

Ruolo dei progenitori renali nella rigenerazione tubulo-glomerulare

D. Lombardi

Dottore in Biotecnologie Medico-Diagnostiche, Studente presso il Corso Magistrale in Terapie Biologiche e Cellulari in Medicina, CdL in Biotecnologie Mediche, Medicina, Università degli Studi di Firenze
Tirocinante del Laboratorio Interdipartimentale di Nefrologia Cellulare e Molecolare diretto dalla Professoressa P. Romagnani, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Firenze



Introduzione

Nei precedenti contributi erano state delineate le principali caratteristiche della popolazione di cellule staminali renali CD133⁺CD24⁺, poi rinominate APEMP, o *Adult Parietal Endothelial Multipotent Progenitors*, con particolare attenzione alle tecniche di natura biotecnologica che hanno permesso di

scoprire, isolare e caratterizzare tale *pool* cellulare.

Di considerevole interesse, soprattutto nel campo della medicina rigenerativa, è però il ruolo che queste cellule assumono *in vivo* sia fisiologicamente, ove rimangono protette nella nicchia staminale identificabile nella giunzione tubulo-glomerulare al polo urinario della capsula di Bowman; che in conseguenza di un insulto, evento che induce "l'attivazione" di queste cellule che, differenziandosi e specializzandosi, vanno a sostituire sia cellule epiteliali tubulari, che podociti. Di notevole attrattiva è però anche lo scenario ben più ampio, seppur ancora lontano, dell'utilizzo di tali progenitori renali nel trattamento di nefropatie quali la glomerulosclerosi e la malattia renale cronica (CKD). Lo studio del processo differenziativo di questi progenitori sia verso il *lineage* epiteliale tubulare, che in direzione del podocita, potrebbe difatti permettere di ipotizzare un loro possibile impiego sia diretto, ossia mediante somministrazione delle cellule stesse; che indiretto, inteso come attivazione delle APEMP autologhe residenti, al fine di rendere possibile la regressione della malattia e delle lesioni renali associate a nefropatie.

La scoperta di tale *pool* cellulare ad opera del gruppo della professoressa Romagnani giunge però solo nel

2006, motivo per cui appare ovvio come ancora il percorso che potrebbe permettere tale tipo di terapia sia lungo e, per alcuni aspetti, sicuramente impervio.

Al momento attuale è stato però possibile studiare nefropatie quali Glomerulosclerosi Segmentale Focale (FSGS), Necrosi tubulare acuta ed ARF (*Acute Renal Failure*), in modelli murini che ricreano tali patologie, e su cui è stata in seguito effettuata una terapia basata sull'impiego di APEMP. Il fine ultimo di tale trattamento è ovviamente quello di verificare la capacità di tali cellule di permettere un recupero delle funzionalità renale e quindi la remissione della malattia *in vivo*.

Cellule staminali renali e modelli murini di nefropatie

Le APEMP utilizzate negli studi riportati di seguito sono state isolate da reni umani, e proprio per questo i modelli sperimentali murini sono stati messi a punto in topi SCID (*Severe Combined Immuno Deficiency*), deficienti ossia nel compartimento linfocitario B e T, di modo che il sistema immunitario murino non fosse in grado di rigettare ed eliminare le cellule somministrate in quanto non autologhe.

Nello studio di Sagrinati C. et al (1) il modello di necrosi tubulare acuta, seguita da ARF, è stato ricreato grazie a una raddomiolisi indotta mediante iniezione intramuscolare di glicerolo ipertonico. L'iniezione di glicerolo induce un significativo incremento nel livello di azotemia sierica (BUN), la quale raggiunge un picco al giorno 3, inizia a declinare a partire dal giorno 7, e tra l'11° e il 14° giorno si ristabilizza a valori che sono però nettamente superiori rispetto a quelli fisiologici. Non rientra "nella

