

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE SPECIALISTICHE

Ciclo XXVIII

Settore Concorsuale di afferenza: 06/D2

Settore Scientifico disciplinare: MED 14

**Caratterizzazione di cellule Progenitrici endoteliali (EPCs) in pazienti affetti da
Insufficienza renale cronica (CKD)**

Effetti immunomodulanti dell'Eritropoietina (EPO)

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

Coordinatore Dottorato

Prof. Roberto Di Bartolomeo

Relatore

Prof. Gaetano La Manna

Esame finale anno 2016

INDICE

CARATTERIZZAZIONE DI CELLULE PROGENITRICI ENDOTELIALI (EPCS) IN PAZIENTI AFFETTI DA INSUFFICIENZA RENALE CRONICA (CKD)

1. INTRODUZIONE	5
1.1 PROGENITORI DI CELLULE ENDOTELIALI (EPCS)	6
1.1.1 <i>Proprietà fenotipiche delle EPCs</i>	6
1.1.2 <i>Classificazione delle EPCs</i>	8
1.1.3 <i>Fasi di attivazione delle EPCs</i>	10
1.1.4 <i>Coinvolgimento delle EPCs in patologie oncologiche</i>	14
1.1.5 <i>Coinvolgimento delle EPCs in patologie metaboliche</i>	16
1.1.6 <i>Coinvolgimento delle EPCs nelle patologie cardiovascolari</i>	18
1.2 IMPLICAZIONI TERAPEUTICHE	19
1.3 INSUFFICIENZA RENALE CRONICA (CKD) E DISORDINE MINERALE E OSSEO (CKD-MBD)	20
1.3.1 <i>Deficit di vitamina D</i>	22
1.3.2 <i>FGF-23 e Klotho</i>	24
1.3.3 <i>Alterato metabolismo di calcio</i>	25
1.3.4 <i>Ritenzione di ioni fosfato</i>	26
1.3.5 <i>Iperparatiroidismo secondario</i>	27
1.4 COINVOLGIMENTO DELLE EPCs NELLA CKD-MBD	28
2. SCOPO DELLA TESI	30
3. MATERIALI E METODI	31
3.1 PAZIENTI	31
3.2 ANALISI CITOFLUORIMETRICA	32
3.3 TEST ELISA	33
3.4 ANALISI LUMINEX	33
3.5 ANALISI STATISTICA	34
4. RISULTATI	35
4.1 CARATTERISTICHE DEI SOGGETTI ARRUOLATI NELLO STUDIO	35
4.2 EPCs CD133^{+/-}OCN^{+/-}VDR^{+/-} AUMENTANO IN PAZIENTI CON CKD-MBD	36
4.3 EPCs CD133^{+/-}OCN^{+/-}VDR^{+/-} AUMENTANO IN PAZIENTI TRATTATI CON VDRAS	38
4.4 IN EPCs CD133^{+/-} L'ESPRESSIONE DI VDR CORRELA CON QUELLA DELL'OCN	40
4.5 IL MICROAMBIENTE SIERICO NON CAMBIA IN PAZIENTI TRATTATI E NON TRATTATI CON VDRAS	41
4.6 EPCs CD133^{+/-}OCN^{+/-}VDR^{+/-} CORRELANO CON L'ANDAMENTO DI CALCIO SIERICO, RETICOLOCITI, DKK1, OPN, VITAMINA D E IL-6 NEI PAZIENTI TRATTATI E NON CON VDRAS	43
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE	44
6. BIBLIOGRAFIA	48

INDICE

EFFETTI IMMUNOMODULANTI DELL'ERITROPOIETINA (EPO)

1. INTRODUZIONE	63
1.1 L'ERITROPOIETINA (EPO)	63
1.2 I SENSORI DELL'OSSIGENO E LA PRODUZIONE DI EPO	65
1.3 RECETTORI DELL'EPO E LE CASCATE DEL SEGNALE	66
1.4 EFFETTI IMMUNOLOGICI DELL'EPO	67
1.5 EFFETTI IMMUNOLOGICI DEL SALE	68
2. SCOPO DELLE TESI	70
3. MATERIALI E METODI	72
3.1 PBMC UMANI	72
3.2 ARRICCHIMENTO CELLULARE	72
3.2.1 <i>Arricchimento di cellule T</i>	72
3.2.2 <i>Arricchimento di cellule T Naive CD4⁺ umane</i>	72
3.2.3 <i>Isolamento di Monociti CD14⁺ umani</i>	72
3.2.4 <i>Isolamento di cellule B umane</i>	73
3.3 COLTURE IN VITRO	73
3.3.1 <i>Colture in vitro di PBMCs</i>	73
3.3.2 <i>Colture in vitro di cellule T</i>	73
3.4 POLARIZZAZIONE CELLULARE IN VITRO	73
3.4.1 <i>Induzione di Treg</i>	73
3.4.2 <i>Induzione di Th17</i>	74
3.5 SAGGIO DI STABILIZZAZIONE DI CELLULE FOXP3	74
3.6 SAGGIO DELL'ANNESSINA V	74
3.7 SAGGIO DI PROLIFERAZIONE CON CFSE	75
3.8 CITOMETRIA A FLUSSO	75
3.9 ANALISI STATISTICA	75
4. RISULTATI	76
4.1 EPO INIBISCE LA PROLIFERAZIONE DI PBMC INDOTTA DA NaCl	76
4.2 EPO NON INFLUENZA L'APOPTOSI CELLULARE	77
4.3 EPO INIBISCE LA PROLIFERAZIONE DI CELLULE T IN RISPOSTA AD UNO STIMOLO ALLOGENICO IN PRESENZA DI NaCl	78
4.4 EPO INIBISCE LA PROLIFERAZIONE DI CELLULE T, STIMOLATE CON aCD3/CD28, INDOTTA DA NaCl	80
4.5 EPO INIBISCE LA PRODUZIONE DI INF-γ IN CELLULE T, STIMOLATE CON aCD3/CD28, INDOTTA DAL NaCl	81
4.6 EPO INIBISCE L'INDUZIONE DI CELLULE Th17, INDOTTA DAL NaCl	83
4.7 EPO INCREMENTA LA PERCENTUALE DI CELLULE T REGOLATORIE	85
4.8 EPO ED NaCl NON INFLUENZANO LA STABILITA' DELLE CELLULE T REGOLATORIE	87
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE	88
6. BIBLIOGRAFIA	91

**CARATTERIZZAZIONE
DI CELLULE PROGENITRICI ENDOTELIALI (EPCS)
IN PAZIENTI AFFETTI DA INSUFFICIENZA RENALE CRONICA (CKD)**

1. INTRODUZIONE

Il crescente interesse per le cellule staminali e per le cellule progenitrici, trova giustificazione nelle proprietà di plasticità e di adattamento di queste cellule, che sembrano suggerire nuove modalità terapeutiche sia nella riparazione dei tessuti danneggiati che nella cura di patologie degenerative, rivestendo un ruolo anche nella terapia oncologica.

I progenitori di cellule endoteliali (EPCs) sono una popolazione di cellule mononucleate che svolgono un ruolo importante nella formazione e riparazione dei vasi sanguigni. Hanno origine nel midollo osseo, circolano nel sangue periferico e sono reclutate nelle sedi di danno vascolare o nei siti di intensa vascolarizzazione.

La genesi del sistema ematopoietico nell'organismo in fase di sviluppo è un processo complesso e la formazione del sistema vascolare è uno degli eventi più precoci dell'organogenesi (Coultas L et al, 2005). La formazione del network vascolare nell'embrione avviene attraverso un processo noto come vasculogenesi, che consiste nella formazione di aggregati cellulari che originano dal mesoderma extraembrionale, migrati attraverso la stria primitiva nella regione del futuro sacco vitellino. All'interno di questi aggregati cellulari, è possibile distinguere, dal punto di vista morfologico e spaziale, due tipologie di cellule: all'interno sono collocati i precursori emopoietici (eritroblasti), mentre all'esterno i precursori endoteliali (angioblasti). Questa stretta associazione spaziale e temporale delle filiere ematopoietica ed endoteliale ha portato a formulare l'ipotesi che i due tipi cellulari derivassero da un precursore bipotente comune, l'emangioblasto (Carmeliet P. et al 2000).

Gli emangioblasti, differenziati in angioblasti, si organizzano in strutture che porteranno alla formazione di sottili capillari formati da cellule endoteliali mature, che acquisiranno le caratteristiche di vene o di arterie (Karamysheva AF, 2008).

Mentre l'embrione si sviluppa, l'espansione della rete vascolare avviene attraverso un processo definito angiogenesi, un meccanismo distinto di crescita vascolare, che vede la formazione di nuovi capillari attraverso lo sviluppo di vasi pre-esistenti mediante migrazione e proliferazione di cellule endoteliali mature. In passato si riteneva che quest'ultimo fenomeno, fosse l'unico meccanismo di sviluppo di nuove reti vascolari e che la vasculogenesi, ovvero il processo di formazione di vasi sanguigni a partire da un tessuto avascolare, fosse limitata alle prime fasi dello sviluppo embrionale.

Recentemente è stato dimostrato che la vasculogenesi può avvenire anche nell'organismo adulto, con il coinvolgimento di cellule progenitrici endoteliali provenienti dal midollo osseo (Asahara T et al., 1999).

1.1 PROGENITORI DI CELLULE ENDOTELIALI (EPCs)

Le cellule progenitrici endoteliali (EPCs) sono state isolate per la prima volta da Asahara e collaboratori nel 1997. Dimostrarono che durante vasculogenesi ed angiogenesi, in risposta a vari segnali da parte di citochine e chemochine, tali cellule venivano mobilitate dal midollo osseo al circolo sanguigno per giungere ai siti di ischemia, contribuendo alla formazione di nuovi vasi sanguigni (George AL et al, 2011, Asahara T et al, 1997). Oggi è noto che le EPCs sono presenti soprattutto nel midollo osseo, ma anche nel sangue periferico e nel sangue cordonale, negli organi parenchimatosi e nella parete degli stessi vasi sanguigni.

Sono cellule “migranti”, cioè dotate della capacità di circolare, proliferare e differenziarsi in cellule endoteliali mature; sono implicate, nella formazione, rigenerazione, riparazione e al mantenimento dell'omeostasi del tessuto endoteliale (Rafii S. et al, 2000).

Molti studi su animali hanno dimostrato che le EPCs possono giocare un ruolo fisiologico nella riparazione endoteliale endogena e nella guarigione delle ferite; tuttavia, il loro potenziale vasculogenico è implicato anche nella patogenesi delle malattie vascolari e nella progressione dello sviluppo dei tumori, i quali sono capaci di provvedere al reclutamento di queste cellule per favorire la propria crescita e metastasi. L'ipossia nei tessuti ischemici e tumorali rappresenta uno degli stimoli più potenti alla mobilitazione delle EPCs dal midollo osseo al circolo periferico, grazie al rilascio di fattori di crescita, citochine e chemochine. (George J, 2005; Kalka C et al., 2000).

1.1.1 Proprietà fenotipiche delle EPCs

I progenitori di cellule endoteliali sono un gruppo eterogeneo di cellule che originano nel midollo osseo e sono presenti in diversi stadi di differenziazione nel sangue periferico.

Dal punto di vista fenotipico, le EPCs sono caratterizzate da specifici antigeni di superficie che si modificano nel corso della differenziazione.

Le EPCs, inizialmente esprimono markers tipici delle cellule staminali quali il CD34, il VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, noto anche come KDR) e il CD133 (Peichev M et al., 2000). Il passaggio nel circolo è segnato da una diminuzione dell'espressione di CD133, mentre rimane costante quella per CD34 e per VEGFR-2. La perdita definitiva della positività per il CD133 e quella successiva per il CD34 segna un ulteriore step differenziativo, fino allo stadio di cellule endoteliali mature, caratterizzate dall'acquisizione di markers quali il CD31 (PECAM-1), VE-caderina, e il fattore di von Willebrand (vWF) (Khakoo AY et al. 2005).

L'antigene CD34 identifica tutte le cellule ematopoietiche staminali e progenitrici del midollo osseo, mentre è assente nei precursori midollari morfologicamente identificabili e nelle cellule circolanti del sangue periferico. Per tale motivo il CD34 è considerato un marcatore specifico di staminalità. La sua espressione sulla superficie di progenitori ematopoietici e la sua progressiva scomparsa nelle cellule più mature suggerisce che abbia un ruolo importante nel mantenimento di un fenotipo indifferenziato della cellula progenitrice

Il CD34 è di una proteina integrale di membrana, del peso molecolare di 110 kD. La presenza di molti siti di glicosilazione, la mancanza di attività tirosin-chinasica e la frequenza molto bassa di sintesi e di degradazione suggeriscono che il CD34 non sia un recettore per un fattore di crescita o una molecola di trasduzione del segnale, ma che sia coinvolto nelle interazioni cellula-cellula o cellula-matrice extracellulare. Infatti, ha un ruolo cruciale nel promuovere l'adesione alla parete endoteliale: viene opportunamente glicosilato per potersi legare alla L-selectina, espressa dalle cellule dell'endotelio. Inoltre, è implicato in molteplici funzioni, tra cui la promozione della proliferazione cellulare, il blocco del differenziamento e la migrazione delle cellule ematopoietiche verso tessuti periferici (Nielsen JS et al, 2008).

Il marcatore VEGFR-2 appartiene alla famiglia dei recettori tirosin-chinasici e lega il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF). Nei mammiferi esistono cinque forme differenti di VEGF, che si legano a tre diversi recettori tirosin-chinasici (VEGF-R): VEGFR-1 fondamentale per lo sviluppo delle cellule emopoietiche, VEGFR-2 critico per lo sviluppo delle cellule endoteliali vascolari e VEGFR-3 implicato nella linfoangiogenesi.

VEGFR-2, espresso sulla superficie delle EPCs, è una proteina del peso di 230 kD, costituita da una regione extracellulare composta da sette immunoglobuline, un dominio transmembrana, e una regione intracellulare contenente un dominio tirosin-chinasico (T. Takahashi, 1997). Risponde al segnale del fattore di crescita avviando una cascata di fosforilazioni che provoca, in ultima analisi, un aumento della trascrizione genica a livello nucleare con conseguente miglioramento della proliferazione endoteliale, della migrazione, della sopravvivenza e della permeabilità della cellula (K.Holmes et al, 2007).

VEGFR-2 è un recettore ad alta affinità per il fattore di crescita dell'endotelio vascolare A (VEGF-A), in grado di attivare a sua volta la protein chinasi B (PKB), proteina coinvolta nel signaling di sopravvivenza cellulare ed anti-apoptotico.

Un secondo network molecolare innescato dal fattore di crescita endoteliale è dato dall'attivazione della fosfolipasi C- γ 1 (PLC- γ 1), che provoca l'idrolisi del fosfatidilinositolo 4-5 bifosfato (PIP-2) e la generazione di due secondi messaggeri: il diacilglicerolo (DAG) e l'inositolo-3-fosfato (IP3). Il DAG attiva la protein chinasi C β (PKC- β), chinasi in grado di indurre un aumento della sintesi di DNA, e quindi un aumento della replicazione cellulare. L'IP3 invece provoca un aumento del Ca^{2+}

intracellulare, che si traduce in un aumento della concentrazione di ossido nitrico, regolatore di numerose funzioni endoteliali (Olsson A.K et al, 2006).

Tra i marker identificativi delle EPCs vi è il CD133, una glicoproteina transmembrana di 120 kD. Questa proteina consiste in un dominio N-terminale extracellulare e cinque domini transmembrana con due loops extracellulari. Cellule che esprimono tale marker possono differenziare in senso angiogenico. Il CD133 permette di distinguere diversi stadi maturativi delle EPCs, poiché è presente nella fase precoce del differenziamento, mentre scompare nella fase tardiva (Peichev M et al, 2000). Molti autori attribuiscono al CD133 un ruolo funzionale di “organizzatore” della topologia della membrana plasmatica. L'interazione con il colesterolo suggerisce che il CD133 possa avere anche un'importanza nel mantenimento di un'appropriata composizione lipidica della membrana e nella comunicazione cellulare (Irollo 2013).

Studi effettuati in diverse tipologie di tumore (epatoma, cancro del pancreas) dimostrano come l'attività di enzimi coinvolti nel metabolismo glucidico vari in relazione all'espressione del CD133 (Gong L. et al, 2012; Lyschchik A et al, 2007).

L'espressione del CD133 è regolata da molti fattori intra ed extracellulari, quali ipossia, disfunzione mitocondriale o deplezione di DNA mitocondriale che inducono un'overespressione reversibile del CD133. Un altro elemento che influenza l'espressione di questo marcatore è il fattore di crescita trasformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), che determina la sovraespressione dell'antigene inibendo l'enzima metiltransferasi-1 (DNMT1) e inducendo invece la demetilazione del promotore (Zhong, 2013).

Il fenotipo delle EPCs nella fase più precoce della mobilizzazione è caratterizzato dalla coespressione di CD34, CD133, VEGFR-2 e l'assenza del CD45 tipico della linea monocitaria, la fase più tardiva vede la scomparsa del CD133 e la comparsa del CD31 e di E-selectina, specifici marcatori del fenotipo endoteliale.

Indipendentemente dal grado di maturazione e dal fenotipo, tutte le EPCs hanno la capacità di essere reclutate nei siti di danno per ripristinare l'integrità vascolare.

1.1.2 Classificazione delle EPCs

Nonostante le differenti caratteristiche delle EPCs coltivate con vari metodi, i diversi autori hanno armonizzato i risultati evidenziando come nel processo di generazione delle colture di EPCs vi siano tre popolazioni distinte: le Early-EPCs, di derivazione monocitaria, che acquisiscono nuovi markers quali CD45, CD14, CD11b/c; le Late-EPCs, che non esprimono CD45 o CD14; infine la terza popolazione è rappresentata dai CAC-EPCs o progenitori angiogenici circolanti (CAC) (**Fig.1**).

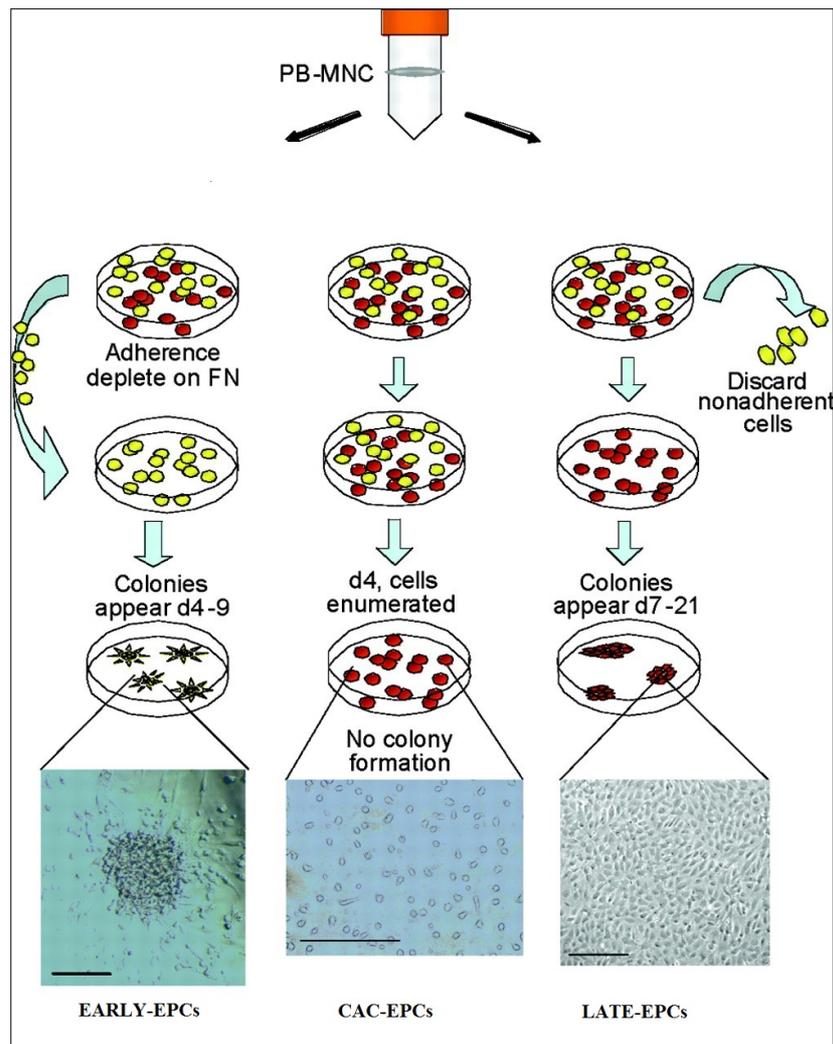


Fig. 1 Progenitori endoteliali provenienti da PBMCs.

Le Early-EPCs, dette anche endothelial cell-like cells, sono cellule che in vitro si presentano di morfologia fusiforme; appaiono in coltura dopo 4-7 giorni dall'isolamento, mostrando il picco di crescita intorno a 2-3 settimane, e possono vivere fino a quattro settimane. Hanno un basso potenziale proliferativo e non sono in grado di formare strutture vascolari in vitro, ma possono contribuirne alla formazione attraverso un meccanismo paracrino: sono, infatti, in grado di secernere fattori pro-angiogenici. Le Early-EPCs oltre ad esprimere il CD34 e CD133, acquisiscono il marker CD45, espresso sulla superficie di tutte le cellule nucleate del lineage emopoietico, mostrando un fenotipo bilineare, sia endoteliale che emopoietico, il che suggerisce che esse derivino da una cellula in origine mieloide (Leone AM et al, 2009).

Le Late-EPCs, anche dette endothelial outgrowth cells, non esprimono marcatori emopoietici come CD45 e CD14, mentre sono caratterizzate dalla positività per alcuni markers endoteliali come KDR,

CD146, e VE-caderina. Questa popolazione appare dopo almeno 7-21 giorni di coltura e il loro sviluppo può richiedere fino a 30 giorni e sono in grado di sopravvivere fino a 12 settimane. Morfologicamente si presentano dall'aspetto poligonale. Esse sono dotate di elevata capacità proliferativa, differenziativa e di una variabile attività di auto-rinnovamento, mostrando quindi di possedere tutte le caratteristiche di vere cellule progenitrici (Hur J et al, 2004).

Le Late-EPCs sono in grado di legare in coltura la lectina ULEX-Europaeus e hanno la capacità di incorporare le LDL acetilate; inoltre esprimono i markers specifici della linea endoteliale, tra cui molecole di adesione endotelio-piastrine (PECAM-1 o CD31), VE-caderina, fattore di Von Willebrand (vWF), ossido nitrico sintetasi endoteliale (eNOS), e se stimolate, E-selectina o CD62 (Leone AM et al, 2009).

In conclusione, le Late-EPCs sono coinvolte nella sostituzione delle cellule endoteliali danneggiate e nel processo di vasculogenesi; diversamente, le Early-EPCs hanno un ruolo di biomarker predittivo del danno endoteliale, soprattutto considerando l'abbondante quantità di dati disponibili sul loro valore prognostico e un ruolo paracrino nella formazione del vaso (Pompilio G. et al, 2009).

La terza popolazione è rappresentata dai progenitori angiogenici circolanti (CAC), che compaiono in coltura dopo 4-5 giorni d'incubazione e si presentano come singole cellule fusiformi, isolate e sparse sul fondo della piastra. Come le Early-EPCs, derivano dalla frazione mononucleata delle cellule periferiche ma a differenza di queste derivano dalla frazione aderente alla piastra di coltura (Kalka C et al., 2000). Anch'esse non sono dotate di capacità di auto-rinnovamento né di proliferazione e mostrano un fenotipo misto emopoietico ed endoteliale. Modelli in vivo di ischemia tissutale trattati con CAC sembrano suggerire una loro effettiva partecipazione alla neovasculogenesi, tuttavia nessun effettivo contributo terapeutico è emerso in trial clinici in pazienti affetti da malattie cardiovascolari (Prater DN et al., 2007).

