell therapy prevents interstitial fibrosis and tubular atrophy in a rat kidney allograft model

M. Franquesa, E. Herrero, J. Torras, E. Ripoll, M. Flaquer, M. Gomà, N. Lloberas, I. Anegón, JM. Cruzado, JM. Grinyó, I. Herrero-Fresneda

Stem cells Dev. 2012 Nov 20;21 (17): 3125-35. Doi
10.1089/scd.2012.0096. Epub 2012 May 18

Mesenchymal Stem Cell Therapy Prevents Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy in a Rat Kidney Allograft Model

Marcella Franquesa,¹ Esther Herrero,¹ Joan Torras,¹ Elia Ripoll,¹ Maria Flaquer,¹ Montse Gomà,² Nuria Lloberas,¹ Ignacio Anegón,³ Josep M. Cruzado,¹ Josep M. Grinyó,¹ and Immaculada Herrero-Fresneda¹

In solid organ transplantation, mesenchymal stem cell (MSC) therapy is strongly emerging among other cell therapies due to the positive results obtained *in vitro* and *in vivo* as an immunomodulatory agent and their potential regenerative role. We aimed at testing whether a single dose of MSCs, injected at 11 weeks after kidney transplantation for the prevention of chronic mechanisms, enhanced regeneration and provided protection against the inflammatory and fibrotic processes that finally lead to the characteristic features of chronic allograft nephropathy (CAN). Either bone marrow mononuclear cells (BMCs) injection or no-therapy (NT) were used as control treatments. A rat kidney transplantation model of CAN with 2.5 h of cold ischemia was used, and functional, histological, and molecular parameters were assessed at 12 and 24 weeks after transplantation. MSC and BMC cell therapy preserves renal function at 24 weeks and abrogates proteinuria, which is typical of this model (NT24w: 68.9 ± 26.5 mg/24h, MSC24w: 16.6 ± 2.3 mg/24h, BMC24w: 24.1 ± 5.3 mg/24h, $P < 0.03$). Only MSC-treated animals showed a reduction in interstitial fibrosis and tubular atrophy (NT24w: 2.3 ± 0.29 , MSC24w: 0.4 ± 0.2 , $P < 0.03$), less T cells (NT: 39.6 ± 9.5 , MSC: 8.1 ± 0.9 , $P < 0.03$) and macrophages (NT: 20.9 ± 4.7 , MSC: 5.9 ± 1.7 , $P < 0.05$) infiltrating the parenchyma and lowered expression of inflammatory cytokines while increasing the expression of anti-inflammatory factors. MSCs appear to serve as a protection from injury development rather than regenerate the damaged tissue, as no differences were observed in Ki67 expression, and kidney injury molecule-1, Clusterin, NGAL, and hepatocyte growth factor expression were only up-regulated in nontreated animals. Considering the results, a single delayed MSC injection is effective for the long-term protection of kidney allografts.

Introduction

CHRONIC ALLOGRAFT NEPHROPATHY (CAN) is a multifactorial process that leads to late allograft dysfunction in renal transplantation. The joint association of nonalloreactive factors, as cold ischemia, and allogeneic factors significantly increases cellular infiltration at both early and late stages, aggravating the progression of CAN, which has been clearly shown in experimental models [1]. The main features of this entity include at end stages severe interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA) with loss-of-renal function.

Cell therapies applied to solid organ transplantation have gained interest in the last years, and among them, mesenchymal stem cell (MSC) therapy has been strongly emerging. In addition to their potential role in therapies for renal repair,

the immunomodulatory properties of MSCs offer promise as a novel cellular therapy for kidney transplantation.

To date, 3 groups have approached MSC cell therapy in the experimental kidney transplantation field but focusing only on the acute kidney injury [2–5]. The use of donor MSCs has been shown to induce tolerance and regulatory T-cell expansion by the induction of indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) expression [2], while allogeneic MSCs enhanced functional recovery and attenuated histological damage from acute rejection by reducing cellular infiltrate in a 7 day follow-up in both syngeneic and allogeneic models of kidney transplantation [3,4]. Contrarily, Zhang et al. [5] did not observe a beneficial effect of treatment with MSCs (undetermined source) compared with cyclosporine A (CsA) monotherapy in a rat allogeneic kidney transplantation model.

¹Experimental Renal Transplantation, Laboratory of Experimental Nephrology, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL)- Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain.

²Department of Pathology, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain.

³INSERM UMR 643, CHU Nantes, ITUN, Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France.

MSCs treatment has also been tested in native chronic kidney disease models. In a 5/6 nephrectomy model, allogeneic MSCs injection decreased proteinuria and fibrosis [6–8] when intravenously injected or under the renal capsule, while the comparison between bone marrow mononuclear cells (BMCs) and MSCs injected in the renal parenchyma showed a better outcome with BMC cell therapy [9]. In a Col4A3 knock-out chronic model, syngeneic MSCs were able to reduce interstitial fibrosis [10], while allogeneic MSCs did not ameliorate the progression of the disease [11].

Moreover, acute kidney rejection can be effectively prevented in the early stages by using conventional drug-based immunosuppression, but unfortunately, there are no efficient immunosuppressive regimens that are able to guarantee long-term graft acceptance. Nowadays, the progressive loss of function secondary to IFTA is the major cause of graft loss.

In this work, we tested the effect of delayed therapy with an intravenous injection of a single dose of allogeneic BMCs or bone marrow-derived MSC on established CAN. We, specifically, assessed the potential immune mechanisms, the outcome of regeneration, and the protection against the inflammatory and fibrotic processes that finally lead to the development of late damage in a life-sustaining model of rat renal allotransplantation.

Materials and Methods

Rat kidney transplantation

For renal transplantation, inbred male Lewis rats (MHC haplotype: RT1^L) (250 g body weight; Charles River) received a kidney from male Fischer-344 rats (MHC haplotype: RT1^{lv1}) (250 g body weight, Charles River) as previously described [12–14]. Briefly, kidneys were 2.5 h preserved in EuroCollins at 4°C. Recipient rats were bi-nephrectomized at the moment of transplantation. The animals received a single daily dose of 5 mg/kg CsA (Novartis) by oral gavage for 15 days. This model develops proteinuria and progressive renal damage [13]. All the procedures and housing conditions were in accordance with the guidelines of the Committee on the Care and Use of Laboratory Animals and Good Laboratory Practice.

Study design and follow-up

Rats were divided into 3 groups of treatment: NT: No-therapy group ($n=11$); BMC: BMCs injection ($n=12$); and MSC: MSCs injection ($n=14$). One rat was transplanted every day, and rats were included in 2 different badges of correlative transplantations (first badge: 21 animals, second badge: 15 animals). Before transplantation and then monthly until the end of the study, the rats were weighed and placed in metabolic cages for 24h-urine and tail vein blood collection. Urine and serum creatinine (μM) were determined by Jaffe's reaction (Beckman Instruments), and proteinuria (Prot, mg/24h) was determined by Ponceau's method (Bayer Diagnostics). Serum creatinine levels were assessed on days 1, 3, 5, and 7 after cell therapy. One week after cell therapy (12 weeks after transplantation), some rats were sacrificed ($n=4$ for NT and BMC and $n=7$ for MSC), and the grafted kidney was processed for histological and molecular studies. At the end of the study (24 weeks), the

rest of the animals were sacrificed, and the grafted kidney was also processed.