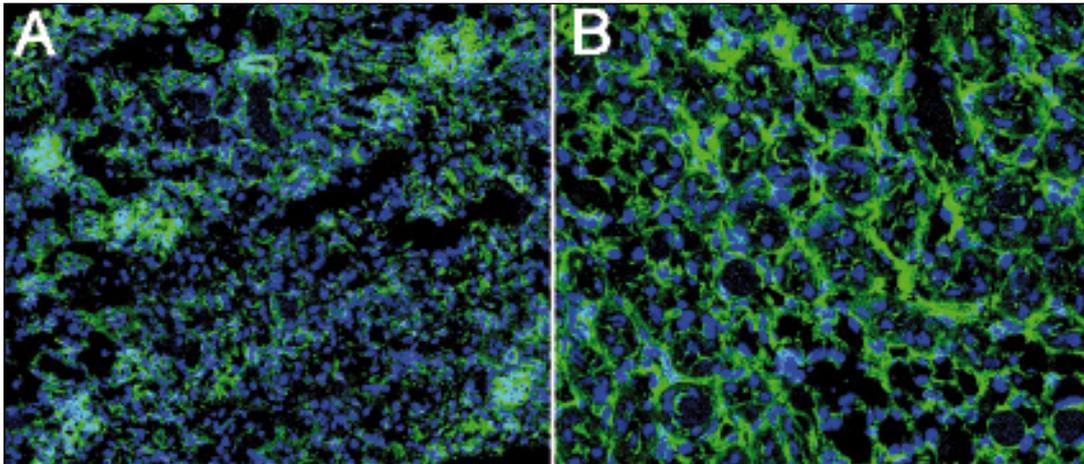


Fig. 1 - Analisi a microscopio confocale a fluorescenza con falloidina di (A) tessuto renale normale; (B) danno tubulo-necrotico consecutivo ad iniezione intramuscolare di glicerolo. In blu sono localizzati i nuclei cellulari.

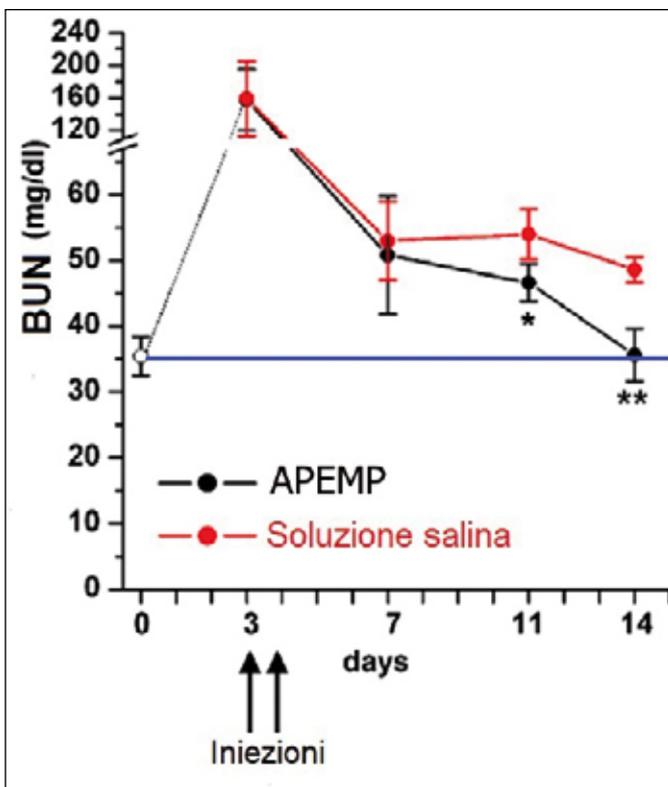


Fig. 2 - Andamento della BUN in topi SCID affetti da ARF e trattati con soluzione salina (rosso) o APEMP (nero). La linea in blu individua i valori fisiologici di azotemia (1).

norma” anche la morfologia dei reni dei topi trattati con glicerolo, i quali mostrano una notevole vacuolizzazione, una diffusa necrosi delle cellule epiteliali tubulari, la formazione di cilindri ialini a livello tubulare nonché perdita dell’orletto a spazzola, con un generale appiattimento delle cellule epiteliali (Fig. 1).

