



Università degli Studi di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE NEFROLOGICHE XX ciclo

SSD: MED 14

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Sergio Stefoni

RUOLO DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI IN MODELLI CELLULARI E ANIMALI DI NEFROPATIA

Tutor

Chiar.ma Prof.ssa Rosanna Gusmano

Dottorando

Dr. Alberto Magnasco

Anno Accademico 2006 - 2007

SOMMARIO

ABSTRACT.....	4
1. INTRODUZIONE.....	6
2. MATERIALI E METODI.....	9
2.1 Coltura e caratterizzazione delle MSC.....	9
2.2 Esperimenti <i>in vitro</i>	11
2.2.1 Podociti umani.....	11
2.2.2 Analisi della generazione del radicale superossido(ROS).....	11
2.2.3 Test di apoptosi.....	11
2.2.4 Valutazione del danno mitocondriale.....	12
2.2.5 Analisi del trasferimento mitocondriale.....	12
2.3 Esperimenti <i>in vivo</i>	13
2.3.1 La nefropatia acuta da ADR.....	14
2.3.2 Nefropatia cronica da ADR.....	14
2.3.3 Studio della distribuzione delle MSC.....	15
2.3.4 Morfologia renale.....	16
2.4 Analisi statistica.....	16
3. RISULTATI.....	17
3.1 Risultati <i>in vitro</i>	17
3.1.1 Effetti dell'ADR sui podociti 'in vitro'.....	17
3.1.2 Valutazione del danno mitocondriale da ADR.....	19
3.1.3 Analisi del trasferimento mitocondriale.....	21
3.2 Effetti dell'ADR sul modello animale 'in vivo'.....	22
3.2.1 Nefropatia acuta.....	23
3.2.2 Nefropatia cronica.....	26

3.3 Distribuzione MSC.....	31
4. DISCUSSIONE.....	33
5. CONCLUSIONI.....	38
6.BIBLIOGRAFIA.....	39
7. RINGRAZIAMENTI.....	42

ABSTRACT

MESENCHYMAL STEM CELLS PROTECTIVE EFFECT IN CELL AND ANIMAL MODELS OF NEPHROPATHY

Background. Mesenchymal stem cells (MSC) may be of value in regeneration of renal tissue after damage, however lack of biological knowledge and variability of results in animal models limit their utilization.

Methods. We studied the effects of MSC on podocytes ‘in vitro’ and ‘in vivo’ utilizing adriamycin (ADR) as a model of renal toxicity. The ‘in vivo’ experimental approach was carried out in male Sprague Dawley rats (overall 60 animals) treated with different ADR schemes to induce acute and chronic nephrosis. MSC were given a) concomitantly to ADR in tail vein or b) in aorta and c) in tail vein 60 days after ADR. Homing was assessed with PKH26-MSC.

Results. MSC rescued podocytes from ‘in vitro’ apoptosis induced by ADR. The maximal effect (80% rescue) was obtained with MSC/Podocytes co-culture ratio of 1:1 for 72 hours. All rats treated with ADR developed nephrosis. In no case MSC modified the clinical parameters (i.e. proteinuria, serum creatinine, lipids) but protected the kidney from severe glomerulosclerosis when given concomitantly to ADR. Rats given MSC 60 days after ADR developed the same severe renal damage. Only few MSC were found in renal tubule-interstitial areas after 1-24 hours from injection and no MSC was detected in glomeruli.

Conclusions. MSC reduced apoptosis of podocytes treated with ADR ‘in vitro’. Early and repeated MSC infusion blunted glomerular damage in chronic ADR

nephropathy. MSC did not modify proteinuria and progression to renal failure, that implies lack of regenerative potential in this model.

Parole chiave (*Keywords*):

MSCs, oxidation, podocytes, nephrotic syndrome, regeneration, kidney

1. INTRODUZIONE

La cosiddetta medicina rigenerativa (1) si pone, al momento, come una potenziale alternativa terapeutica che potrebbe rivoluzionare modalità e tecniche di trapianto. Si è sviluppata sulla base di nuove eccitanti scoperte nel campo della biologia delle cellule staminali, precursori con la capacità di autorigenerarsi e differenziare in cellule specializzate in risposta ad appropriati segnali. Le cellule staminali vengono distinte in embrionali (ES) o adulte. Le ES sono isolate dalla blastocisti e sono totipotenti, dando origine a qualunque tipo cellulare. Le cellule staminali adulte sono presenti in tutti i tessuti, sono pluripotenti e posseggono un alto, ma limitato, potenziale replicativo. Cellule staminali adulte emopoietiche sono state isolate nel midollo osseo, ma non è semplice coltivarle senza indurre il differenziamento: è pertanto necessario affinarne le tecniche di coltura. Cellule staminali mesenchimali (MSC) (2, 3) sono state isolate in quasi tutti i tessuti, tra cui osso, tessuto adiposo, midollo osseo, muscolo, encefalo. Possono duplicarsi mantenendosi indifferenziate per poi differenziarsi, in risposta a specifici segnali, in cellule diverse, endoteliali, muscolari, ossee, cartilaginee, adipose, emopoietiche. La ricerca sulle cellule staminali si trova oggi ad affrontare il problema di identificare una fonte conveniente per un possibile utilizzo come terapia rigenerativa. A causa delle restrizioni etiche per quanto riguarda l'utilizzazione delle cellule staminali embrionali (4, 5), sono stati effettuati numerosi tentativi nei quali tessuti adulti vengono utilizzati come fonte di cellule pluripotenti per terapie di sostituzione tissutale. Le fonti autologhe, come il midollo osseo, le cellule mobilizzate dal midollo o le cellule pluripotenti residenti nei tessuti periferici sono con ogni probabilità una fonte conveniente da utilizzare per la riparazione tissutale in seguito a danni tissutali estesi. Questo approccio ha l'evidente vantaggio di essere al riparo dalle possibili complicazioni derivanti dall'incompatibilità HLA: tali cellule possono infatti essere prelevate dal midollo osseo, dal rene, dal cuore, dal tessuto adiposo o da un altro tessuto del paziente, coltivate ed amplificate, portate ad una densità cellulare compatibile con l'estensione del danno tissutale e caratterizzate in vitro prima dell'uso, per quanto riguarda il

loro potenziale differenziativo. D'altra parte la necessità di allestire popolazioni cellulari "personalizzate" che possono essere utilizzate solo dal donatore o da soggetti con esso istocompatibili rende problematica e molto costosa questa terapia. Inoltre l'uso di cellule che appartengono ad una linea differenziativa diversa potrebbe non rappresentare la soluzione ideale per quanto concerne l'integrazione anatomica e funzionale all'interno del tessuto ricevente. Differenze a carico delle proprietà funzionali, nonché a carico delle connessioni tra le cellule residenti nel tessuto danneggiato e le cellule trapiantate potrebbero rendere più difficile l'integrazione funzionale di queste ultime, dando origine ad una zona di tessuto dotata di proprietà autonome rispetto al resto dell'organo. D'altro canto, le condizioni per l'isolamento e la coltivazione di cellule capaci di rigenerare tessuti periferici diversi sono descritte soltanto in modo molto sommario nella letteratura recente. Non esiste neppure concordanza tra i diversi laboratori per quanto riguarda il repertorio di antigeni di superficie dei precursori tissutali, la plasticità o l'eterogeneità delle cellule destinate ad imboccare una certa via differenziativa e sugli stimoli che inducono la differenziazione cellulare *in vitro*.

Negli anni 2001-2004 sono stati effettuati molti studi sperimentali che hanno utilizzato il midollo osseo come fonte di cellule staminali, facilmente reperibili da donatori. In esso infatti risiedono due componenti cellulari: le cellule staminali emopoietiche (HSC), già da tempo usate in terapia in quanto precursori delle cellule del sangue, e le cellule mesenchimali stromali (MSC): queste ultime, per molto tempo ritenute prive di un ruolo funzionale, si sono rivelate in realtà cellule in parte indifferenziate, benché già "committed" nella linea mesenchimale. *In vitro* però, sotto appropriati stimoli, le MSC sono in grado di differenziarsi in altre cellule di tipo mesenchimale, in particolare cellule adipose, condroblasti e osteoblasti. Questa loro plasticità ha spinto i ricercatori a intraprendere studi *in vivo* volti a valutarne il potenziale rigenerativo in svariate patologie d'organo.

I primi dati scientifici negli anni 2001-2004 sull'utilizzo delle MSC in diverse patologie croniche importanti quali diabete, infarto del miocardio, malattie neurologiche degenerative sembravano molto promettenti ma sono stati

successivamente contestati. A titolo solo esemplificativo possiamo citare alcuni titoli di lavori apparsi sulla prestigiosa rivista Nature in momenti successivi: “Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium” (6) e successivamente “Adult pancreatic β -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation (7); oppure, “Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium”, (8) e successivamente “Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium” (9).

Le MSC sono state utilizzate anche nel trattamento di patologie renali sperimentali con risultati variabili. I primi dati dimostravano un positivo effetto clinico in modelli di insufficienza renale acuta da glicerolo (10, 11), o cisplatino (12) o ischemia/riperfusion (13) e la sede del danno renale era principalmente il tubulo renale. Dati sul riparo glomerulare sono meno certi. Kunter e al. (14) dimostravano una accelerazione del recupero della funzione renale nel modello di glomerulonefrite mesangioproliferativa da anticorpi anti-Thy1.1, ma quando questo modello, spontaneamente reversibile veniva cronicizzato con una preventiva mononefrectomia, il beneficio delle MSC era non significativo (15). E' interessante notare che questi autori ricorrevano alla somministrazione di MSC direttamente in aorta tra le arterie renali perché per via endovenosa le MSC non arrivavano al rene. Dimostravano inoltre che non c'è differenziazione delle MSC in cellule renali funzionanti.

Un problema importante nella terapia cellulare con MSC riguarda proprio la necessità che esse raggiungano l'organo danneggiato (*homing*) I dati della letteratura sono al riguardo quanto mai contrastanti. Alcuni autorevoli autori non hanno evidenziato traccia di MSC nel tessuto renale dopo inoculo EV (né in altri organi parenchimali) (16) per cui altri autori sono ricorsi all'inoculo intraarterioso, (17, 15, 14) mentre altri autori ne evidenziavano tracce minime a livello interstiziale nelle prime ore dopo l'inoculo (18). Un recente studio di elegante cinetica della distribuzione delle MSC utilizzava cellule marcate con destrano ferroso rilevate in risonanza magnetica all'interno dei capillari glomerulari dopo bolo EV. (19)

Se rimane aperto il problema dell'*homing* renale e quindi di come riuscire a fornire al rene una quantità adeguata di cellule staminali l'ipotesi di

“engraftment” ovvero della capacità di differenziazione delle MSC in cellule renali funzionanti sembra ormai abbandonata. Gli ultimi lavori non hanno dimostrato co-espressione di antigeni staminali e tubulari mentre sembra prevalere l’ipotesi che la capacità rigenerativa delle MSC si basi su un’azione paracrina con immunomodulazione ad azione antinfiammatoria (riduzione delle citochine pro-infiammazione tipo IL-1, TNF-alfa, INF gamma, iNOS e aumento dell’IL-10 con azione antinfiammatoria). Sono anche rimodulate altre chemochine come HGF, VEGF-A-B-C-D, EGF, IGF-1 e BMP-7. Una elegante dimostrazione di questa azione paracrina si trova nella letteratura più recente ad opera di Bi e al (20), che hanno dimostrato di migliorare l’evoluzione dell’insufficienza renale acuta dovuta a cisplatino con la sola somministrazione del terreno di cultura delle MSC.

Noi abbiamo effettuato uno studio sperimentale basato sulla nefropatia da ADR, che ha la peculiarità di fornire sia un modello *in vitro* di danno renale sul podocita, sia *in vivo* con la classica sclerosi focale evolutiva in uremia nei ratti. In questo modello abbiamo dapprima verificato l’azione delle MSC in culture di podociti e poi trasferito la sperimentazione sull’animale in vivo.