Cell preparation and injection

Male Sprague-Dawley green fluorescent protein (GFP) transgenic rats (GenOway) weighing between 250 and 300 g were used as a MSC and BMC source [15]. Briefly, the femurs and tibias were surgically removed and flushed under sterile conditions with phosphate buffer saline (PBS). Cells were passed through a 70 μm mesh and washed twice with PBS to obtain BMCs. For the MSCs isolation, 60×10^6 were cultured in 15 cm-diameter plates with DMEM (Gibco, Life Technologies) with 10% fetal bovine serum (FBS; Lonza). Between passages 3 and 5, the cells were harvested; depleted for CD45⁺ CD11b/c⁺ (autoMACS; Miltenyi Biotec); stained for CD90-Allophycocyanin (Miltenyi Biotec), CD73, MHC-I (ox-18-PE), and MHC-II (ox-6-PE) (Becton Dickinson); and analyzed by flow cytometry (FACSCanto II and Diva software for the analysis; Becton Dickinson). MSCs were proved to be multipotent with a conditioning medium: IMDM (PAA) with 20% FBS, 2 mM L-glut, 0.05 mM β -Mercaptoethanol, 10^{-9} Dexamethasone supplemented with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Insuline for the adipogenic medium, and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid 2-P and 10 mM β -Glycerophosphate for the osteogenic medium. A single-cell (MSC or BMC) suspension was prepared in PBS and maintained at 4°C until the moment of the injection. All animals received, through the tail vein, 0.5 mL of PBS alone (NT), 0.5×10^6 GFP⁺ cultured MSC (MSC), or 10^7 GFP⁺ freshly isolated BMC (BMC) at the 11th week after kidney transplantation. The timing chosen corresponds to the increasing proteinuria in this model, as previously described [12].

Histological studies

Transversal kidney graft, liver, and spleen slices (1–2 mm) were either fixed in buffered formalin and frozen in optimal cutting temperature compound or dehydrated and embedded in paraffin. For light microscopy, tissue sections (3–4 μm) were stained with hematoxylin-eosin, periodic acid-Schiff, and Masson's trichrom. A pathologist blinded to the treatment groups examined all sections. Glomerulosclerosis was expressed as a percentage of damaged glomeruli, while tubular atrophy, interstitial fibrosis, interstitial cell infiltration, and vasculopathy were graded following a semi-quantitative scale from 0 to 3 (0, no abnormalities; +1, abnormalities affecting <1/3 of the sample; +2, between 1/3 and 2/3; +3, >2/3 of the sample). IF/TA was assessed following the Banff criteria [16].

Immunohistochemistry

Representative tissue sections were immunoperoxidase stained for connective tissue growth factor (CTGF, rabbit polyclonal IgG; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), α -smooth muscle actin (α SMA, MS-113, Neomarkers; LabVision Ltd.), CD3 (monoclonal mouse anti-rat, Serotec; Bionova científica), ED1 (Oxford Biomarketing), Ki67 (mouse anti-rat; BD Pharmingen), and rabbit anti-rat IDO [17] and immunofluorescence stained for GFP (ab5450; Abcam) in paraffin-embedded sections. The CTGF, α SMA, CD3, ED1, and Ki67 stained samples were revealed with diaminobenzidine (Sigma-Aldrich) and counterstained with hematoxylin. IDO

MSCs PREVENT IFTA IN KIDNEY ALLOGRAFT

3

immunostaining was performed as previously described [17]. GFP was directly observed under fluorescence light microscopy in kidney, liver, and spleen sections. Positive CTGF, α SMA, and IDO samples were semi-quantitatively scored from 0 to 3 in the tubules, the interstitial compartment, or the glomeruli. Positive CD3, ED1 infiltrating, and Ki67 tubular cells were quantitatively assessed at least in 20 power fields in a 400 magnification.

Quantification of circulating donor-specific antibodies

The presence of circulating donor-specific antibodies (DSAs) class-I and class-II was quantified on recipient serum samples that were incubated with donor spleen cells and measured by flow cytometry. Plasma samples were collected at the moment of sacrifice. Donor splenocytes were isolated from Fischer-344 or Sprague-Dawley rat spleens by Ficoll[®] density gradient and freshly used. Different controls were added: serum from nontransplanted Lewis rat as naïve; serum from a transplanted Lewis rat with high anti-MHC antibody titer as a positive control.

Briefly, 5×10^5 splenocytes were incubated with 25 μ L of recipient serum for 30 min at room temperature, washed in PBS, incubated in the dark (30 min, 4°C) with a 1:25 mix of anti-CD3 (eBioscience) and anti-IgG Fc portion (Jackson Immuno Research), fixed with 1% paraformaldehyde, and analyzed by flow cytometry. A fluorescence increase of 15% with regard to the negative control was considered positive. Results were expressed as a percentage of positive cells with regard to the total number of CD3⁺ spleen cells.

Gene expression assays

Frozen kidney tissue was homogenized in trizol reagent. Total RNA was extracted and purified using PureLink RNA mini kit (Invitrogen, Life Technologies). Overall, 500 μ g of total RNA was retrotranscribed with a high-capacity complementary DNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). Negative controls for reverse transcriptions were carried out using distilled water. Gene expression of IL4 (Rn01456866_m1), IL6 (Rn00561420_m1), IL7 Receptor (Rn01402421_m1), IL10 (Rn00563409_m1), IL12p40 (Rn00575112_m1), IL15 (Rn00565548_m1), IL23 α (Rn00590334_g1), tumor necrosis factor alpha (TNF α , Rn99999017_m1), Fibronectin1 (Rn00569575_m1), Ki67 (Rn01451448_g1), basic fibroblast growth factor (bFGF, Rn00570809_m1), hepatocyte growth factor (HGF, Rn00566673_m1), IDO (Rn00576778_m1), CXCR4 (Rn01483207_m1), CXCL12 (Rn00573260_m1), Clusterin (Rn00562081_m1), NGAL (Rn00590612_m1), and kidney injury molecule-1 (KIM-1, Rn00597703_m1) was performed by Taqman assay in a 7900HT real-time polymerase chain reaction (PCR) system (Applied Biosystems) by relative to 18S quantification using the C_T method. PCR reactions and amplification were performed as previously described [12]. The gene expression of NT12w kidneys was used as reference values. Results were expressed as many folds of the unknown sample with regard to the reference value (arbitrary units).

Statistical analysis

Serum creatinine differences at any time point, DSA, gene expression, and plasma proteins were analyzed by analysis of variance and subsequent Scheffe's test. For a histological

comparison of Banff classification, a Chi Square *P* value was calculated from the contingency table. A semi-quantitative histological evaluation was analyzed through the non-parametric Kruskal-Wallis test. Two-tailed *P* < 0.05 was considered statistically significant. Data are presented as mean \pm SEM.

Results*MSCs show low immunogenicity*

MSCs were isolated by plastic adherence, and the CD45⁺, CD11b/c⁻, and CD90⁺, CD73⁺ subpopulation was used for cell therapy. The multipotentiality of these cells was proved by their ability to differentiate into adipocytes or osteocytes (data not shown). They were selected for the therapy given their low immunogenicity, as they did not express MHC-II and had a very low expression of MHC-I (Fig. 1A, B). Contrarily, BMCs expressed MHC-II and, especially, MHC-I.