1.1.3 Fasi di attivazione delle EPCs

In condizioni fisiologiche, le cellule progenitrici endoteliali si trovano in uno stato quiescente a livello midollare.

Quando avviene una lesione a livello vascolare, le EPCs migrano nella zona del danno e interagiscono con il monostrato endoteliale leso. Nella riparazione del danno endoteliale ad opera delle EPCs si riconoscono tre fasi principali: la prima fase consiste nella mobilitazione, ovvero nel rilascio dal midollo osseo; la fase successiva è il reclutamento al sito di neovascolarizzazione, ed infine la differenziazione in cellule endoteliali mature. Gli step in realtà tendono a sovrapporsi come

anche l'azione dei fattori inducenti, che, nonostante vengano schematicamente classificati per fase, agiscono di concerto in ogni passaggio del processo maturativo delle cellule staminali (Rose J.A et al, 2014).

Mobilizzazione e homing

In condizioni di ischemia, che rappresenta lo stimolo maggiore di mobilizzazione, i progenitori endoteliali dalla nicchia midollare entrano nel circolo sanguigno.

Molti fattori sono coinvolti in questa fase: il fattore di crescita delle colonie granulocitarie (G-CSF), il fattore di crescita basico dei fibroblasti (bFGF), il fattore di crescita placentare (PGF), l'eritropoietina (EPO), la metalloproteasi di matrice 9 (MMP-9), il ligando kit-solubile (sKitL), il VEGF-A e il fattore-1 di derivazione stromale (SDF-1).

La proteasi MMP-9 ha un ruolo fondamentale nella mobilitazione dei progenitori, soprattutto attraverso la digestione della matrice extracellulare che ancora queste cellule al midollo osseo. Questa proteasi, inoltre, favorisce la trasformazione di recettori di superficie delle EPCs, ad esempio Kit, in recettore solubile. Il rilascio di sKitL, forma solubile di Kit, porta ad una maggiore mobilità dei progenitori endoteliali (Heissig B, 2002). Si è visto che, modelli murini con deficit o in condizione di inibizione di MMP-9, presentano una ridotta mobilizzazione delle EPCs, a conferma dell'importanza di questo enzima nel processo (Huang PH et al., 2009).

Il fattore di crescita VEGF-A contribuisce alla mobilizzazione delle EPCs, agendo sul recettore VEGFR-2, espresso sulla superficie di queste cellule. In condizione di danno vascolare, i valori plasmatici di VEGF-A risultano elevati. È stato provato il coinvolgimento di questo fattore nella rapida mobilizzazione delle cellule progenitrici endoteliali dal midollo osseo alla circolazione periferica (Gill M et al, 2001). Uno studio ha mostrato come il VEGF-A promuova la mobilizzazione delle EPCs dalla nicchia midollare attraverso un aumento dell'espressione delle MMP-9 midollari (Heissig B et al, 2002).

Molti altri fattori sono implicati nel processo di reclutamento, tutti attualmente utilizzati come agenti mobilizzatori di cellule staminali capaci di migliorare anche la funzionalità. Tra i più importanti vi è l'SDF-1, protagonista non solo nella fase di mobilizzazione, ma con un ruolo anche nella protezione delle EPCs dall'apoptosi. I livelli di SDF-1 possono risultare alterati da una serie di stimoli: mediatori infiammatori, cambiamenti nella matrice extracellulare e ipossia (Ceradini DJ et al., 2004). Le piastrine secernono livelli estremamente elevati di SDF-1 e questo potrebbe fornire un meccanismo molto efficace di mobilitazione e homing. Tuttavia livelli aumentati di SDF-1 non possono indurre neovascolarizzazione in assenza di lesioni.

Inoltre, intervengono nel processo di mobilizzazione: l'FGF, il PFG, quest'ultimo importante nella

cascata di attivazione delle cellule staminali e nell'up-regulation dell'attività delle MMP-9 e ancora, l'EPO e la sintetasi costitutiva endoteliale dell'ossido nitrico (eNOS), la cui assenza, nei topi, produce un deficit funzionale e numerico di cellule staminali (Rose A.J et al, 2014)

Reclutamento al sito di neovascolarizzazione

La tappa successiva nel processo di neovascolarizzazione mediato dalle EPCs prevede il reclutamento e il differenziamento di quest'ultime nei siti di interesse. Molti dei fattori coinvolti nella mobilitazione si ritrovano anche nel reclutamento. La condizione di ipossia o di danno vascolare comporta un aumento della produzione delle citochine e dei fattori di crescita, che raggiungono una concentrazione a livello del tessuto danneggiato superiore a quella presente nel midollo, con conseguente richiamo delle EPCs nel sito danneggiato.

Uno dei fattori coinvolti, VEGF-A, agisce nella regolazione della proliferazione cellulare legandosi al VEGFR-2 e si ritrova nella fase di reclutamento agendo sul VEGFR-1.

Il reclutamento e l'incorporazione delle EPCs richiede una serie di eventi sequenziali, quali l'adesione, la transmigrazione e il differenziamento in cellule endoteliali.

Lo step iniziale per il reclutamento dei progenitori comprende l'adesione degli stessi alle cellule endoteliali, attivate da citochine. L'adesione è principalmente mediata da integrine, overesprese sulla membrana delle EPCs in questa fase: le $\beta 2$ -integrine e le $\alpha 4\beta 1$ -integrine, che sono coinvolte successivamente anche nella transmigrazione. Studi evidenziano che la mancanza di queste integrine causa una diminuzione dell'homing, reclutamento e della capacità di creare nuovi vasi (Chavakis E et al, 2005). In particolar modo, il deficit delle $\beta 2$ -integrine riduce la capacità migratoria delle cellule staminali su piastra, mentre la deplezione $\alpha 4\beta 1$ -integrine riduce specificatamente l'homing cellulare cardiaco, a evidenziare come le molecole d'adesione siano tessuto-specifiche. La riendotelizzazione, invece, avviene per mezzo delle vitronectine e rispettivi recettori (aVB3 e aVB5) che mediano l'adesione delle EPCs all'endotelio del vaso danneggiato. Studi in vivo hanno dimostrato che la loro inibizione blocca il processo di riendotelizzazione (Hattori K et al., 2001).

La transmigrazione delle EPCs attraverso il monostrato endoteliale dipende dall'attività delle proteasi, soprattutto della MMP-9 che digerisce le componenti della matrice interstiziale. L'attività dell'enzima è legata ad un aumento della concentrazione di ossido nitrico, conseguente l'attivazione di ossido nitrico sintetasi endoteliale, da parte di diversi fattori (GCSF, VEGF, bFGF, PGF).

È ben noto, dunque, che la collaborazione di integrine e proteasi sia essenziale per modulare l'invasione e la migrazione attraverso la matrice extracellulare.

Una volta giunte al sito di riparazione, le EPCs contribuiscono alla formazione di nuovi vasi

attraverso diverse vie: incorporazione nell'endotelio, differenziazione in cellule endoteliali mature oppure attraverso la produzione di segnali paracrini (Balaji et al, 2013)

Differenziazione

Una volta raggiunta la sede di riparazione del danno vascolare, le EPCs devono integrarsi nel tessuto endoteliale preesistente, proliferare e differenziarsi.

Il processo di differenziazione da progenitori endoteliali a cellule endoteliali mature comprende l'adesione mediata dalle integrine alle componenti della matrice extracellulare, principalmente alla fibronectina, seguita da proliferazione indotta da fattori di crescita. Le integrine giocano un ruolo molto importante anche durante la differenziazione delle EPCs. L'espressione delle integrine sulla superficie delle EPCs varia nel corso del processo di maturazione: alcune integrine sono espresse solo sulle EPCs "indifferenziate", mentre altre sono espresse solo in stadi successivi della maturazione. Il profilo di espressione delle integrine sulla superficie delle EPCs è un processo dinamico; le integrine vengono attivate e sono overespresse ai vari step del percorso che guida le EPCs dalla nicchia midollare al sito di riparazione, e la loro espressione riflette l'adattamento di queste cellule alle diverse condizioni che regolano la loro mobilitazione in circolo, il reclutamento, la migrazione transendoteliale, l'invasione e la differenziazione.

È stato dimostrato che la migrazione transendoteliale è mediata soprattutto dall'integrina β -2. Le integrine che legano la fibronectina sono espresse durante tutto il processo di differenziazione, suggerendo che l'interazione diretta tra fibronectina ed EPCs sia indispensabile per la loro maturazione (Balaji et al, 2013).

I principali fattori coinvolti nel processo di differenziamento sono i fattori di crescita angiogenici, che comprendono la famiglia dei VEGF, il gruppo delle angiopoietine e fattori di crescita endoteliali. La maturazione e l'acquisizione di un fenotipo endoteliale è mediato dalla regolazione della deacetilazione dell'istone del fattore trascrizionale HoxA.

Citochine e forze meccaniche sembrano iniziare una cascata di eventi che porterà le cellule progenitrici ad acquisire caratteristiche fenotipiche di cellule endoteliali. Il network molecolare che regola la maturazione delle EPCs a cellule endoteliali pronte per essere integrate nell'endotelio è in gran parte sconosciuto.

La maturazione delle EPCs è segnata dalla perdita di CD133/CD14 e dalla comparsa di markers specifici quali il fattore di Von Willebrand. Tali modifiche dell'assetto fenotipico si verificano durante la migrazione dalla periferia al monostrato endoteliale

Il processo di differenziazione in cellule endoteliali mature prevede inoltre la secrezione di fattori

paracrini da parte delle EPCs, quali il VEGF, l'SDF-1, il fattore di crescita 1 insulinsimile (IGF-1), e la proteina chemiotattica dei monociti 1 (MCP-1). Tutti questi fattori in combinazione tra loro possono agire su differenti popolazioni cellulari portando ad una risposta globale che promuove sia l'angiogenesi che la rigenerazione dei tessuti lesi (Balaji et al, 2013).

1.1.4 Coinvolgimento delle EPCs in patologie oncologiche

L'angiogenesi tumorale è principalmente un processo mediato dalle cellule endoteliali, ed è stato ampiamente dimostrato assumere un ruolo cruciale nella crescita del tumore, invasione e metastasi. Di conseguenza, la neovascolarizzazione tumore-associata rappresenta un obiettivo fondamentale nella cancroterapia. Diversi meccanismi partecipano alla genesi vascolare patologica, in particolare neoangiogenesi e vasculogenesi postnatale. Questi processi possono anche svolgere un ruolo fondamentale nella resistenza agli agenti anti-angiogenici, che porta alla progressione del tumore. Le cellule progenitrici endoteliali sono responsabili della mediazione della vasculogenesi; possono differenziare in cellule endoteliali mature in risposta alla crescita del tumore, inducendo di conseguenza l'invasione e la metastasi del cancro (**fig. 2**).

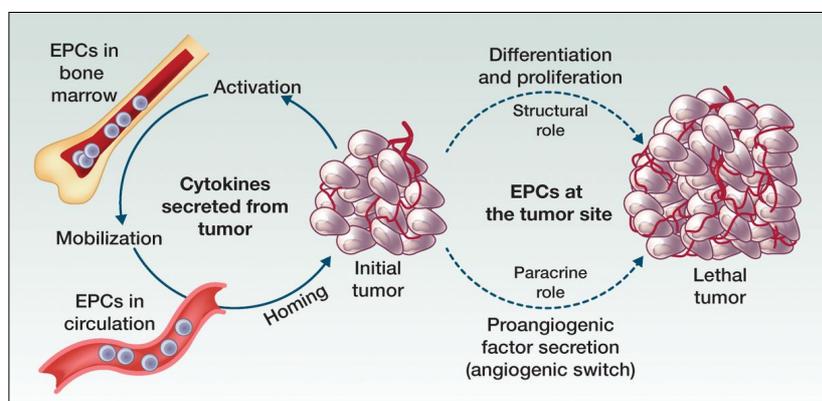


Fig.2 Angiogenesi tumorale e coinvolgimento delle EPCs (de la Puente P, 2013).

L'identificazione delle EPCs ha provocato un cambiamento di paradigma riguardo alla conoscenza sulla formazione della rete vascolare, introducendo il processo di vasculogenesi come un nuovo meccanismo per la formazione dei vasi nel tumore.

La prima prova del contributo delle EPCs alla vasculogenesi cancro-indotta è emersa dagli studi svolti da Lyden e collaboratori, in topi mutanti con difetti nell'angiogenesi. È stato dimostrato che il trapianto di midollo osseo da topi wild-type a topi knock-out, angiogenesi difettivi, ripristina la

vascolarizzazione del tumore e la crescita di diverse linee cellulari tumorali, EPCs mediata (Lyden et al, 2001).

Diversi studi suggeriscono che nei processi tumorali le EPCs potrebbero promuovere il processo “angiogenic switch” sia attraverso meccanismi autocrini che paracrini. In particolare, l'attività paracrina è di grande interesse clinico, perchè come dimostrato da Gao et al., il blocco della mobilitazione delle EPCs dovrebbe causare una grave inibizione dell'angiogenesi, e quindi ridurre notevolmente la progressione del cancro (Gao et al., 2008)

Pertanto, l'intervento nei meccanismi di vasculogenesi mediata dalle EPCs rappresenta un obiettivo terapeutico estremamente interessante, in tutte le fasi della progressione del cancro, mediante la sintesi di nuovi e più efficaci farmaci anti-angiogenici.

Dato l'importante ruolo della vascolarizzazione in neoplasie umane, sono stati intrapresi numerosi sforzi per identificare biomarcatori surrogati, che possano riflettere l'attività vascolare/angiogenica indotta dal tumore. Sono stati ampiamente studiati parametri quali la densità dei microvasi (MVD) e il livello di espressione di VEGF, che sembrano essere ottimi indicatori diagnostici e prognostici in oncologia clinica (Trivella M et al., 2007). In aggiunta a questi due marcatori, anche la concentrazione di EPCs nel sangue periferico sembra essere un marcatore utile, proprio perché potrebbe riflettere l'attività di vascolarizzazione tumore-indotta.

Purtroppo i risultati dei diversi studi presentano incongruenze a causa della non uniformità delle caratteristiche dei campioni di popolazione studiati, sia relativamente ai pazienti oncologici che ai controlli sani. Pertanto, per convalidare il valore diagnostico delle EPCs è necessaria una maggiore uniformità nei criteri di selezione dei partecipanti allo studio, che tengano in considerazione numerosi fattori di confondimento, quali ad esempio malattie cardiovascolari, metaboliche e differenti stili di vita (tra cui fumo, esercizio fisico..) (Zhao SF et al., 2013).

L'efficacia dei trattamenti antitumorali è solitamente valutata misurando gli effetti diretti sulla massa tumorale e/o sulla sopravvivenza, ed è per lo più confinata a tecniche di imaging come raggi X, tomografia computerizzata, risonanza magnetica e gli ultrasuoni (Eisenhauer EA et al., 2009). Tuttavia, la valutazione di questi parametri non può riflettere l'efficacia del trattamento antitumorale nell'immediato e in maniera diretta; perciò è necessario un biomcatore affidabile. Il potenziale di EPCs nel monitoraggio della risposta ad un intervento terapeutico è determinata distinguendo l'impatto dei vari interventi (ad esempio, la chirurgia, la chemioterapia e radiazioni) su EPCs in diversi tumori, tra cui il cancro al seno (Goon PK et al., 2009), il cancro del polmone (Pirro M et al., 2013) il cancro ovarico (Kim YB et al., 2013) il cancro del colon-retto (Pohl M et al., 2011) il cancro gastrico (Ha X, Zhao et al., 2013) e tipi misti (Roodhart JM et al., 2010).

Pertanto, le EPCs potrebbero essere utilizzati come potenziali indicatori della risposta clinica a vari interventi, ma solo dopo la convalida da ulteriori studi clinici su larga scala.

Inoltre, sono necessari studi di base con i seguenti obiettivi: chiarire l'origine, la funzione, e pathway molecolari delle EPCs; migliorare l'identificazione, l'isolamento e la caratterizzazione molecolare delle EPCs, ma soprattutto comprendere a fondo il processo di vascolarizzazione tumorale.

1.1.5 Coinvolgimento delle EPCs in patologie metaboliche

Le malattie metaboliche sono un gruppo di patologie, genetiche e non tutte di natura ereditaria, molte delle quali non hanno ancora una diagnosi certa né una terapia. Esse sono causate da un difetto nella catena di funzionamento delle reazioni metaboliche, dove per un piccolissimo tassello una sostanza può non essere correttamente metabolizzata, può accumularsi in eccesso interferendo con altre funzioni, può essere metabolizzata attraverso sistemi alternativi con la liberazione di intermedi tossici oppure determinare un disturbo della crescita. E' stato dimostrato che in presenza di alterazioni o patologie metaboliche, il numero di progenitori endoteliali diminuisce, la loro funzionalità è compromessa e viene a mancare l'equilibrio fisiologico, a favore di un aumentato rischio di sviluppo di patologie cardiovascolari.

I dati combinati degli studi condotti sull'uomo e sugli animali hanno stabilito come l'insulino-resistenza (IR), una tra le più frequenti manifestazioni in patologie metaboliche, sia un determinante importante della biodisponibilità di monossido di azoto (NO). L'IR comporta, infatti, diverse alterazioni biochimiche, tra cui l'infiammazione e lo stress ossidativo, con conseguente aumento di specie reattive dell'ossigeno, che riducono la biodisponibilità di NO e promuovono l'apoptosi (King GL et al., 2004). Anche se gli effetti dell'IR sulla produzione di NO non sono stati studiati direttamente, è noto che il fattore di crescita VEGF stimola la produzione di NO attraverso l'attivazione di PI3K, una chinasi coinvolta nei pathways di segnalazione di fattori di crescita e citochine, che nell'IR si presenta fortemente down-regolata.

Studi recenti hanno dimostrato come l'insulino-resistenza colpisca le proprietà funzionali di EPCs. Pazienti affetti da IR presentano un aumento della produzione di citochine infiammatorie, tra le quali TNF- α , che inibisce la proliferazione e la differenziazione EPCs in vitro (Richard M et al., 2009).

Una delle condizioni maggiormente studiate è l'effetto del diabete sulle cellule progenitrici endoteliali. Diversi studi hanno concordato nell'affermare che, in pazienti con diabete di tipo 1 e 2, le EPCs diminuiscono numericamente e risulta compromessa anche la funzione. Si ritiene che questa condizione contribuisca all'insorgenza o alla progressione di micro o macroangiopatia. La riduzione del pool di cellule progenitrici circolanti CD34⁺ si verifica in una fase iniziale del diabete di tipo 2 e può essere dimostrata in soggetti con alterata tolleranza al glucosio. La deplezione di cellule progenitrici persiste nel tempo e peggiora in pazienti con complicanze avanzate. Infatti, livelli di

EPCs CD34⁺ KDR⁺ sono fortemente correlati negativamente al grado di complicazioni vascolari nel diabete di tipo 2. È interessante notare che una piccola, ma significativa, riduzione di cellule circolanti CD34⁺ è rilevabile in pazienti con condizioni di diabete non conclamato, con alterati valori di glicemia a digiuno e ridotta tolleranza al glucosio, suggerendo che questo possa essere un indicatore precoce nel corso naturale della malattia (Fadini GP et al., 2010).

In linea teorica, le cause della riduzione del numero delle EPCs circolanti nel diabete includono una ridotta sopravvivenza, un'alterata mobilitazione dal midollo osseo e una differenziazione compromessa. Uno studio ha dimostrato che lo stress ossidativo e la glucotossicità influenzano la sopravvivenza delle cellule progenitrici in vitro: la presenza di glicazione induce disfunzioni e apoptosi delle EPCs in coltura, interagendo con i pathways di segnalazione per la trasduzione del segnale (Marchetti V et al, 2006).

Le EPCs sono state studiate in quasi tutte le complicanze diabetiche, con risultati coerenti tra i diversi studi, che mostrano sia una disfunzione significativa e/o una riduzione del numero di cellule progenitrici, sia complicazioni macrovascolari e microvascolari. Sebbene i metodi utilizzati in questi studi siano molto diversi tra loro e talvolta analizzino sottopopolazioni differenti di EPCs, la concordanza tra i risultati è solida, e mostra chiaramente un difetto nelle EPCs nel contesto del diabete.

Per quanto riguarda il comportamento delle EPCs in pazienti affetti da sindrome metabolica, esistono studi e dati limitati. Nello studio condotto da Westerweel e collaboratori, si afferma che i livelli di EPCs circolanti CD34⁺KDR⁺ sono ridotti di quasi il 40% negli uomini obesi con sindrome metabolica rispetto agli uomini non obesi (Westerweel P.E. Et al., 2008).

Nello studio di Jialal et al., sono stati indagati sia il numero che la funzionalità delle EPCs in un campione più ampio di soggetti con sindrome metabolica (n=46), di cui il 77% erano di sesso femminile. In accordo con lo studio illustrato precedentemente nei maschi obesi, è stata dimostrata una significativa diminuzione del numero di EPCs, definite per la doppia positività per i marcatori CD34/KDR. Inoltre, in questo studio sono state valutate alcune delle proprietà delle EPCs, quali la capacità di formare colonie, la migrazione e la formazione di tubuli (Jialal L. et al., 2010). Oltre alla riduzione del numero, è stata documentata una significativa compromissione della capacità clonogenica delle EPCs, e una ridotta capacità di essere incorporate in strutture tubulari.

È necessario sottolineare che nessuno dei soggetti partecipanti ai due studi illustrati era affetto da diabete o malattie cardiovascolari, nessuno utilizzava farmaci che influenzassero EPCs; questi dati, per quanto limitati, suggeriscono perciò che il danno nelle EPCs compare già dalle prime manifestazioni della sindrome metabolica, prima dello sviluppo del diabete o di malattie cardiovascolari.

1.1.6 Coinvolgimento delle EPCs nelle patologie cardiovascolari

Le malattie cardiovascolari (CVD) sono tra le principali cause di mortalità sia nei paesi sviluppati che in quelli via di sviluppo. Poiché il danno endoteliale è implicato nella patogenesi di malattie cardiovascolari (aterosclerosi, trombosi e ipertensione) e considerando che le cellule endoteliali mature possiedono limitate capacità di rigenerazione, vi è un crescente interesse nei confronti delle EPCs circolanti per la loro implicazione nel mantenimento dell'integrità endoteliale, nell'angiogenesi e nella neovascolarizzazione postnatale (Shantsila E et al, 2007). L'endotelio rappresenta non solo una barriera tra il sangue e le proteine subendoteliali della matrice ma impedisce anche l'infiltrazione delle cellule infiammatorie, la formazione di trombi, modula il tono muscolare e controlla la proliferazione della muscolatura liscia vascolare (Dzau et al, 2005).