2. MATERIALI e METODI

2.1 Coltura e caratterizzazione delle MSC

Mediante ripetuti lavaggi del canale midollare con soluzione fisiologica (*flushing*) di femori ottenuti da ratti normali Sprague-Dawley sacrificati, abbiamo isolato cellule di midollo osseo. Le cellule così ottenute sono state seminate in piastre di Petri ad elevata densità, in terreno altamente selettivo per la crescita delle MSC (Mesencult Murine Supplement Stem Cell Tech. Inc) e, in virtù della proprietà di adesione alla plastica da parte delle MSC, abbiamo progressivamente purificato in 4-6 passaggi una omogenea popolazione di cellule “fusiformi” (spindle-shaped) figura 1. Queste cellule sono state ulteriormente caratterizzate al citofluorimetro per la presenza di antigeni di

superficie tipici delle cellule staminali (CD90, CD73) e la contemporanea assenza del CD45, marker dei progenitori ematopoietici. Inoltre abbiamo verificato la “plasticità” di questa popolazione di cellule ottenendo la loro differenziazione *in vitro* nella linea adipogenica, condrogenica e osteogenica in seguito a stimolazioni specifiche. Per gli esperimenti sia *in vitro* che *in vivo* abbiamo utilizzato solo cellule ottenute entro il decimo passaggio e con percentuali di purezza (CD90+e CD45-) > 90%.

Figura 1

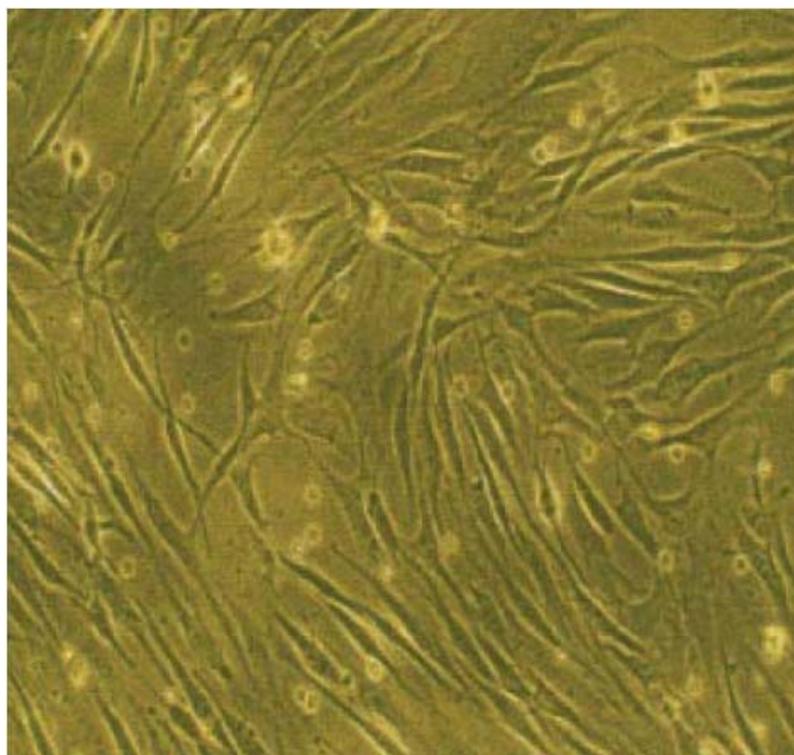


Figura 1. Popolazione di MSC ottenute da midollo osseo di ratto, caratterizzate da aspetto fusiforme e presenza di antigeni di superficie tipici delle cellule staminali (CD90, CD73) e la contemporanea assenza del CD45

2.2 Esperimenti *in vitro*

2.2.1 *Podociti umani*

Colture ottenute da una linea cellulare immortalizzata di podociti umani (21, 22) (dono del prof. G. Camussi) venivano mantenute in Dulbecco's Eagle's Medium (DMEM) supplementato con 10% di siero fetale di vitello.

2.2.2 *Analisi della generazione del radicale superossido(ROS)*

La capacità dell'ADR di indurre la formazione di ROS nelle culture podocitarie e di MSC, veniva misurata attraverso lo studio della trasformazione di CM-H₂-dichlorofluorescein-diacetate (DCFDA), una molecola che diviene fluorogena quando un gruppo acetato viene rimosso dall'ossidazione. In questo modo, la quantità di ROS intracellulari può essere agevolmente misurata come picco di fluorescenza all'analisi citofluorimetrica.

Per questa analisi le cellule in cultura venivano staccate dalle piastre di Petri dopo un delicato trattamento con tripsina e risospese in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) ad una concentrazione di 10⁶ cells/ml. Le cellule venivano quindi marcate con CM-H₂-DCFDA (1μM) per 10 minuti a 37°C, 5% CO₂; quindi veniva aggiunta ADR (2 γ/ml). L'ossidazione di CM-H₂-DCFDA veniva misurata a differenti intervalli di tempo (da 0 a 55') dal trattamento con ADR, mediante analisi al citofluorimetro (FACScalibur instrument, Becton Dickinson) utilizzando le lunghezze d'onda di 488nm in eccitazione e 527nm in emissione.

2.2.3 *Test di apoptosi*

I podociti venivano seminati su piastre multiwell da 6 pozzetti nel normale terreno di coltura ad una densità di 7x10⁴ cell/well. Dopo 24 ore le cellule erano esposte a 2 γ/ml ADR. Dopo 2 h di incubazione con ADR, il supernatante veniva rimosso, i podociti lavati 2 volte con tampone fosfato (PBS) e veniva aggiunto terreno di coltura fresco con le cellule MSC secondo un rapporto cellulare di 1:1, 1:2. Al fine di riuscire a distinguere le due popolazioni cellulari

le MSC di ratto venivano preventivamente colorate con PKH26 (Sigma) secondo le istruzioni fornite dalla ditta.

L'apoptosi veniva misurata a tempi diversi dal trattamento con ADR utilizzando il kit dell'annessina V coniugata con FITC. Questo tipo di analisi sfrutta la proprietà delle cellule apoptotiche di esporre sulla superficie di membrana il fosfolipide fosfatidilserina, in grado di legare l'annessina. La determinazione quantitativa dei podociti in apoptosi, ovvero marcati con annessina, veniva effettuata in citofluorimetria.

2.2.4 Valutazione del danno mitocondriale

Per questa analisi i podociti in coltura dopo il trattamento con ADR sono stati marcati con JC1, un colorante vitale fluorescente ad alta affinità per i mitocondri. Il JC1, quando è molto concentrato (ad esempio quando è localizzato all'interno dei mitocondri) è presente in forma aggregata, ed emette fluorescenza nella lunghezza d'onda del rosso (circa 590 nm) ; quando invece è localizzato nel citoplasma è presente in forma monometrica, caratterizzata da una fluorescenza verde (picco di emissione a circa 525 nm) In presenza di un danno ossidativo si ha aumento della permeabilità mitocondriale per la variazione del potenziale di membrana dei mitocondri, con conseguente diffusione del colorante nel citoplasma. Di conseguenza il picco di emissione di fluorescenza del JC1 subisce uno *shift*, con passaggio da una fluorescenza rossa a una verde. La determinazione quantitativa del danno mitocondriale è stata eseguita al citofluorimetro.

2.2.5 Analisi del trasferimento mitocondriale

Per questo scopo le cellule mesenchimali sono stati colorate con Mitofluor, un colorante fluorescente emettente luce verde, in grado di legarsi permanentemente ai mitocondri, e co-coltivate con podociti. per 24 h. Come contro colorazione è stato impiegato sui podociti il colorante rosso, PKH26. La valutazione dei mitocondri trasferiti dalle MSC ai podociti è stata fatta al microscopio confocale (Figura 2).

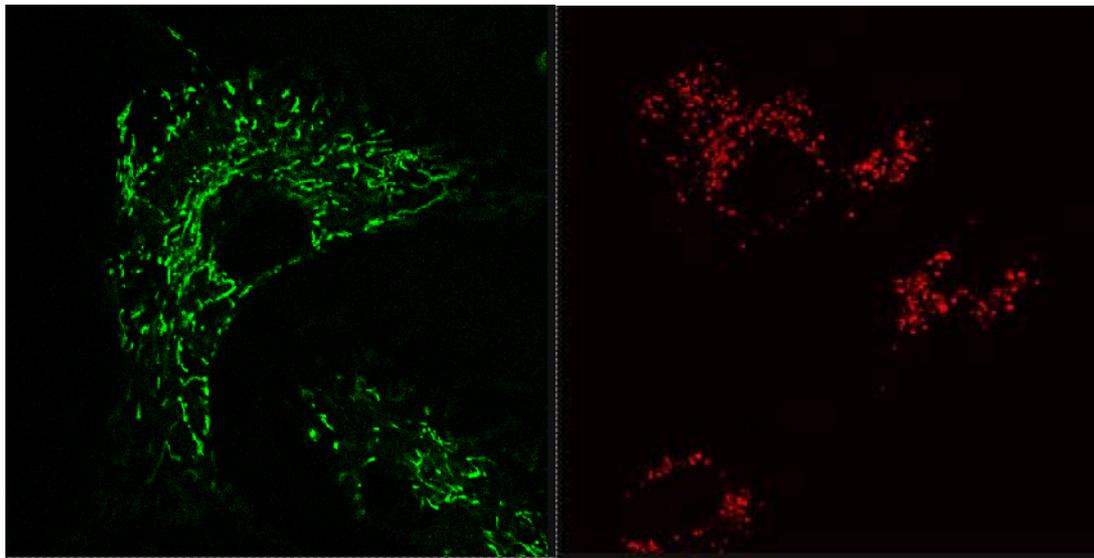


Figura 2. Colorazione mitocondriale delle MSC in verde (Mitofluor, cellule a sinistra) e dei podociti in rosso PKH26 (a destra).

2.3 Esperimenti ‘in vivo’

La nefropatia acuta e cronica da ADR era indotta in ratti Sprague-Dawley (SD) (Harlan Italy) del peso di 175-200 g, seguendo due schemi sperimentali consolidati (23, 24): dose singola elevata (5mg/kg) per ottenere un modello acuto e rapido di SINDROME NEFROSICA (23, 25) dose minore ripetuta (2.5mg/kg) (24) per sviluppare un modello di sclerosi focale evolutiva verso l'insufficienza renale cronica. Gli animali venivano custoditi secondo le linee guida del Ministero della Salute in ambiente controllato per luce, temperatura, umidità. Gli animali avevano libero accesso all'acqua e ad una dieta standard. Tutte le procedure sperimentali erano effettuate secondo la legislazione italiana ed erano state preventivamente approvate dal Comitato Etico per le sperimentazioni animali.

Lo studio della funzione renale veniva effettuato con mensili raccolte di urine delle 24h (gabbie metaboliche) per l'analisi della proteinuria (Bredford test); allo stesso intervallo venivano eseguiti prelievi ematici dal seno retroorbitale durante breve stordimento con gas CO₂, per la valutazione di parametri biochimici di funzione renale (creatinina, urea, proteine totali, lipidi, dosati con analizzatore automatico (Integra Roche Diagnostic, Milan, Italy).

2.3.1 La nefropatia acuta da ADR

La nefropatia acuta da ADR (23, 25) è stata indotta in 14 ratti SD maschi con un singolo inoculo EV di 5 mg/kg di ADR. Per l'inoculo EV abbiamo inserito un ago cannula da 24G nella vena caudale distale in modo da garantire la dose somministrata evitando altresì la tossicità locale diretta del farmaco attraverso un lavaggio della vena stessa con soluzione fisiologica post-infusione.

Questo modello riproduceva in vivo l'esperimento di danno ossidativo dei podociti in cultura dopo aggiunta di ADR. Abbiamo sperimentato la terapia con MSC secondo diversi schemi infusivi:

- 4 ratti erano trattati mediante infusione EV di 3×10^6 MSC 10 minuti dopo l'ADR
- 4 ratti erano trattati mediante infusione intraortica di 5×10^5 MSC 10 minuti dopo l'ADR
- 2 ratti erano trattati mediante infusione intraperitoneale di 9×10^6 MSC 10 minuti dopo l'ADR

Data la rapidità dello sviluppo del modello acuto abbiamo effettuato uno stretto controllo settimanale della proteinuria e bisettimanale di parametri biochimici. Lo studio prevedeva il sacrificio degli animali dopo 7 settimane dal trattamento.

2.3.2 Nefropatia cronica da ADR

La nefropatia cronica da ADR (24) è stata indotta in 37 ratti SD maschi mediante l'inoculo EV di due successive dosi di ADR 2.5 mg/kg al tempo 0 e 14 giorni. Abbiamo applicato al modello di nefropatia cronica la terapia cellulare con cellule mesenchimali secondo diversi schemi infusivi:

- 9 ratti trattati con un bolo EV di 3×10^6 MSC 60 giorni dopo l'inizio del trattamento sperimentale con ADR, cioè tardivamente (late MSC), al fine di valutare l'efficacia riparativa e rigenerativa di un danno renale già avanzato
- 10 ratti trattati con due boli EV di 3×10^6 MSC che seguivano di qualche minuto l'infusione di ADR (circa 10 minuti, per permettere la rapida

clearance plasmatica del farmaco tossico), quindi al tempo 0 e 14 giorni. Questo schema di trattamento precoce (early MSC), ci permette di studiare l'effetto protettivo, antiossidante della terapia cellulare.