Moreover, rats treated with MSCs did not develop cell DSAs against Sprague-Dawley MHC class I or class II early post-transplantation, while rats receiving BMCs developed high levels of DSA against Sprague-Dawley MHC-I within the first week after a cell injection (Fig. 1C). As expected, NT rats did not present circulating antibodies against Sprague-Dawley (data not shown), indicating specificity of the circulating antibodies present in both cell treatment groups of animals.

MSCs prevent from renal dysfunction

All the animals followed up to 24 weeks post-transplantation survived the study period. As shown in Fig. 2, the animals that were not treated developed progressive proteinuria and renal insufficiency from the 12th week onward. In marked contrast, the animals receiving either BMCs or MSCs therapy had no increase in proteinuria and also preserved normal serum creatinine levels.

One week after treatment, there was no difference in kidney function between PBS and MSC or BMC treatment.

MSCs preserve renal histology along the follow-up

As expected, at 24 weeks, the conventional histology of NT grafts showed extensive tubular atrophy with widespread interstitial fibrosis and moderate diffuse interstitial infiltration (Fig. 3). Although those kidney grafts displayed a diverse degree of damage, most of them showed the highest IFTA values among the 3 groups of treatment (Mean value: 2.3, Fig. 3A). The MSC grafts displayed a normal histological picture with minimal tubular atrophy, interstitial fibrosis, and cellular infiltration (Fig. 3F). This resulted in very low IFTA scores in this group, contrary to NT (Mean value: 0.4). BMCs-injected animals presented the most heterogeneous histological damage distribution with IFTA scores ranging from 0 to 3 (Mean value: 1.6), significantly higher than the ones of the MSC group but not lower than the ones of the NT group.

Even though the 3 groups showed similar initial IFTA at 12 weeks (data not shown), MSC treatment appeared to decrease the number of infiltrating cells within the first week after therapy compared with the other 2 groups, and interestingly, BMCs-injected animals slightly increased interstitial

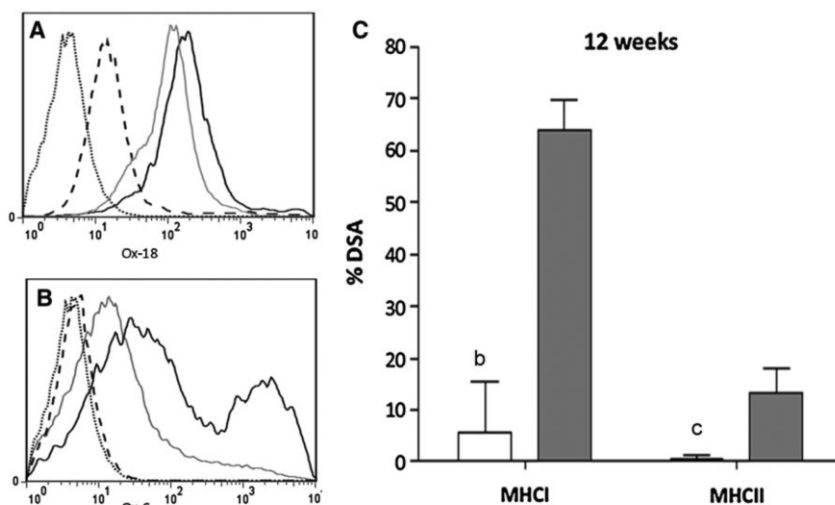


FIG. 1. MSCs are low-immunogenic cells. Levels of MHC-I (A) and MHC-II (B). MSCs (dashed line) express low levels of MHC-I and are negative for MHC-II, while BMCs (gray line) express high levels of MHC-I and low levels of MHC-II. As a positive control of MHC-I and MHC-II expression, we used Sprague-Dawley rat splenocytes (black line). We also quantified the percentage of DSA against third-party injected cells (MSCs or BMCs) 1 week after the injection (C), and observed no antibodies in MSC-injected animals (open bars) and positive MHC-I in BMC-injected animals (gray bars) (^b $P=0.005$, ^c $P=0.06$). MSC, mesenchymal stem cell; BMCs, bone marrow mononuclear cells; DSA, donor specific antibody.

infiltrate mainly composed of ED1⁺ macrophages. It is worth mentioning that the MSC injection prevented the inflammatory infiltrate also at 24 weeks and maintained lower IFTA values until the end of the study, suggesting a preventive rather than corrective role of this cell therapy.

Although the model is not characterized by severe vasculopathy, both cellular treatments reduced vascular damage at 24 weeks. Notably, cellular therapy also halted the progression of glomerulosclerosis development (Fig. 3F).

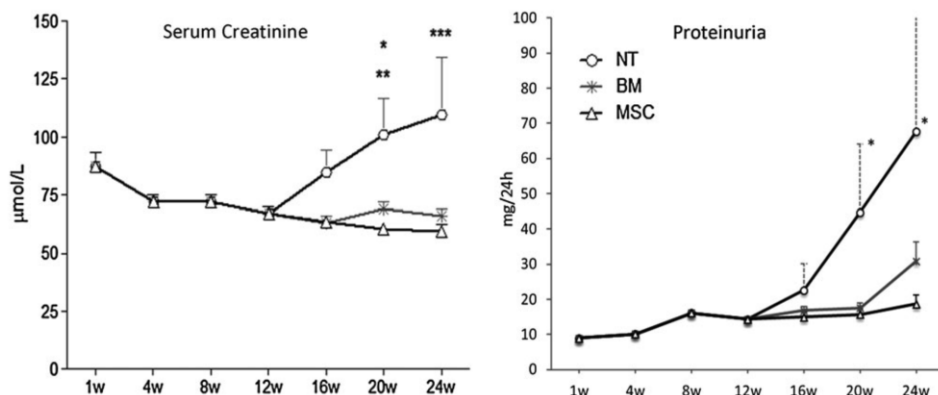


FIG. 2. MSCs and BMCs prevent from developing late allograft dysfunction. The animals treated with MSCs or BMCs did not increase the proteinuria levels, reaching significant differences at 20 and 24 weeks when compared with NT animals ($P<0.05$). In parallel, serum creatinine levels were nonpathologically maintained in both cell-injected groups (^{*} $P<0.05$ NT vs. BMC, ^{**} $P<0.001$ vs. MSC, ^{***} $P<0.001$ NT vs. MSC and BMC). NT, no-therapy.