Molti studi clinici hanno, infatti, messo in evidenza che la presenza di uno qualsiasi dei classici fattori di rischio per malattia cardiovascolare (ipertensione arteriosa, dislipidemia, diabete mellito, fumo, obesità) si associa ad una riduzione o disfunzione delle EPCs circolanti rispetto ai soggetti controllo. I meccanismi molecolari alla base di tali alterazioni sono stati in parte chiariti. Ad esempio, l'eccesso di angiotensina-II, di aldosterone, di low density lipoproteins (LDL) e il fumo agiscono diminuendo il numero di EPCs tramite un meccanismo infiammatorio e pro-apoptotico, mentre l'iperglicemia riduce sia la mobilizzazione sia la sopravvivenza delle EPC, in circolo (Fadini, 2010). Sono state inoltre dimostrate correlazioni inverse tra il livello delle EPCs circolanti e altri biomarker surrogati di rischio cardiovascolare, quali la proteina C reattiva, l'omocisteina e le LDL ossidate. È stato chiarito come, non solo i fattori di rischio si associno singolarmente a diminuzione delle cellule progenitrici circolanti (CD34⁺), ma come l'associazione di multipli fattori di rischio cardiometabolico negli stessi pazienti si associ a una riduzione progressiva e sinergica del loro livello circolante. Inoltre, pazienti con malattia vascolare aterosclerotica manifestano un'ulteriore diminuzione dei livelli di EPCs (CD34⁺KDR⁺ e CD34⁺) rispetto ai pazienti senza segni di aterosclerosi conclamata, a parità di fattori di rischio. Una lieve ma significativa riduzione delle EPCs circolanti si osserva anche in soggetti apparentemente sani, ma che presentano un elevato spessore intima-media a livello della carotide, indicando che le alterazioni delle EPCs sono un evento precoce e precedono lo sviluppo clinico dell'aterosclerosi (Fadini, 2006). Il livello delle EPCs circolanti si può a ragione ritenere rispecchi in maniera sorprendente la storia naturale e la fisiopatologia della malattia aterosclerotica, dalla comparsa dei fattori di rischio allo sviluppo delle sindromi cliniche. Le EPCs si configurano, quindi, come un nuovo prototipo di biomarcatore di rischio cardiovascolare. Ad ulteriore supporto di tale scenario, la letteratura propone tre studi longitudinali che dimostrano come il basso livello delle EPCs circolanti rappresenti un predittore indipendente di eventi cardiovascolari in diverse popolazioni di pazienti. Werner et al. nel 2005 hanno per la prima volta mostrato che il livello basale

delle EPCs CD34⁺KDR⁺ predice negativamente lo sviluppo di un evento cardiovascolare maggiore a distanza di 12 mesi in una popolazione di oltre 500 pazienti sottoposti a coronarografia, indipendentemente dai fattori di rischio tradizionali e da altri potenziali marcatori di rischio, tra cui la frazione di eiezione del ventricolo sinistro (Werner et al., 2005). Quasi contemporaneamente, Schmidt-Lucke et al. dimostravano che il livello basale di EPCs CD34⁺KDR⁺ è un predittore negativo indipendente di eventi cardiovascolari e/o di progressione dell'aterosclerosi in una popolazione di 120 pazienti con diverso profilo di rischio durante un periodo di 10 mesi (Schmidt-Lucke C et al., 2005). Più recentemente Maruyama et al. hanno evidenziato il significato prognostico del basso livello di cellule CD34⁺ circolanti nei confronti di eventi cardiovascolari in una popolazione di 216 pazienti con insufficienza renale cronica in dialisi, durante un periodo di 23 mesi (Maruyama et al., 2008). Complessivamente questi studi, condotti su un numero cumulativo di quasi 1000 pazienti, confermano che il basso livello di cellule progenitrici circolanti rappresenta un biomarcatore di rischio cardiovascolare in soggetti a medio-alto rischio. Il comportamento delle EPCs ed alcuni meccanismi di patogenesi in cui sono coinvolte, sono stati chiariti in molte patologie cardiovascolari. Tuttavia alcuni studi hanno mostrato risultati contrastanti, probabilmente dovuti alla definizione variabile di EPCs. Infatti, i diversi studi indicano metodi differenti di identificazione, diversi tempi di prelievo di sangue, diversa gravità della patologia di base, presenza di farmaci concomitanti e comorbidità che possono influenzare il numero di EPCs circolanti e la loro funzionalità. Queste discrepanze nei risultati dei diversi studi potrebbero essere causate dalla diversa gravità della patologia dei pazienti reclutati, oltre alla non uniformità dei metodi di indagine applicati.

Quindi, le questioni in termini di isolamento e identificazione di EPCs, in particolare per quanto riguarda la caratterizzazione di specifici marcatori di superficie per queste cellule, sono ancora irrisolti. Questo rappresenta un grosso limite per la progressione e lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche.

1.2 IMPLICAZIONI TERAPEUTICHE

Le EPCs partecipano alla rigenerazione o alla riparazione del danno di strutture vascolari e di tessuti extravascolari (ad esempio lo stesso miocardio). Non è ancora stato definito il range di normalità riguardo al numero di EPCs circolanti dei soggetti sani. Viceversa, è stata studiata l'influenza di alcune condizioni patologiche sul numero di tali cellule, quali farmaci e fattori di crescita. L'infarto acuto del miocardio, ad esempio, è stato associato al rapido incremento di EPCs; traumi vascolari, quali l'impianto di by pass coronarici, hanno prodotto una rapida, ma transitoria mobilitazione di tali cellule. Le prospettive al riguardo di un'applicazione clinica di queste cellule sono limitate

dall'esiguo numero di elementi circolanti e dalle difficoltose procedure di isolamento. Sono, dunque, in fase di studio e sperimentazione, diversi approcci sperimentali per indurre un aumento del numero delle EPCs circolanti, tra cui una mobilitazione VEGF-indotta e la transfezione di vettori virali codificanti il gene del VEGF, il principale fattore angiogenetico conosciuto. Altri studi sono necessari per chiarire il ruolo fisiologico delle EPCs e la conoscenza dei fattori che determinano il loro numero e la velocità di turn-over, nonché dei meccanismi che ne regolano l'adesione, la tras migrazione e la differenziazione in vitro e in vivo.

1.3 INSUFFICIENZA RENALE CRONICA (CKD) E DISORDINE MINERALE E OSSEO (CKD-MBD)

La CKD (Chronic Kidney Disease o Insufficienza Renale Cronica) è il processo fisiopatologico a eziologia varia risultante nella riduzione della funzionalità renale, di entità sufficiente da rendere il paziente dipendente in maniera permanente dalla terapia sostitutiva della funzione renale (dialisi o trapianto). Può essere determinata da qualsiasi importante causa di disfunzione renale, come malattie primitive renali (es. glomerulonefriti, nefropatie ereditarie) o altre condizioni patologiche quali diabete mellito e ipertensione, che portano ad un danneggiamento progressivo dell'organo. La malattia progredisce con un deficit quantitativo della massa nefronica funzionante fino ad arrivare all'insufficienza terminale (fase uremica). Nonostante non tutte le patologie presentino la stessa velocità di evoluzione, tutte le nefropatie croniche possono esitare in CKD. Negli ultimi anni molti studi hanno dimostrato che nei pazienti affetti da CKD si rilevano con elevata frequenza lesioni aterosclerotiche e arteriosclerotiche, che espongono le persone affette ad un rischio di mortalità per cause cardiovascolari maggiore del 50%.

Il termine Chronic Kidney Disease- Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) è un termine coniato per definire un disturbo che coinvolge il metabolismo minerale e osseo indotto dall'insufficienza renale cronica che si riflette tuttavia anche a livello sistemico, caratterizzato da tre manifestazioni (presenti da sole o in associazione): anomalie di parametri di laboratorio (Ca, P, PTH e vitamina D)(**fig.3**), anomalie ossee e calcificazione vascolare.

Le anomalie del metabolismo minerale non sono coinvolte solo nell'alterato rimodellamento osseo, dove si osserva una diminuzione dell'attività degli osteoblasti e della velocità di formazione ossea, ma influiscono direttamente anche sul sistema cardiovascolare, causando calcificazioni ectopiche a livello dei vasi. Inoltre, possono anche contribuire alla progressione del danno renale (Davies et al, 2005).

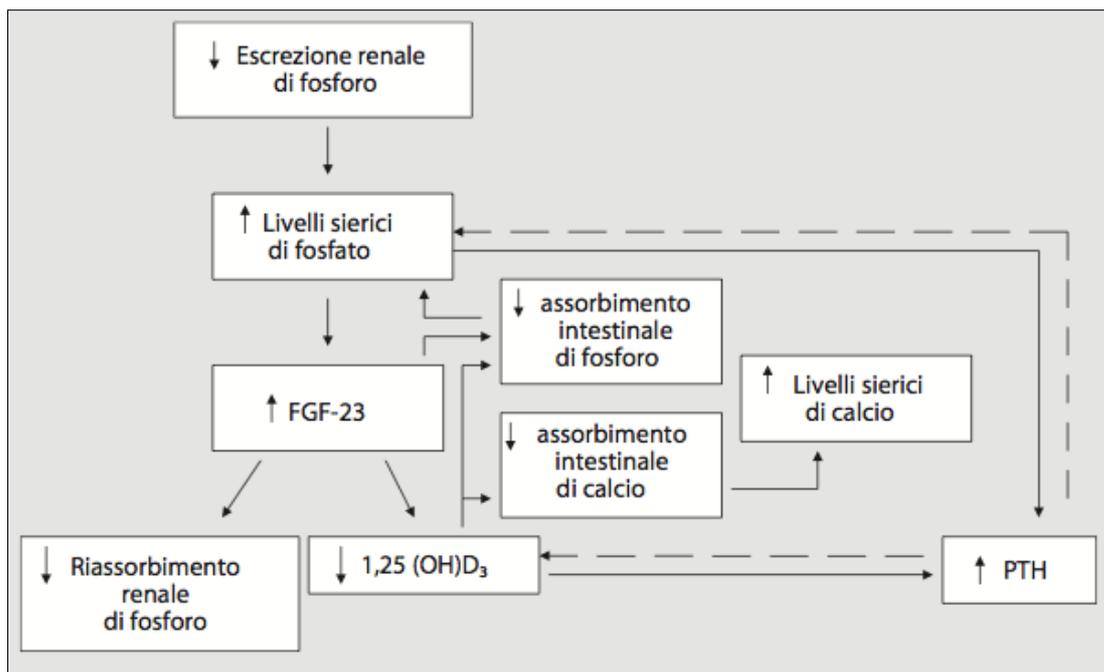


Fig. 3: Anomalie nei parametri di laboratorio in pazienti affetti da CKD-MBD (M. Cozzolino et al., 2010).

La CKD-MBD, insieme al rischio di calcificazione vascolare, comincia a manifestarsi precocemente nel corso della storia clinica del paziente con insufficienza renale cronica, benchè i parametri biochimici di laboratorio non sempre permettono di avere un quadro completo della patologia.

I dati epidemiologici e sperimentali hanno identificato nell'iperfosforemia un'alterazione chiave per lo sviluppo della CKD-MBD. L'incremento della fosforemia è strettamente associato alla mortalità cardiovascolare nei pazienti in fase sia dialitica che predialitica (Kestenbaum B, 2005). Le ricerche sulle cellule muscolari lisce di arterie umane hanno permesso di capire che l'iperfosforemia stimola l'espressione del cotrasportatore sodio-fosfato (PiT1) sulla loro membrana plasmatica. L'uptake del fosfato mediato da PiT1 innesca la produzione di fattori osteogenici (runx2, osteopontina, fosfatasi alcalina, collagene tipo 1) e la transdifferenziazione in senso osteoblastico delle cellule muscolari lisce vascolari, che diventano capaci di depositare idrossiapatite e collagene di tipo I, attivando, così, il processo di calcificazione arteriosa (Jono S et al 2000). L'importanza di PiT1 per l'attivazione dei processi di calcificazione è stata dimostrata anche negli osteoblasti, che sono stimolati a formare osso dall'uptake di fosfato da esso mediato (Yoshiko Y et al, 2007). Il fosfato plasmatico è stato, perciò, identificato come il nemico da combattere per prevenire la mortalità cardiovascolare nella CKD-MBD (Adeney et al, 2009). Tuttavia, diversi studi hanno dimostrato che altri fattori possono essere coinvolti nella calcificazione indipendentemente dalla concentrazione del fosfato. Diversi dati indicano come responsabile principale delle calcificazioni e dell'ipertrofia miocardica nella CKD: il paratormone. Esso sembra influenzare direttamente la funzione dei miocardiociti e

delle cellule muscolari lisce vascolari e, per questo, può assumere un ruolo rilevante nel predisporre i pazienti agli eventi cardiovascolari. Perciò, l'enfasi cardiovascolare che viene attribuita oggi al fosfato dai clinici e dai ricercatori deve lasciare spazio anche all'iperparatiroidismo, restituendo a questa alterazione il giusto rilievo nella genesi della CKB-MBD (Chen NX et al, 2002).

È possibile osservare due tipi principali di disturbi ossei nei pazienti con insufficienza renale terminale: l'osteodistrofia a elevato turnover, nota come osteite fibroso-cistica; e uno stato a basso turnover caratterizzato inizialmente da osteomalacia e quindi da osteopatia adinamica.

L'osteodistrofia uremica a basso turnover potrebbe rappresentare la patologia ossea iniziale della CKD, ma spesso non viene diagnosticata. Questa patologia è caratterizzata da un netto calo del turnover osseo dovuto a un ridotto numero di siti di rimodellamento attivi, la soppressione della formazione di osso e un basso riassorbimento, con conseguente scarso rimodellamento osseo che porta a osteopenia e osteoporosi. La maggior parte del tessuto osseo trabecolare è coperta da cellule di rivestimento, con scarsi osteoblasti e pochi osteoclasti. La struttura ossea è in prevalenza lamellare e la superficie di mineralizzazione è marcatamente ridotta.

Dati recenti suggeriscono che l'alterato metabolismo minerale possa rappresentare un rischio aggiuntivo per l'insorgenza di malattia cardiovascolare, nel caso di un sovraccarico concomitante di alluminio o calcio a causa dell'inabilità dell'osso di tamponare i minerali in eccesso.

La malattia ossea ad alto turnover è invece caratterizzata da una velocità elevata di riassorbimento e formazione ossea, che avviene in risposta ad alti livelli di paratormone in circolo. In questa condizione aumenta sia l'attività degli osteoclasti che quella degli osteoblasti e questo tipo di rimodellamento impedisce un'adeguata mineralizzazione dell'osso neoformato. La malattia ossea ad alto turnover rappresenta l'anomalia ossea metabolica più frequente nei pazienti con CKD. Nei pazienti pre-dialisi, più del 90% dei soggetti presentano questa forma di coinvolgimento osseo (Moe et al, 2007). In conclusione, diversi i fattori patogenetici che intervengono nella CKD-MBD, strettamente correlati tra loro: il deficit di Vitamina D, l'alterazione del metabolismo di calcio (Ca), la ritenzione di ioni fosfato, un aumento eccessivo nella secrezione di paratormone (PTH), la presenza di calcificazioni vascolari o dei tessuti molli, l'aumento dei livelli di Fibroblast Growth Factor 23 (FGF-23) e la diminuzione dell'espressione di Klotho (Pi M et al, 2013).

1.3.1 Deficit di vitamina D

La vitamina D è un gruppo di pro-ormoni liposolubili costituito da 5 diverse vitamine: vitamina D1, D2, D3, D4 e D5. Le due più importanti forme nella quale la vitamina D si può trovare sono la

vitamina D2 (ergocalciferolo) e la vitamina D3 (colecalfiferolo), entrambe le forme dall'attività biologica molto simile. Il colecalfiferolo (D3), derivante dal colesterolo, è sintetizzato negli organismi animali, mentre l'ergocalciferolo (D2) è di provenienza vegetale.

La vitamina D, ottenuta dall'esposizione solare o attraverso la dieta, è presente in una forma biologicamente non attiva e deve subire due reazioni di idrossilazione per essere trasformata nella forma biologicamente attiva, il calcitriolo, che ha un ruolo centrale nella regolazione dell'omeostasi del calcio.

L'esposizione della cute alla luce solare determina la trasformazione del 7-deidrocolesterolo, precursore della vitamina D prodotto dai cheratinociti dell'epidermide, in colecalfiferolo. Questa previtamina entra in circolo mediante uno specifico trasportatore la Vitamin D Binding Protein (DBP) e raggiunge il fegato dove subisce una prima reazione di idrossilazione nella forma 25-idrossivitamina D [25(OH)D]. Per ottenere la forma biologicamente attiva della vitamina, è necessaria una seconda reazione di idrossilazione, che avviene a livello del tubulo renale ad opera dell'enzima α -1 idrossilasi, che trasforma la previtamina in calcitriolo. L'attivazione epatica è substrato-dipendente, quindi regolata dalla quantità di vitamina D resasi disponibile dalle fonti esogene ed endogene; l'attivazione a livello renale invece è enzima-dipendente, quindi regolata dalla disponibilità dell' α -1 idrossilasi che, a sua volta, è influenzata dalle concentrazioni ematiche di calcio, fosforo, paratormone e FGF-23 (Ganesh SK et al, 2003).

Il calcitriolo agisce secondo le caratteristiche proprie degli ormoni steroidei, legandosi ad un recettore nucleare specifico (Vitamin D Receptor o VDR) che regola la trascrizione di numerosi geni. Il complesso vitamina-D-VDR, dopo essersi legato al recettore dell'acido retinico, raggiunge un sito sensibile sul DNA, chiamato vitamin D-response element o VDRE, in cui vengono modulati i processi di trascrizione e di conseguente sintesi proteica. La sintesi proteica può essere stimolata o inibita dalla vitamina D in funzione della capacità di arruolare fattori trascrizionali co-attivatori o co-repressori.

L'attivazione di questo recettore, localizzato su diversi organi quali intestino, cuore, osso, rene, paratiroidi, ha come effetto biologico l'incremento dei livelli di calcemia giocando un ruolo fondamentale nell'omeostasi del metabolismo minerale e osseo: a livello intestinale aumenta l'efficienza dell'assorbimento intestinale di calcio del 30-40% e di fosforo circa dell'80% e a livello renale aumenta il riassorbimento di calcio nel tubulo distale stimolando la sintesi di uno specifico canale (Ogata H et al., 2007; Hruska K et al., 2010).

La progressione del danno renale è associata alla riduzione della sintesi di calcitriolo e con l'inadeguata clearance dei fosfati, fattori che contribuiscono ad alterare l'omeostasi minerale (ad esempio riducendo i valori di calcemia e incrementando la fosforemia).

La diminuzione dei livelli circolanti di calcitriolo inizia precocemente nell'insufficienza renale. La

terapia di elezione in tal caso è la correzione di questo deficit attraverso la somministrazione di attivatori del recettore della vitamina D (VDRAs); la terapia a base di calcitriolo o di analoghi selettivi come il paracalcitolo hanno mostrato un'azione cardioprotettiva e di rallentamento del danno renale. La patologia cardiovascolare è la principale causa di morte tra i pazienti con insufficienza renale cronica, con l'ipertrofia ventricolare sinistra che rappresenta il più potente fattore di rischio. Un crescente numero di evidenze mostra un miglioramento della funzione del ventricolo sinistro in seguito a terapia con VDRAs (Ganesh SK et al, 2003). La vitamina D modula la crescita, la deposizione del collagene e la differenziazione dei cardiomiociti attribuendo ai VDRAs un ruolo diretto nella fisiologia cardiaca.

La condizione uremica, inoltre, si associa ad uno stato infiammatorio cronico e all'aterogenesi, come evidenziato dagli elevati livelli di markers infiammatori; la terapia con VDRAs inibisce la produzione di citochine proinfiammatorie, riducendo il rischio di formazione e instabilità della placca aterosclerotica.

Studi clinici recenti hanno dimostrato come il trattamento con VDRAs sia in grado di ridurre la mortalità nei pazienti in emodialisi, sia generale che per cause cardiovascolari (Teng M. et al, 2005). Ne consegue che una ridotta attivazione del VDR può contribuire alla patogenesi della malattia cardiovascolare nei pazienti con CKD.

1.3.2 FGF-23 e Klotho

Il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF-23) e Klotho sono due fattori associati a diversi disturbi metabolici. In topi knock-out per FGF-23 e Klotho sono stati osservati disturbi caratteristici dell'invecchiamento tra cui vasculopatia cronica, demineralizzazione ossea, atrofia cutanea ed enfisema (Bernheim J et al, 2011).

Recentemente è stato dimostrato il ruolo di questi fattori nel controllo dell'omeostasi del metabolismo minerale, in particolare a livello delle cellule paratiroidee e anche nella modulazione della produzione della forma attiva della vitamina D, due funzioni compromesse in presenza di malattia renale cronica. Il fattore di crescita dei fibroblasti è una proteina di 32 kD espressa principalmente da osteociti e osteoblasti e, in qualità di fosfatona, è uno dei principali regolatori dei livelli sierici di fosfato: FGF-23 esercita il suo effetto ipofosfatemizzante agendo principalmente sul rene; esso aumenta l'escrezione renale di fosfato riducendo l'espressione dei costrasportatori Na/P e riduce i livelli di 1,25(OH) vitamina D inibendo l'enzima α 1-idrossilasi con un sistema PTH-dipendente (Kuro-o M, 2011).

Con il progredire dell'insufficienza renale, l'escrezione del fosfato si riduce e si instaura, quindi, iperfosfatemia, che causa a sua volta l'incremento della secrezione di FGF-23 da parte degli osteoblasti.

La presenza della proteina Klotho è essenziale affinché FGF-23 possa esercitare la sua azione poiché aumenta moltissimo l'affinità tra questa proteina e il suo recettore.

Klotho è una proteina costituita da un dominio extracellulare, uno transmembrana ed uno intracellulare ed è espressa soprattutto a livello renale. Esiste in due forme: può essere presente come recettore di membrana, che regola la sintesi della forma attiva della vitamina D, oppure come proteina in circolo, con attività pleiotropiche tra cui l'inibizione del signalling indotto dai fattori di crescita e la regolazione di canali ionici (Kuro-o M., 2006).

Alcuni studi mostrano che modelli murini deleti per la proteina Klotho mostrano un fenotipo simile alla sindrome da invecchiamento prematuro presente nell'uomo, mentre una sovraespressione di questa proteina provoca un aumento della longevità rispetto a topi wild type (Koro et al, 1997- Kurosu et al, 2005).

Nella CKD-MBD l'espressione di Klotho diminuisce progressivamente, mentre i livelli di FGF-23 aumentano. La diminuzione dell'espressione di Klotho è già apprezzabile nella CKD di fase I e precede l'aumento di FGF-23. Per tali ragioni, alcuni autori ritengono Klotho il biomarker più precoce di CKD, secondo questa teoria il deficit di Klotho sarebbe l'evento iniziale che condurrebbe all'alterazione del metabolismo minerale correlata alla CKD (Kuro-o M., 2011).

1.3.3 Alterato metabolismo di calcio

Nel corso della progressione della CKD-MBD i livelli di calcio diminuiscono gradualmente, principalmente a causa del ridotto assorbimento intestinale secondario al deficit di calcitriolo. Bassi livelli di calcio in forma ionica nel sangue costituiscono lo stimolo principale per la secrezione di paratormone (PTH) e per l'insorgenza dell'iperparatiroidismo secondario. Una bassa concentrazione circolante di calcio viene rilevata dalle cellule delle paratiroidi grazie al Calcium-Sensing Receptor (CaSR), in grado di reprimere la secrezione di PTH e di rilevare le alterazioni nei livelli plasmatici di calcio in forma ionica (Hruska et al, 2010).

Lo studio del CaSR nel tessuto osseo in topi knockout per il suo gene ha dimostrato che la sua attivazione sostiene il turnover osseo, influenzando sia la fase del riassorbimento che la fase della deposizione. Inducendo la differenziazione e l'attività degli osteoblasti attraverso la promozione del trofismo, la mineralizzazione e lo sviluppo osseo (Xue Y et al, 2012).

L'ipocalcemia, durante la CKD-MBD, induce l'aumento nei livelli di PTH circolanti attraverso diversi meccanismi. Una stimolazione delle paratiroidi di breve durata induce l'esocitosi del PTH contenuto nei granuli citoplasmatici. Una stimolazione più lunga induce proliferazione delle cellule deputate alla produzione dell'ormone, cui seguono alterazioni nei livelli di degradazione intracellulare e la mobilizzazione di un pool di riserva secondario.

Il deficit di calcitriolo comporta una sottoregolazione dei CaSR espressi dalle paratiroidi, le quali non sono più in grado di rispondere al carico di calcio nelle fasi avanzate di CKD e nell'iperparatiroidismo refrattario (Larsson TE, 2010).

Oltre all'iperparatiroidismo, le alterazioni nel metabolismo del calcio sono coinvolte in diversi disordini ipertensivi, quali l'ipertensione essenziale e gestazionale. Nella CKD, il deficit di calcio contribuisce a mantenere un'elevata pressione arteriosa (Ogata H et al., 2007).