- 4 ratti trattati precocemente con un bolo di MSC direttamente nell'aorta al fine di valutare l'importanza del sito di inoculo. La procedura prevedeva un'anestesia con ketamine/xylazine, accesso chirurgico posteriore paraspinale sinistro evitando l'apertura del peritoneo. Si isolava rapidamente l'aorta addominale. Dopo delicato clampaggio dell'aorta sopra e sotto l'emergenza della arteria renale sinistra, un ago da 28G veniva inserito nell'aorta isolata e infondevamo lentamente (2 minuti) 2×10^6 MSC. Con questa procedura cercavamo di ottenere l'inoculo intrarenale diretto monolaterale utilizzando il rene controlaterale per il successivo controllo istologico (rene sinistro ADR+MSC; rene destro ADR). Tale procedura richiedeva un tempo medio di 27 minuti e il periodo di ischemia renale era molto rapido (< 5 minuti).

Lo studio prevedeva il sacrificio degli animali dopo 3 mesi dall'ADR con controlli di proteinuria e esami ematici mensili.

Infine 5 ratti erano trattati con soluzione fisiologica e utilizzati come controllo non trattato

2.3.3 Studio della distribuzione delle MSC

La distribuzione nell'animale delle cellule mesenchimali infuse è stato studiato utilizzando MSC colorate con PKH26 (Sigma) secondo la tecnica descritta da Sagrinati et al (26). 3×10^6 PKH-MSC erano somministrate in 4 ratti o per via EV nella vena della coda del ratto o per via intraortica. Due animali venivano sacrificati per l'analisi istologica in immunofluorescenza 2 ore dopo l'inoculo, altri due dopo 24 ore. Tessuti congelati di rene, fegato, polmone e coda venivano tagliati in sezioni di 5 μ m, fissati in acetone per 5 minuti. Le sezioni venivano controcolorate con DAPI (Sigma) e coperte con liquido fluorescent mounting medium (Dakocytomation). Specifica fluorescenza contro sfondo

renale veniva analizzata ad ingrandimento di 40x con microscopio Leica DML (eccitazione 490 nm/emissione 570 nm).

2.3.4 Morfologia renale

Tessuto renale per la microscopia ottica veniva fissato per 12 ore in tampone neutro di paraformaldeide al 5%, poi deidratato in alcool e infine fissato in paraffina. Per l'analisi istologica e morfometrica, venivano effettuate colorazioni con ematossilina-eosina, PAS e tricromica di Masson su sezioni coronali di 4 μ m. Le lesioni glomerulari (circa 15 glomeruli per sezione) venivano descritte da un anatomopatologo senza conoscere il trattamento effettuato con un metodo semiquantitativo in 2 livelli, 0 = non lesioni o presenza di sclerosi nel < 25% dei glomeruli analizzati; 1= sclerosi > 25%. La fibrosi tubulointerstiziale veniva studiata con l'analisi morfometrica. Le immagini venivano acquisite con una fotocamera digitale (Leica DC 250, Leica Italia, Milano, Italia) dal microscopio Leitz Diaplan microscope (Leica) e quindi trasferite su un Pentium III 500 computer (Maxwel, Rozzano, Italia) usando il programma Leica IM1000 e il Leica Q-Fluor per acquisire le doppie colorazioni. Le valutazioni quantitative venivano fatte sulle colorazioni di Masson utilizzando il programma di analisi delle immagini ETC3000 (Graftek; Villanterio, Pavia, Italia). L'area della fibrosi interstiziale veniva espressa come percentuale dell'area totale.

2.4 Analisi statistica

I dati sono espressi come media \pm DS. La significatività statistica è stata valutata con il t test di Student. Un valore di $p < 0.05$ viene considerato statisticamente significativo.

3. RISULTATI

3.1 Risultati in vitro

3.1.1 Effetti dell'ADR sui podociti 'in vitro'

L'effetto dell'ADR è stato testato su una linea di podociti immortalizzati (21, 22). L'incubazione dell'ADR induceva entro pochi minuti la formazione di radicali liberi, principalmente ossigeno superossido, in grado di interagire con CM-H₂-DCFDA producendo un derivato fluorescente (Figura 3).

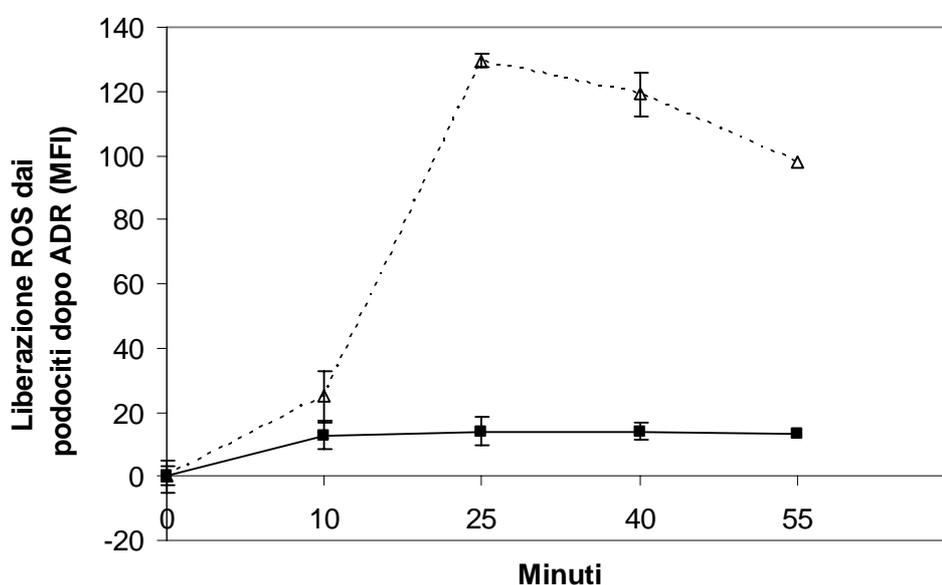


Figura 3. Generazione di radicali liberi, principalmente anione superossido (ROS) da parte di podociti umani dopo esposizione a ADR 2 γ /ml per un tempo di 55 minuti. Diversamente le MSC esposte all'ADR, non producevano ROS. ROS erano misurati come variazione d'intensità di fluorescenza di CM-H₂-DCFDA. I risultati sono dati come fluorescenza media. Linea spezzata: podociti+ADR; Linea continua: MSC+ADR.

Dopo 24 ore dall'esposizione all'ADR i podociti andavano in apoptosi con un picco del 50% delle cellule alle 72 ore (Figura 4). Diversamente, le cellule mesenchimali di ratto erano resistenti all'ADR non producendo ROS né danno apoptotico (Figura 3).

Diversamente, quando i podociti venivano co-cultivati con le MSC dopo trattamento con ADR, l'apoptosi rilevata a 24, 48 e 72 ore era significativamente più bassa, non superando il 10-15% (Figura 4)

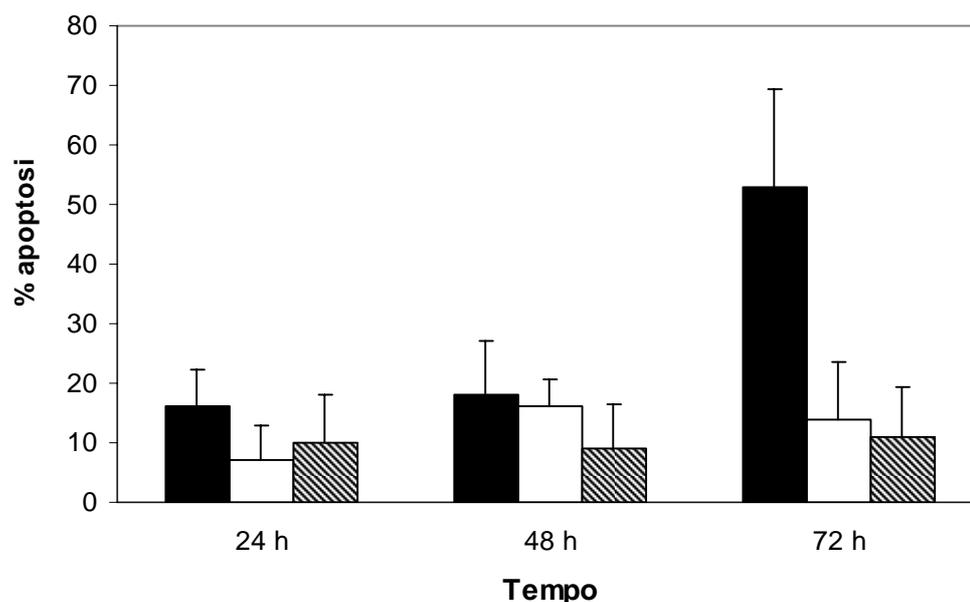


Figura 4. Apoptosi dei podociti dopo esposizione all' ADR a 37°C, 5% CO₂. Dopo 72 ore di incubazione, quasi il 55% dei podociti erano in apoptosi mentre in presenza di MSC questa quota si riduceva dell'80%. L'apoptosi era misurata con il metodo dell'Annexina a intervalli di tempo diversi. Rettangoli neri (ADR+Podociti); Rettangoli bianchi (ADR+MSC+podociti 1:1), Rettangoli tratteggiati (ADR +MSC+podociti 1:2).

3.1.2 Valutazione del danno mitocondriale da ADR

La funzionalità mitocondriale dei podociti trattati con ADR risulta significativamente compromessa; infatti il rilascio di JC1 intramitocondriale è pari a circa il 50% a 24 ore, e raggiunge il 93% a 48 ore (Figura 5 Podociti+ADR). Abbiamo verificato se il contatto in cocultura con le MSC era in grado di modificare questo danno mitocondriale dei podociti e per questo abbiamo ripetuto il test con il JC1 dopo aver coltivato i podociti insieme alle MSC (1:1). Per l'analisi citofluorimetrica abbiamo sortato i podociti dalla cocultura dalle altre cellule mesenchimali attraverso la colorazione con il PKH26. Sulla popolazione di podociti così purificata abbiamo ripetuto l'analisi al citofluorimetro che dimostrava un danno mitocondriale significativamente ridotto (Figura 5 Podociti+ADR+MSC) passando dal 93% al 59%.