Al fine di verificare il possibile effetto rigenerativo di tali CD133⁺CD24⁺APEMP *in vivo*, un gruppo sperimentale

di topi ha ricevuto, al giorno 3 e 4 dopo l’induzione del danno, un’iniezione via vena caudale di tali cellule, mentre in parallelo un altro gruppo di topi ha ricevuto solamente soluzione salina. La scelta somministrativa dei giorni 3 e 4 è legata al fatto che presso tale tempistica si raggiunge il picco massimo nella BUN.

I topi sono stati poi sacrificati a differenti intervalli temporali (3, 7, 11 e 14 giorni dall’inizio dell’esperimento) e campioni di sangue sono stati prelevati alle medesime tempistiche per determinare i livelli di BUN.

L’analisi istologica e l’andamento della BUN dimostrano che la somministrazione di APEMP possiede un effetto protettivo nei confronti della funzione renale come evidenziato dai livelli, significativamente inferiori, di BUN ai giorni 11 e 14, se comparati all’azotemia sierica dei topi trattati con la sola soluzione salina. È interessante notare che al 14° giorno i topi trattati con le APEMP mostravano una funzionalità renale fisiologicamente e completamente ristabilita, con livelli di BUN non troppo distanti rispetto a quelli osservabili in topi sani (Fig. 2). È stato inoltre possibile dimostrare che tali APEMP, marcate grazie all’uso del fluoroforo rosso PKH26 e individuabili mediante microscopia a fluorescenza, sono in grado di integrarsi e di rigenerare differenti porzioni del nefrone, portando a una riduzione della necrosi tissutale, della fibrosi e della deposizione di matrice extracellulare ad essa associata (Fig. 3).

Di notevole rilievo è il fatto che il trattamento cellulare migliora in modo significativo, sia da un punto di vista morfologico, che da un punto di vista funzionale, il danno renale, come evidenziato grazie ad analisi istologiche effettuate al giorno 14 dopo l’induzione del danno.

In questo modo è stato possibile dimostrare che le APEMP sono capaci di dar luogo alla riparazione di strutture tubulari, evento che non era altresì osservabile nei topi trattati con soluzione salina, i quali esibivano perciò ampie aree di fibrosi interstiziale (Fig. 4).

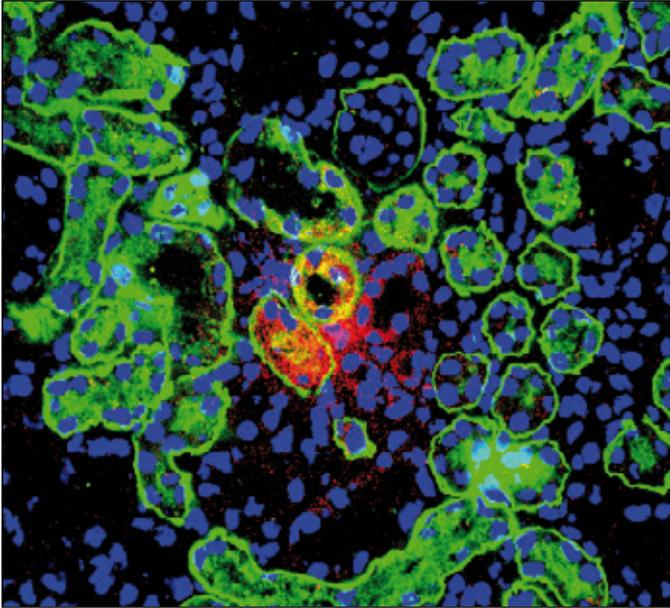


Fig. 3 - Sezione renale di topo con ARF analizzata mediante microscopia confocale a fluorescenza in cui è possibile osservare la presenza di APEMP marcate con PKH26 (rosso) integratisi a livello tubulare. In verde si ha il marcatore del tubulo prossimale LTA, in blu sono marcati i nuclei cellulari.

Il trattamento dei topi affetti da necrosi tubulare acuta con APEMP porta quindi ad una completa restituzione della funzionalità renale nonché a un significativo decremento della fibrosi renale: questi dati permettono di ipotizzare che la protezione funzionale attuata dalle APEMP sia probabilmente dovuta alla capacità di queste cellule di integrarsi, ed in seguito differenziare, in diverse porzioni tubulari, come evidenziato dalla loro capacità di ripopolare il tubulo.