1.3.4 Ritenzione di ioni fosfato

L'iperfosfatemia, tra le anomalie dei parametri di laboratorio tipiche della CKD-MBD è quella con l'associazione più forte con mortalità cardiovascolare.

Fisiologicamente, gli ioni fosfato vengono liberamente filtrati dal rene a livello glomerulare e vengono riassorbiti dal tubulo prossimale attraverso l'azione di un cotrasportatore sodio-fosfato (NaPi). Con il progredire dell'insufficienza renale, la funzione di filtrazione del rene viene gradualmente compromessa, con un conseguente aumento dei livelli sierici di ioni fosfato. La ritenzione di fosfato gioca inoltre un ruolo principale nella patogenesi dell'iperparatiroidismo secondario, in quanto il fosfato stimola direttamente la sintesi di PTH, la secrezione e la proliferazione delle cellule paratiroidi, stabilizzando il mRNA dell'ormone e aumentandone in questo modo la sintesi. Tale effetto sembra essere diretto, indipendente dai livelli di Ca e vitamina D e dai rispettivi recettori. Il fosforo è implicato anche nell'iperplasia della paratiroide, che può rappresentare il legame tra iperfosfatemia ed iperparatiroidismo secondario (Ogata H et al, 2006).

È stato dimostrato che il fosforo circolante in eccesso, tende a legarsi al calcio e a formare sali di fosfato di calcio che si depositano a livello dei tessuti molli e nella parete dei vasi, favorendo l'irrigidimento della parete vascolare, la riduzione del calibro luminale e la trasformazione delle cellule muscolari lisce dei vasi in cellule dal fenotipo osteoblastico (Ogata H et al, 2007). L'aumento di fosfato intracellulare, mediato dal cotrasportatore PiT1, stimola negli osteoblasti e nei condrociti la produzione di proteine collageniche e non e l'espressione di geni osteoblasto-specifici come *Osf2/Cbfa-1*. *Cbfa-1*, a sua volta, regola l'espressione del gene dell'osteocalcina (OCN), uno dei fattori più importanti dell'osteoblastogenesi (Cozzolino et al, 2005).

In fine, il fosforo agisce, con un meccanismo non ancora del tutto chiaro, sulla via di segnale che si origina dall'interazione tra TGF- α (Transforming Growth Factor α) ed Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR).

Nonostante il ruolo centrale del fosforo nella calcificazione ectopica, non tutti i chelanti del calcio hanno dimostrato la stessa efficacia nel ridurre il rischio di questa condizione (Cozzolino et al, 2003).

1.3.5 Iperparatiroidismo secondario

Nei pazienti con CKD, l'iperparatiroidismo secondario consiste in un'aumentata secrezione di PTH ed è una delle alterazioni più comuni e importanti del metabolismo minerale.

L'aumento del PTH determina un aumento dei processi di rimodellamento osseo, ma nell'uremia si osservano anche acidosi metabolica e carenza di vitamina D, entrambe responsabili dell'insorgenza di difetti della calcificazione della matrice ossea.

L'importanza del PTH nello sviluppo dell'arteriosclerosi calcifica è stata messa in evidenza dai risultati di uno studio su ratti uremici paratiroidectomizzati trattati con dosi sovrafisiologiche di PTH. Questi ratti sono stati divisi in due gruppi sottoposti l'uno a dieta ricca e l'altro a dieta povera di fosfato per 52 giorni. Entrambi i gruppi sviluppavano calcificazioni nella tonaca media dell'aorta e delle coronarie, sebbene solo i ratti a dieta ricca di fosfato presentassero iperfosforemia (Neves KR et al, 2007). Il PTH può, perciò, innescare il processo di calcificazione arteriosa nell'animale uremico indipendentemente dalla presenza di iperfosforemia. Purtroppo, in questo modello animale, non sono stati studiati i meccanismi cellulari della calcificazione e non sono, perciò, note le modificazioni indotte dal PTH nelle cellule muscolari lisce.

Mentre questi risultati hanno evidenziato i risvolti negativi sul deterioramento arterioso della somministrazione prolungata del PTH, altri studi in diversi modelli animali hanno osservato una risposta vasodilatatoria alla somministrazione acuta di PTH. Questa risposta è stata attribuita all'attivazione dell'adenilato ciclasi nelle cellule muscolari lisce, che induce l'inibizione della permeabilità dei canali L voltaggio-dipendenti all'influsso di calcio dal fluido extracellulare. La risposta vasodilatatoria che segue alla somministrazione di PTH potrebbe anche essere spiegata dall'attivazione della sintesi dell'ossido nitrico endoteliale che, l'ormone è capace di indurre a livello endoteliale (Rashid G et al, 2006).

Sono diversi i fattori che contribuiscono ad un'aumentata secrezione di PTH: iperfosforemia, ipocalcemia e produzione ridotta di calcitriolo, sia direttamente che indirettamente, attraverso l'azione di FGF-23. I fattori descritti contribuiscono all'ipertrofia e alla proliferazione delle cellule

della paratiroide, che comportano lo sviluppo di un'iperplasia prima diffusa e poi nodulare. È noto che lo sviluppo di iperplasia nodulare è associata alla sottoregolazione del VDR e del CaSR, ma gli eventi iniziali che portano allo sviluppo di iperplasia sono ancora da chiarire. Nella maggior parte dei casi i pazienti con iperplasia nodulare sono refrattari alla terapia: il trattamento con analoghi della vitamina D non solo è inefficace, ma addirittura aumenta il rischio di formazione di calcificazioni vascolari. Concentrazioni elevate di PTH rappresentano una delle principali tossine uremiche e sono coinvolte nell'insorgenza di diverse complicanze dell'uremia, come ipertensione, alterazione del metabolismo lipidico e intolleranza glucidica (Fukagawa et al, 2006).

1.4 COINVOLGIMENTO DELLE EPCs NELLA CKD-MBD

I pazienti con fattori di rischio cardiovascolare come ipertensione, preeclampsia, fumo, invecchiamento, sindrome metabolica e diabete di tipo I e di tipo II mostrano un numero di EPCs circolanti inferiore, con funzionalità angiogenica compromessa e ridotta capacità migratoria in risposta al fattore chemotattico SDF-1 (Sugawara J et al., 2005). Anche in pazienti con insufficienza renale cronica (CKD) si riscontra una riduzione del numero di EPCs circolanti e una ridotta funzionalità (Choi JH et al., 2004).

Questi difetti nei progenitori endoteliali sembrano instaurarsi precocemente nel corso della malattia. Alcuni studi mostrano come un numero ridotto e una funzionalità aberrante di cellule CD34⁺ circolanti si riscontrino anche nella CKD di fase I, con un peggioramento con la progressione a stadi più avanzati. La maggior parte degli studi sui pazienti in emodialisi hanno riscontrato riduzione del numero e alterata funzionalità delle EPCs (Schlieper G et al, 2008).

Tuttavia, sia la dialisi che il trapianto di rene sembrano avere un effetto positivo, ma non normalizzante, sulle EPCs.

Sebbene sia noto che la funzionalità delle EPCs è compromessa nella CKD, i meccanismi di patogenesi non sono invece ancora del tutto chiari. Una possibile spiegazione potrebbe essere data dal fatto che la CKD è associata ad elevati livelli di dimetilarginina asimmetrica, un inibitore endogeno dell'ossido nitrico sintasi endoteliale; quest'enzima, prodotto dalle cellule endoteliali, diffonde in parte nel compartimento ematico, riducendo l'aggregabilità delle piastrine e l'adesività dei leucociti alle pareti dei vasi sanguigni, e, in parte, raggiunge la sottostante muscolatura liscia vascolare inducendone il rilascio. I conseguenti effetti anti-aggreganti, anti-infiammatori ed anti-ipertensivi sono ritenuti di grande importanza nella prevenzione dell'aterosclerosi. Inoltre, anche il diabete, una condizione frequente in pazienti CKD, è associato ad una carenza di ossido nitrico derivato da un

deficit dell'ossido nitrico sintasi endoteliale (Fadini, 2012) (**Fig. 4**).

Un altro potenziale meccanismo che causa la disfunzione delle cellule progenitrici endoteliali potrebbe essere la condizione di infiammazione; infatti, diversi markers infiammatori come l'interferone, l'interleuchina-6 o proteina C-reattiva hanno implicazioni nell'alterazione della funzionalità delle EPCs, andando ad interferire con i pathways molecolari che inducono senescenza e apoptosi (Fujii H et al., 2006).

Inoltre, diversi agenti, tra cui l'angiotensina II e lipoproteine a bassa densità sono coinvolti nell'apoptosi dei progenitori tramite induzione dello stress ossidativo e riduzione dell'attività telomerasica (Imanishi T et al., 2005).

L'uremia, o alcune delle tossine uremiche, come omocisteina, ad esempio, possono inibire la differenziazione e la funzionalità delle cellule progenitrici (Chen JZ et al., 2004).

Infine, le complicazioni di CKD come la mancanza di eritropoietina o iperparatiroidismo secondario, possono anche contribuire alla disfunzione dei progenitori midollari (Mohandas R et al., 2010)

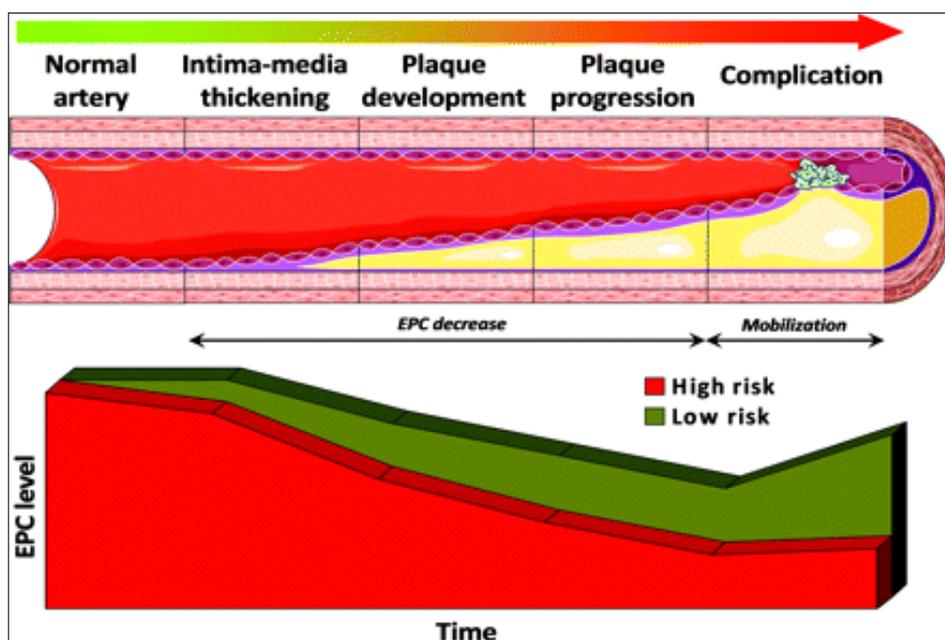


Fig. 4: progressione della placca aterosclerotica e livello delle EPCs (Fadini, 2012)

L'importanza del microcircolo renale come meccanismo di difesa contro il danno renale progressivo e le recenti osservazioni che le EPCs possono funzionare come sistema di rigenerazione (micro) vascolare endogena, suggeriscono che la terapia a base EPCs possieda un potenziale terapeutico importante nella malattia renale. Tali strategie terapeutiche possono includere la somministrazione di EPCs autologhe, ma potrebbero anche mirare alla valorizzazione della mobilitazione delle EPCs, al reclutamento e all'homing, ovvero alla migrazione verso il sito di neovascolarizzazione. In definitiva questo può portare a nuove strategie per migliorare la capacità rigenerativa del rene (Goligorsky MS et al., 2009)

2. SCOPO DELLA TESI

La CKD-MBD è associata ad un rischio maggiore di sviluppare eventi cardiovascolari a causa dello scompenso del metabolismo minerale che si riflette a livello sistemico. Le anomalie del metabolismo minerale non sono coinvolte solo nell'alterato rimodellamento osseo, ma influiscono direttamente sul sistema cardiovascolare, causando calcificazioni ectopiche a livello dei vasi (Fadini, 2012).

Nel paziente affetto da insufficienza renale cronica esistono fattori specifici che incidono fortemente sulla morbosità e mortalità per cause cardiovascolari, fra cui: lo stress ossidativo, l'età dialitica, la disfunzione endoteliale, l'infiammazione cronica.

Diversi studi hanno sottolineato il coinvolgimento dei progenitori endoteliali (EPCs) nella progressione della malattia aterosclerotica correlandolo all'espressione di osteocalcina (OCN), marcatore di calcificazione e ossificazione (Lieben et al, 2013).

Inoltre, è stata descritta nella CKD-MBD la presenza di un numero ridotto di progenitori di cellule endoteliali, con funzionalità compromessa (Fadini, 2012).

Attualmente, il ruolo delle EPCs nella formazione delle calcificazioni vascolari nei pazienti in trattamento emodialitico sostitutivo non è stato ancora chiarito.

Il presente lavoro si propone una serie di obiettivi correlati e consequenziali tra di loro:

1. contribuire a descrivere i meccanismi patogenetici implicati nella disfunzione delle EPCs nel paziente con CKD-MBD in trattamento sostitutivo emodialitico, attraverso una caratterizzazione fenotipica più accurata e mirata delle EPCs;
2. studiare il possibile fenotipo pro-calcifico delle EPCs attraverso la valutazione dell'espressione di osteocalcina (OCN) in pazienti trattati e non trattati con analoghi della vitamina D (VDRAs);
3. studiare l'espressione del recettore della vitamina D (VDR) su EPCs, in pazienti trattati con VDRAs e non trattati, tale trattamento ha effetti positivi sul sistema cardiovascolare;
4. valutare se vi è un'espressione contemporanea di OCN e VDR sulle EPCs, per comprendere che tipo di fenotipo acquisiscono in pazienti affetti da CKD-MBD trattati e non trattati con VDRAs.
5. Caratterizzare il micro ambiente sierico del paziente attraverso il monitoraggio di fattori coinvolti nell'omeostasi vascolare e valutarne come l'ambiente uremico possa o meno contribuire al fenotipo e alla mobilizzazione delle EPCs

3. MATERIALI E METODI

3.1 PAZIENTI

In un arco temporale di 12 mesi sono stati reclutati 52 pazienti caucasici in trattamento emodialitico da almeno sei mesi. Di questi, 17 erano stati sottoposti a terapia con calcitriolo (età: $61,67 \pm 12,28$), 18 con paracalcitolo (età: $58,92 \pm 11,92$), e 17 (età: $62,46 \pm 15,07$) non ricevevano alcuna terapia con agonisti del recettore della vitamina D (VDRAs). I pazienti effettuavano lo stesso regime di terapia da almeno sei mesi prima dell'inclusione e un trattamento emodialitico standard tre volte alla settimana, con l'utilizzo di una membrana di polisulfone.

Venticinque soggetti sani sono stati arruolati come gruppo di controllo (età: $37,4 \pm 9,22$).

I criteri di inclusione comprendevano: età superiore ai 18 anni, stabilità clinica per almeno i tre mesi precedenti l'inizio dello studio e una fistola arterovenosa funzionante come accesso vascolare. Sono stati considerati criteri di esclusione la presenza di infezioni attive, eventi cardiovascolari recenti (nei sei mesi precedenti l'arruolamento), neoplasie, sanguinamento attivo, fratture ossee durante gli ultimi 12 mesi, malattia di Paget, terapia con bifosfonati, dislipidemia, ipertensione, terapia con ACE inibitori o antagonisti del recettore dell'angiotensina II, terapia con calcio mimetici.

Per ogni paziente sono stati raccolti parametri demografici: anni e sesso, parametri clinici: patologia di base, età dialitica e durata di CKD, e parametri biochimici al momento dell'inclusione: proteina C-reattiva, emoglobina, ematocrito, creatinina plasmatici, colesterolo totale, trigliceridi calcio, fosfatasi alcalina ed ossea, fosfato, magnesio, albumina, protidemia, fosfatasi alcalina, glicemia, profilo lipidico, fibrinogeno, emoglobina, ematocrito, ferro, paratormone e 25(OH)D tramite metodiche di routine.

Dal momento che i livelli di 25(OH)D cambiano con l'esposizione solare, è stata valutata la media di almeno tre misurazioni nel periodo di un anno. Come anche per i parametri: PTH, calcio, fosforo, emoglobina, reticolociti e proteina C-reattiva.

I pazienti sono stati sottoposti a Multislice Spiral Computed Tomography (MSCT) per valutare il grado di calcificazioni coronariche. La valutazione è stata effettuata con lo strumento Somatom Sensation 16 Cardiac (Siemens, Forchheim, Germany), mentre il valore di calcium score di ogni paziente è stato determinato usando un software specifico (Syngo Ca-score; Siemens) in accordo con il sistema di Agatston.⁵⁶

Il sangue periferico, per le analisi biochimiche, citometriche, Luminex ed ELISA, dei soggetti partecipanti allo studio è stato prelevato, solo previo espresso consenso informato dell'interessato, prima dell'inizio della sessione dialitica eliminando i primi ml di sangue, per evitare contaminazioni,

prodotte dall'ago, di cellule endoteliali residenti.

Lo studio è stato approvato dal comitato etico locale (S.Orsola-Malpighi, Bologna, Italia numero di protocollo: 053/2010 / O / Oss, data di approvazione:14/9/2010) e i soggetti reclutati allo studio hanno letto e firmato il consenso informato in accordo con la Dichiarazione di Helsinki.

3.2 ANALISI CITOFLUORIMETRICA

L'analisi citofluorimetrica è stata utilizzata per definire e quantificare cellule con fenotipo $CD34^+CD45^-CD133^{\pm}KDR^+VDR^{\pm}$ e $CD34^+CD45^-CD133^{\pm}KDR^+OCN^{\pm}$. Il protocollo usato è stato modificato e migliorato da Cinciolo et al. 2013. Nell'analisi non sono stati usati anticorpi secondari e alla marcatura è stato aggiunto DRAQ-5, intercalante del DNA, in grado di escludere dall'analisi finale sia i detriti che le piastrine giganti (Kraan J et al. 2012).

Circa 40 ml di sangue periferico sono stati prelevati dai pazienti e dai soggetti sani in provette Vacutainer contenenti EDTA. I campioni dei pazienti dializzati sono stati prelevati prima dell'inizio dell'emodialisi per escludere ogni possibile influenza della dialisi sulle cellule. Il sangue è stato diluito con tampone fosfato salino (PBS) 1:2 e successivamente tramite centrifugazione su gradiente di densità in Ficoll Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) sono state isolate le cellule mononucleate del sangue (PBMC). Quest'ultime sono state fissate e permeabilizzate utilizzando Inside Stain Kit (Miltenyi Biotec) seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Questo step è stato fondamentale per consentire l'accesso del anticorpo per il recettore nucleare VDR all'interno della cellula.

Gli anticorpo VDR e OCN erano entrambi marcati con fluoroforo FITC, per tale ragione sono state preparate due sospensioni da 100 μ l contenenti 2×10^6 cellule fissate e permeabilizzate. Una è stata utilizzata per la marcatura per VDR, mentre un'altra è stata impiegata per l'analisi dell'espressione di OCN. Entrambi le sospensioni, sono state incubate per un ora a temperatura ambiente con i seguenti anticorpi: 20 μ l di CD34-PerCP (BD Biosciences), 5 μ l di CD45- PE-Cy7 (BD Biosciences), 20 μ l di CD133-APC (Miltenyi Biotec), 10 μ l di KDR-PE (R&D Systems) e 20 μ l VDR (Biorbyt Limited)/OCN (Biorbyt Limited). Le cellule sono state, in fine, risospese in 1 ml di buffer di lettura e incubate per 30 minuti con 0,5 μ l di DRAQ-5.

Cellule marcate con controlli isotipici e privi di anticorpi sono state usate come controlli negativi di fluorescenza.

Sono stati acquisiti 200.000 eventi per provetta utilizzando un citofluorimetro FACSaria (Becton Dickinson). L'analisi dei dati è stata effettuata tramite il software dedicato, CellQuest (Becton Dickinson).

3.3 TEST ELISA

Il test ELISA è stato effettuato su tutti i campioni di plasma dei pazienti e dei volontari sani arruolati nello studio, per analizzare l'andamento di Klotho. L'analisi è stata effettuata utilizzando il kit ELISA commerciale (Cusabio, Catalog No.: CSB-E13235h), seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

Ogni campione è stato analizzato in triplicato. I risultati, espressi in densità ottica, sono stati interpolati a una curva standard generata a partire da campioni a concentrazione nota (forniti all'interno del kit).

3.4 ANALISI LUMINEX

L'analisi Luminex è stata eseguita su tutti i campioni dei pazienti e dei volontari sani arruolati, per analizzare contemporaneamente molteplici biomarker coinvolti nell'infiammazione, nei processi cardiovascolari e di mineralizzazione. Le analisi sono state effettuate con il sistema Luminex MAGPIX® (Millipore Corp, Billerica, MA), seguendo le istruzioni della ditta produttrice sono stati utilizzati kit commerciali per la quantificazione del: fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)(Milliplex Map Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel, Cat #: HCYTOMAG-60K, Kit lot #: 2439427), osteocalcina (OC), osteoprotegerina (OPG), osteopontina (OPN), Dickkopf-related protein 1 (DKK1), Fibroblast Growth Factor 23 (FGF-23), interleuchina-6 (IL-6), paratormone (PTH) e Tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Milliplex Map Human Bone Magnetic, Cat. #: HBNMAG-51K, Kit lot #: 2439417) e infine fetuina (Milliplex Map Human CVD Panel 3 Magnetic, Cat. #: HCVD3MAG-67K, Kit lot #: 2439420).

Per ogni soggetto sono stati raccolti 2 ml di plasma. Per l'analisi sono state preparate le soluzioni standard per la curva di calibrazione e i controlli di qualità seguendo le istruzioni della ditta produttrice. In piastra da 96 pozzetti sono stati caricati gli standard (7) ottenuti mediante diluizioni seriali, i controlli di qualità, il background, i campioni (diluiti 1:2) e le biglie magnetiche. I kit sono stati incubati overnight, in modo da permettere il legame tra anticorpo e analita di interesse. Dopo aver effettuato 3 lavaggi per eliminare le sostanze non legate, a ciascun pozzetto è stato aggiunto un cocktail anticorpo biotinilato specifico per gli analiti di interesse. In seguito, è stato aggiunto in ogni pozzetto streptavidina-ficoerittrina coniugato (streptavidina-PE), che lega gli anticorpi biotinilati di rilevamento. Un lavaggio finale è stato effettuato per rimuovere streptavidina-PE non legata e le biglie sono state risospese in 100 μ l di soluzione Sheath Fluid. Infine è stata effettuata la lettura delle piastre tramite il sistema Luminex MAGPIX®. L'analisi dei dati è stata effettuata tramite il software dedicato Analyst 5.1 PLUS (Milliplex®).

3.5 ANALISI STATISTICA

I partecipanti allo studio sono stati suddivisi in due gruppi in base al trattamento con agonisti del recettore della vitamina D (VDRAs) e confrontati con controlli sani nei test demografici e di laboratorio con t-test o ANOVA seguita da post-hoc per confronti a coppie, con test di Tamhane per le variabili continue e test del Chi-quadro per le variabili categoriali. E' stata eseguita una trasformazione log dei valori di laboratorio per normalizzare le variabili.

Le analisi di regressione lineare multipla sono state effettuate per analizzare la relazione del CPE con il trattamento, e tutte i markers quantificati.

Tutte le analisi sono state effettuate utilizzando SPSS, versione 20.0.