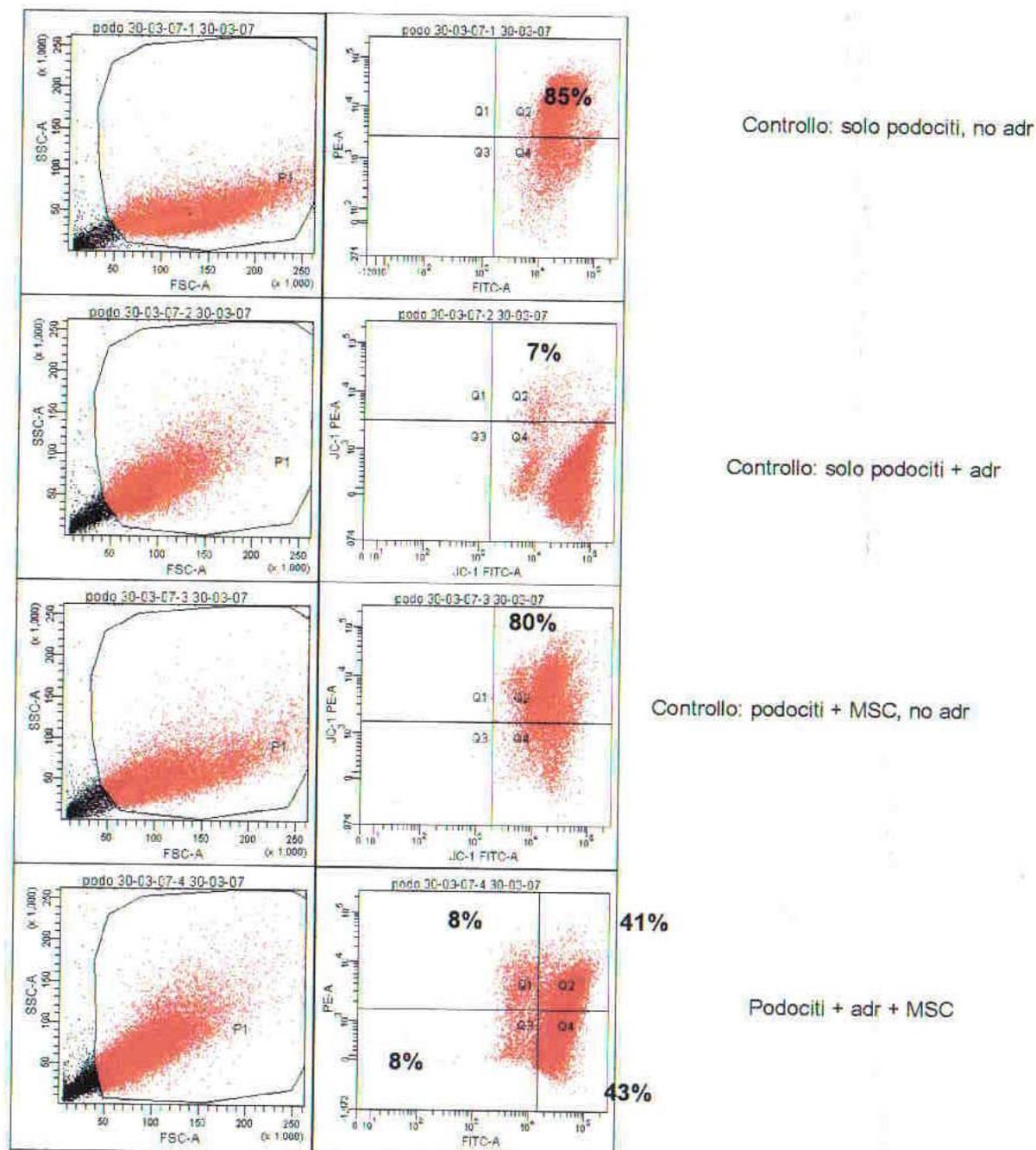


Figura 5. Valutazione del danno mitocondriale con marcatore di vitalità mitocondriale JC1 su podociti senza ADR (danno mitocondriale del 15%), podociti dopo esposizione all'ADR (danno mitocondriale del 93%), su podociti dopo cocoltura con le MSC (danno mitocondriale ridotto al 59%). Tale valutazione veniva effettuata dopo purificazione della popolazione podocitaria tramite sorting al FACS

3.1.3 Analisi del trasferimento mitocondriale

Un altro dato suggestivo a conferma del dato di riduzione del danno mitocondriale nei podociti dopo contatto con le MSC veniva dall'analisi al microscopio confocale delle coculture di podociti marcati in rosso dal PKH26 e MSC trattate con il colorante permanente mitocondriale Mitofluor. Come mostra la figura 6 sembra avvenire un passaggio di mitocondri direttamente dalle MSC ai podociti.

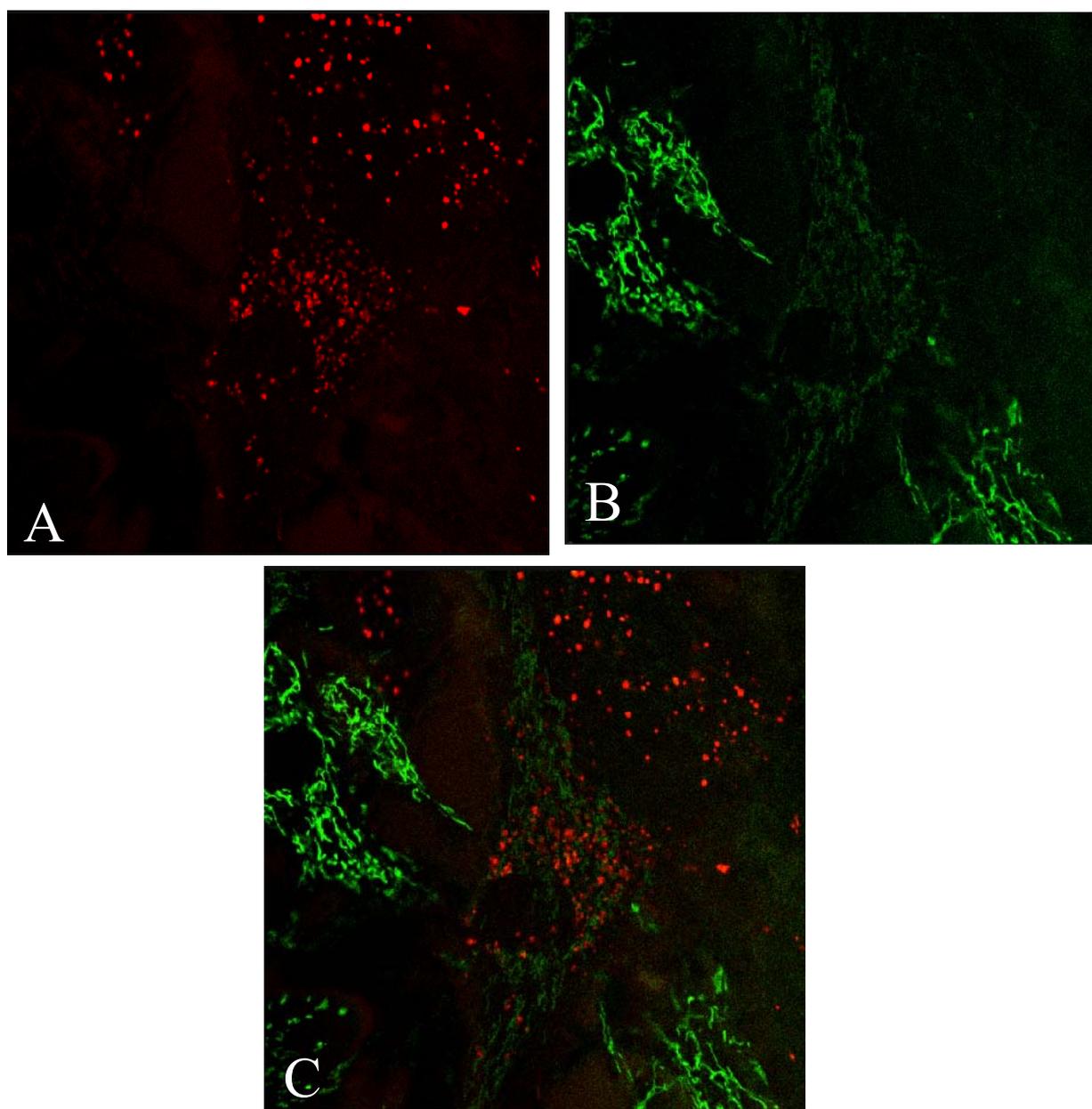


Figura 6. Immagine al confocale di podociti colorati in rosso con PKH26 (A); MSC con colorazione mitocondriale in verde (B). La sovrapposizione delle immagini (C) suggerisce il passaggio di mitocondri marcati in verde dalle MSC ai podociti a stretto contatto con le MSC.

3.2 Effetti dell'ADR sul modello animale 'in vivo'

La nefropatia da ADR veniva indotta nei ratti SD seguendo due classici approcci ben descritti in letteratura: dose singola elevata (5mg/kg) per ottenere un modello acuto e rapido di sindrome nefrosica (23, 25) dose minore ripetuta (2.5mg/kg) (24) per sviluppare un modello di sclerosi focale evolutiva verso l'insufficienza renale cronica. In entrambi i casi la proteinuria compariva rapidamente aumentando progressivamente fino a raggiungere livelli nefrosici (>250 mg/die) (Figura 7 e 8). Nessuna differenza significativa si dimostrava tra i gruppi trattati con MSC e non.

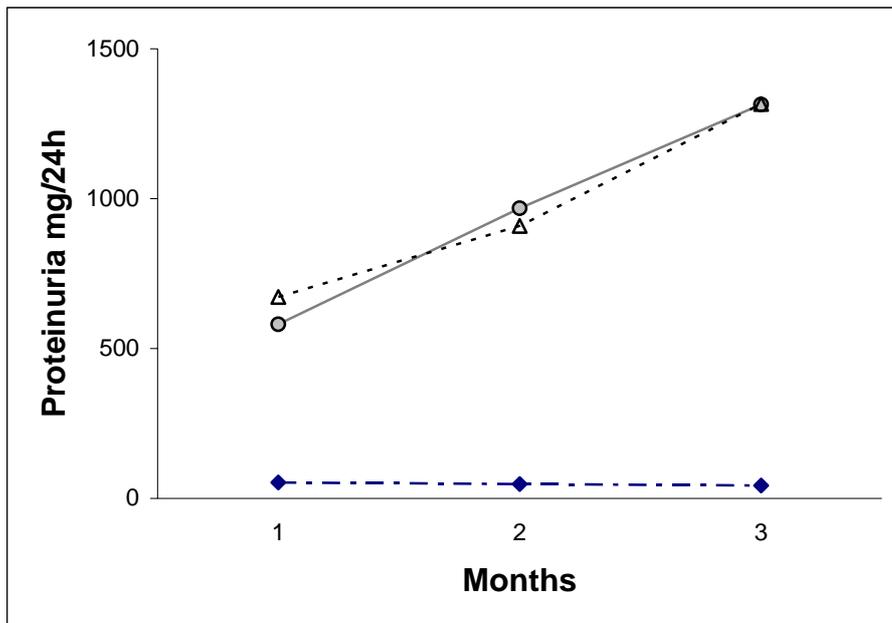


Figura 7. Andamento della proteinuria durante i mesi di sviluppo della nefropatia cronica da ADR. Δ =MSC, O = ADR; \blacklozenge = Controlli non trattati.

Figura 8A

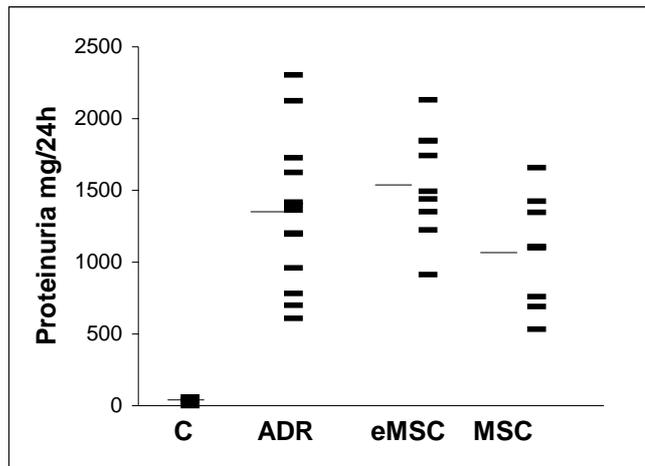


Figura 8B

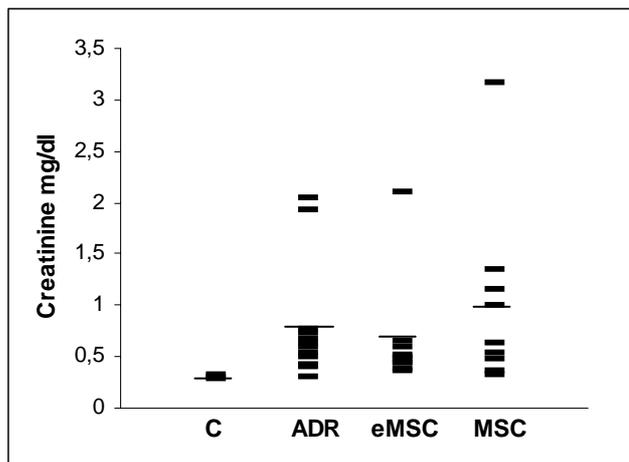


Figura 8 (A e B)

Proteinuria (A) e creatinina (B) erano valutate alla fine dello studio. I ratti erano trattati precocemente con MSC (eMSC) in 2 boli endovenosi di 3×10^6 MSC 10 minuti dopo il trattamento con ADR nei giorni 0 e 14; oppure tardivamente (MSC) in bolo singolo da 3×10^6 , 60 giorni dopo il primo ADR.

3.2.1 Nefropatia acuta.

Questo modello ripete in vivo l'esperienza di ossidazione acuta da ADR studiata in vitro con le culture podocitarie.

14 ratti SD trattati con ADR in dose singola di 5 mg/kg sviluppavano rapidamente proteinuria nefrosica (al tempo 15 giorni da ADR, proteinuria = 1253 ± 608 mg/die, controlli 31 ± 9 mg/die, $p < 0.001$). Si associava un peggioramento delle condizioni cliniche generali con progressivo scarso accrescimento ponderale e quadro ematico conclamato di sindrome nefrosica particolarmente evidente alla settima settimana, per cui i ratti venivano sacrificati a questo tempo (gruppo ADR peso 227 ± 22 g rispetto al peso dei controlli 320 ± 33 g; $p < 0.05$) (vedi tabella 1). I dati di funzione renale dimostravano un lieve peggioramento dei ratti trattati con ADR rispetto ai controlli pur senza raggiungere significatività statistica (vedi tabella 1).