Analogamente nello studio di Lazzeri et al (2) il modello

di ARF è stato messo a punto grazie ad una raddiomolisi indotta da iniezione intramuscolare di glicerolo. Questi topi sono poi stati sottoposti a trattamento con Progenitori Renali Embrionici, o REC, ossia quella popolazione di cellule che con lo sviluppo dell'embrione e del feto rimarranno selettivamente localizzate presso il polo urinario della capsula di Bowman divenendo così APEMP. Anche in questo caso il trattamento è avvenuto mediante iniezione delle cellule tramite vena caudale sia al 3° che al 4° giorno consecutivi all'iniezione di glicerolo, ossia nel momento in cui si raggiungono i massimi livelli di azoto ureico. Ciò che è stato possibile osservare è che tali cellule, marcate nuovamente con il fluoroforo PKH26, erano analogamente in grado di integrarsi e ricostituire varie e diverse porzioni del nefrone, riducendo le aree fibrotiche e sclerotiche. In particolare le REC marcate si incorporano nelle zone maggiormente danneggiate, vale a dire i tubuli, dove esprimono sia il marcatore tipico del tubulo prossimale LTA (*Lotus Tetragonolobus Lectin*, o il marker DBA (*Dolichos Biflorus Agglutinin*) che altresì caratterizza il tubulo distale ed i dotti collettori.

I livelli di BUN misurati nei topi che avevano ricevuto la terapia cellulare a base di REC sono poi risultati significativamente inferiori rispetto agli stessi topi trattati invece con soluzione salina, in accordo con quanto verificato nel precedente studio (1). Anche in questo caso la morfologia renale dei topi trattati con soluzione salina mostra la presenza di ampie aree fibrotiche interstiziali, che non sono altresì presenti nei topi sottoposti a terapia cellulare: il trattamento con le REC è quindi associato ad una migliore preservazione della struttura renale, con una completa remissione della funzionalità renale entro 14 giorni.

Ciò che è però in particolar modo importante sottolineare è che tali cellule non mostrano potenziale tumorigenico, suggerendo che potrebbero essere effettivamente impiegate nel trattamento dell'ARF; cosa che altresì è al

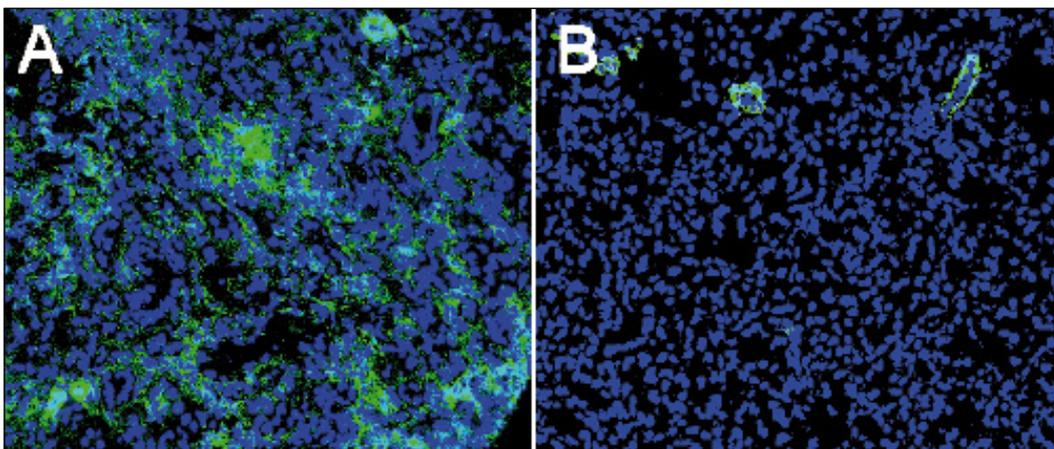


Fig. 4 - Fibrosi interstiziale residua individuata dal marcatore α -sma (in verde) in topi trattati con la sola soluzione salina (A), o con APEMP (B). In blu il To-pro-3 marca i nuclei cellulari.

momento possibile escludere per terapie basate su cellule staminali embrionali, attrattiva di notevole interesse, ma che al momento trova scarse applicazioni a causa dell'alta incidenza nel conseguente sviluppo di teratomi (2).