4. RISULTATI

4.1 CARATTERISTICHE DEI SOGGETTI ARRUOLATI NELLO STUDIO

Le caratteristiche demografiche, cliniche e biochimiche dei pazienti e volontari sani arruolati nello studio sono presentate in tabella 1. Sono stati analizzati 23 casi controllo (A), 35 pazienti in emodialisi e sottoposti a terapia con VDRAs (B), e infine 18 pazienti in emodialisi non sottoposti a terapia con VDRAs (C).

I pazienti arruolati non presentavano patologie cardiache, patologie aterosclerotiche cerebro vascolari e vasculopatie periferiche.

Caratteristiche (media \pm SD)	Pazienti			χ -squared / Kruskal-Wallis : p-value	Post Hoc Comparison Kruskal - Wallis
	Volontari sani (A)	trattati con VDRAs (B)	non trattati VDRAs (C)		
Genere (%femminile)	52.2%	31.4%	38.9%	ns	\
Diabete (% presente)	0.0%	20.0%	33.3%	0.016	A<B,C
Età	37.4 \pm 9.2	60.3 \pm 12.0	62.5 \pm 15.2	<0.001	A<B,C
Età dialitica (mesi)	\	25.9 \pm 33.4	20.5 \pm 20.1	ns	\
Durata CKD (mesi)	\	64.5 \pm 65.1	75.6 \pm 83.0	ns	\
Coronaro_tc	\	411.7 \pm 644.0	1062.3 \pm 1386.8	ns	\
Trattamento con EPO (UI)	\	15222.22 \pm 8556.07	15333.33 \pm 7584.45	ns	\
Hb	14.2 \pm 1.3	10.9 \pm 1.2	10.8 \pm 1.4	<0.001	A>B,C
pCreat	0.8 \pm 0.2	9.8 \pm 3.0	9.1 \pm 3.6	<0.001	A<B,C
HDL	43.6 \pm 8.6	42.9 \pm 14	37.5 \pm 15.1	ns	\
LDL	119.4 \pm 13.9	90 \pm 33.0	82.2 \pm 35.4	<0.001	A>B,C
Ca	9.1 \pm 0.4	8.7 \pm 0.6	8.5 \pm 0.4	<0.001	A>B,C
P	4.6 \pm 0.9	5.5 \pm 1.6	5.2 \pm 1.3	ns	\
albumina	4.7 \pm 0.5	4.1 \pm 0.3	3.7 \pm 0.3	<0.001	A>B>C
FA	107 \pm 16.2	91.6 \pm 68.3	73.9 \pm 37.0	<0.001	A>B,C
ferro	81.4 \pm 36.9	54.7 \pm 21.4	43.3 \pm 24.4	<0.001	B>C
ferritina	143.5 \pm 57.8	216.7 \pm 224.3	320.7 \pm 307.4	ns	\
PTH	47.9 \pm 18.4	314.3 \pm 200.8	157.6 \pm 95.7	<0.001	B>C>A
pcr	0.8 \pm 0.2	0.5 \pm 0.8	1.2 \pm 1.5	<0.001	B<A,C
BAP	14.4 \pm 8.3	20.2 \pm 15.8	14.8 \pm 8.0	ns	\
25OH	46.4 \pm 21.5	17.3 \pm 9.9	18.9 \pm 11.8	<0.001	A>B,C

Tab. 1: caratteristiche demografiche e cliniche dei gruppi in studio

Inoltre, in tabella 2, è rappresentata la media delle ultime tre quantificazioni biochimiche nei pazienti in emodialisi trattati con VDRAs (B) e in pazienti in emodialisi non sottoposti a terapia con VDRAs (C)

al momento del reclutamento allo studio.

Caratteristiche (media \pm SD)	Pazienti		χ -squared / Kruskal- Wallis : p-value	Post Hoc Comparison Kruskal - Wallis
	trattati con VDRAs (B)	non trattati VDRAs (C)		
Ca_M	8.8 \pm 0.6	8.7 \pm 0.6	ns	\
P_M	5.5 \pm 1	5.4 \pm 1.4	ns	\
PTH_M	337.5 \pm 191	189.4 \pm 128.5	0.002	B>C
VitD_M	16.5 \pm 9.5	17.7 \pm 10.9	ns	\
Hb_M	10.7 \pm 1.2	10.9 \pm 1.0	ns	\
Ret_M	1.9 \pm 0.7	2.1 \pm 0.6	ns	\
PCR_M	0.8 \pm 1.0	0.8 \pm 0.5	ns	\

Tab. 2: caratteristiche cliniche dei gruppi in studio

4. 2 EPCs CD133^{+/-}OCN^{+/-}VDR^{+/-} AUMENTANO IN PAZIENTI CON CKD-MBD

Tramite citofluorimetria a flusso sono stati quantificati i progenitori endoteliali a fenotipo CD133^{+/-}CD34⁺CD45⁺KDR⁺OCN^{+/-} e VDR^{+/-}, nei soggetti sani, nei pazienti in trattamento sostitutivo emodialitico. I risultati sono riportati in medie con relative deviazioni standard, la significatività sono state calcolate tramite test non parametrico Kruskal-Wallis.

Nei pazienti in trattamento sostitutivo emodialitico il numero di progenitori endoteliali esprimenti CD133 (Fig. 4A) e con fenotipo CD34⁺CD45⁺KDR⁺ non esprimenti OCN è significativamente più alto rispetto ai soggetti sani (20.42 \pm 14.33 vs 12.82 \pm 8.45 p=0.04). Anche progenitori esprimenti OCN sono significativamente maggiori in pazienti in emodialisi rispetto ai soggetti sani (20.23 \pm 14.15 vs 12.57 \pm 8.51 p=0.034).

Progenitori con fenotipo CD133⁻CD34⁺CD45⁻KDR⁺ non esprimenti OCN (Fig. 4B) (21.11 \pm 16.54 vs 12.91 \pm 7.93 p=0.068) sono numericamente maggiori nei pazienti in emodialisi rispetto ai soggetti sani ma non raggiungono la significatività. Mentre progenitori esprimenti OCN sono significativamente maggiori in pazienti in emodialisi rispetto ai soggetti sani (20.32 \pm 16.04 vs 11.70 \pm 7.34 p=0.021).

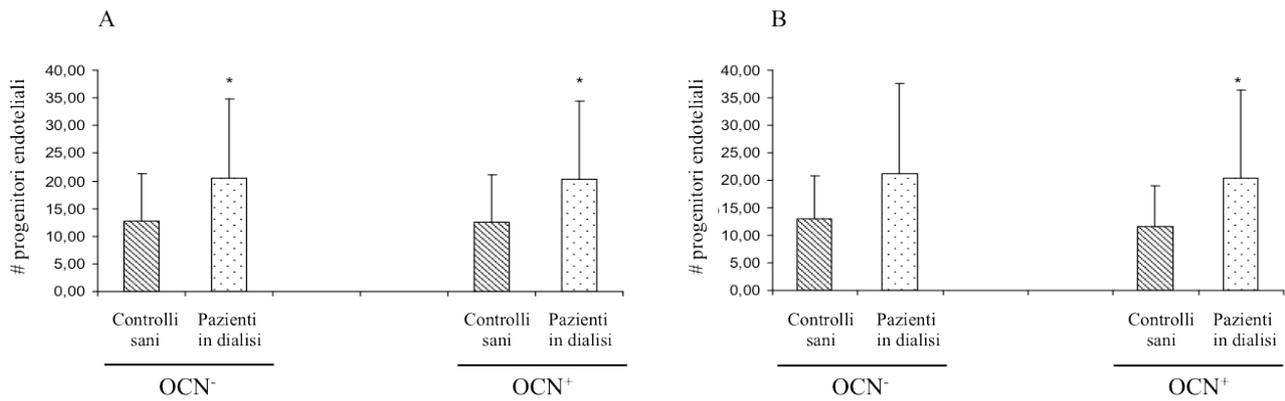


Fig. 4: (A) EPCs precoci con fenotipo CD133⁺CD34⁺CD45⁻KDR⁺ OCN^{+/-}, (B) EPCs tardive con fenotipo CD133⁻CD34⁺CD45⁻KDR⁺ OCN^{+/-}

Sono state quantificate, inoltre, nei soggetti sani e nei pazienti dializzati progenitori marcati con VDR (Fig. 5). Progenitori endoteliali esprimenti CD133 (Fig. 5A), con fenotipo CD34⁺CD45⁻KDR⁺VDR⁻ (21.75 ±15.53 vs 12.8 ±9.2 p=0.017) e quelli CD34⁺CD45⁻KDR⁺VDR⁺ (21.75 ±15.53 vs 12.7 ±9.29 p=0.016), sono significativamente superiori in pazienti in dialisi rispetto ai soggetti sani. Lo stesso andamento è riscontrabile anche per quanto concerne progenitori endoteliali non esprimenti CD133 (Fig. 5B) con fenotipo CD34⁺CD45⁻KDR⁺VDR⁻ (22.23 ±18.26 vs 12.39 ±10.25 p=0.014) ed esprimenti VDR (21.96 ±18.25 vs 11.78 ±9.88 p=0.011).

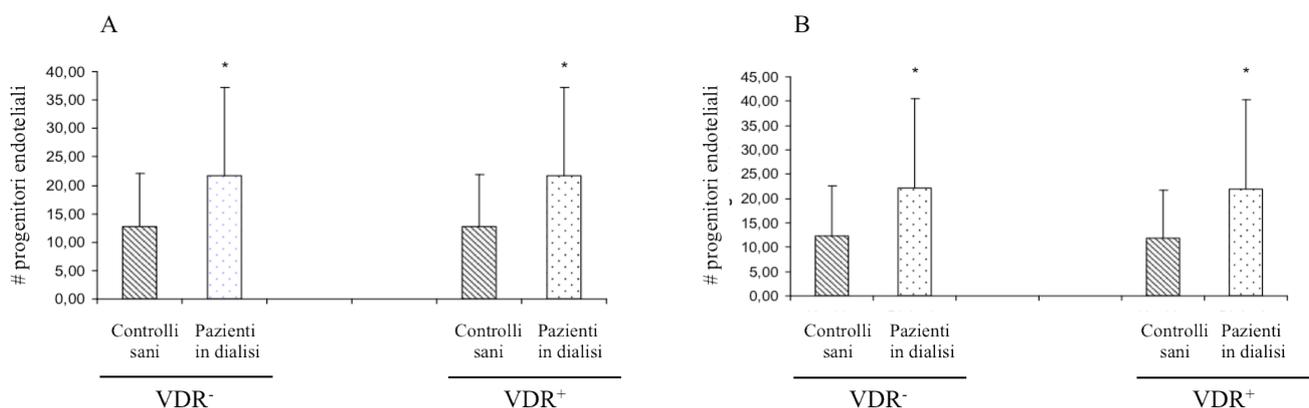


Fig. 5: (A) EPCs precoci con fenotipo CD133⁺CD34⁺CD45⁻KDR⁺ VDR^{+/-}, (B) EPCs tardive con fenotipo CD133⁻CD34⁺CD45⁻KDR⁺ VDR^{+/-}

4. 3 EPCs CD133^{+/-}OCN^{+/-}VDR^{+/-} AUMENTANO IN PAZIENTI TRATTATI CON VDRAs

I pazienti in emodialisi analizzati sono stati suddivisi tra soggetti trattati con attivatori del recettore della vitamina D (VDRAs): calcitriolo o paracalcitriolo, e pazienti che non ricevevano tale terapia. Questo per valutare l'influenza della terapia sul numero dei progenitori endoteliali circolanti. In figura (**Fig. A e B**) sono mostrati progenitori endoteliali precoci esprimenti CD133. I progenitori endoteliali a fenotipo CD34⁺CD45⁻KDR⁺OCN⁻ sono significativamente superiori nei pazienti che ricevevano terapia VDRAs rispetto ai soggetti sani (23.1 ±15.22 vs 12.83 ±8.45 p=0.014). Per quanto riguarda progenitori con fenotipo CD34⁺CD45⁻KDR⁺OCN⁺, questi sono significativamente superiori nei pazienti che ricevevano terapia VDRAs rispetto ai soggetti sani (22.8 ±15 vs 12.57 ±8.51 p=0.012). A destra della figura (**Fig. 6B**) sono rappresentati progenitori endoteliali marcati con VDR. Cellule a fenotipo CD133⁺CD34⁺CD45⁻KDR⁺VDR⁻ risultano significativamente superiori nei pazienti che ricevevano terapia VDRAs rispetto ai soggetti sani (25.38 ±15 vs 12.78 ±9.22 p=0.0024), mentre non vi sono differenze tra i pazienti non trattati con VDRAs (12.42 ±6.34) e i soggetti sani. Per quanto riguarda progenitori con fenotipo CD133⁺CD34⁺CD45⁻KDR⁺VDR⁺, questi sono significativamente superiori nei pazienti che ricevevano terapia VDRAs rispetto ai soggetti sani (25.38 ±15 vs 12.70 ±9.29 p=0.0023), mentre non vi sono differenze tra i pazienti non trattati con VDRAs (12.42 ±6.34) e i soggetti sani.

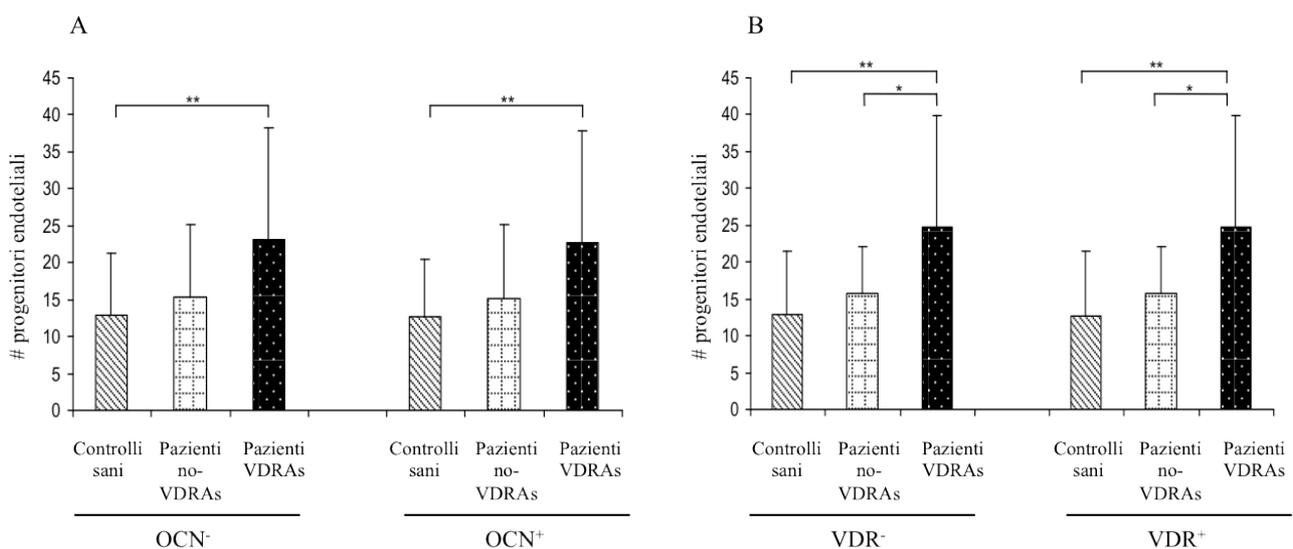


Fig. 6: (A) EPCs precoci con fenotipo CD133⁺CD34⁺CD45⁻KDR⁺ OCN^{+/-}, (B) EPCs precoci con fenotipo CD133⁺CD34⁺CD45⁻KDR⁺ VDR^{+/-}

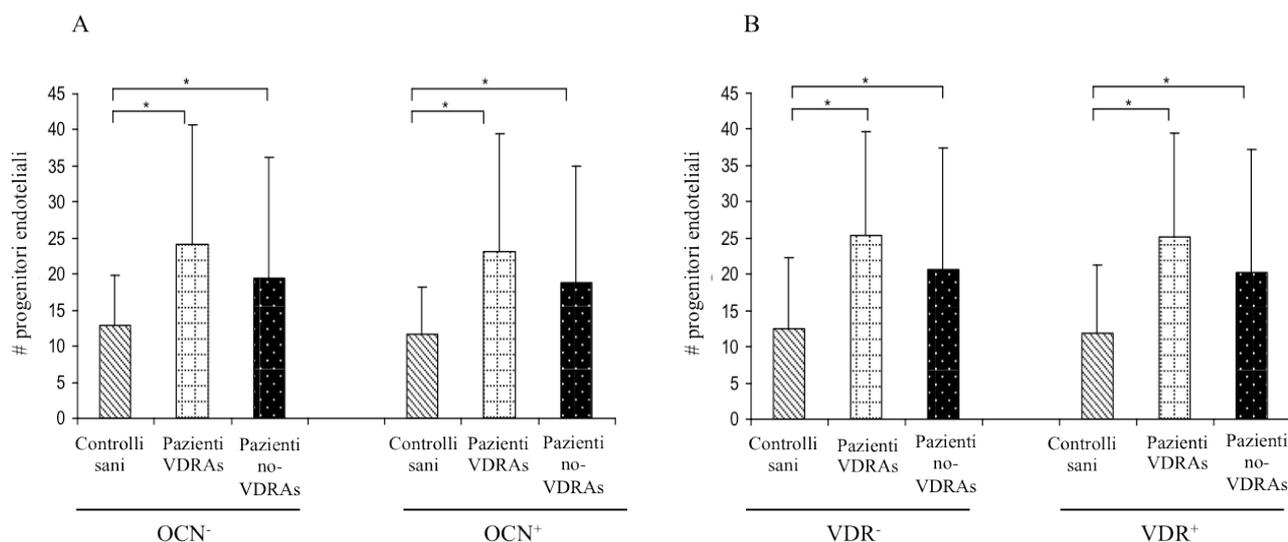


Fig. 7: (A) EPCs tardive con fenotipo CD133⁻CD34⁺CD45⁻KDR⁺ OCN^{-/+}, **(B)** EPCs tardive con fenotipo CD133⁻CD34⁺CD45⁻KDR⁺ VDR^{-/+}

In figura 7 sono mostrati progenitori endoteliali non esprimenti il marker CD133. Progenitori endoteliali a fenotipo CD34⁺CD45⁻KDR⁺OCN⁻ sono significativamente superiori nei pazienti che ricevevano terapia VDRAs rispetto ai soggetti sani (24.28 ±16.79 vs 12.91 ±7.93 p=0.028). Anche i pazienti che non ricevono terapia con VDRAs hanno un numero statisticamente superiore di progenitori endoteliali rispetto ai soggetti sani (20.66 ±16.44 vs 12.91 ±7.93 p=0.050) (**Fig. 7A** sinistra).

Per quanto riguarda progenitori endoteliali con fenotipo CD34⁺CD45⁻KDR⁺OCN⁺, questi sono significativamente superiori nei pazienti che ricevevano terapia VDRAs rispetto ai soggetti sani (21.1 ±16.04 vs 11.70 ±7.34 p=0.015). Anche i pazienti che non ricevono terapia con VDRAs hanno un numero statisticamente superiore di progenitori endoteliali rispetto ai soggetti sani (19.6 ±16.33 vs 11.70 ±7.34 p=0.049) (**Fig. 7A**, destra).

In figura 7B sono rappresentati progenitori endoteliali marcati per VDR (**Fig. 7B**). Cellule a fenotipo CD133⁻CD34⁺CD45⁻KDR⁺VDR⁻ risultano significativamente superiori nei pazienti che ricevevano terapia VDRAs rispetto ai soggetti sani (25.67 ±16.86 vs 12.39 ±10.25 p=0.016). Tendono alla significatività nei pazienti che non ricevono VDRAs rispetto ai soggetti sani (18.28 ±14.38 vs 12.39 ±10.25 p=0.058). Per quanto riguarda progenitori a fenotipo CD133⁻CD34⁺CD45⁻KDR⁺VDR⁺, questi sono significativamente superiori nei pazienti che ricevevano terapia VDRAs rispetto ai soggetti sani (22.4 ±16.85 vs 11.78 ±9.88 p=0.012). Anche i pazienti che non ricevono terapia con VDRAs hanno un numero statisticamente superiore di progenitori endoteliali rispetto ai soggetti sani (18 ±14.28 vs 11.78 ±9.88 p=0.048).

Per tutte le popolazioni analizzate di progenitori endoteliali non vi sono differenze tra pazienti trattamenti con paracalcitriolo e calcitriolo, ma risultano numericamente simili.

4.4 IN EPCs CD133^{+/-} L'ESPRESSIONE DI VDR CORRELA CON QUELLA DELL'OCN

Tramite analisi cifluorimetrica non poteva essere valutata la contemporanea espressione di OCN e VDR, in quanto i due anticorpi disponibili sono marcati con lo stesso fluoroforo FITC. Per tali ragioni sono stati interpolati gli eventi citofluorimetrici positivi per i progenitori endoteliali a fenotipo CD133^{+/-}CD34⁺CD45⁻KDR⁺OCN⁺ e CD133^{+/-}CD34⁺CD45⁻KDR⁺VDR⁺ tramite analisi di regressione lineare.

In figura 4 sono mostati gli scatterplot di progenitori endoteliali precoci esprimenti CD133. Nella popolazione l'espressione dei markers risulta correlare positivamente per i controlli sani (**Fig. 8A**)($R^2=0,694$), per i pazienti che ricevono terapia con VDRA (Fig. 8B) ($R^2=0,623$) e per i pazienti non trattati con VDRA (Fig. 8C) ($R^2=0,708$). In quest'ultima popolazione la correlazione risulta più marcata.

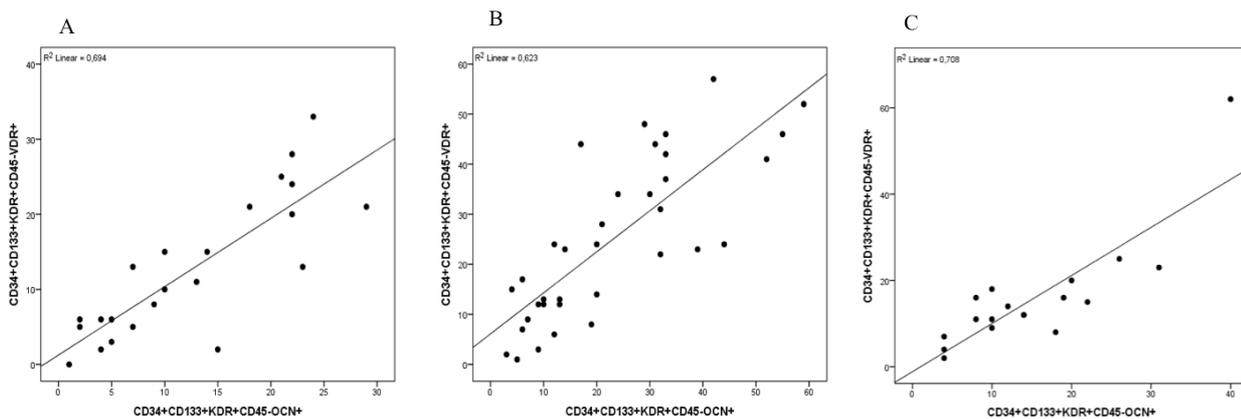


Fig. 8: regressione lineare per EPCs precoci CD34⁺CD133⁺KDR⁺CD45⁻OCN⁺ / VDR⁺ (A) in controlli sani ($R^2=0,694$), (B) in pazienti in emodialisi trattati con VDRA ($R^2=0,623$) e (C) in pazienti in emodialisi non trattati con VDRA ($R^2=0,708$).

In figura 9 sono mostati gli scatterplot di progenitori endoteliali tardivi non esprimenti CD133. Nella popolazione l'espressione dei markers risulta correlare positivamente per i controlli sani (**Fig. 9A**)($R^2=0,413$), per i pazienti che ricevono terapia con VDRA (Fig. 9B) ($R^2=0,732$) e per i pazienti non trattati con VDRA (Fig. 9C) ($R^2=0,810$). In quest'ultima popolazione la correlazione risulta più marcata.