Le MSC venivano inoculate subito dopo il bolo di ADR seguendo differenti protocolli di inoculo ma in nessun caso modificavano la proteinuria, dislipidemia o evoluzione clinica generale (tabella 1 e figura 9).

Tabella 1. Parametri clinici e di laboratorio nei ratti con nefropatia acuta da ADR.

	Controlli n 3	ADR n 5	i.v. MSC n 4	i.a. MSC n 3	i.p. MSC n 2
proteinuria (mg/24h)	33±9	662±388*	912±582*	1783± 835*	704±226*
creatinina (mg/dl)	0.26±0.05	0.31±0.02	0.32±0.05	0.37 ±0.03	0.33±0.08
urea (mg/dl)	33±6	42±15	48±16	55±19	67±26
trigliceridi (mg/dl)	48±19	136±68*	235±176*	369±210*	239±102*
coolesterolo (mg/dl)	88±17	352±222*	356±259*	593±276*	425±112*
proteine totali (g/l)	7±0.7	6.19±0.28	6.0±0.65	7±0.33	6.07±0.65
Peso (g)	320±33	227±22*	232±33*	264±34*	227±38*

Parametri clinici e di laboratorio alla fine dello studio (7 settimane dopo ADR) nei ratti con nefropatia acuta da ADR e controlli sani. Le MSC venivano infuse a seguire l'ADR: in 4 ratti, le MSC erano infuse EV, in 3 ratti direttamente in aorta (i.a), e in 2 ratti per via intraperitoneale (ip). * $p < 0.05$ vs. control rats.

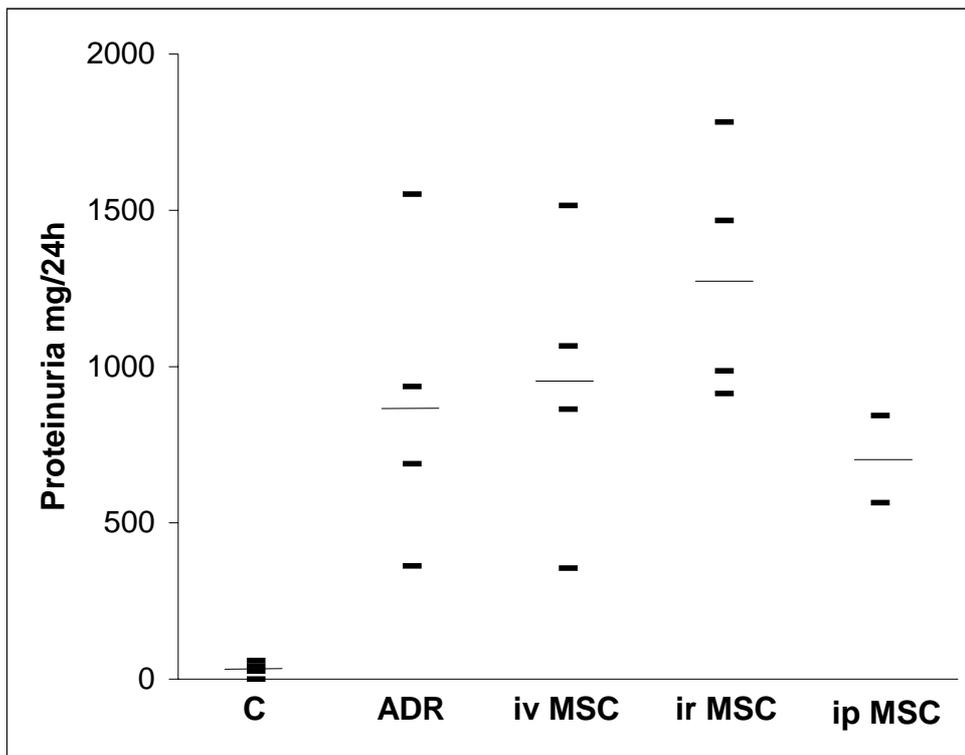


Figura 9. Proteinuria al termine dello studio (7 settimane) nel modello di nefropatia acuta da ADR (5 mg/ kg) in 14 ratti. Le MSC erano infuse 10 minuti dopo ADR seguendo differenti vie: (1) endovena nella coda (iv MSC) (n4), (2) direttamente in aorta (ir MSC) (n4) or (3) intra-peritoneale (ip MSC) (n2).

La microscopia elettronica dimostrava la fusione dei podociti in più del 50% dei glomeruli sia nel gruppo ADR che in quello trattato con MSC, mentre la valutazione istologica standard effettuata sempre alla 7 settimana non dimostrava alterazioni né glomerulari, né interstiziali (tempo troppo precoce per evoluzione istologica fibrotica).

3.2.2 Nefropatia cronica

Dopo 3 mesi dal trattamento con ADR i ratti presentavano un quadro urinario e sierologico di sindrome nefrosica conclamata (tabella 2) con un aumento della creatinina e azotemia (Figura 8B) e riduzione significativa del peso corporeo rispetto ai controlli non trattati.

Tabella 2. Parametri clinici e di laboratorio nei ratti con nefropatia cronica da ADR.

	Controlli n5	ADR n14	early MSC n10	late MSC n9	i.aortica MSC n4
proteinuria (mg/24h)	42±20	1380±461*	1554±374*	1078±392*	1197± 623*
creatinina (mg/dl)	0.31±0.02	0.73±0.56	0.65±0.55	1.01±0.95	0.42 ±0.16
urea (mg/dl)	44±3.4	78.9±35.4	80±59	124±96	51±35
trigliceridi (mg/dl)	52±26	606±285*	830±347*	525±191*	474±198*
colesterolo (mg/dl)	98±15	540±162*	548±79*	586±169*	586±588*
proteine totali (g/l)	6.6±0.7	6.5±0.6	6.8±0.2	6.6± 0.7	6.08±0.57
peso (g)	447±26	361±31*	392±28*	359±39*	310±22*
decessi	0/5	1/14 leukemia	1/10 uremia	1/9 uremia	2/4 post-surgery

Parametri clinici e di laboratorio alla fine dello studio (90 giorni dopo ADR) nei ratti con nefropatia cronica da ADR e controlli sani. Le MSC venivano infuse a seguire l'ADR (early MSC) o dopo 60 giorni (late MSC). In 4 ratti, le MSC erano infuse direttamente in aorta (i.aortica). un ratto moriva per leucemia, 2 ratti trattati con le MSC morivano per uremia terminale a 80 giorni da ADR. 2/4 ratti trattati per via chirurgica intraortica morivano dopo l'intervento per cause non chirurgiche.

* p <0.05 vs. controlli non trattati.

Al 3° mese cioè a modello di nefropatia cronica ben sviluppato, i ratti venivano sacrificati per effettuare l'analisi istologica e morfometrica. La figura 10 mostra un quadro istologico normale in ratti non trattati (controlli).

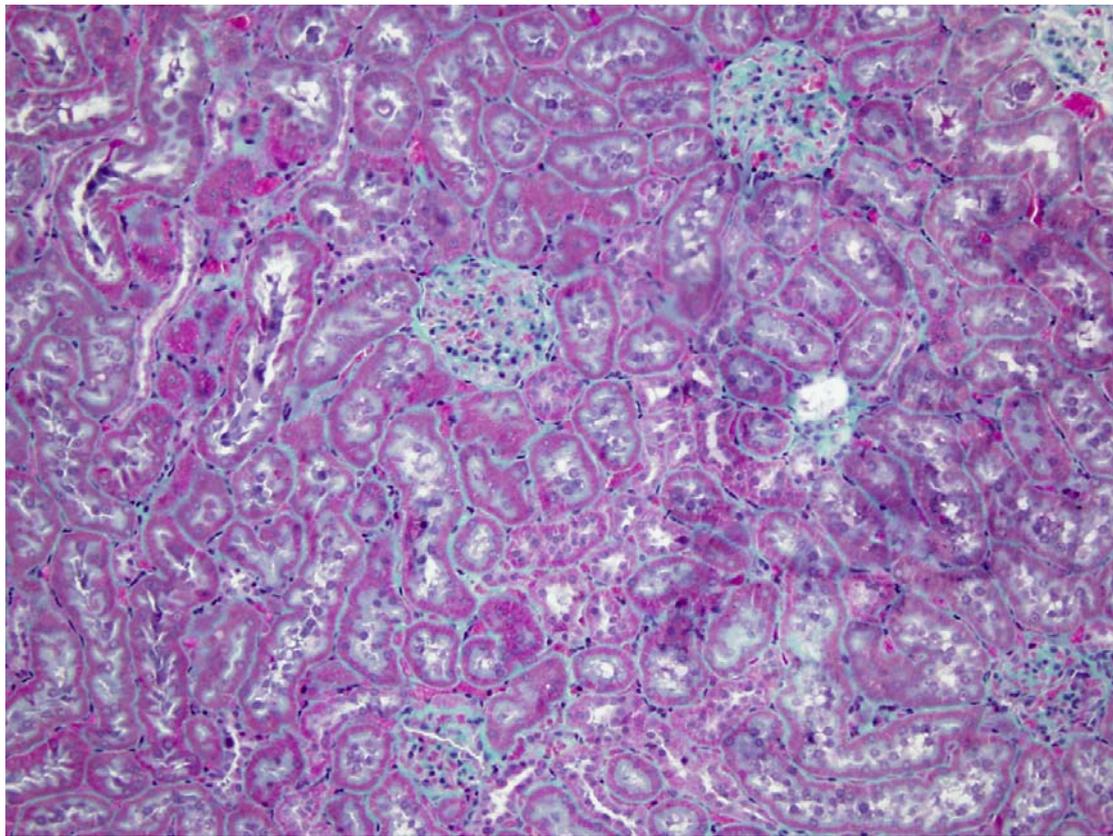


Figura 10. Quadro istologico normale in ratti non trattati

I glomeruli dei ratti trattati con ADR presentavano diffuse aree di sclerosi con depositi di matrice mesangiale nei glomeruli analizzati, riduzione degli spazi capillari fino alla completa ialinosi. Lo score istologico 1 (sclerosi > 25% dei glomeruli valutati per sezione) era attribuito nel $56\pm 27\%$ dei ratti ADR, mentre era assente nei ratti di controllo, dimostrando l'efficacia del modello nel determinare il quadro di sclerosi focale. I tubuli, apparivano molto dilatati assumendo in alcuni casi l'aspetto di pseudo-cisti ripiene di materiale colloidale (freccia figura 11). Le cellule epiteliali erano diffusamente sofferenti con aspetto dilatato, in alcuni elementi vacuolizzate e staccate dalla membrana basale suggerendo avanzati processi di danno tubulare con apoptosi. Diffuse aree di aumento dell'interstizio con depositi di collagene erano presenti con uno score fibrotico all'analisi morfometrica del $11.7\pm 3.8\%$ significativamente più elevato rispetto al controllo non trattato ($0.7\pm 0.3\%$) (Figure 10 e 11)