È comunque da considerare che in seguito alla somministrazione dei Progenitori Embrionali (REC) in topi affetti da ARF, circa il 15% delle cellule tubulari erano di derivazione del donatore, mentre il medesimo protocollo sperimentale, basato però sull'utilizzo di APEMP, ha evidenziato che in questo caso solo il 6% delle cellule tubulari erano di origine umana, suggerendo quindi che le REC presentino un potenziale rigenerativo molto maggiore rispetto alle APEMP (2). Ciò lo si spiega in quanto le REC sono cellule molto meno commissionate e che presentano un potenziale differenziativo di più alto rilievo, in accordo con la loro natura di cellule di derivazione embrionale, da opporsi alla derivazione adulta delle APEMP, le quali proprio per questo mostrano percentuali di integrazione inferiori.

Con lo studio di Ronconi et al (3) sono state ulteriormente chiarite le possibilità rigenerative associate alle APEMP: i due studi precedentemente citati hanno difatti messo in risalto la possibilità del differenziamento in senso tubulare. In realtà tali cellule sono anche in grado di specializzarsi in senso podocitario, e questo ha permesso di supporre che potessero dar luogo, *in vivo*, alla generazione di nuovi podociti e quindi alla ricostituzione della barriera di filtrazione glomerulare. È opportuno ricordare che il podocita è una cellula post-mitotica che presenta caratteristiche fenotipiche tipiche di una cellula altamente specializzata, e ciò gli impedisce di dividersi al fine di sostituire i podociti persi. Ciononostante sono documentati casi di remissione e persino di regressione delle lesioni renali associate a glomerulosclerosi in seguito a trattamento con ACE-inibitori, e questo implica che debba esistere un meccanismo che permetta la ricostruzione della struttura glomerulare danneggiata. Il candidato perfetto appare essere nuovamente l'APEMP, capace di differenziare *in vitro* in lineage cellulari anche di origine extrarenale (1).

Al fine di verificare se le APEMP fossero in grado *in vivo* di differenziare a podociti è stato utilizzato come modello murino la nefropatia indotta da adriamicina, analogo sperimentale della FSGS. I topi che subiscono l'iniezione di adriamicina vanno incontro allo sviluppo di un danno podocitario che inizia a manifestarsi clinicamente attorno al 7° giorno, tempo dal quale è possibile osservare un incremento della proteinuria, ossia nel rapporto albumina/creatinina. Tale perdita di proteine diviene massiva tra il 14°-21° giorno, mentre dal 21° al 28° giorno è possibile notare un suo lieve e graduale decremento, il quale non rientrerà comunque nel range fisiologico.

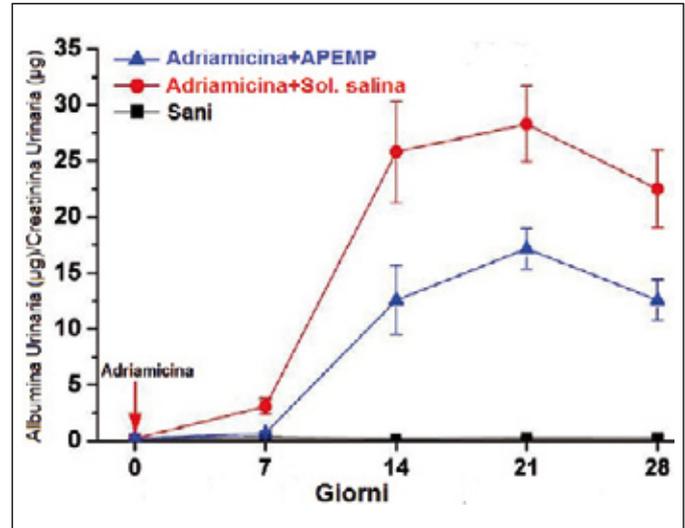


Fig. 5 - Time-course della proteinuria (rapporto albumina/creatinina urinaria) in topi sani (nero), in topi trattati con adriamicina e soluzione salina (rosso) e in topi trattati con adriamicina ed APEMP (blu) (3).