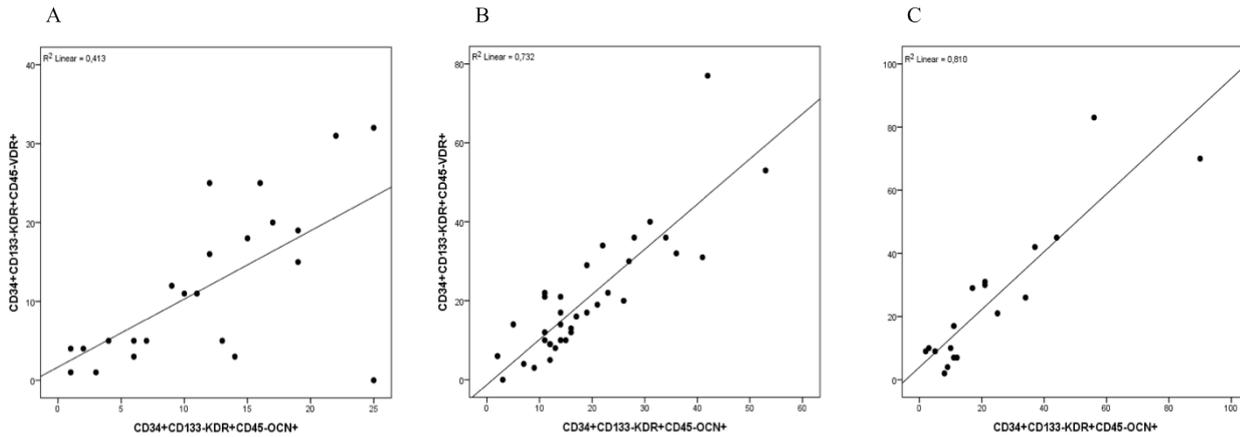


Fig. 9: regressione lineare per EPCs tardivi $CD34^+CD133^+KDR^+CD45^-OCN^+ / VDR^+$ (A) in controlli sani ($R^2=0,413$), (B) in pazienti in emodialisi trattati con VDRAs ($R^2=0,732$) e (C) in pazienti in emodialisi non trattati con VDRAs ($R^2=0,810$).

Per tutte le popolazioni analizzate di progenitori endoteliali non vi sono differenze nelle correlazioni tra pazienti trattati con paracalcitriolo e calcitriolo, ma risultano simili.

4.5 IL MICROAMBIENTE SIERICO NON CAMBIA IN PAZIENTI TRATTATI E NON TRATTATI CON VDRAs

Il microambiente sierico dei soggetti reclutati nello studio è stato valutato tramite analisi luminex, nei controlli sani, nei pazienti in emodialisi trattati con VDRAs e in pazienti in emodialisi non trattati con VDRAs. I risultati sono medie in pg/ml in scala logaritmica con relative deviazioni standard, la significatività è stata calcolata tramite test non parametrico Kruskal-Wallis.

Nei pazienti in emodialisi non trattati con VDRAs e trattati con VDRAs sono emersi valori statisticamente superiori, rispetto ai soggetti sani, per quanto concerne i seguenti parametri: DKK-1 (2.7 ± 0.2 vs 2.6 ± 0.2 vs 2.2 ± 0.2 $p < 0.001$), IL-6 (0.4 ± 0.3 vs 0.5 ± 0.3 vs 0.2 ± 0.1 $p < 0.001$), TNF- (0.7 ± 0.1 vs 0.7 ± 0.1 vs 0.3 ± 0.1 $p < 0.001$), OPG (2.7 ± 0.2 vs 2.7 ± 0.2 vs 2.2 ± 0.1 $p < 0.001$), OCN (3.9 ± 0.3 vs 4.1 ± 0.3 vs 3.5 ± 0.2 $p < 0.001$), OPN (4.1 ± 0.4 vs 4.3 ± 0.3 vs 3.5 ± 0.4 $p < 0.001$), PTH (2.1 ± 0.2 vs 2.2 ± 0.2 vs 1.7 ± 0.2 $p < 0.001$), FGF-23 (2.9 ± 0.7 vs 3.1 ± 0.7 vs 1.4 ± 0.3 $p < 0.001$) (Fig. 10).

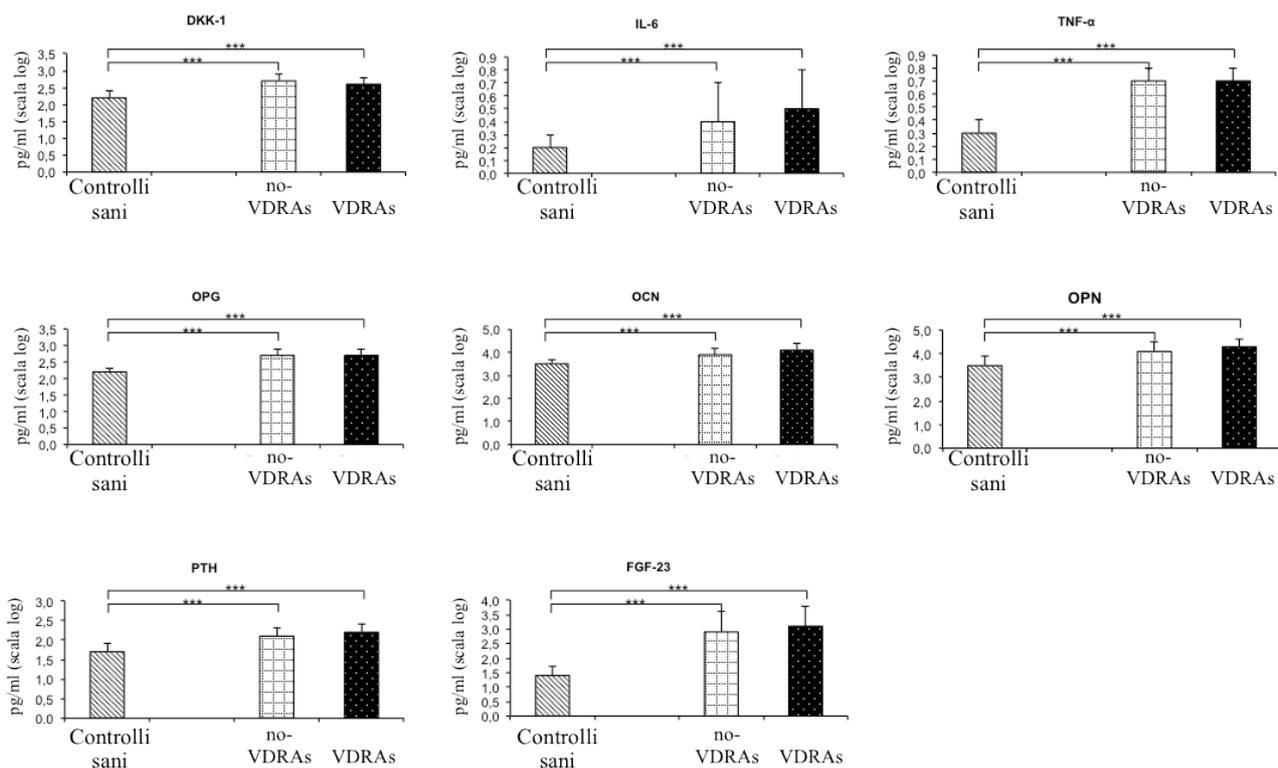


Fig. 10: quantificazione luminex di: DKK1, IL-6, TNF- α , OPG, OCN, OPN, PTH e FGF23

Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative, tra pazienti in emodialisi non trattati con VDRAs, trattati con VDRAs e soggetti sani, per VEGF (2.5 ± 0.6 vs 2.4 ± 0.6 vs 2.8 ± 0.8 p=ns) e per Fetuin A (1.7 ± 0.1 vs 1.7 ± 0.3 vs 1.8 ± 0.2 p=ns) (**Fig. 11**).

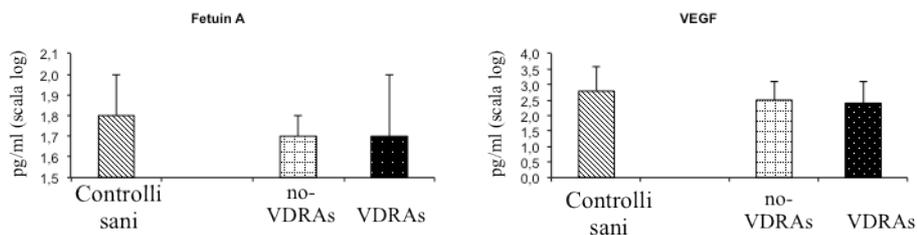


Fig. 11: quantificazione luminex di: Fetuina A e VEGF

Infine, è stato quantificato tramite test ELISA il marker Klotho. Quest'ultimo, nei pazienti in emodialisi non trattati con VDRAs e trattati con VDRAs è statisticamente superiore, rispetto ai soggetti sani (0.3 ± 0.1 vs 0.3 ± 0.1 vs 0.1 ± 0.1 $p < 0.001$) (**Fig. 12**).

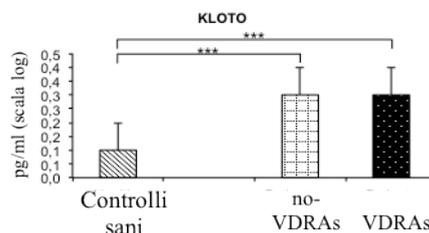


Fig. 10: quantificazione ELISA di KLOTO

4.6 EPCs CD133^{+/-}OCN^{+/-}VDR^{+/-} CORRELANO CON L'ANDAMENTO DI CALCIO SIERICO, RETICOLOCITI, DKK1, OPN, VITAMINA D E IL-6 NEI PAZIENTI TRATTATI E NON CON VDRAs

Sono stati correlati tramite analisi univariata i parametri biochimici, i parametri ottenuti tramite Luminex e test ELISA con l'andamento dei progenitori endoteliali quantificati nei volontari sani arruolati nello studio, nei pazienti in emodialisi non trattati con VDRAs e nei pazienti in emodialisi trattati con VDRAs.

Nei soggetti sani non è risultata nessuna correlazione significativa.

Nei pazienti non sottoposti a terapia con VDRAs, progenitori endoteliali a fenotipo CD133⁺CD34⁺CD45⁻KDR⁺OCN^{+/-} correlano positivamente con il valore medio del calcio sierico (0.473 $p=0.047$ per EPCsOCN⁻, 0.474 $p=0.047$ per EPCsOCN⁺) e con il valore medio dei reticolociti (0.619 $p=0.006$ per EPCsOCN⁻, 0.608 $p=0.007$ per EPCsOCN⁺), mentre correlano negativamente con l'andamento di DKK-1 (-0.657 $p=0.03$ per EPCsOCN⁻, -0.649 $p=0.004$ per EPCsOCN⁺). Inoltre, progenitori endoteliali a fenotipo CD133⁻CD34⁺CD45⁻KDR⁺VDR^{+/-} correlano inversamente con l'andamento di OPN (-0.590 $p=0.010$ per EPCsVDR⁻, -0.554 $p=0.017$ per EPCsVDR⁺).

Nei pazienti in emodialisi trattati con VDRAs, progenitori entoteliali a fenotipo CD133⁻CD34⁺CD45⁻KDR⁺OCN⁺ (0.333 $p=0.050$) correlano positivamente con l'andamento del valore medio della vitamina D sierica. Infine progenitori endoteliali a fenotipo CD133⁺CD34⁺CD45⁻KDR⁺VDR^{+/-} correlano positivamente con l'espressione di IL-6 (0.381 $p=0.024$ per EPCsVDR⁻, 0.381 $p=0.024$ per EPCsVDR⁺).

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Rispetto alla popolazione generale, i pazienti con insufficienza renale cronica presentano una riduzione del numero e una alterata funzione di EPCs in circolazione (Krieter DH et al., 2010), queste anomalie peggiorano con l'avanzare della CKD (Krenning G, 2009). In questi pazienti, l'inizio del trattamento emosostitutivo aumenta il numero di EPCs circolanti (De Groot K et al., 2004) ed una dose dialitica più alta ne incrementa il numero e la funzionalità (Choi JH et al., 2004). Infatti, gli studi condotti fino ad ora sui diversi fenotipi e sui i fattori che influenzano la sopravvivenza in circolo delle EPCs in pazienti in emodialisi si sono concentrati soprattutto sul possibile effetto delle tossine uremiche, modalità e tecnica di dialisi (Jourde-Chiche N. et al., 2009). I risultati ottenuti fino a questo momento sulle variazioni quantitative dei progenitori endoteliali in pazienti con CKD non sono univoci, due lavori ne descrivono un lieve aumento o simili livelli in pazienti uremici, rispetto ai pazienti con funzione renale normale (Herbrig K et al., 2004 e Steiner et al., 2005).

Il primo risultato importante di questo studio supporta l'incremento di EPCs tardive e precoci, esprimenti e non OCN e VDR, in pazienti in emodialisi rispetto a soggetti sani.

Anche con i limiti della natura di cross-sectional del nostro studio, questi risultati, differenti da quelli pubblicati precedentemente, che descrivevano un numero ridotto di EPCs, potrebbero trovare una nuova e diversa interpretazione, alla luce delle recenti scoperte circa i meccanismi coinvolti nel rilascio midollare di HSCs (cellule staminali emapoietiche) (Morrison SJ, 2014).

All'interno del midollo osseo sono state identificate specifiche nicchie o microambienti tissutali locali che mantengono e regolano le HSCs. La nicchia si divide in due zone distinte, ma ugualmente connesse: la prima nella quale è presente l'osteoblasto a svolgere un ruolo primario (nicchia osteoblastica); la seconda dove invece predominano le cellule endoteliali, denominata perciò nicchia vascolare (Morrison SJ, 4014 e Lo Celso, 2009). In condizioni normali e patologiche c'è il rilascio continuo dal midollo osseo verso il circolo sanguigno di HSCs, comprese le cellule che differenzieranno in epitelio: questo processo viene chiamato mobilitazione (Brunner et al. 2008). La mobilitazione delle cellule dalle nicchie alla periferia e verso tessuti periferici prende il nome di homing. Mobilitazione e homing sono finemente regolati da interazioni specifiche tra diverse citochine (G-CSF, eritropoietina), fattori di crescita e ormoni. L'interazione tra SDF-1/CXCL12 e il suo recettore CXCR4 è il meccanismo più importante coinvolto per mantenere HSCs all'interno del midollo osseo e per la mobilitazione di HSC/EPCs (Huber et al., 2014).

Calvi et al. hanno dimostrato che all'interno della nicchia, le cellule osteoblastiche regolano il rinnovo di HSC in quanto esprimono livelli moderati di CXCL12 trattenendo HSC in uno stato di quiescenza. In altre parole, qualsiasi fattore in grado di ridurre gli osteoblasti o l'espressione di CXCL12 provoca una tras migrazione delle cellule staminali ematopoietiche e di linee cellulari derivanti verso la

circolazione periferica (Calvi et al., 2003).

Oltre al suo ruolo fisiologico nel rimodellamento osseo, il PTH modula l'espansione di HSCs nelle nicchia midollari interagendo con i suoi recettori osteoblastici. Ciò provoca un aumento dell'espressione di Notch ligando di Jagged1, che a sua volta può interagire con i recettori su HSCs, e aumentare l'espressione di citochine (IL-6 e IL-11). Inoltre, il PTH, attraverso il rilascio endogeno di G-CSF, stimola la mobilitazione e l'homing di HSCs dovuto alla modulazione dell'asse SDF-1/CXCR4 (Huber et al., 2014).

Nel nostro studio, sia i pazienti trattati che non trattati con VDRA presentano una maggiore espressione di tutti i fattori potenzialmente in grado di indurre la migrazione di HSCs/EPCs dal midollo osseo: IL-6, PTH e rhEPO.

Nei pazienti trattati con VDRA l'espressione di IL-6 è significativamente associata con un elevato numero di cellule $CD34^+CD133^+CD45^-KDR^+$, esprimenti e non VDR. Tale aumento potrebbe essere mediato dal PTH i cui livelli sono più alti in questo sottogruppo di pazienti.

Un ulteriore fattore in grado di indurre un aumento in circolo di EPCs potrebbe essere l'attivazione di VDR. Yiu et al. hanno dimostrato che la carenza di vitamina D è associata in modo indipendente con la deplezione di EPCs a fenotipo $CD34^+CD133^+KDR^+$ in pazienti con diabete di tipo 2 (Yiu YF et al., 2011). Inoltre il trattamento con VDRA in colture cellulari porta ad un aumento del numero delle colonie attraverso la modulazione positiva dell'espressione di geni protettivi e di crescita endoteliale (Cianciolo et al., 2011).

Un altro fattore che potrebbe portare ad un aumento delle EPCs circolanti è la disfunzione endoteliale. La disfunzione endoteliale anormale è certamente presente in fase avanzata in pazienti CKD in emodialisi (Moody et al., 2012). Guven et al. suggeriscono che il numero di EPCs potrebbe riflettere la gravità del danno endoteliale e potrebbe essere considerato l'espressione di un continuo processo di riparazione del danno endoteliale e il ripristino della funzione endoteliale (Güven H et al., 2006).

Un ulteriore risultato documentato in questo studio è stato un significativo maggior numero di precursori endoteliali con fenotipo $CD34^+KDR^+CD133^-CD45^-$ esprimenti OCN, sia nei pazienti trattati o non trattati con VDRA rispetto ai controlli sani. In pazienti trattati con VDRA il numero di progenitori $CD34^+KDR^+CD133^-CD45^-$ OCN⁺ è significativamente associato con i livelli di 25OH sierici. Inoltre, pazienti trattati con VDRA mostrano un numero più elevato di precursori con fenotipo $CD34^+CD133^+KDR^+CD45^-$ ed esprimenti OCN.

L'OCN è una piccola proteina con l'elevata affinità dei residui gamma-glutammici per l'idrossiapatite e studi di delezione genica fanno ipotizzare un suo coinvolgimento nel processo di mineralizzazione dell'osso. Infatti l'OCN di nuova sintesi viene rilasciata dalla cellula in minima parte nel circolo sanguigno mentre, in maggior quantità, viene incorporata nella matrice ossea,

rappresentando circa il 15% delle proteine non-collageniche dell'osso. In seguito al riassorbimento osseo viene liberata nel torrente ematico. Interagendo con proteine e recettori di superficie cellulare l'OCN gioca un ruolo attivo nell'organizzazione della matrice extracellulare, tuttavia, sebbene conosciuta da più di venti anni, ancora oggi il suo esatto ruolo è da definire (Jiang D et al., 2004).

L'OCN è prodotta ed espressa dalle cellule osteoblastiche e dalle cellule circolanti osteoprogenitrici (cellule ematopoietiche e di origine mesenchimale), la sua espressione è regolata da una serie di ormoni e fattori di crescita calcitropici, compresa la vitamina D3 1,25-diidrossi, il PTH, le proteine morfogenetiche ossee, il fattore di necrosi tumorale e il fattore di crescita trasformante beta (Jiang D et al., 2004)

Eghbali-Fatourehchi et al. hanno dimostrato che l' OCN è espressa anche su cellule progenitrici circolanti CD34⁺ (Eghbali-Fatourehchi GZ et al., 2007). Cellule CD34⁺ e CD133⁺ sono in grado di differenziarsi in vitro in osteoblasti, in cellule ematopoietiche ed endoteliali, suggerendo così un certo grado di sovrapposizione tra cellule esprimenti marcatori osteoblastici e cellule appartenenti alla linea endoteliale/ematopoietica. Questa tesi è confermata anche dai nostri risultati di correlazione tra l'espressione contemporanea di OCN e VDR in EPCs. D'altra parte, durante il rimodellamento osseo, è essenziale garantire un adeguato apporto di sangue essenziale per la crescita ossea e la guarigione delle fratture (Tondreau T et al., 2005).

Di conseguenza, nei pazienti trattati con VDRAs, un elevato numero di EPCs con un fenotipo CD34⁺ CD133⁻KDR⁺CD45⁻ ed esprimenti OCN potrebbe essere correlato a un effetto combinato del 25OH, dalla terapia VDRAs e, non da ultimo, dal PTH, i cui valori, sono più alti in questo sottogruppo di pazienti. Considerando il carattere di cross sectional dello studio è possibile che l'effetto del PTH sull'espressione di OCN su tali precursori sia contenuto dal trattamento con VDRAs.

La mobilizzazione dal midollo osseo delle EPCs è anche regolata dell' rhEPO. L'EPO induce la proliferazione, la differenziazione e l'adesione delle EPCs. Nello studio non sono state descritte differenze significative nella dose di rhEPO tra i due gruppi di pazienti in emodialisi. Tuttavia, un possibile, ma non specifico effetto dell' rhEPO è indirettamente confermata in pazienti non trattati con VDRAs, dalla significativa e diretta associazione di CD34⁺CD133⁺KDR⁺CD45⁻ (esprimenti o meno OCN) con i reticolociti. Questo risultato differisce dello studio di Schlieper et al, in cui l'ematocrito e reticolociti erano negativamente predittori del numero di EPCs (Schlieper G et al., 2008).

Nei pazienti uremici vi è un aumentato numero di progenitori esprimenti OCN, rispetto ai soggetti sani. In particolar modo, nei pazienti trattati con VDRAs, EPCs con fenotipo CD34⁺KDR⁺CD133⁻CD45⁻ sono numericamente maggiori rispetto ai pazienti trattati con VDRAs, ciò rende plausibile la possibilità che l'aumento, di EPCs a fenotipo osteogenico, sia associato all'ambiente uremico stesso e anche al trattamento.

La concentrazione di cellule OCN positive in soggetti sani aumenta con l'età. La sindrome uremica è il prototipo di invecchiamento precoce. I fattori causali sono: ritenzione di fosfato, diminuzione dell'espressione di Klotho a livello ematico e accumulo di tossine uremiche che promuovono lo stress ossidativo e l'infiammazione, che attraverso l'accorciamento dei telomeri, e il danno al DNA mitocondriale può causare senescenza cellulare e riduzione delle cellule staminali. Questi fattori a loro volta possono favorire malattie vascolari e invecchiamento precoce (Stenvinkel P et al., 2003). L'aumento di EPCs esprementi OCN potrebbe rappresentare un'altra manifestazione dell' uremia e dell' invecchiamento precoce.

Lo studio di EPCs con fenotipo osteogenico in pazienti emodializzati risulta importante, se si considera che diversi studi preclinici indicano la presenza di EPCs in siti di danno vascolare e che l'espressione OCN su EPCs circolanti è significativamente associato con disordini cardiovascolari, diabete e calcificazione valvolari. Tali comorbidità, sono spesso presenti nei pazienti con CKD.

In teoria, questo shift fenotipico pro-calcifico dei progenitori endoteliali, indipendentemente dai possibili fattori scatenanti, ha il potenziale per fornire uno stimolo alla calcificazione vascolare tramite cellule che naturalmente sono responsabili della riparazione endoteliale e vascolare, attraverso l'adesione al vaso.

Le nostri dati suggeriscono che i disordini minerali e la carenze di vitamina D possono essere associate ad alcuni effetti avversi nei pazienti con insufficienza renale cronica.

Il ruolo della carenza di vitamina D nella malattia cardiovascolare è un campo relativamente nuovo e negli ultimi anni, molti studi hanno documentato gli effetti regolatori della vitamina D per quanto riguarda i vari fattori di rischio cardiovascolare come il diabete mellito, il sistema renina-angiotensina, oltre ad un effetto protettivo nei confronti delle calcificazioni vascolari. Di contro, un sovradosaggio della vitamina D potrebbe indurre ipercalcemia, iperfosfatemia ed aumento del fattore di crescita dei fibroblasti 23. La terapia di vitamina D limitata evidenza per quanto riguarda attualmente impedisce raccomandazioni generali per l'applicazione di vitamina D.

Il nostro studio ha diverse limitazioni, tra cui il numero relativamente ridotto di pazienti studiati e la natura cross-sectional dei dati che non ci permettono di trarre conclusioni definitive rispetto alla causalità o variazioni delle variabili considerate nel corso del tempo.