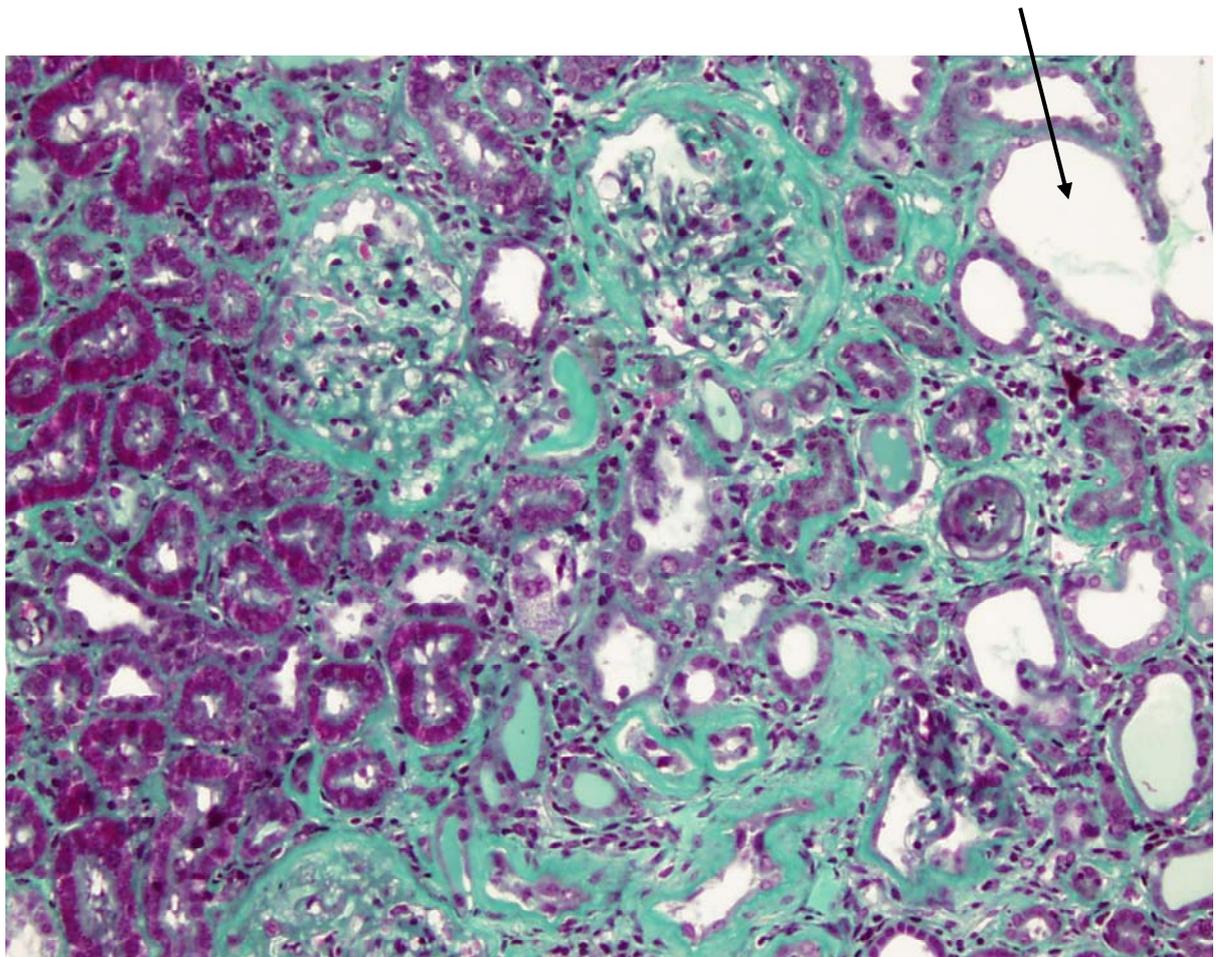


Figura 11. Esempio di istologia renale in ratti con nefropatia cronica da ADR. Le sezioni erano processate e colorate secondo la dettagliata descrizione (vedi materiali e metodi). Ingrandimento x20

Le cellule mesenchimali venivano utilizzate nel tentativo di ridurre la proteinuria e bloccare l'evoluzione della nefropatia cronica secondo tre diversi modelli infusionali. Un primo gruppo di 9 ratti era trattato con le MSC 60 giorni dopo l'inizio dell'ADR, in un momento in cui le lesioni renali erano già avanzate e il quadro di sindrome nefrosica conclamato. Questo schema cercava di valutare la capacità delle MSC di recuperare un danno renale consolidato o perlomeno di arrestarne l'evoluzione ulteriore. Un secondo gruppo di 10 ratti era trattato precocemente con due inoculi EV di MSC che seguivano di circa 10 minuti i boli di ADR nell'ipotesi di ottenere una protezione dal danno ossidativo renale simile a quella verificata in vitro sui podociti. Infine 4 ratti ricevevano le

MSC direttamente in aorta e quindi in arteria renale sinistra per cercare di migliorare l'arrivo all'organo delle stesse. In nessun caso le MSC modificavano il risultato biochimico e clinico della SINDROME NEFROSICA con simili valori di proteinuria, dislipidemia, funzione renale, scarso accrescimento ponderale fra ratti ADR e ratti ADR+MSC (Tabella 2; Figure 8A, 8B). I dati istologici dimostravano invece una significativa riduzione della glomerulosclerosi nel gruppo di ratti trattati con MSC precoci rispetto sia all'ADR che alle MSC tardive (score istologico 1 nel 28%±10% early MSC vs. 53%±18% late MSC, $p < 0.003$; vs. 56%±27% ADR, $p < 0.01$) (Fig 12 e 13).

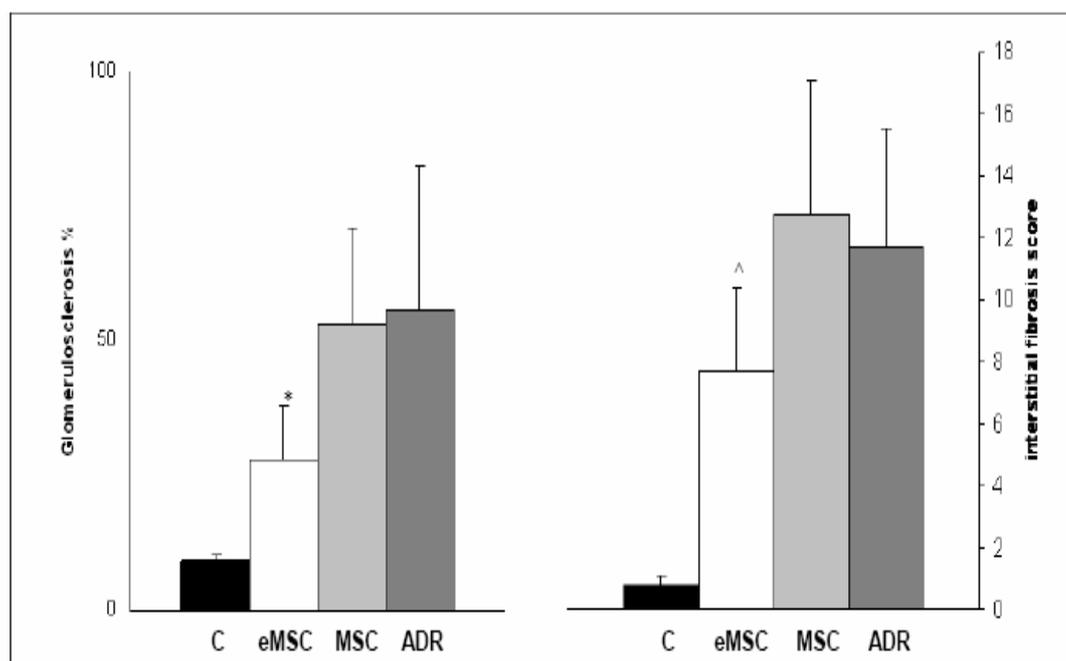


Figura 12. Percentuale di glomerulosclerosi e fibrosi interstiziale in ratti trattati con 2 dosi di ADR per indurre la nefropatia cronica. MSC erano infuse secondo diversi schemi: eMSC, doppia infusione a seguire l'ADR; MSC, infusione singola dopo 60 giorni da ADR. I ratti venivano sacrificati per l'analisi istologica dopo 3 mesi dall'induzione della nefropatia. * $p < 0.003$ vs. MSC and $p < 0.01$ vs. ADR ; ^ $p < 0.07$ vs. MSC

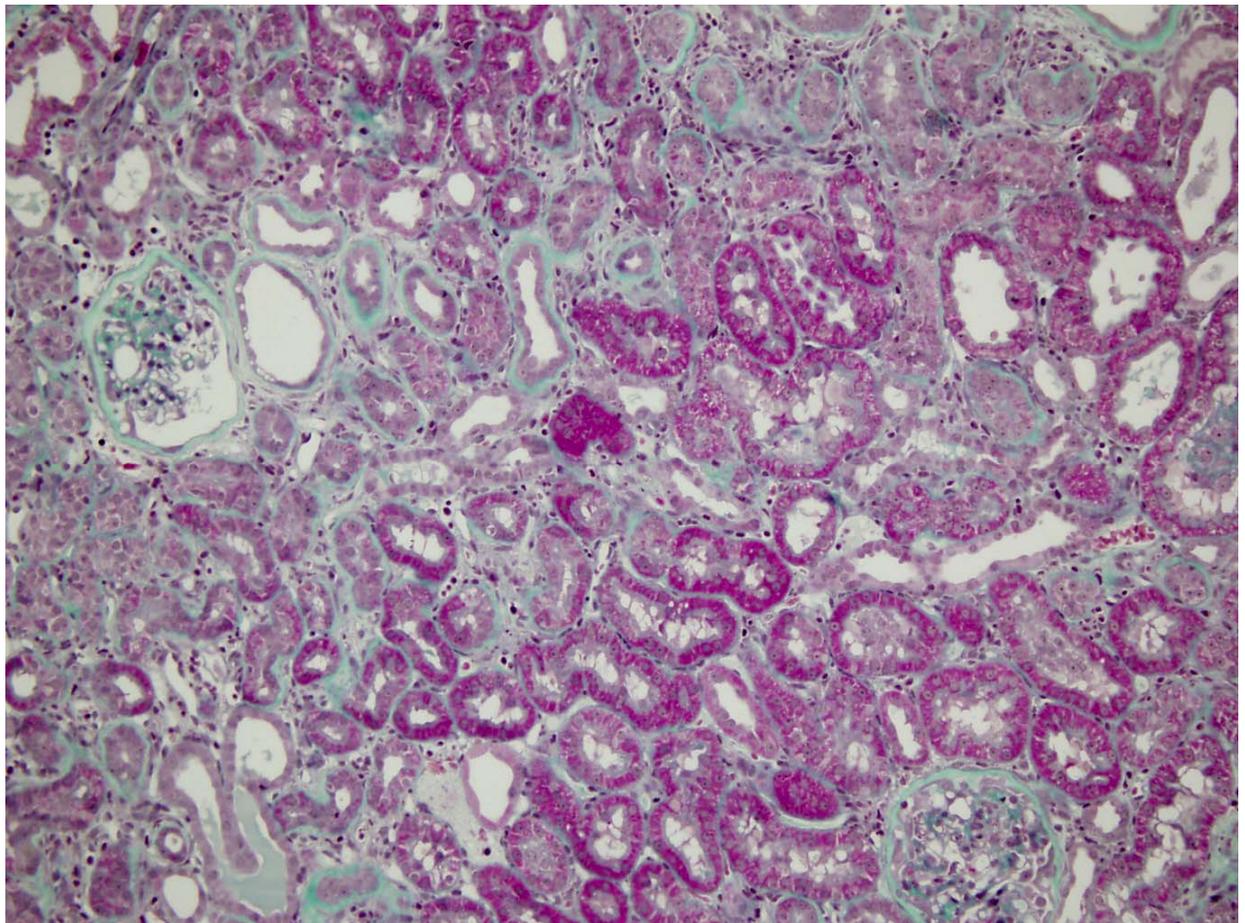


Figura 13. Esempio di istologia renale in ratti con nefropatia cronica da ADR e trattati con MSC in doppia infusione a seguire l'ADR. Appare evidente la minore compromissione sia tubulointerstiziale sia nella componente glomerulare dei reni trattati precocemente con MSC, rispetto ai ratti ADR (figura 11). Le sezioni erano processate e colorate secondo la dettagliata descrizione (vedi materiali e metodi). Ingrandimento x20.

Anche l'analisi morfometrica dimostrava un trend verso la riduzione del danno interstiziale nel gruppo di MSC precoci ($7.7 \pm 2.7\%$ early MSC vs. $12.8 \pm 4.4\%$ late MSC, $p=0.07$; $11.7 \pm 3.8\%$ ADR p ns) pur non raggiungendo significatività statistica (figura 12).

Due ratti trattati chirurgicamente con l'inoculo intarortico morivano nel post-operatorio per complicazioni non chirurgiche mentre gli altri 2 ratti sviluppavano lo stesso grado di ADR nefrosi (Tabella 2).

3.3 Distribuzione MSC

In 4 ratti precedentemente trattati con ADR venne valutata la distribuzione delle MSC marcate con PKH dopo bolo endovena in diversi tessuti bersaglio dopo 1 e 24 ore dall'inoculo. Poche cellule erano dimostrabili nel fegato, nessuna nel polmone mentre molte cellule erano dimostrate nel sito d'inoculo (coda del ratto). Da notare che l'infusione EV di MSC era effettuata sempre tramite agocannula inserito nella vena caudale in modo da garantire la sicurezza dell'inoculo stesso. Per ciò che riguarda il rene furono analizzati almeno 50 campi a ingrandimento 40x riconoscendo solo poche cellule nello spazio periglomerulare (figura 14A) o peri-tubulare (figura 14B). In altri 2 ratti venne effettuata la prova di tracciabilità con le MSC rosse per inoculo intraortico ma l'esperimento fallì a causa della trombosi dell'arteria renale con infarto renale.