In questo studio (3) è stato dimostrato come la somministrazione di APEMP porti ad una riduzione nella proteinuria e migliori il danno glomerulare cronico, suggerendo così che tale popolazione cellulare possa essere il meccanismo chiave che permette la sostituzione dei podociti persi e che possa quindi potenzialmente trattare i disordini glomerulari caratterizzati da deplezione podocitaria, proteinuria e glomerulosclerosi progressiva.

Difatti dopo 7 giorni dall'inizio del trattamento, i topi sani, trattati con soluzione salina o con cellule CD133⁻CD24⁻, mancanti ossia dei due principali marcatori di staminalità delle APEMP e quindi delle loro caratteristiche fenotipiche, mostrano un alto rapporto albumina/creatinina. Al contrario, l'iniezione di CD133⁺CD24⁺APEMP è capace di ridurre fortemente la proteinuria, come evidenziato dal rapporto significativamente inferiore albumina/creatinina urinaria (Fig. 5).

L'analisi morfologica renale dei topi trattati con soluzione salina o cellule CD133⁻CD24⁻, evidenzia un'avanzata glomerulosclerosi associata ad una riduzione della superficie glomerulare, contrariamente al volume dell'interstizio, il quale risulta relativamente aumentato. La proteinuria inoltre non era ridotta come avveniva nel gruppo trattato con APEMP, a rimarcare nuovamente il ruolo centrale che tali cellule assumono, differenziando a podociti, al fine di ricostruire l'architettura glomerulare e la capacità di filtro selettivo che il glomerulo possiede in condizioni fisiologiche. APEMP marcate sono difatti riscontrate nelle strutture glomerulari, dove poi

acquisiscono l'espressione di marcatori specifici podocitari come la nefrina, la sinaptopodina e la podocina.

Un diverso sguardo al futuro

Complessivamente da questi studi emerge quindi che tali cellule, *in vivo*, possono agire da progenitori bi-potenti capaci di intraprendere sia una via che le porterà verso la linea epiteliale della componente tubulare, che un diverso percorso, in questo caso in direzione del polo vascolare e del *lineage* podocitario. Esse sono quindi le principali responsabili dei processi rigenerativi renali e la dimostrazione di tali capacità promette quindi di essere un nuovo strumento per la terapia cellulare dei disordini renali. Permangono però problematiche di base come la necessità di ulteriori sperimentazioni, la necessità di approfondimenti sulla capacità di modulare l'attivazione di tali cellule *in vivo*, o la necessità che si verrebbe a creare, in un possibile scenario di somministrazione di terapia cellulare in uomo, di poter avere grandi quantità di APEMP autologhe.

Tutte problematiche che tempo e ricerca renderanno sicuramente risolvibili.

Indirizzo degli Autori:

Duccio Lombardi
Via B. Scala 23
50126 Firenze
lombarduccio@alice.it

Bibliografia

1. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F, Ronconi E, Meini C, Gacci M, Squecco R, Carini M, Gesualdo L, Francini F, Maggi E, Annunziato F, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Romagnani P. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2443-56.
2. Lazzeri E, Crescioli C, Ronconi E, Mazzinghi B, Sagrinati C, Netti GS, Angelotti ML, Parente E, Ballerini L, Cosmi L, Maggi L, Gesualdo L, Rotondi M, Annunziato F, Maggi E, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Vannelli GB, Romagnani P. Regenerative potential of embryonic renal multipotent progenitors in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 3128-38.
3. Ronconi E, Sagrinati C, Angelotti ML, Lazzeri E, Mazzinghi B, Ballerini L, Parente E, Becherucci F, Gacci M, Carini M, Maggi E, Serio M, Vannelli GB, Lasagni L, Romagnani S, Romagnani P. Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 322-32.

L'articolo con le foto a colori è disponibile on-line:
www.sin-italy.org/TN&D/benvenuto.asp