MSCs PREVENT IFTA IN KIDNEY ALLOGRAFT

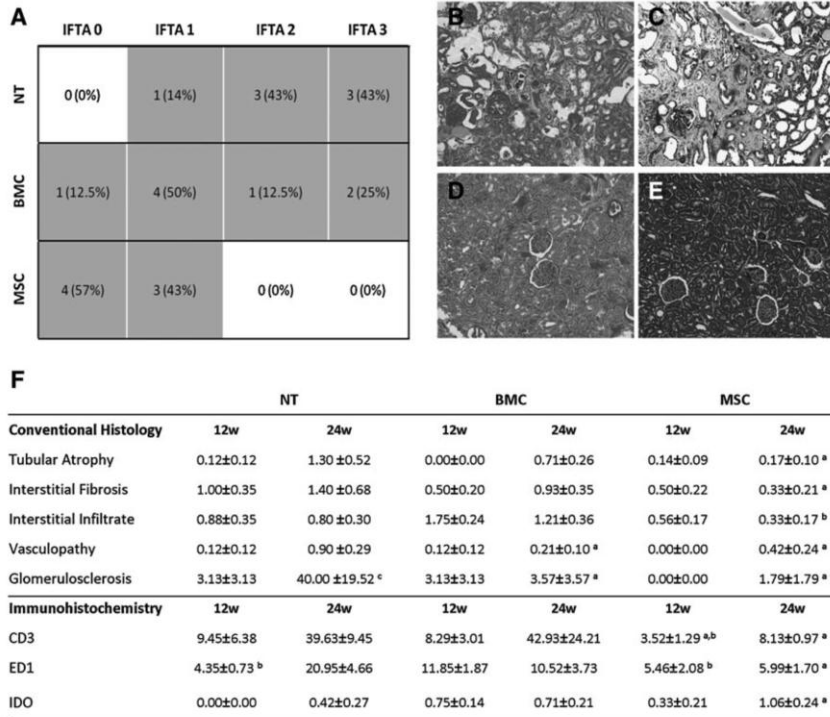


FIG. 3. Conventional histology. NT animals showed the worst outcome when pathological histology was analyzed (**A**). Not only IFTA degree in MSC animals was lower compared with NT animals, but also BMC animals show the worst histological preservation ($P < 0.003$ vs. NT, $P < 0.05$ vs. BMC). (**B**) and (**C**) are representative pictures of the NT kidney at 24 weeks of PAS and Masson staining, respectively. (**D**) and (**E**) show better-preserved and also less fibrotic MSC kidneys at 24 weeks with the same staining. In (**F**), we have specified the histological parameters evaluated by a pathologist at 12 and at 24 weeks and immunohistochemical-staining quantification of lymphocytic (CD3) and macrophagic (ED1) infiltrates (mean positive cells/field viewed \pm SEM) as well as semi-quantitative evaluation of IDO expression (score 0 to 3), ($^a P < 0.05$ vs. NT group at the same time point, $^b P < 0.05$ vs. BMC group at the same time point, $^c P < 0.05$ vs. same group at 12 weeks). IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; IFTA, interstitial fibrosis and tubular atrophy.

MSCs modulate the immune-inflammatory response

Further immunohistochemical analysis revealed that a BMC injection immediately recruited increased numbers of ED1⁺ (macrophages) infiltrating cells with regard to NT- and MSC-treated animals at 12 weeks (Fig. 3F). At this time point, MSC therapy reduced the number of both ED1⁺ and CD3⁺ infiltrating cells not only with regard to the BMC group but also with regard to the NT group (Fig. 3F), and this observation persisted at 24 weeks. Contrarily, ED1⁺ and CD3⁺ infiltrating cells in NT animals increased at 24 weeks. BMC-injected animals maintained the number of infiltrating macrophages over time and highly increased the number of infiltrating T lymphocytes.

In accordance, MSC-treated animals showed a reduction in the parenchymal gene expression of inflammation-related genes along the follow-up, especially in IL6,

IL23 α , and IL7R (Table 1), although no differences were observed in IL15, IL12p40, or IL4 (data not shown). Furthermore, we also observed an immediate anti-inflammatory effect of MSC treatment through low gene expression of TNF α 1 week after cell therapy (NT_{12w}: 1.00±0.00, BMC_{12w}: 0.97±0.23, MSC_{12w}: 0.49±0.10^{a,b}; $P < 0.05$ a: vs. NT, b: vs. BMC) along with a long-term effect on the up-regulation of the anti-inflammatory IL10 at 24 weeks (Table 1).

The immunomodulatory properties of MSC are supported by the IDO expression. An immunohistochemical analysis showed an increase of this protein in the MSC grafts at 24 weeks (Fig. 3F). The gene expression showed a logarithmic up-regulation a long time after the cell treatment (Fig. 4). In BMC-treated animals, IDO was 10-fold over-expressed with regard to NT at 24 weeks, but this was still far under the expression level reached by MSC treatment.

TABLE 1. GENE EXPRESSION

Gene name	NT		BM		MSC	
	12 weeks	24 weeks	12 weeks	24 weeks	12 weeks	24 weeks
Inflammation						
<i>Il6</i>	1.00±0.00	1.19±0.53	1.14±0.40	0.61±0.13 ^a	0.99±0.31	0.58±0.15 ^a
<i>Il7r</i>	1.00±0.00	1.02±0.26	0.83±0.18	0.79±0.17	0.98±0.21	0.58±0.14 ^a
<i>Il23a</i>	1.00±0.00	0.82±0.11	0.87±0.23	0.653±0.284	0.77±0.79	0.55±0.38 ^a
<i>Il10</i>	1.00±0.00	0.93±0.38 ^b	0.95±0.26	0.68±0.21	0.51±0.13	1.03±0.37 ^b
Fibrosis						
<i>bFGF</i>	1.00±0.00	1.14±0.22	0.66±0.22	0.51±0.21 ^a	0.41±0.06 ^a	0.59±0.14 ^a
<i>Fibronectin</i>	1.00±0.00	0.42±0.15 ^c	0.64±0.14	0.41±0.14	0.43±0.10 ^a	0.59±0.14 ^a
Homing						
<i>Cxcl12</i>	1.00±0.00	0.51±0.15 ^c	0.40±0.053 ^a	0.57±0.05	0.44±0.036 ^a	0.43±0.04
<i>Cxcr4</i>	1.00±0.00	0.52±0.13 ^c	0.66±0.22 ^a	0.37±0.07	0.4±0.09 ^a	0.31±0.02

Immunomodulation of gene expression analysis of the grafts at 12 and at 24 weeks shows a modulation in the immune response. Results are presented as folds versus NT 12 weeks. We observe a decrease over time in the inflammatory cytokine levels in MSC-treated animals, along with an increase in the anti-inflammatory cytokine IL10. Fibrosis gene expression analysis (expressed as many folds over NT12 weeks) revealed an early effect of MSC therapy, decreasing the expression of profibrotic genes. At 24 weeks, we only observe differences at a gene level in the expression of basic fibroblast growth factor. On the other hand, at 12 weeks, the expression of homing genes CXCL12 and CXCR4 was down-regulated in both treated groups, and no differences were observed at 24 weeks (^aP<0.05 vs. NT group at the same time point, ^bP<0.05 vs. BMC group at the same time point, ^cP<0.05 vs. same group at 12 weeks).

MSC, mesenchymal stem cell; BMC, bone marrow mononuclear cell, NT, no-therapy.

MSCs prevent from anti-donor-specific humoral responses

Without treatment, at 12 weeks, transplanted animals developed kidney DSAs against Fischer-344 MHC class I (DSA-I) but not against MHC class II (DSA-II, below 15%). Both DSA-I and DSA-II levels significantly increased over time in these NT animals.

MSC or BMC cell injections had a different effect in the development of DSA. The BMC animals presented DSA-I levels similar to NT rats and higher levels of DSA-II. In contrast, MSC treatment protected from DSA-I and DSA-II development at 12 weeks, and despite increasing over time, at 24 weeks, both DSA-I and DSA-II levels were still considerably reduced compared with NT animals (Table 2).