Figura 14A

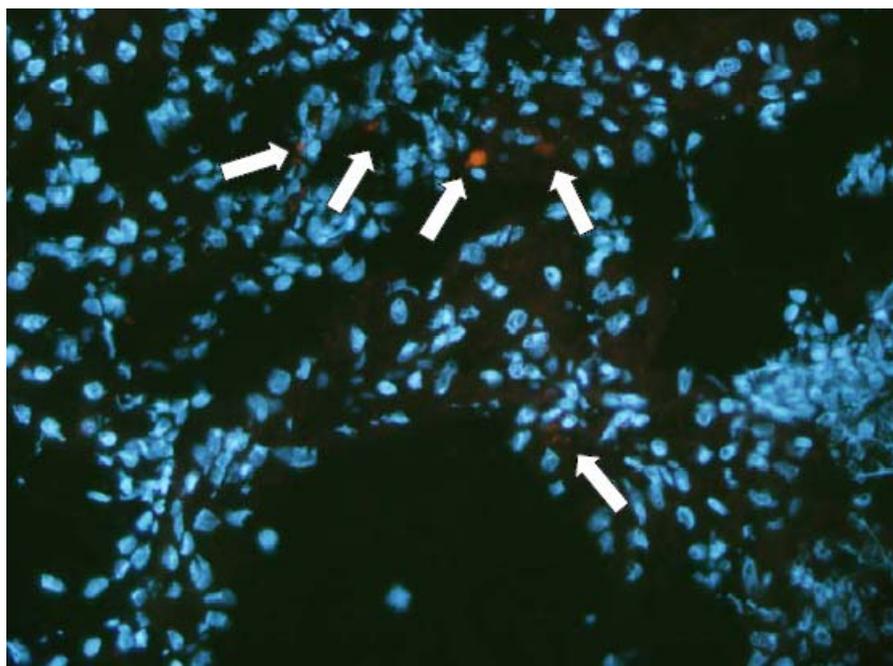


Figura 14B

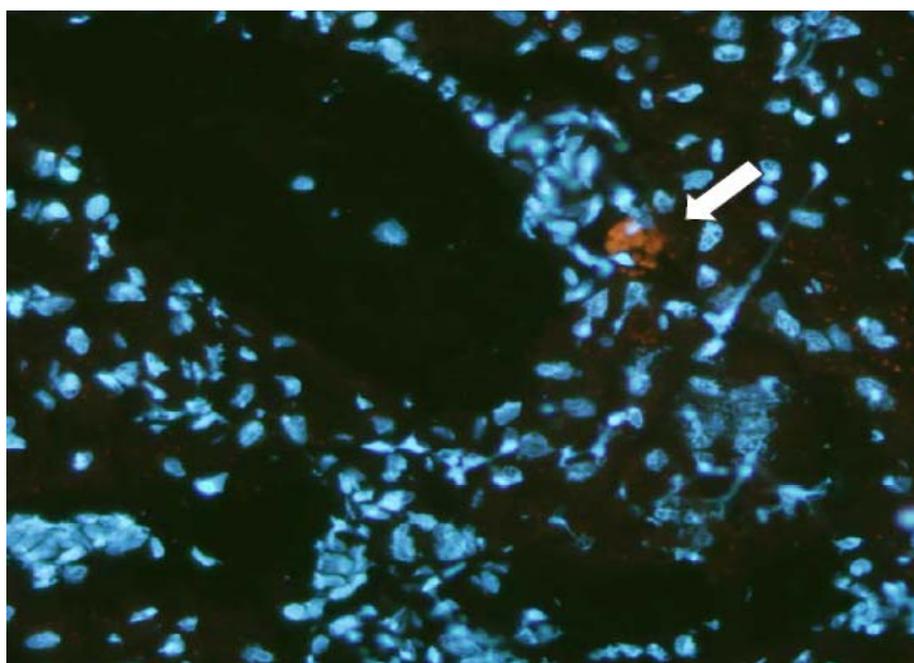


Figura 14 (A, B). Distribuzione renale delle MSC 1 ora dopo l'incolo endovenoso. Le MSC erano colorate in rosso fluorescente (PKH26 fluorescent dye) secondo la tecnica descritta da Sagrinati et al. (26). Reni congelati erano fissati in acetone per 5 minuti. Le sezioni erano controcolorate con DAPI (blue) per distinguere i nuclei cellulari. Circa 50 campi erano valutati; poche cellule marcate erano presenti nello spazio peri-glomerulare (A) e ancora più raramente si trovavano nell'area peri-tubulare (B) (immagini x40).

4. DISCUSSIONE

In confronto con altri tessuti altamente specializzati come cuore e cervello il rene possiede una notevole capacità rigenerativa dopo un danno acuto, riuscendo a rigenerare cellule specializzate ma anche a ricostruire strutture e funzioni molto complesse come il tubulo renale. Questa capacità rigenerativa avviene attraverso la proliferazione e migrazione lungo la membrana basale tubulare denudata di cellule scarsamente differenziate. L'origine di queste cellule rigeneranti è ancora controversa. Esse potrebbero derivare da 1) cellule epiteliali tubulari in grado sotto particolari stimoli di de-differenziarsi, proliferare e quindi re-differenziarsi in mature cellule tubulari; 2) cellule staminali mesenchimali stromali provenienti da midollo osseo capaci di migrare nel tessuto danneggiato e sotto stimoli locali differenziarsi in epitelio renale; 3) una popolazione di cellule staminali renali residenti.

Dopo le esperienze con l'utilizzo della terapia cellulare staminale nel diabete, infarto del miocardio, negli ultimi anni è stato proposto il trattamento con cellule staminali in diversi modelli di danno renale sperimentale, senza ottenere ancora risultati definitivi e condivisi. Miglioramenti significativi del danno renale sono stati ottenuti in modelli di danno acuto renale sia dovuto a agenti tossici (10, 11, 13, 12, 17, 16) o a ischemia/riperfusionne renale (27-30) che per definizione sono spontaneamente reversibili. Le MSC rappresenterebbero una alternativa più attraente (3, 31) rispetto ad altre terapie a causa della semplicità d'uso attraverso una infusione endovenosa senza richiedere terapia immunosoppressiva data la non espressione prevalente degli antigeni HLA da parte delle MSC stesse. Quest'ultimo dato è stato recentemente contestato da una ricerca specifica sulla presenza di immunoreazione sia in vitro (reazione linfocitica mista e test di immunoadsorbimento) sia in vivo in maiali trattati con inoculi intracardiaci di MSC allogeneiche (32). Mentre gli esperimenti in vitro confermavano un basso profilo immunogenetico delle MSC allogeneiche senza generare risposta proliferativa, in vivo gli animali sviluppavano una risposta umorale e cellulare donatore-specifica con citotossicità anticorpi-compimento-mediata.

Mancano ancora prove solide della loro capacità rigenerativa o riparativa oltrechè prove definitive sulla loro sicurezza, prima di estenderne l'utilizzo all'uomo. In particolare c'è bisogno di un maggior numero di prove sperimentali sull'effetto di queste cellule in modelli di danno renale cronico che rappresentano il maggior problema della patologia nefrologica nell'uomo essendo una patologia evolutiva per la quale mancano attualmente terapie curative. I dati della letteratura invece, prevalentemente utilizzano modelli di danno renale acuto

Ci sono anche dubbi sul reale meccanismo alla base del più rapido recupero della funzionalità renale nei modelli di danno ischemico acuto in quanto l'engraftment (ovvero l'attecchimento e differenziazione nel tessuto danneggiato) da parte delle staminali è stato dapprima affermato e successivamente smentito da analisi più approfondite. Lo stesso homing delle MSC, ovvero il raggiungimento del tessuto danneggiato attraverso la circolazione sanguigna è controverso e sicuramente limitato a poche cellule (16, 18), mentre appare probabile un effetto paracrino delle stesse MSC in grado di interagire con il network di citochine pro e anti-infiammatorie in azione nel tessuto danneggiato (13, 17, 20). E' chiaro che se il meccanismo fosse questo, un'applicazione della terapia con MSC a malattie croniche sembra poco realizzabile in quanto necessiterebbe di ripetute somministrazioni di MSC al fine di mantenere un'attività modulatrice e cronicamente attiva, aumentando enormemente i costi ed i rischi di reazioni allergiche o immunologiche.

I primi dati sperimentali su modelli animali di malattia cronica confermano queste premesse. Infatti nell'Alport murino caratterizzato dalla mancanza del gene per la catena A3 del collagene (COL4 A3^{-/-}) con conseguente deficit di struttura della membrana basale glomerulare e sviluppo di nefropatia progressiva fino all'uremia, l'utilizzo di infusioni anche ripetute (6 volte) di MSC non hanno modificato il decorso clinico con lo sviluppo di uremia terminale (18). Diversamente l'utilizzo di trapianto di midollo, forniva cellule staminali midollari selvatiche senza difetto genetico (COL4 A3^{+/+}) e sorprendentemente si associava ad un significativo miglioramento clinico renale con riduzione della proteinuria, miglioramento della funzione renale e del

quadro istologico con comparsa di collagene normale nella membrana basale glomerulare. Questa opzione terapeutica è molto interessante dal punto di vista speculativo in quanto dimostrerebbe che cellule staminali provenienti dal midollo osseo sono in grado di raggiungere il rene malato e in piccola percentuale (circa il 10%) trasformarsi in cellule renali differenziate e funzionali, con riparo del danno renale. Il meccanismo preciso di questa trasformazione è ignoto, potrebbe trattarsi di una differenziazione in cellule renali sotto la spinta di fattori locali o potrebbe trattarsi di un processo di fusione cellulare con passaggio di materiale nucleare dalla cellula staminale a cellula residente renale. Questi dati confermano le precedenti osservazioni di Poulson e al. (30) nel trapianto renale umano in cui si dimostrava la presenza nel rene trapiantato di un 6.8% di cellule del ricevente differenziate in cellule tubulari renali.

In ogni caso la creazione di una chimera midollare rimane una ipotesi di lavoro suggestiva sebbene gravata da importanti effetti collaterali e rischi connessi al trapianto di midollo stesso.

La nostra ricerca parte da questo background e si prefigge di studiare l'effetto protettivo o riparativo in un ben collaudato modello di nefropatia cronica evolutiva che è la nefropatia da ADR (25, 24). Prima di sviluppare il modello animale, abbiamo testato l'effetto delle MSC in vitro utilizzandole in cocultura con podociti esposti all'ADR. E' ben noto infatti che la tossicità cellulare da ADR, potente agente ossidante, è legata alla produzione di radicali liberi (33, 34) con induzione di apoptosi.

Nella prima parte di questo studio noi dimostriamo che le MSC giocano un rilevante ruolo protettivo sui podociti esposti all'ADR. Infatti in pochi minuti si formavano notevoli quantità di radicali liberi, principalmente ossigeno superossido, (Figura 3) e già dopo 24 ore dall'esposizione all'ADR i podociti andavano in apoptosi con un picco del 50% delle cellule alle 72 ore (Figura 4). L'aggiunta delle MSC riduceva significativamente la quota di apoptosi dei podociti (Figura 4) dimostrando una potente azione antiossidante ottenuta con elevata concentrazione di MSC (rapporto MSC-podociti, 1:1). Non conosciamo il preciso meccanismo di questa "rescue" cellulare e i dati di letteratura sulla

relazione tra MSC e apoptosi sono scarsi, comunque alcuni autori hanno dimostrato che le MSC producono un arresto della crescita di linee cellulari tumorali nella fase G1 riducendone il tasso di apoptosi (35).

Un'altra ipotesi suggestiva riguarda un possibile coinvolgimento del sistema mitocondriale, tipicamente danneggiato nel podocita dall'ADR, come dimostrato dai nostri esperimenti *in vitro* con JC1 (figura 5), mentre i mitocondri sono conservati nelle MSC esposte all'ADR (figura 5). In effetti il danno mitocondriale è strettamente legato all'apoptosi: questo fenomeno è infatti un processo a cascata, spesso innescato dal rilascio di citocromo C nel citoplasma, in seguito ad aumento della permeabilità mitocondriale, spesso indotta da agenti tossici e/o ossidanti; in conseguenza di ciò si ha l'attivazione di fattori apoptotici (ad es APAF-1) e di enzimi specifici (caspasi) responsabili della frammentazione del DNA, evento culminante dell'apoptosi. Queste ipotesi sul meccanismo in base al quale le MSC proteggono i podociti dal danno da ADR sono supportate dal fatto che i nostri dati dimostrano che *in vitro* l'ADR è capace non solo di generare ROS intracellulari nei podociti, ma anche di indurre un aumento della permeabilità mitocondriale, (come dimostrato dal rilascio nel citoplasma di JC1, figura 5), evento che presumibilmente avvia la cascata apoptotica. Inoltre la cocultura con MSC riduce il danno mitocondriale dei podociti dal 93% al 59% e l'evento finale è una significativa riduzione dell'apoptosi dei podociti. Partendo dai dati di Prockop (36), che dimostravano la capacità dei mitocondri di trasferirsi dalle MSC a cellule limitrofe, abbiamo ipotizzato che l'azione protettiva delle MSC sul danno da ADR potesse essere mediata da un trasferimento di mitocondri non danneggiati dalle MSC ai podociti. La figura 6 ottenuta al microscopio confocale delle coculture di podociti marcati in rosso dal PKH26 e MSC trattate con il colorante permanente mitocondriale Mitofluor sembra dimostrare un passaggio di mitocondri direttamente dalle MSC ai podociti.