Nonostante questi limiti, il nostro studio ci ha permesso di identificare un fenotipo osteogenico di precursori endoteliali, naturalmente presente in individui sani ma che in condizioni patologiche diventa un altro potenziale attore nella progressione fisiopatologia della calcificazione vascolare.

6. BIBLIOGRAFIA

- Aarif Y. Khakoo and Toren Finkel “Progenitor Endothelial Cells” *Annu. Rev. Med.* 2005. 56:79–101
- Adeney KL, Siscovick AS, Ix JH, et al. Association of serum phosphate with vascular and valvular calcification in moderate CKD. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 381-7.
- Asahara T, Kawamoto A, Masuda H. Concise review: circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells.* 2011;29(11):1650–5.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85(3): 221–228.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275(5302):964–7
- Balaji S., King A., Crombleholme T.M and Keswani S.G. *The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing*, 2013.
- Bernheim J. and Benchetri S. The potential roles of FGF23 and Klotho in the prognosis of renal and
- Bhaskar A, Gupta R, Kumar L, Sharma A, Sharma MC, Kalaivani M, et al. Circulating endothelial progenitor cells as potential prognostic biomarker in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* 2012;53(4):635–40.
- Briguori C, Testa U, Riccioni R, Colombo A, Petrucci E, Condorelli G, Mariani G, D’Andrea D, De Micco F, Rivera NV, Puca AA, Peschle C, Condorelli G. Correlations between progression of coronary artery disease and circulating endothelial progenitor cells. *FASEB J* 2010; 24: 1981-1988 [PMID: 20056714 DOI: 10.1096/fj.09-138198]
- Brunner M, Thurnher D, Heiduschka G, Grasl M, Brostjan C, Erovic BM. Elevated levels of circulating endothelial progenitor cells in head and neck cancer patients. *J Surg Oncol.* 2008;98(7):545–50. cardiovascular diseases. *Nephrol Dial Transplant* (2011) 26: 2433–2438
- Brunner S, Zaruba MM, Huber B, David R, Vallaster M, Assmann G, et al. Parathyroid hormone

effectively induces mobilization of progenitor cells without depletion of bone marrow. *Exp Hematol.* 2008 Sep;36(9):1157-66.

- Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003;425: 841-6.
- Carmeliet P. “Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis.” *Nature*, 2000 Sep 14;407(6801):249-57
- Ceradini DJ, Kulkarni A.R, Callaghan M.J, Tepper O.M, Bastidas N, Kleinman M.E, Capla J.M, Galiano R.D, Levine J.P & Geoffrey C Gurtne G.C Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1 *Nature Medicine* 10, 858 - 864 (2004)
- Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, Sasaki K, Kaiser R, El Makhfi N, Urbich C, Peters T, Scharffetter-Kochanek K, Zeiher AM, Chavakis T, Dimmeler S. “Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells”, *J Exp Med*, Vol. 201, no. 1, 2005, pp. 63-72.
- Chen JZ, et al: Effects of homocysteine on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36: 233–239
- Chen NX, O’Neill KD, Duan D, Moe SM. Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 2002; 62: 1724-31.
- Choi JH, Kim KL, Huh W, Kim B, Byun J, Suh W, et al. Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Jul;24(7):1246-52.
- Corsini E, Ciusani E, Gaviani P, Silvani A, Canazza A, Bernardi G, et al. Decrease in circulating endothelial progenitor cells in treated glioma patients. *J Neurooncol.* 2012;108(1):123–9.
- Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. “Endothelial cells and VEGF in vascular development”, *Nature*, Vol. 438, no. 7070, 2005, pp. 937-45].
- Cozzolino M, Brancaccio D, Gallieni M, Slatopolsky E. Pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2005; 68: 429-36.
- Cozzolino M, Staniforth ME, Liapis H, et al. Sevelamer hydrochloride attenuates kidney and cardiovascular calcifications in long-term experimental uremia. *Kidney Int* 2003; 64: 1653-61.
- Cubbon RM, Kahn MB and Wheatcroft SB Effects of insulin resistance on endothelial Progenitor

cells and vascular repair *Clinical Science* (2009) 117, 173–190

- Davies MR, Lund RJ, Mathew S, Hruska KA. Low turnover osteodystrophy and vascular calcification are amenable to skeletal anabolism in an animal model of chronic kidney disease and the metabolic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16:917–928
- De Groot K, Bahlmann FH, Sowa J, Koenig J, Menne J, Haller H, Fliser D. Progenitor cell deficiency. *Kidney Int.* 2004; 66: 641–6.
- De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Chuah MK et al. Phenotypic correction of von Willebrand disease type 3 blood-derived endothelial cells with lentiviral vectors expressing von Willebrand factor. *Blood* 2006;107:4728–4736.
- Delva P, De Marchi S, Prior M, Degan M, Lechi A, Trettene M, Arosio E. Endothelial progenitor cells in patients with severe peripheral arterial disease. *Endothelium* 2008; 15: 246-253 [PMID: 19065316 DOI: 10.1080/10623320802487718]
- Dzau VJ, Gneccchi M, Pachori AS, Morello F, Melo LG. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. *Hypertension* 2005; 46: 7-18
- Eghbali-Fatourehchi GZ, Mödder UI, Charatcharoenwiththaya N, Sanyal A, Undale AH, Clowes JA, et al. Characterization of circulating osteoblast lineage cells in humans. *Bone.* 2007 May;40(5):1370-7.
- Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 2009;45(2):228–47.
- Eizawa T, et al: Circulating endothelial progenitor cells are reduced in hemodialysis patients. *Curr Med Res Opin* 2003; 19: 627– 633
- Eizawa T, Ikeda U, Murakami Y, Matsui K, Yoshioka T, Takahashi M, Muroi K, Shimada K. Decrease in circulating endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. *Heart* 2004; 90: 685-686
- Fadini GP (2008) An underlying principle for the study of circulating progenitor cells in diabetes and its complications. *Diabetologia* 51:1091–1094
- Fadini GP & Avogaro A. Potential manipulation of endothelial progenitor cells in diabetes and its complications *Diabetes, Obesity and Metabolism* 12: 570–583, 2010

- Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S.: Critical Reevaluation of Endothelial Progenitor Cell Phenotype for Therapeutic and Diagnostic Use. *Circulation research*, 2012; 110:624-637.
- Fadini GP, Sartore S, Albiero M, Baesso I, Murphy E, Menegolo M, Grego F, Vigili de Kreutzenberg S, Tiengo A, Agostini C, Avogaro A. Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2140-2146
- Fadini GP, Sartore S, Baesso I, Lenzi M, Agostini C, Tiengo A, Avogaro A. Endothelial progenitor cells and the diabetic paradox. *Diabetes Care* 2006; 29: 714-716
- Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992;267(16): 10931–4.
- Fujii H, et al: C-reactive protein alters antioxidant defenses and promotes apoptosis in endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2476–2482
- Fukagawa M., Hamada Y., Nakanishi S, Tanaka M. The kidney and bone metabolism: Nephrologists' point of view *J Bone Miner Metab* (2006) 24:434–438
- Ganesh SK, Hulbert-Shearon t, Port FK, Eagle K and Stack AG. Mortality differences by dialysis modality among incident ESRD patients with and without coronary artery disease. *J AM Soc Nephrol* 2003, 14: 415-424.
- Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K, Mittal V. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science*. 2008;319(5860):195–8.
- George AL, Bangalore-Prakash P, Rajoria S, Suriano R, Shanmugam A, Mittelman A, Tiwari RK. Endothelial progenitor cell biology in disease and tissue regeneration. *J Hematol Oncol* 2011; 4: 24-31.
- George J, Afek A, Abashidze H, Deutsch V, Kopolovich J, Miller H, Keren G. Transfer of endothelial progenitor and bone marrow cells influences atherosclerotic plaque size and composition in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 Dec;25(12):2636-41.
- Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(1)AC133(1) endothelial precursor cells. *Circ Res* 2001;88:167–174
- Goligorsky MS, Kuo MC, Patschan D, Verhaar MC. Review article : Endothelial progenitor cells

in renal disease. *Nephrology (Carlton)* 2009; 14: 291-297.

- Gong L, Cui Z, Yu X, Wei Y, Peng J, Leng X: Hexokinase II in CD133+ and CD133- hepatoma BEL-7402 Cells. *Pathol Oncol Res* 2012, 18(2):377–381.
- Goon PK, Lip GY, Stonelake PS, Blann AD. Circulating endothelial cells and circulating progenitor cells in breast cancer: relationship to endothelial damage/dysfunction/apoptosis, clinicopathologic factors, and the Nottingham Prognostic Index. *Neoplasia*. 2009;11(8):771–9
- Güven H, Shepherd RM, Bach RG, Capoccia BJ, Link DC. The number of endothelial progenitor cell colonies in the blood is increased in patients with angiographically significant coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Oct 17;48(8):1579-87.
- Ha X, Zhao M, Zhao H, Peng J, Deng Z, Dong J, et al. Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in gastric cancer. *Biomarkers*. 2013;18(6):487–92
- Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MAS, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002;109: 625–637.
- Herbrig K, Pistrosch F, Oelschlaegel U, Wichmann G, Wagner A, Foerster S, et al. Increased total number but impaired migratory activity and adhesion of endothelial progenitor cells in patients on long- term hemodialysis. *Am J Kidney Dis*. 2004 Nov;44(5):840-9.
- Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003;348(7):593–600.
- Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med* 2004;8:508–515.
- Hruska K, Choi ET, Memon I, Davis TK, Mathew S. Cardiovascular risk in chronic kidney disease (CKD): the CKD-mineral bone disorder (CKD-MBD). *Pediatr Nephrol* 2010; 25: 769-778
- Huber BC, Grabmaier U, Brunner S. Impact of parathyroid hormone on bone marrow-derived stem cell mobilization and migration. *World J Stem Cells*. 2014 Nov 26;6(5):637-43
- Hur J., Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB Characterization of Two Types of Endothelial Progenitor Cells and Their Different Contributions to Neovascuogenesis

- Imanishi T, Hano T, Nishio I: Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J Hypertens* 2005; 23: 97–104
- Imanishi T, Hano T., Sawamura T., Nishio I.: Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31: 407–413.
- Irollo E., Pirozzi G. CD133: to be or not to be, is this the real question? *Am J Transl Res* 2013;5(6):563-581.
- Jialal I., Devaraj S., Singh U., and Huet B.A., “Decreased number and impaired functionality of endothelial progenitor cells in subjects with metabolic syndrome: implications for increased cardiovascular risk,” *Atherosclerosis*, vol. 211, no. 1, pp. 297–302, 2010
- Jiang D, Franceschi RT, Boules H, Xiao G. Parathyroid hormone induction of the osteocalcin gene. Requirement for an osteoblast-specific element 1 sequence in the promoter and involvement of multiple- signaling pathways. *J Biol Chem.* 2004 Feb 13;279(7):5329-37.
- Jie KE, Goossens MH, van OO, Lilien MR, Verhaar MC. Circulating endothelial progenitor cell levels are higher during childhood than in adult life. *Atherosclerosis* 2009; 202: 345–7.
- Jono S, McKee MD, Murry CE, et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 2000; 87: E10-7.
- Jourde-Chiche N, Dou L, Sabatier F, Calaf R, Cerini C, Robert S, et al. Levels of circulating endothelial progenitor cells are related to uremic toxins and vascular injury in hemodialysis patients. *J Thromb Haemost.* 2009 Sep;7(9):1576-84.
- Karamysheva AF, Mechanisms of angiogenesis, *Biochemistry (Mosc)* 2008; 73(7):751-62.
- Katherine Holmes, Owain LI Roberts, Angharad M. Thomas, Michael J. Cross Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition, 2007
- Kestenbaum B, Sampson JN, Rudser KD, et al. Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 520-8.
- Khakoo AY, Finkel T: Endothelial progenitor cells. *Annu Rev Med* 2005, 56:79-101
- Kim YB, Chung YW, Bae HS, Lee JK, Lee NW, Lee KW, et al. Circulating endothelial progenitor cells in gynaecological cancer. *J Int Med Res.* 2013;41(2):293–9.

- King GL, Loeken MR. Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. *Histochem Cell Biol* 2004;122:333-8
- Kraan J, Strijbos MH, Sieuwerts AM, Foekens JA, den Bakker MA, Verhoef C, Sleijfer S, Gratama JW. A new approach for rapid and reliable enumeration of circulating endothelial cells in patients. *J Thromb Haemost.* 2012 May; 10 (5): 931-9. doi: 10.1111 / j.1538-7836.2012.04681.x.
- Krankel N, Adams V, Linke A et al. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25: 698–703.
- Krenning G, Dankers PY, Drouven JW, Waanders F, Franssen CF, van Luyn MJ, et al. Endothelial progenitor cell dysfunction in patients with progressive chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009 Jun;296(6):F1314-22.
- Krieter DH, Fischer R, Merget K, Lemke HD, Morgenroth A, Canaud B, Wanner C. Endothelial progenitor cells in patients on extracorporeal maintenance dialysis therapy. *Nephrol Dial Transplant.* 2010 Dec;25(12):4023-31.
- Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997;390:45-51.
- Kuro-o M. *Klotho* and the Aging Process. *Korean J Intern Med* 2011;26:113-122
- Kuro-o M. *Klotho* as a regulator of fibroblast growth factor signaling and phosphate/calcium metabolism. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006;15:437-441
- Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, et al. Suppression of aging in mice by the hormone *Klotho*. *Science* 2005;309:1829-1833
- Larsson TE. The role of FGF-23 in CKD-MBD and cardiovascular disease: friend or foe? *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 1376-1381.
- Leone AM, Valgimigli M, Giannico MB, Zacccone V, Perfetti M, D'Amario D, Rebuffi AG, Crea F. From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells. *Eur Heart J* 2009; 30: 890-899.
- Lieben L., Carmeliet G.: Vitamin D signaling in osteocytes: Effects on bone and mineral homeostasis. *Bone* 54 (2013) 237-243
- Liguori A, Fiorito C, Balestrieri ML, Crimi E, Bruzzese G, Williams-Ignarro S, D'Amora M,

Sommese L, Grimaldi V, Minucci PB, Giovane A, Farzati B, Ignarro LJ, Napoli C. Functional impairment of hematopoietic progenitor cells in patients with coronary heart disease. *Eur J Haematol* 2008; 80: 258-264

- Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*. 2000 Jan; 105 (1): 71-7
- Lo Celso C, Fleming HE, Wu JW, Zhao CX, Miake-Lye S, Fujisaki J, et al. Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature*. 2009 Jan 1;457(7225):92-6.
- Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ et al. Endothelial progenitor cell dysfunction: A novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 195–9.
- Losordo DW, Kibbe MR, Mendelsohn F, Marston W, Driver VR, Sharafuddin M, Teodorescu V, Wiechmann BN, Thompson C, Kraiss L, Carman T, Dohad S, Huang P, Junge CE, Story K, Weistroffer T, Thorne TM, Millay M, Runyon JP, Schainfeld R. A randomized, controlled pilot study of autologous CD34+ cell therapy for critical limb ischemia. *Circ Cardiovasc Interv* 2012; 5: 821-830
- Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med*. 2001;7(11):1194–201
- Lyschchik A, Higashi T, Hara T, Nakamoto Y, Fujimoto K, Doi R, Imamura M, Saga T, Togashi K: Expression of glucose transporter-1, hexokinase-II, proliferating cell nuclear antigen and survival of patients with pancreatic cancer. *Cancer Invest* 2007, 25(3):154–162
- Marchetti V, Menghini R, Rizza S et al. Benfotiamine counteracts glucose toxicity effects on endothelial progenitor cell differentiation via Akt/FoxO signaling. *Diabetes* 2006; 55: 2231–2237.
- Maruyama S, Taguchi A, Iwashima S, et al. Low circulating CD34+ cell count is associated with poor prognosis in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 74: 1603–1609, 2008.
- Mayr M, Niederseer D, Niebauer J. From bench to bedside: what physicians need to know about endothelial progenitor cells. *Am J Med*. 2011;124(6):489–97.
- Mohandas R, Segal MS. Endothelial Progenitor Cells and Endothelial Vesicles – What Is the Significance for Patients with Chronic Kidney Disease? *Blood Purif* 2010; 29: 158-162.

- Moody WE, Edwards NC, Madhani M, Chue CD, Steeds RP, Ferro CJ, Townend JN. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease in early-stage chronic kidney disease: cause or association? *Atherosclerosis*. 2012 Jul;223(1):86-94.
- Morishita T, Uzui H, Nakano A, Mitsuke Y, Geshi T, Ueda T, Lee JD. Number of endothelial progenitor cells in peripheral artery disease as a marker of severity and association with pentraxin-3, malondialdehyde-modified low-density lipoprotein and membrane type-1 matrix metalloproteinase. *J Atheroscler Thromb* 2012; 19: 149-158
- Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014 Jan 16;505(7483):327-34.
- Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349: 1436-1442
- Naik RP, Jin D, Chuang E, Gold EG, Tousimis EA, Moore AL, et al. Circulating endothelial progenitor cells correlate to stage in patients with invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;107(1):133–8.
- Neves KR, Gracioli FG, dos Reis LM, et al. Vascular calcification: Contribution of parathyroid hormone in renal failure. *Kidney Int* 2007; 71: 1262-70.
- Nielsen JS, McNagny M. Novel function of CD34 family. *J. Cell Sci*. 2008, 121, 3683-3692.
- Nowak K, Rafat N, Belle S, Weiss C, Hanusch C, Hohenberger P, et al. Circulating endothelial progenitor cells are increased in human lung cancer and correlate with stage of disease. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2010;37(4):758–63.
- Ogata H, Koiwa F, Ito H, Kinugasa E. Therapeutic strategies for secondary hyperparathyroidism in dialysis patients. *Ther Apher Dial* 2006;10:355–64.
- Ogata H, Koiwa F, Kinugasa E, Akizawa T. CKD-MBD: impact on management of kidney disease. *ClinExpNephrol* 2007; 11:261-268.
- Olsson A.K, Dimberg A., Kreuger J. And Claesson-Welsh L VEGF receptor signaling-in control of vascular function, *Nature* 2006, (7).
- Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95: 952–958

- Pi M, Quarles LD. Novel bone endocrine networks integrating mineral and energy metabolism. *Curr Osteoporos Rep* 2013 Dec;11(4):391-9..
- Pirro M, Cagini L, Paciullo F, Pecoriello R, Mannarino MR, Bagaglia F, et al. Baseline and post-surgery endothelial progenitor cell levels in patients with early-stage non-small-cell lung carcinoma: impact on cancer recurrence and survival. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2013;44(4):e245–52.
- Pohl M, Werner N, Munding J, Tannapfel A, Graeven U, Nickenig G, et al. Biomarkers of anti-angiogenic therapy in metastatic colorectal cancer (mCRC): original data and review of the literature. *Z Gastroenterol.* 2011;49(10):1398–406
- Pompilio G, Capogrossi MC, Pesce M, Alamanni F, DiCampli C, Achilli F, Germani A, Biglioli P. Endothelial progenitor cells and cardiovascular homeostasis: Clinical implications. *Int J Cardiol* 2009; 131: 156-167
- Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J. Clin. Invest.* 2000 105:17–19
- Ramirez R, Carracedo J, Merino A, Nogueras S, Alvarez-Lara MA, Rodríguez M, et al. Microinflammation induces endothelial damage in hemodialysis patients: the role of convective transport. *Kidney Int.* 2007 Jul;72(1):108-13.
- Rashid G, Bernheim J, Green J, Benchetrit S. Parathyroid hormone stimulates the endothelial nitric oxide synthase through protein kinase A and C pathways. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 22: 2831-7.
- Roodhart JM, Langenberg MH, Vermaat JS, Lolkema MP, Baars A, Giles RH, et al. Late release of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells after chemotherapy predicts response and survival in cancer patients. *Neoplasia.* 2010;12(1):87–94.
- Rose J.A., Erzurum S., Asosingh K.. Biology and Flow Cytometry of Proangiogenic Hematopoietic Progenitors Cells. *Cytometry* 2015 Jan;87(1):5-19
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-809
- Sabin FR. Preliminary Note on the Differentiation of Angioblasts and the Method by Which They Produce Blood-Vessels, Blood-Plasma and Red Blood-Cells As Seen in the Living Chick. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research.* February 2002, 11(1): 5-7

- Sakamori Y, Masago K, Ohmori K, Togashi Y, Nagai H, Okuda C, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells predicts response in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2012;103(6):1065–70.
- Schlieper G, Hristov M, Brandenburg V, Krüger T, Westenfeld R, Mahnken AH, et al. Predictors of low circulating endothelial progenitor cell numbers in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2008 Aug;23(8):2611-8.
- Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kämper U, Dimmeler S, Zeiher AM. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 2005; 111: 2981-2987
- Seeger, F. H., Haendeler, J., Walter, D. H., Rochwalsky, U., Reinhold, J., Urbich, C., Rossig, L., Corbaz, A., Chvatchko, Y., Zeiher, A. M. and Dimmeler, S. (2005) p38 mitogen-activated protein kinase downregulates endothelial progenitor cells. *Circulation* 111, 1184–1191
- Shantsila E, Watson T, Lip GY. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 741-752
- Sheri Miraglia, Wayne Godfrey, Amy H. Yin, Kristin Atkins, Roger Warnke, Jeannine T. Holden, Robert A. Bray, Edmund K. Waller, and David W. Buck “A Novel Five-Transmembrane Hematopoietic Stem Cell Antigen: Isolation, Characterization, and Molecular Cloning”
- Sieveking DP, Buckle A, Celermajer DS, Ng MK. Strikingly Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay. *J Am Coll Cardiol.* 2008 Feb 12;51(6):660-8.
- Steiner S, Schaller G, Puttinger H, Födinger M, Kopp CW, Seidinger D, et al. History of cardiovascular disease is associated with endothelial progenitor cells in peritoneal dialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2005 Sep;46(3):520-8.
- Stenvinkel P, Larsson TE. Chronic kidney disease: a clinical model of premature aging. *Am J Kidney Dis.* 2013 Aug;62(2):339-51
- Su Y, Zheng L, Wang Q, Li W, Cai Z, Xiong S, et al. Quantity and clinical relevance of circulating endothelial progenitor cells in human ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010;29:27.
- Sugawara J, Mitsui-Saito M, Hayashi C et al. Decrease and senescence of endothelial progenitor

cells in patients with preeclampsia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90: 5329–32

- Takahashi JT, M. Shibuya, The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 14 (17) (1997) 2079
- Teng M, Wolf M, Ofsthun MN et al Activated injectable vitamin D and hemodialysis survival: a historical cohort study. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(4): 1115-25
- Tepper OM, Galiano RD, Capla JM et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 2002; 106: 2781–6.
- Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Dejefeffe M, Leroy R, Massy M, et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells.* 2005 Sep;23(8):1105-12.
- Trivella M, Pezzella F, Pastorino U, Harris AL, Altman DG. Microvessel density as a prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2007;8(6):488–99
- Umemura T, Higashi Y. Endothelial progenitor cells: therapeutic target for cardiovascular diseases. *J Pharmacol Sci.* 2008; 108(1):1–6.
- Urbich C, Dimmeler S. Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in Vascular Biology. *Circ Res* 2004; 95: 343-353.
- Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res.* 2004;64(9):2941–55.
- Verma S, et al: C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function – further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation* 2004; 109: 2058–2067.
- Wang HY, Gao PJ, Ji KD, Shen WF, Fan CL, Lu L, Zhu DL. Circulating endothelial progenitor cells, C-reactive protein and severity of coronary stenosis in Chinese patients with coronary artery disease. *Hypertens Res* 2007; 30: 133-141
- Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. Circulating

endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005; 353: 999-1007
PMID: 16148285 DOI: 10.1056/NEJMoa043814

- Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Schiegl T, Kosiol S, Link A, Walenta K, Nickenig G. Endothelial progenitor cells correlate with endothelial function in patients with coronary artery disease. *Basic Res Cardiol* 2007; 102: 565-571
- Westerweel PE, Hofer IE, Blankestijn PJ et al. End-stage renal disease causes an imbalance between endothelial and smooth muscle progenitor cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2007; 292: F1132–40
- Westerweel PE, Visseren FL, Hajer GR et al. Endothelial progenitor cell levels in obese men with the metabolic syndrome and the effect of simvastatin monotherapy vs. simvastatin/ezetimibe combination therapy. *Eur. Heart J.* 2008; 29: 2808–17.
- Xue Y, Xiao Y, Liu J. The calcium-sensing receptor complements parathyroid hormone-induced bone turnover in discrete skeletal compartments in mice. *Am J Physiol endocrinol Metab* 2012, 302: e841–e851.
- Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 2003;107:1322–1328.
- Yiu YF, Chan YH, Yiu KH, Siu CW, Li SW, Wong LY, Lee et al. Vitamin D deficiency is associated with depletion of circulating endothelial progenitor cells and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 May;96(5):E830-5.
- Yoshiko Y, Candelieri GA, Maeda N, Aubin JE. Osteoblast autonomous Pi regulation via Pit1 plays a role in bone mineralization. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 4465-74.
- Zhao SF, Yang XD, Lu MX, Sun GW, Wang YX, Zhang YK, et al. Prognostic significance of VEGF immunohistochemical expression in oral cancer: a meta-analysis of the literature. *Tumour Biol.* 2013;34(5):3165–71.
- Zhong L. CD133: a stem cell biomarker and beyond Li *Experimental Hematology & Oncology* 2013, 2:17.