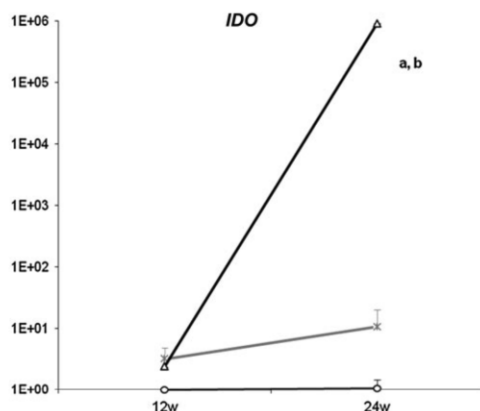


FIG. 4. IDO gene expression. The gene expression of IDO in transplanted kidneys was analyzed by quantitative polymerase chain reaction. Results are normalized by the expression of housekeeping gene 18S and expressed as many folds of the NT at 12 weeks (y axis). MSC-treated animals (-o-) have increased the levels of IDO at 12 weeks that significantly increase at 24 weeks with regard to BMC treatment (-x-) and NT kidneys (-Δ) (^aP<0.05 vs. NT, ^bP<0.05 vs. BMC).

TABLE 2. MESENCHYMAL STEM CELLS INJECTION REDUCES KIDNEY DONOR-SPECIFIC ANTIBODY LEVELS

	% F344 DSA-I		
	12 weeks	24 weeks	P
NT	54.3±19.9	86.1±2.284	0.043
BMC	65.8±13.5	46.8±15.5 ^a	NS
MSC	16.1±5.25 ^b	35.1±15.9 ^a	NS
	% F344 DSA-II		
	12 weeks	24 weeks	P
NT	8.87±4.9	31.6±5.2	0.03
BMC	22.4±6.6	17.1±6.1	NS
MSC	1.6±1.2 ^b	15.5±7.1 ^c	NS

The presence of circulating DSA class-I and class-II was quantified on recipient serum samples incubated with kidney donor (F344) spleen cells and measured by flow cytometry. A fluorescence increase of 15% with regard to the negative control was considered positive. Results were expressed as a percentage of positive cells with regard to the total number of CD3⁺ spleen cells. DSA titers were analyzed by analysis of variance followed by Scheffe's test. MSC treatment protects from developing DSAs from 1 week after the injection (12 weeks) and at 24 weeks. The BMCs injection has a different reaction, increasing the DSAs at 1 week after cell transplantation and maintaining them along with time.

^aP≤0.04 versus NT, ^bP=0.06 versus BMC, ^cP=0.06 versus NT.

DSAs, donor specific antibodies.

MSCs PREVENT IFTA IN KIDNEY ALLOGRAFT

MSCs abrogate the onset of parenchymal fibrosis

At 12 weeks, no histological differences were observed in the conventional histology (Fig. 3F) or in the immunohistochemistry (IHC) of fibrosis markers (Fig. 5A) among the 3 groups. Nonetheless, the effect of MSC cell therapy was reflected at a gene level in the down-regulation of bFGF and fibronectin gene expression 1 week after the cell injection (Table 1). At 24 weeks, the expression of fibronectin was equivalent in the 3 groups of study, but bFGF gene expression was still significantly lower in MSC and also in BMC animals compared with NT (Table 1).

At 24 weeks, a conventional histology evaluation showed a dramatic decrease in the glomerular and interstitial fibrosis in MSC-treated animals compared with NT (Fig. 3F). This effect is

accompanied by a lower CTGF protein expression in both tubuli and glomeruli, in the MSC-treated kidneys. BMC treatment also reduced CTGF expression, only in the tubuli, although remaining significantly higher than MSC kidneys (Fig. 5). A similar pattern of reduced α SMA protein expression was observed in both glomeruli and interstitium, as shown in Fig. 5.

Cell homing is not enhanced by cell therapy

The expression of the cell homing genes (*Cxcl12*, *Cxcr4*) in the renal parenchyma was down-regulated at 12 weeks in both MSC and BMC groups, although at 24 weeks, these differences had already disappeared (Table 1).

On the other hand, the presence of injected MSC or BMC cells within renal, hepatic, and spleen parenchyma was

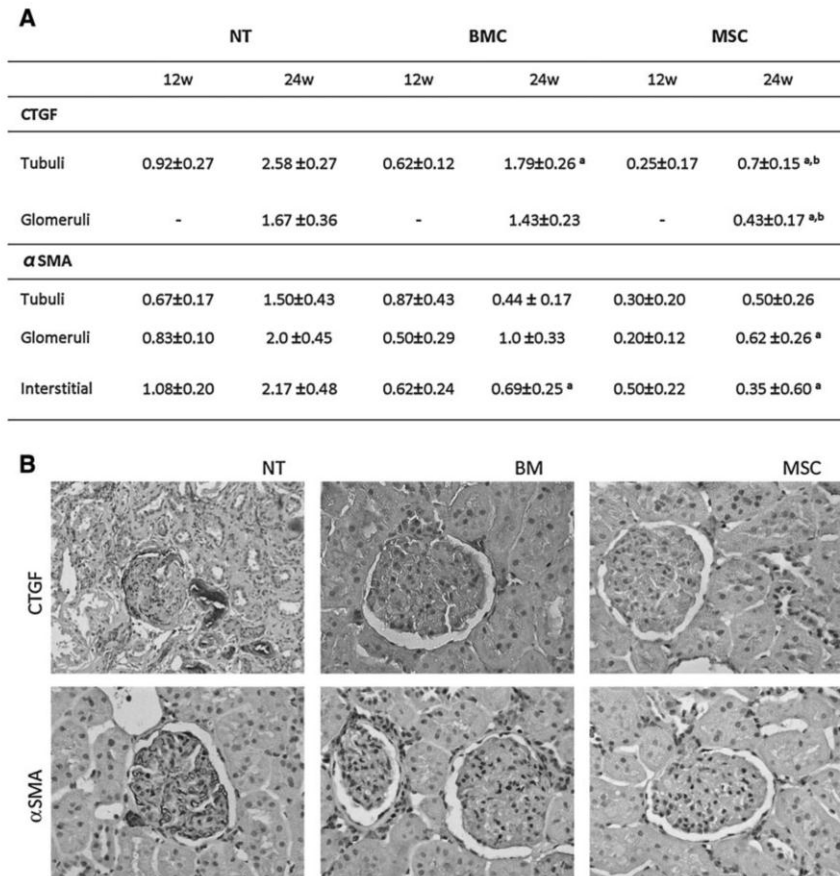


FIG. 5. Parenchymal fibrosis. **(A)** shows the semi-quantitative analysis of CTGF and α SMA tissue expression (score 0 to 3). We observe lower α SMA parenchymal expression in MSC compared with NT at 24 weeks, and also lower CTGF tubular and glomerular expression when compared with both NT and BMC groups (^a $P < 0.05$ vs. NT group at the same time point, ^b $P < 0.05$ vs. BMC group at the same time point). **(B)** depicts representative histological slides from all groups stained for α SMA and CTGF (400 magnification). CTGF, connective tissue growth factor. α SMA, alpha-smooth muscle actin.

assessed not only by direct GFP⁺ observation on frozen tissue but also by the enhancement of GFP by specific immunostaining in either frozen or paraffin-embedded tissues. We could not find GFP⁺ cells in any parenchyma either early after cell infusion at 12 weeks or late at 24 weeks, in any of the treatment groups (data not shown).