Partendo da questi interessanti e promettenti dati ottenuti con le culture cellulari siamo passati alla verifica sul modello animale del ruolo delle MSC. Abbiamo mantenuto lo stesso agente ossidante, l'ADR che nel ratto produce un ben noto quadro di sclerosi focale evolutiva verso l'uremia con precoce comparsa di

proteinuria e sindrome nefrosica conclamata. Abbiamo sviluppato sia il modello acuto utilizzando una dose singola elevata di ADR (5 mg/Kg) più simile all'esperimento di ossidazione dei podociti in vitro sia il classico modello a lento sviluppo ottenuto con 2 dosi successive di ADR. Come atteso, in tutti i casi trattati con ADR abbiamo ottenuto quantità crescenti di proteinuria e nel tempo compariva anche l'insufficienza renale (3 mese) dimostrando l'attendibilità del modello scelto. Per la somministrazione in vivo delle MSC abbiamo sperimentato diversi approcci (EV, intraperitoneale, intraortico) per cercare di migliorare l'arrivo delle MSC al rene. L'approccio chirurgico con infusione diretta intraortica all'imbocco dell'arteria renale sinistra appariva quello migliore come garanzia di rilascio di cellule direttamente all'organo da trattare ma è stato gravato da un'elevata mortalità (4/10) non da complicanze chirurgiche ma prevalentemente trombotiche infartuali dimostrando un reale rischio pro-trombotico delle MSC.

In tutti i casi e indipendentemente dalla via di somministrazione l'infusione di MSC non ha dato alcun vantaggio clinico, cioè non si è modificata la proteinuria, il peggioramento della funzionalità renale e delle condizioni generali con progressivo decremento ponderale.

L'istologia renale dimostrava invece un miglioramento significativo del quadro di sclerosi glomerulare e un trend verso la riduzione della fibrosi interstiziale osservati nel gruppo di ratti trattati precocemente con MSC, subito dopo l'infusione dell'ADR. Questi risultati sono molto simili a quelli ottenuti in un modello simile di danno renale cronico come l'Alport murino in cui si dimostrava nessun effetto clinico e sulla proteinuria ma un miglioramento del dato istologico (18). Ci pare ragionevole concludere che l'effetto di protezione dalla fibrosi renale ottenuto con le MSC non sia sufficiente per raggiungere un significativo miglioramento clinico e dei parametri biochimici ma d'altra parte dobbiamo anche concludere riconoscendo in questi dati uno scarso effetto delle MSC nei modelli di nefropatia cronica. L'apparente contraddizione tra la protezione ottenuta in vitro sui podociti ossidati dall'ADR richiede alcune considerazioni conclusive. Una significativa differenza tra i due modelli (in vitro e in vivo) risiede nel fatto che nelle cellule in cultura riuscivamo a

garantire un elevatissimo rapporto certo tra MSC e cellula renale (rapporto 1:1), irraggiungibile nel modello animale e ancor meno nell'uomo. Oltre che da un limite di cellule staminali utilizzabili questo rapporto in vivo è limitato dal fatto che è difficile far giungere nel sito di danno renale le MSC come dimostrato anche dai nostri dati di "homing", argomento quanto mai controverso (16, 18).

Ultima differenza fra il modello "in vitro" e animale è rappresentato dal sistema immunitario dell'animale che è capace di distruggere le MSC riconosciute come "not self" (32).

Infine crediamo da questi risultati possa emergere un ulteriore aspetto importante che è il potente effetto protettivo delle MSC come antiossidante. La lista di malattie renali in cui è presente un alterato processo ossidativo con conseguente grave danno cellulare è lunga e probabilmente coinvolge molte delle nefropatie immunologiche primitive e secondarie includendo la membranosa e la sclerosi focale (37, 38). Su base teorica è possibile che le MSC possano modificare lo sviluppo di queste patologie grazie al loro ruolo antiossidante e anti apoptotico dimostrato in questo lavoro.

5. CONCLUSIONI

Questa ricerca ha dimostrato che le MSC possono ridurre l'ossidazione e la conseguente apoptosi dei podociti in vitro e possono bloccare il danno glomerulare e ridurre la fibrosi interstiziale nel modello di nefropatia da ADR nel ratto. D'altra parte le MSC non modificano la proteinuria e l'evoluzione verso l'insufficienza renale dimostrando la mancanza di un potenziale rigenerativo di engraftment. Nuovi tentativi andranno compiuti per migliorare il rilascio delle MSC sugli organi bersaglio e/o studi sul network di citochine responsabili di quell'effetto paracrino probabilmente determinante per il ruolo effettore delle MSC, in modo da trovare nuove molecole in grado di ripetere l'effetto biologico delle MSC evitando le difficoltà pratiche di somministrazione delle cellule stesse.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Korbling M & Estrov Z: Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med*, 349: 570-82, 2003.
2. Herzog EL, Chai L & Krause DS: Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*, 102: 3483-93, 2003.
3. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA & Verfaillie CM: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418: 41-9, 2002.
4. Frankel MS: In search of stem cell policy. *Science*, 287: 1397, 2000.
5. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS & Jones JM: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282: 1145-7, 1998.
6. Hess D, Li L, Martin M, Sakano S, Hill D, Strutt B, Thyssen S, Gray DA & Bhatia M: Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol*, 21: 763-70, 2003.
7. Dor Y, Brown J, Martinez OI & Melton DA: Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*, 429: 41-6, 2004.
8. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A & Anversa P: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 410: 701-5, 2001.
9. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL & Robbins RC: Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*, 428: 668-73, 2004.
10. Bussolati B, Bruno S, Grange C, Buttiglieri S, Deregibus MC, Cantino D & Camussi G: Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol*, 166: 545-55, 2005.
11. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Fonsato V, Romanazzi GM & Camussi G: Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med*, 14: 1035-41, 2004.
12. Morigi M, Imberti B, Zoja C, Corna D, Tomasoni S, Abbate M, Rottoli D, Angioletti S, Benigni A, Perico N, Alison M & Remuzzi G: Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 15: 1794-804, 2004.
13. Lange C, Togel F, Itrich H, Clayton F, Nolte-Ernsting C, Zander AR & Westenfelder C: Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Kidney Int*, 68: 1613-7, 2005.
14. Kunter U, Rong S, Djuric Z, Boor P, Muller-Newen G, Yu D & Floege J: Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 17: 2202-12, 2006.

15. Kunter U, Rong S, Boor P, Eitner F, Muller-Newen G, Djuric Z, van Roeyen CR, Konieczny A, Ostendorf T, Villa L, Milovanceva-Popovska M, Kerjaschki D & Floege J: Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure but maldifferentiate into glomerular adipocytes. *J Am Soc Nephrol*, 18: 1754-64, 2007.
16. Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, Kelley VR, Scadden DT, Ichimura T & Bonventre JV: Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest*, 115: 1743-55, 2005.
17. Togel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C & Westenfelder C: Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289: F31-42, 2005.
18. Ninichuk V, Gross O, Segerer S, Hoffmann R, Radomska E, Buchstaller A, Huss R, Akis N, Schlondorff D & Anders HJ: Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice. *Kidney Int*, 70: 121-9, 2006.
19. Hauger O, Frost EE, van Heeswijk R, Deminiere C, Xue R, Delmas Y, Combe C, Moonen CT, Grenier N & Bulte JW: MR evaluation of the glomerular homing of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a rat model of nephropathy. *Radiology*, 238: 200-10, 2006.
20. Bi B, Schmitt R, Israilova M, Nishio H & Cantley LG: Stromal Cells Protect against Acute Tubular Injury via an Endocrine Effect. *J Am Soc Nephrol*, 2007.
21. Doublier S, Ruotsalainen V, Salvidio G, Lupia E, Biancone L, Conaldi PG, Reponen P, Tryggvason K & Camussi G: Nephtrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol*, 158: 1723-31, 2001.
22. Rastaldi MP, Candiano G, Musante L, Bruschi M, Armelloni S, Rimoldi L, Tardanico R, Sanna-Cherchi S, Ferrario F, Montinaro V, Haupt R, Parodi S, Carnevali ML, Allegri L, Camussi G, Gesualdo L, Scolari F & Ghiggeri GM: Glomerular clusterin is associated with PKC-alpha/beta regulation and good outcome of membranous glomerulonephritis in humans. *Kidney Int*, 70: 477-85, 2006.
23. Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, Delaini F, Sacchi G, Thoua Y, Mecca G, Remuzzi G & Donati MB: Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab Invest*, 46: 16-23, 1982.
24. Okuda S, Oh Y, Tsuruda H, Onoyama K, Fujimi S & Fujishima M: Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. *Kidney Int*, 29: 502-10, 1986.
25. Bertani T, Rocchi G, Sacchi G, Mecca G & Remuzzi G: Adriamycin-induced glomerulosclerosis in the rat. *Am J Kidney Dis*, 7: 12-9, 1986.
26. 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*, 17: 2443-56, 2006.
27. Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, Kim Y & Rosenberg ME: A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure. *Kidney Int*, 62: 1285-90, 2002.
 28. Kale S, Karihaloo A, Clark PR, Kashgarian M, Krause DS & Cantley LG: Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J Clin Invest*, 112: 42-9, 2003.
 29. Lin F, Cordes K, Li L, Hood L, Couser WG, Shankland SJ & Igarashi P: Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol*, 14: 1188-99, 2003.
 30. Poulsom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnarasah S, Jeffery R, Hunt T, Alison M, Cook T, Pusey C & Wright NA: Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol*, 195: 229-35, 2001.
 31. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S & Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143-7, 1999.
 32. Poncelet AJ, Vercruyse J, Saliez A & Gianello P: Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intracardiac injection elicits an immune response in vivo. *Transplantation*, 83: 783-90, 2007.
 33. Doroshow JH: Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase. *Cancer Res*, 43: 4543-51, 1983.
 34. Ghiggeri GM, Bertelli R, Ginevri F, Oleggini R, Altieri P, Trivelli A & Gusmano R: Multiple mechanisms for doxorubicin cytotoxicity on glomerular epithelial cells 'in vitro'. *Eur J Pharmacol*, 228: 77-83, 1992.
 35. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G & Dazzi F: Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation*, 83: 71-6, 2007.
 36. Spees JL, Olson SD, Whitney MJ & Prockop DJ: Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 1283-8, 2006.
 37. Binder CJ, Weiher H, Exner M & Kerjaschki D: Glomerular overproduction of oxygen radicals in Mpv17 gene-inactivated mice causes podocyte foot process flattening and proteinuria: A model of steroid-resistant nephrosis sensitive to radical scavenger therapy. *Am J Pathol*, 154: 1067-75, 1999.
 38. Musante L, Candiano G, Petretto A, Bruschi M, Dimasi N, Caridi G, Pavone B, Del Boccio P, Galliano M, Urbani A, Scolari F, Vincenti F & Ghiggeri GM: Active focal segmental glomerulosclerosis is associated with massive oxidation of plasma albumin. *J Am Soc Nephrol*, 18: 799-810, 2007.

6. RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare innanzitutto il Prof. Sergio Stefoni per il sostegno offerto in ogni occasione a questo progetto di ricerca innovativo. Si ringrazia la Fondazione “Kidney Foundation” per il continuo interesse per le ricerche effettuate e per aver sostenuto parte delle spese di questo lavoro sperimentale. Si ringrazia lo staff del Centro Cellule Staminali dell’Azienda Ospedaliera Ospedale S. Martino di Genova diretto dal Prof. Francesco Frassoni per la continua e ricchissima collaborazione. Infine un particolare ringraziamento va ai colleghi biologi del Laboratorio di Fisiopatologia renale dell’Istituto G. Gaslini e al responsabile Dr GM Ghiggeri per la splendida esperienza di ricerca vissuta in questi anni di lavoro comune.