MSC therapy prevents injury

We stained tissue slides for Ki67 to check whether these protected tissues would show a higher number of positive proliferating tubular or glomerular cells. No differences were observed between the 3 groups of treatment neither at 12 nor at 24 weeks. A further analysis of the gene expression of Ki67 also showed no differences at 24 or at 12 weeks between any of the groups (Fig. 6).

When we checked for the expression of other genes involved in tubular damage and regeneration after injury such as *Havr1* (Kim-1), *Lcn2* (NGAL), *Clu* (Clusterin), and HGF, the results were completely different. The expression of these genes was only up-regulated in the NT group both at 12 and/or at 24 weeks; meanwhile, both cell treatments abrogated the over-expression in time in these 3 genes. On the contrary, the dynamics of HGF was somewhat different, showing an initial increase in NT animals and a decrease over time in all groups.

Discussion

In this study, we observed for the first time the long-term beneficial effect of the MSC injection in a well-described CAN model. The rationale of using MSCs in this setting rose from the proposed immunomodulatory and remodelative properties of these cells [8,18]. In this model, these properties would help decrease the immune infiltrate, enhance renal parenchyma regeneration, and, therefore, counterbalance the fibrotic and inflammatory-driven chronic injury processes [1]. Our experience shows that an injection of MSCs or BMCs serves as protection from the development of proteinuria, glomerulosclerosis, and vasculopathy, typically observed in CAN, and also maintains stable function; albeit only MSC-injected animals showed decreased numbers of infiltrating cells, a fully preserved parenchyma structure, and were protected from developing graft fibrosis with a very homogeneous effect. However, we could not find any sign of kidney regeneration or homing of the injected cells in the graft.

Our main contribution to the success in the treatment of the CAN is the timing of the therapy, which leads to a complete prevention or protection of the graft 24 weeks after transplantation. A recent report from a clinical trial treating at the early stages after transplantation [19] showed the unexpected deleterious short-term effects of MSC therapy. We chose a later time after transplantation, as we and others [20] have shown a second deleterious inflammatory wave that leads to chronic tissue fibrosis. This type of approach has proved successful in our group with the use of HGF gene therapy [1].

An important point that needs to be addressed is the fact that we did not detect any of the injected MSCs 7 days after the therapy. As other authors have reported [21] those cells get trapped in the lungs within hours, and no cells or fluo-

rescent signal is detected 3 days after the injection, suggesting that allogeneic MSCs die in the lungs early after the injection or are cleared from the circulation by immune cells. However, we know that the injected cells are low MHC class I expressers and MHC Class II negative before the injection, which theoretically makes them immune privileged to clearance by the adaptive immune system although more susceptible to the innate immune system. We cannot confirm whether there is a phenotypic change after an injection, as some authors have proved both MHC I and MHC II up-regulation after IFN γ stimulus *in vitro* [22]. However, the fact that the MSC-injected animals do not generate specific antibodies against the 3rd party cell donor, contrary to what happens in the BMC group, confirms that MSCs are not rejected by the recipient. Another option that should be contemplated is the possibility of MSCs being eliminated by CD8 T cells, as has been reported *in vitro* [23].

The use of BMCs as a therapeutic tool in solid organ transplantation had been already attempted in experimental [9] and clinical models [24] with very good results as a pro-tolerogenic agent. More recently, it has been suggested that whole BMCs would be more efficient in comparison to MSCs in the reduction of the progression of chronic kidney [9] and heart [25,26] diseases. We, therefore, injected whole BMC as a control group to MSC therapy. Since whole BMC includes MSCs, they represent a better control than sham injections.

Gene expression gives us a more precise insight of the immune regulation while observing a decreased expression of inflammatory genes with a clear down-regulation over time, and an increased expression of anti-inflammatory and immunosuppressive genes. IDO appears to be a key factor in this regulation, as it is highly up-regulated in MSC-treated animals. IDO can block activation of T cells, which are particularly sensitive to loss of tryptophan [27]. Notably, IDO is needed to prevent T-cell-mediated rejection [28,29], and it has been shown to be responsible, at least in part, for the induction of kidney allograft tolerance through the generation of regulatory T cells in a mouse model of acute allograft rejection [2] and in a solid organ transplantation model, being also required for organ acceptance [30].

MSC cell therapy served as a protection not only from inflammatory cellular infiltrate but also from humoral responses. This is in tune with *in vitro* findings [31] showing how MSC suppress allo-specific antibody production by B cells. Interestingly, BMC therapy rapidly increases circulating alloantibodies specific against the cell donor along with an increase in circulating alloantibodies against the kidney donor.

Along with this cellular and humoral anti-inflammatory effect of the MSC early after treatment, we observe a gene modulation of pro-fibrotic genes. Shortly after the injection, MSCs show the ability to down-regulate bFGF and fibronectin, while without them, treatment would be increased. The down-regulation of fibronectin at the onset of the fibrotic process and the effective long-term down-regulation of bFGF are unequivocal signs of fibrosis inhibition or protection from damage by the treatment [32,33]. At 24 weeks, the anti-fibrotic effect may be seen in conventional histology and IHC with a significant decrease in CTGF and α SMA.

Interestingly, this effect was maintained along with time, although the cells were found neither at 24 weeks nor 1 week

MSCs PREVENT IFTA IN KIDNEY ALLOGRAFT

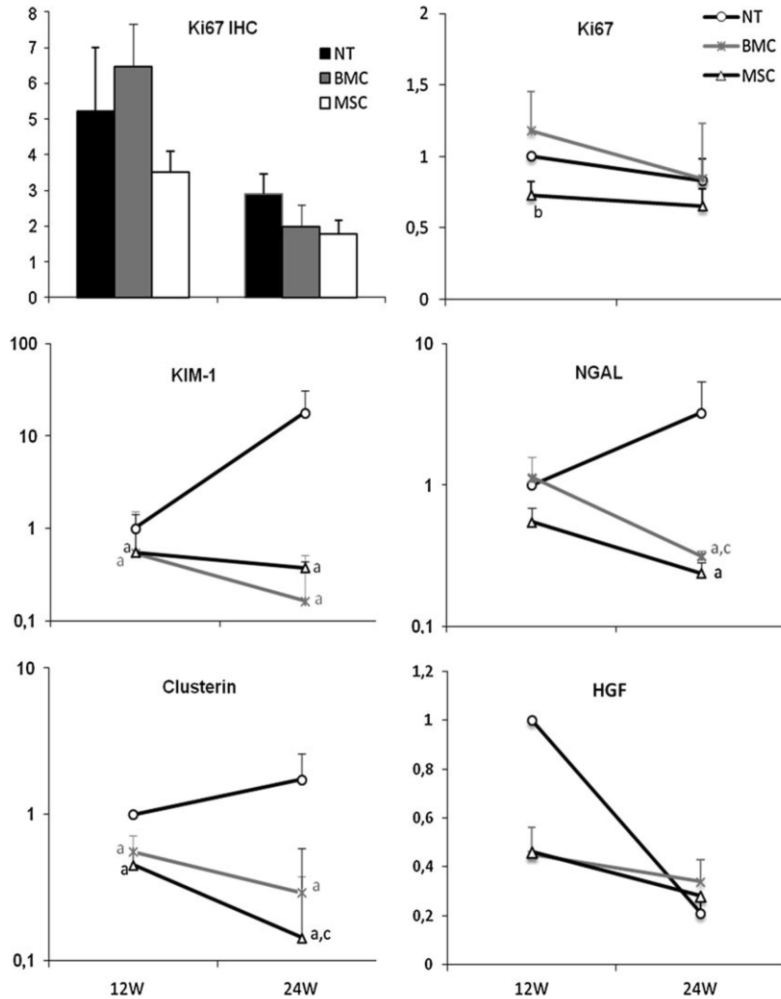


FIG. 6. Renal regeneration. Ki67 immunostaining of tubular epithelial cells (bars chart) was quantitatively assessed and expressed as mean of positive cells/per field viewed, and showed no differences between the groups at 12 or at 24 weeks. Gene expression of Ki67 shows slightly less expression at 12 weeks in the MSC group compared with the BMC group. Damage/proliferation markers as Kim-1, NGAL, and Clusterin show a dramatic increase in NT compared with MSC- and BMC-injected animals. HGF show the opposite pattern but again confirming no regeneration in the cell treatment group (^a $P < 0.05$ vs. NT group at the same time point, ^b $P < 0.05$ vs. BMC group at the same time point, ^c $P < 0.05$ vs. same group at 12 weeks). HGF, hepatocyte growth factor; KIM-1, kidney injury molecule-1.

after the injection. CXCL12 expression has been widely shown to play a role in the mobilization and homing of CXCR4⁺ cells enhanced by tissue injury or DNA damage [34,35]. Since the expression of these 2 factors is only early enhanced in the non-MSC-treated groups, it gives strength to our idea of injury blockage by the cell therapy.

As a last step, we aimed at testing tissular regeneration. It remains controversial whether the differentiation of MSCs is produced, as some authors have localized injected MSCs in chronic injury models and reported a regenerative effect [10], but they have not been able to observe kidney structures or cells derived from the injected MSCs. In our model, although

we were expecting a pro-regenerative effect, we have observed neither the differentiation of injected MSCs in the renal parenchyma similar to that proposed by some authors nor the enhancement of regeneration. Since we have not detected the injected MSCs in the renal parenchyma or in liver or spleen, we cannot contribute to this subject.

Moreover, we observed a decreased expression of Kim-1, NGAL, clusterin, and HGF. The expression of these genes has been used as a biomarker of acute kidney damage and is also related to the regeneration to overcome injury [36–40]. Both cell treatments show no increase in the expression of these 4 genes in time along with a conserved parenchyma, indicating a prevention of the damage settling and again corroborating the idea of injury blockage by the MSC therapy.

In summary, we have observed a therapeutic effect of MSC attenuating the progression of CAN when this process is already in progress. This beneficial effect observed seems to be attributable to the immunomodulatory properties of MSCs, which rather than promoting tissue regeneration prevent the onset of the disease.

Acknowledgments

M.F. is a postdoctoral fellow funded by ERA-EDTA; E.R. is the recipient of a fellowship from IDIBELL. I.H.F. is a researcher from "Programa Estabilización Investigadores" financed by ISCIII and Dpt. Salut Generalitat Catalunya. This work was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III/FIS (FIS06/0230, PS09/00107), REDinREN (FIS06/0016), and Fundación SENEPRO 2007. The authors thank N. Bolaños for immunohistochemical support and Centres Científics i Tecnològics - CCITUB, UB-Bellvitge, for microscopy and flow cytometry technical support.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Herrero-Fresneda I, J Torras, M Franquesa, A Vidal, JM Cruzado, N Lloberas, C Fillat and JM Grinyo. (2006). HGF gene therapy attenuates renal allograft scarring by preventing the profibrotic inflammatory-induced mechanisms. *Kidney Int* 70:265–274.
- Ge W, J Jiang, J Arp, W Liu, B Garcia and H Wang. (2010). Regulatory T-cell generation and kidney allograft tolerance induced by mesenchymal stem cells associated with indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *Transplantation* 90:1312–1320.
- Zonta S, M De Martino, G Bedino, G Piotti, T Rampino, M Gregorini, F Frassoni, A Dal Canton, P Dionigi and M Alessiani. (2010). Which is the most suitable and effective route of administration for mesenchymal stem cell-based immunomodulation therapy in experimental kidney transplantation: endovenous or arterial? *Transplant Proc* 42: 1336–1340.
- De Martino M, S Zonta, T Rampino, M Gregorini, F Frassoni, G Piotti, G Bedino, L Cobianchi, A Dal Canton, P Dionigi and M Alessiani. (2010). Mesenchymal stem cells infusion prevents acute cellular rejection in rat kidney transplantation. *Transplant Proc* 42:1331–1335.
- Zhang W, C Qin and ZM Zhou. (2007). Mesenchymal stem cells modulate immune responses combined with cyclosporine in a rat renal transplantation model. *Transplant Proc* 39:3404–3408.
- Cavaglieri RC, D Martini, MC Sogayar and IL Noronha. (2009). Mesenchymal stem cells delivered at the subcapsule of the kidney ameliorate renal disease in the rat remnant kidney model. *Transplant Proc* 41:947–951.
- Choi S, M Park, J Kim, S Hwang, S Park and Y Lee. (2009). The role of mesenchymal stem cells in the functional improvement of chronic renal failure. *Stem Cells Dev* 18: 521–529.
- Semedo P, M Correa-Costa, M Antonio Cenedeze, D Maria Avancini Costa Malheiros, M Antonia dos Reis, MH Shimizu, AC Seguro, A Pacheco-Silva and NO Saraiva Camara. (2009). Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model. *Stem Cells* 27:3063–3073.
- Caldas HC, IM Fernandes, F Gerbi, AC Souza, MA Baptista, HJ Ramalho, RS Kawasaki-Oyama, EM Goloni-Bertollo, EC Pavarino-Bertelli, DM Braile and M Abbud-Filho. (2008). Effect of whole bone marrow cell infusion in the progression of experimental chronic renal failure. *Transplant Proc* 40: 853–855.
- Ninichuk V, O Gross, S Segerer, R Hoffmann, E Radomska, A Buchstaller, R Huss, N Akis, D Schlondorff and HJ Anders. (2006). Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice. *Kidney Int* 70:121–129.
- Prodomidi EI, R Poulosom, R Jeffery, CA Roufosse, PJ Pollard, CD Pusey and HT Cook. (2006). Bone marrow-derived cells contribute to podocyte regeneration and amelioration of renal disease in a mouse model of Alport syndrome. *Stem Cells* 24:2448–2455.
- Herrero-Fresneda I, J Torras, JM Cruzado, E Condom, A Vidal, M Riera, N Lloberas, J Alsina and JM Grinyo. (2003). Do alloreactivity and prolonged cold ischemia cause different elementary lesions in chronic allograft nephropathy? *Am J Pathol* 162:127–137.
- Herrero-Fresneda I, J Torras, A Vidal, N Lloberas, JM Cruzado and JM Grinyo. (2005). Reduction of postischemic immune inflammatory response: an effective strategy for attenuating chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 79:165–173.
- Herrero-Fresneda Z. Experimental kidney transplant. www.renal.transplantation.com.
- Remy S, L Tesson, C Usal, S Menoret, V Bonnamain, V Nerie-re-Daguin, J Rossignol, C Boyer, TH Nguyen, et al. (2010). New lines of GFP transgenic rats relevant for regenerative medicine and gene therapy. *Transgenic Res* 19:745–763.
- Sis B, M Mengel, M Haas, RB Colvin, PF Halloran, LC Racusen, K Solez, WM Baldwin, 3rd, ER Bracamonte, et al. (2010). Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant* 10:464–471.
- Hill M, V Pereira, C Chauveau, R Zagani, S Remy, L Tesson, D Mazal, L Ubbilos, R Brion, et al. (2005). Heme oxygenase-1 inhibits rat and human breast cancer cell proliferation: mutual cross inhibition with indoleamine 2,3-dioxygenase. *FASEB J* 19:1957–1968.
- Casiraghi F, M Noris and G Remuzzi. (2010). Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells in

MSCs PREVENT IFTA IN KIDNEY ALLOGRAFT

11

- solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 15:731-737.
19. Perico N, F Casiraghi, M Inrona, E Gotti, M Todeschini, RA Cavinato, C Capelli, A Rambaldi, P Cassis, et al. (2011). Autologous mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: a pilot study of safety and clinical feasibility. *Clin J Am Soc Nephrol* 6:412-422.
 20. Diamond JR, NL Tilney, J Frye, G Ding, J McElroy, I Pesek-Diamond and H Yang. (1992). Progressive albuminuria and glomerulosclerosis in a rat model of chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 54:710-716.
 21. Yang X, I Balakrishnan, B Torok-Storb and MM Pillai. (2012). Marrow Stromal Cell Infusion Rescues Hematopoiesis in Lethally Irradiated Mice despite Rapid Clearance after Infusion. *Adv Hematol* 2012:142530.
 22. Crop MJ, CC Baan, SS Korevaar, JN Ijzermans, M Pescatori, AP Stubbs, WF van Ijcken, MH Dahlke, E Eggenhofer, W Weimar and MJ Hoogduijn. (2010). Inflammatory conditions affect gene expression and function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 162:474-486.
 23. Crop MJ, SS Korevaar, R de Kuiper, JN Ijzermans, NM van Besouw, CC Baan, W Weimar and MJ Hoogduijn. (2011). Human mesenchymal stem cells are susceptible to lysis by CD8+ T-cells and NK cells. *Cell Transplant* [Epub ahead of print]; Doi: 10.3727/096368910X564076.
 24. Mathew JM, RO Garcia-Morales, M Carreno, Y Jin, L Fuller, B Blomberg, R Cirocco, GW Burke, G Ciancio, et al. (2003). Immune responses and their regulation by donor bone marrow cells in clinical organ transplantation. *Transpl Immunol* 11:307-321.
 25. Mazo M, JJ Gavira, G Abizanda, C Moreno, M Ecay, M Soriano, P Aranda, M Collantes, E Alegria, et al. (2010). Transplantation of mesenchymal stem cells exerts a greater long-term effect than bone marrow mononuclear cells in a chronic myocardial infarction model in rat. *Cell Transplant* 19:313-328.
 26. Ghanem A, A Ziomka, B Krausgrill, K Schenk, C Troatz, T Miszalski-Jankna, G Nickenig, K Tiemann and J Muller-Ehmsen. (2009). Functional impact of targeted closed-chest transplantation of bone marrow cells in rats with acute myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cell Transplant* 18:1289-1297.
 27. Muller AJ, JB DuHadaway, PS Donover, E Sutanto-Ward and GC Prendergast. (2005). Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med* 11:312-319.
 28. DelaRosa O, E Lombardo, A Beraza, P Mancheco-Corvo, C Ramirez, R Menta, L Rico, E Camarillo, L Garcia, et al. (2009). Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A* 15:2795-2806.
 29. English K, FP Barry, CP Field-Corbett and BP Mahon. (2007). IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol Lett* 110:91-100.
 30. Popp FC, E Eggenhofer, P Renner, P Slowik, SA Lang, H Kaspar, EK Geissler, P Piso, HJ Schlitt and MH Dahlke. (2008). Mesenchymal stem cells can induce long-term acceptance of solid organ allografts in synergy with low-dose mycophenolate. *Transpl Immunol* 20:55-60.
 31. Comoli P, F Ginevri, R Maccario, MA Avanzini, M Marconi, A Groff, A Cometa, M Cioni, L Porretti, et al. (2008). Human mesenchymal stem cells inhibit antibody production induced in vitro by allostimulation. *Nephrol Dial Transplant* 23:1196-1202.
 32. Vieira JM, Jr., E Mantovani, LT Rodrigues, H Delle, IL Noronha, CK Fujihara and R Zatz. (2005). Simvastatin attenuates renal inflammation, tubular transdifferentiation and interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. *Nephrol Dial Transplant* 20:1582-1591.
 33. Liu N, E Tolbert, M Pang, M Ponnusamy, H Yan and S Zhuang. (2011). Suramin inhibits renal fibrosis in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 22:1064-1075.
 34. Tegel F, J Isaac, Z Hu, K Weiss and C Westenfelder. (2005). Renal SDF-1 signals mobilization and homing of CXCR4-positive cells to the kidney after ischemic injury. *Kidney Int* 67:1772-1784.
 35. Ponomaryov T, A Peled, I Petit, RS Taichman, L Habler, J Sandbank, F Arenzana-Seisdedos, A Magerus, A Caruz, et al. (2000). Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest* 106:1331-1339.
 36. Mishra J, Q Ma, A Prada, M Mitsnefes, K Zahedi, J Yang, J Barasch and P Devarajan. (2003). Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* 14:2534-2543.
 37. Gobe GC, R Buttyan, KR Wyburn, MR Etheridge and PJ Smith. (1995). Clusterin expression and apoptosis in tissue remodeling associated with renal regeneration. *Kidney Int* 47:411-420.
 38. Vinuesa E, A Sola, M Jung, V Alfaro and G Hotter. (2008). Lipocalin-2-induced renal regeneration depends on cytokines. *Am J Physiol Renal Physiol* 295:F1554-F1562.
 39. Homsí E, P Janino, SK Biswas, S Mizuno, T Nakamura and JB Lopes de Faria. (2007). Attenuation of glycerol-induced acute kidney injury by previous partial hepatectomy: role of hepatocyte growth factor/c-met axis in tubular protection. *Nephron Exp Nephrol* 107:e95-e106.
 40. Bailly V, Z Zhang, W Meier, R Cate, M Sanicola and JV Bonventre. (2002). Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J Biol Chem* 277:39739-39748.

Address correspondence to:

Dr. M. Franquesa

Experimental Renal Transplantation

Laboratory of Experimental Nephrology, Bellvitge Biomedical

Research Institute (IDIBELL)

Universitat de Barcelona (UB)

Laboratory 4122 4^a Planta Pavelló de Govern

Campus Bellvitge

Av/Feixa Larga sn

08907 L'Hospitalet de Llobregat

Barcelona

Spain

E-mail: mfranquesa@ub.edu

Received for publication February 23, 2012

Accepted after revision April 11, 2012

Prepublished on Liebert Instant Online XXXX XX, XXXX