EFFETTI IMMUNOMODULANTI DELL'ERITROPOIETINA (EPO)

1. INTRODUZIONE

L'eritropoietina (EPO) è un ormone, prodotto dai reni e in misura minore dal fegato e dal cervello, che ha come funzione principale la regolazione dell'eritopoiesi. Recentemente è stato descritto che questa molecola presenta però anche altre azioni, tra cui effetti antiapoptotici che si traducono in una protezione del sistema nervoso centrale, del sistema cardiovascolare e del tessuto renale (Chu CY et al., 2008). Esistono, inoltre, lavori che suggeriscono effetti dell'EPO sul sistema immune (Cravedi P. et al., 2014).

1.1 L'ERITROPOIETINA (EPO)

L'ossigeno svolge un ruolo chiave nel metabolismo di molti esseri viventi, dai semplici organismi unicellulari procarioti sino a quelli complessi multicellulari, incluso il corpo umano.

Alterazioni della sua disponibilità, causate da variazioni nell'equilibrio tra l'introduzione ed il consumo, richiedono un'adeguata risposta adattativa da parte dell'organismo. Questi meccanismi possono essere attivati sia nelle prime fasi embrionali sia in vari momenti dello sviluppo, per esempio durante le improvvise variazioni ambientali alla nascita o in condizioni di stress.

Negli organismi più complessi, le risposte adattative avvengono in modi diversi, includono il comportamento, la fisiopatologia, la biochimica e la regolazione genica. L'inadeguata regolazione di queste risposte contribuisce all'instaurazione di numerose malattie come la retinopatia, cancro, disordini cerebrovascolari, cardiaci, ecc. Ed è proprio l'ipossia che induce la sintesi di EPO.

L'EPO renale di tipo I, agisce come regolatore chiave dell'eritopoiesi, promuove la proliferazione e la differenziazione delle cellule progenitrici eritoidi; ma essa serve anche a proteggere gli eritroblasti immaturi e gli eritociti maturi dalla morte apoptotica cellulare, interferendo con il signaling apoptotico Fas e del suo ligando FasL. Nelle cellule eritroidi mature un aumento della produzione di FasL e del ligando inducente apoptosi TNF related (TRAIL), membri della superfamiglia del TNF inducono apoptosi attraverso l'interazione con i rispettivi recettori. Questa interazione culmina con il clivaggio e l'inattivazione del fattore GATA1, essenziale per la sopravvivenza e la differenziazione degli ultimi precursori eritroidi (De Maria R et al., 1999, Pevny L. et al., 1991). L'EPO è in grado di down-modulare l'espressione di Fas e di FasL (**Fig.1**) ciò consente inibizione dell'apoptosi, il differenziamento eritroide, la produzione di globuli rossi (RBC) e l'aumento del trasporto di ossigeno nella circolazione (Liu Y. Et al., 1991).

In topi knockout per il gene dell'EPO o per il suo recettore si manifesta anemia severa e morte (Wu et al., 1995). La somministrazione di EPO aumenta il numero di cellule progenitrici eritroidi, che differenziano in normoblasti, eliminano il nucleo e lasciano il midollo osseo. Dopo 1-2 settimane

dalla somministrazione dell'ormone, il numero dei reticolociti aumenta sia per la maggiore produzione di eritroblasti sia per la loro prematura uscita dal midollo osseo (Krantz et al., 1991).

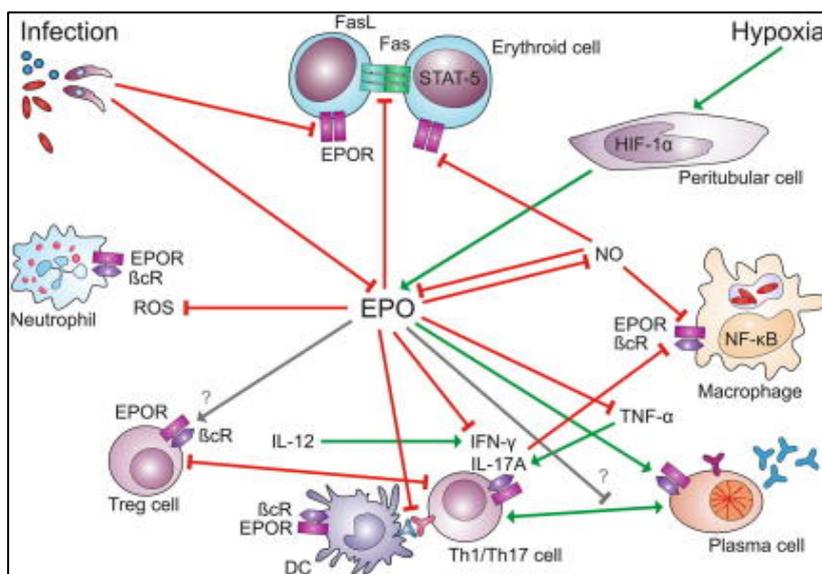


Fig. 1 : funzioni “non classiche” dell’EPO

La produzione di EPO è controllata da un sistema a feedback molto sensibile, in cui un sensore, il prolin idrossilasi (PHDs), a livello del rene percepisce le alterazioni nell’apporto di ossigeno e attiva la trascrizione del fattore inducibile dell’ipossia (HIF) (Haase V.H, 2010). Una riduzione dei livelli sierici di emoglobina (Hb), un aumento del consumo di ossigeno nei tessuti periferici o una perfusione renale ridotta possono indurre la produzione renale EPO. Come conseguenza, dopo alcuni giorni, si verifica un incremento del numero dei reticolociti nel sangue periferico e dopo circa due settimane un significativo aumento dei valori dell’ematocrito (HCT) (Eckardt K.U., 2005).

Tuttavia, il rene non è l'unico organo in grado di produrre l’EPO in risposta a basse concentrazioni di ossigeno. L’ipossia cronica è anche rilevata dall’epidermide da un meccanismo HIF-dipendente; un incremento nel flusso sanguigno di ossido nitrico (NO), rilevato della cute, scatena un aumento secondario dell’escrezione di EPO a livello renale (Boutin A.T. et al., 2008). Anche se il rene è il sito di maggior produzione di EPO, la sintesi extra-renale può contribuire, come ad esempio quella nel fegato, ad aumentarne le concentrazioni in circolo negli adulti.

Mentre HIF-1α e HIF-2α promuovono l’espressione dell’EPO, il fattore nucleare (NF)-κB la inibisce (La Ferla K. et al., 2002). Il fattore NF- κB svolge un ruolo primario nella regolazione della risposta immunitaria e infiammatoria, il suo effetto negativo sull’espressione dell’EPO può contribuire all’aggravarsi dell'anemia da malattie croniche (ACD). Ciò accade frequentemente in pazienti affetti da malattie infiammatorie sostenendo, in tal modo, un impatto negativo sulla funzionalità degli organi e della qualità della vita (Weiss G., 2005). Allo stesso modo, attraverso la stimolazione di NF-κB,

l'interleuchina 1 e il TNF- α sono in grado di inibire l'espressione di EPO in vitro. Di conseguenza, l'iniezione di lipopolisaccaride (LPS), in topi, provoca una riduzione dei livelli d'espressione dell'mRNA nei reni e una diminuzione dei livelli circolanti dell'EPO (Jelkmann W., 1998). Al contrario, la formazione epatica di EPO è stimolata da IL-6 e da NF- κ B, tramite un sistema HIF-1 α dipendente, ciò fornisce la prova di un'interazione tra mediatori infiammatori e la formazione di EPO (Ramadori P., 2010). È stata dimostrata la capacità dell'EPO di ridurre la proliferazione delle cellule T effettrici Th1 o Th17, di modulare l'espansione delle T regolatorie CD4, CD25 e Foxp3 positive, e indurre l'inibizione delle cellule dendritiche (DC), anche se i meccanismi alla base di questi effetti rimangono ancora del tutto da chiarire (Hirose S. et al., 2007)(Fig.1).

1.2 I SENSORI DELL'OSSIGENO E LA PRODUZIONE DI EPO

HIF è un fattore di trascrizione eterodimerico con subunità α (1 α e 2 α), la cui stabilità è ossigeno dipendente, e una subunità β ossigeno indipendente, essenziale per la produzione di EPO (Semenza GL, 2009).

La natura molecolare dei sensori dell'ossigeno che coinvolge la risposta HIF-1 non è ben conosciuta. Il gene HIF-1 α è localizzato sul cromosoma 14, è formato da 15 esoni nell'uomo, mentre il gene di HIF-1 β è localizzato sul cromosoma 1 (Wang GL 1995). Per quanto riguarda le due isoforme HIF-1 α e 2 α , è stato dimostrato, in ratti, una differenza significativa nell'espressione e nell'induzione nei diversi organi (Wiesener MS et al., 2002).

In condizione di normossia, nel citoplasma, le subunità α sono altamente instabili e i residui prolinici subiscono due eventi di idrossilazione catalizzati dagli enzimi PHDs (proteina prolin idrossilasi-dominio) e FIH (fattore di inibizione di HIF). La proteina VHL (pVHL) si lega tramite il suo dominio b all'HIF idrossilato, e all'elongina C. Viene quindi reclutato un complesso ubiquitin-ligasico che contiene elongina B e cullina 2 (Cul2), il quale determina l'ubiquitinazione di HIF e lo contrassegna per la degradazione a opera del proteasoma (Jaakkola P et al., 2001).

In condizioni di ipossia, gli enzimi PHDs e FIH sono inattivi a causa della mancanza di ossigeno necessario alle reazioni di idrossilazione. In tal modo la subunità α è stabilizzata, e trasloca nel nucleo per legarsi alla subunità β , formando un eterodimero (HIF α /HIF β) che rappresenta la forma attiva di HIF, in grado di funzionare da fattore di trascrizione. L'eterodimero si lega ad una regione del DNA, chiamata HRE (elemento regolatore dell'ipossia), per formare un complesso trascrizionale attivo HIF-1 β e CBP/p300 (cAMP response element binding protein), che a sua volta può indurre la trascrizione dei geni sensibili all'ipossia come l'EPO (Rocha, 2007).

HIF attiva non solo l'EPO ma anche altri geni coinvolti nel meccanismo di risposta all'ipossia: regolazione del tono vasale (NO sintetasi), angiogenesi (VEGF, PDGF), glicolisi anaerobia e introito

cellulare di glucosio. Al ritorno delle condizioni di normossia HIF-1 α viene rapidamente degradato da un proteosoma nucleare. Altri sensori (ossido reduttasi e citocromi) possono partecipare al processo attraverso la via dei ROS (Buemi M et al. 2006).

Fino a poco tempo fa si riteneva che la produzione di EPO fosse di esclusiva pertinenza renale ed epatica. Solo recentemente è stato messo in evidenza che numerosi tessuti come il cuore ed il polmone sono in grado di produrre l'ormone (Chu CY et al., 2008).

Paus et al. hanno individuato nella cute un complesso meccanismo sensoriale per l'ossigeno finalizzato al controllo della secrezione dell'EPO renale ed alla produzione locale autocrina e paracrina. Sembra essere il bulbo pilifero la struttura cutanea centrale di questo sorprendente meccanismo che apre un nuovo scenario sull'azione pleiotropica e protettiva dell'EPO nei confronti di tessuti sottoposti ad ischemia (Paus R et al., 2009).

1.3 RECETTORI DELL'EPO E LE CASCADE DEL SEGNALE

Il recettore dell'EPO (EPOR) è una proteina trans-membrana (tipo 1) con un motivo WSXWS nella porzione extracellulare, appartiene alla superfamiglia dei recettori delle citochine ed è formato da otto esoni (dominio extracellulare: 1-5; dominio di membrana: 6; dominio intracellulare: 7,8); la porzione intracellulare non presenta attività chinasi (Noguchi C. T. et al., 1991).

In seguito al legame, l'EPO, induce l'omodimerizzazione del suo recettore, con conseguente attivazione della kinasi 2 che è ad esso associata, provocando la fosforilazione della tirosina di EPOR, la trasduzione del segnale e in fine l'attivazione del fattore di trascrizione 5 (Stat 5) (Penta K., Sawyer S. T., 1995).

A EPOR sono associate ed attivate anche proteine con domini SH2 (Src di omologia 2) come la chinasi PI3. Quest'ultima sopprime l'apoptosi tramite l'attivazione precoce a valle del suo effettore, Akt. L'interazione EPO-EPOR induce il "pathway" di ras/MAPK e la trascrizione del kB-dependent nuclear factor (Christensen B. et al., 2012)(**Fig.2**) .

Uno dei principali effetti dell'interazione EPO-EPOR è l'incremento dei livelli intracellulari di calcio. Il complesso EPO-EPOR induce la fosforilazione della fosfolipasi C- γ 1 (PLC) a livello della membrana cellulare, qui catalizza l'idrolisi del PIP₂ in DAG e IP₃. La reazione di idrolisi catalizzata dalle PLC avviene attraverso due fasi sequenziali: innanzitutto si ha il taglio del fosfoinositide in DAG e IP₂ ciclico, poi si ha la conversione di quest'ultimo in IP₃. Mentre il DAG rimane associato

Lavori sperimentali suggeriscono che questi risultati clinici possano essere attribuiti, almeno in parte, ad un effetto immunosoppressivo diretto dell'EPO. In particolar modo, in vitro, l'EPO ha la capacità di inibire la proliferazione di cellule effettrici, la produzione di IFN- γ senza indurre la morte delle cellule T o alterare la generazione di cellule Treg coinvolgendo la via mediata dall'interleuchina 2 (IL-2) (Cravedi P. et al., 2014). Gli effetti sono mediati direttamente tramite l'attivazione del recettore dell'EPO (EPO-R) espresso sulle cellule T. Infatti il blocco dell'EPO-R inibisce gli effetti antiproliferativi e inibisce la fosforilazione di JAK2 indotta da EPO. Di contro, non sono stati rilevati effetti sulla funzionalità o il fenotipo in cellule dendritiche indotte da EPO. E' stato osservato che stimolando cellule T, con anti-CD3/anti-CD28, si ha un up-regolazione dell'espressione di EPO-R mediata da un aumento del fattore di trascrizione Sp1, noto regolatore positivo per l'espressione del recettore (Lisowska KA et al., 2013). In cellule eritroidi è stato dimostrato che il signaling del recettore delle cellule T (TCR) altera l'espressione di EPO-R (Singh S et al., 2012). Questo dato è stato confermato anche in cellule T ma l'inibizione richiede anche il blocco della via IL2-IL2-R essenziale per la proliferazione delle cellule T. Il blocco di quest'ultima via è provocato da un disaccoppiamento del recettore di IL-2, inibendo la fosforilazione di AKT, e non da una diminuzione nell'espressione del recettore o della citochina.

Inoltre, l'EPO è in grado di inibire l'espansione di cellule T Naive CD4 e la produzione di IFN- γ in topi NOD/SCID γc^{null} (Cravedi P. et al., 2014).

Nuovi dati in vitro indicano che l'EPO non pregiudica il segnale mediato da IL-2, ma che l'effetto immunomodulatorio sia dovuto ad un'induzione della proliferazione della linea cellulare T regolatorie FoxP3⁺, mediatrici della tolleranza, promuovendo la produzione di TGF- β da parte dei monociti e cellule tubulari renali (Wan G et al., 2015).

1.5 EFFETTI IMMUNOLOGICI DEL SALE

Anche se recentemente sono state chiarite molte delle varianti genetiche alla base del rischio di sviluppare malattie autoimmuni, il significativo aumento dell'incidenza della malattia, in particolare di sclerosi multipla e il diabete di tipo 1, indica che ci sono stati cambiamenti fondamentali per l'ambiente che non possono essere legati a fattori genetici. La dieta, con l'incremento del sale (NaCl) in essa è stata a lungo ipotizzata come un potenziale fattore di rischio ambientale per questa crescente incidenza di malattie autoimmuni nei paesi sviluppati negli ultimi decenni (Ascherio A. et al., 2007). Per verificare se una maggiore assunzione di NaCl potesse avere un effetto diretto sulle popolazioni di cellule T CD4⁺ e quindi rappresenta un fattore di rischio per le malattie autoimmuni, sono stati condotti studi su popolazioni Th17 in seguito a trattamento con alte concentrazioni di sale e ne è stata

dimostrata una diretta influenza su cellule coinvolte nell'innata innata come Th17 (Machnik A. et al., 2009).

Le cellule T helper CD4⁺ esprimenti IL-17 rappresentano una nuova linea cellulare, scoperta recentemente nei modelli murini e studiata anche nell'uomo, che si è trovata ad affiancare il noto paradigma della risposta T helper rappresentata dal binomio Th1- Th2.

Modelli animali di patologie umane dimostrano un loro coinvolgimento in vari processi, tra cui l'autoimmunità, la difesa contro alcune infezioni, malattie croniche, allergiche, ma anche sembrano colmare il gap tra immunità innata ed acquisita, perché richiamano cellule "scavenger" e altre popolazioni di linfociti Th nel sito infiammatorio con conseguente liberazione di proteine distruttive (Chen Dong C et al. 2006).

Inducendo Th17 in vitro e trattandole con concentrazioni crescenti di NaCl, 10-40mM, vi è un aumento delle cellule che esprimono CD4 e IL-17A, dose-dipendente. Anche l'espressione del TNF- α , IL-2 e IL-9, citochine pro-infiammatorie, aumenta in presenza di alte concentrazioni di sale (Markus Kleinewietfeld et al. 2013). Inoltre, vi è un up-regolazione del fattore di crescita dei granulociti e dei macrofagi (GM-CSF), proteina secreta da varie cellule del sistema immunitario e fondamentale per la patogenicità di Th17 e dell'espressione del recettore chemochinico CCR6, cruciale per le funzioni di Th17 in patologie autoimmuni (Codarri, L. et al., 2011). Per di più vi è un aumento della trascrizione del gene MIR155HG (chiamato anche MIRHG2), up-regolato in Th17 in encefalite sperimentale autoimmune (EAE). Queste osservazioni indicano che un aumento delle concentrazioni di NaCl sono in grado di promuovere la generazione di un tipo cellule Th17 ad alta patogenicità (O'Connell, R. M. et al, 2010).

Il sale gioca un ruolo fondamentale nella regolazione della via NFAT5/GSK1. NFAT5 una volta fosforilato entra nei nuclei e attiva la trascrizione dei geni della risposta immunitaria. Questa via si intreccia con altri importanti segnali come quelli controllati dalla glicogeno sintetasi SGK1 e dalle MAPK. Il sale non solo induce un aumento dell'espressione di NFAT ed un conseguente aumento della fosforilazione di p38/MAPK ma anche un aumento dell'espressione del mRNA di SGK1 (Chen, S. et al., 2009).

In un modello di topo EAE, un aumento di apporto di sale nella dieta determina un peggioramento della patologia, un aumento di Th17 in circolo e un aumento dell' infiltrato linfocitario CD3⁺ e macrofagico MAC3⁺.

2. SCOPO DELLE TESI

Lo scopo principale di questo lavoro di tesi è la definizione dei meccanismi immunomodulanti dell'eritropoietina (EPO) in presenza di concentrazioni di sale (NaCl) normalmente presenti nel rene e in grado di scatenare una risposta immunitaria in loco. Il lavoro si propone di comprendere gli effetti immunologici della combinazione EPO e NaCl e un possibile impiego, dell'EPO, come strategia terapeutica tollerogena per prevenire il rigetto nel trapianto di rene.

Il razionale è fondato sullo stimolo dei meccanismi fisiologici deputati, da un lato, al mantenimento della tolleranza verso il "self" e, dall'altro, alla modulazione delle risposte immunitarie ormai innescate. Come è noto, infatti, il riconoscimento dell'antigene da parte dei precursori alloreattivi avviene tramite lo specifico recettore sulle cellule T. Questa reazione, tuttavia, in assenza dell'intervento delle molecole di superficie di "costimolazione", dà luogo a anergia o, appunto, tolleranza.

Ogni risposta immunitaria si associa all'attivazione, oltre che delle cellule effettrici Th1 e Th17 della risposta immune, anche delle cellule T regolatorie, che sono quelle in grado di sopprimere la risposta immunitaria effettrice. Queste cellule si caratterizzano per la produzione di citochine immunomodulanti quali IL-10 e TGF- β e sono identificate dall'espressione di FoxP3. Ma i farmaci immunosoppressori standard, quali ad esempio basiliximab, inibitori della calcineurina e micofenolato, inibiscono sia l'attivazione delle cellule T effettrici che l'attivazione delle cellule T regolatrici.

Inoltre è noto, che il rene esposto ad alte concentrazioni di sodio (Na) promuove una risposta autoimmune mediata dalla componente cellulare T effettrice. L'ipotesi di partenza di questo progetto è che la produzione di EPO renale e un conseguente aumento della componente regolatoria sia una strategia evolutiva, in grado di promuovere tolleranza, sviluppata per bloccare e contenere l'aumento della componente cellulare effettrice NaCl-indotta.

Per verificare ciò il presente lavoro si propone di:

1. studiare l'effetto immunomodulante dell'EPO in PBMCs umani in seguito a trattamento con NaCl e valutarne gli effetti sulla sopravvivenza cellulare ;
2. studiare l'effetto immunomodulante dell'EPO in linfociti T CD4⁺, stimolati con monociti o aCD3/CD28 e testare la produzione di INF- γ in seguito a trattamento con NaCl;
3. studiare l'effetto immunomodulante dell'EPO in cellule T regolatorie FoxP3⁺, indotte da Naive CD4⁺ e stimulate con monociti, provenienti da donatori sani e trattati con NaCl;

4. studiare l'effetto immunomodulante dell'EPO in cellule Th17 IL17⁺, indotte da Naive CD4⁺ e stimulate aCD3/CD28, provenienti da donatori sani e trattati con NaCl.

3. MATERIALI E METODI

3.1 PBMC UMANI

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) sono state purificate mediante centrifugazione con gradiente di densità (Ficoll/Hypaque®) partendo da buffy coats di donatori sani anonimi provenienti dalla Blood Bank di New York.

3.2 ARRICCHIMENTO CELLULARE

3.2.1 Arricchimento di cellule T

Le cellule T necessarie per le successive analisi di coltura cellulare sono state isolate da PBMCs umani utilizzando il kit di arricchimento EasySep (Stem Cell cat.: #19051) seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo l'isolamento, per verificare la purezza della popolazione selezionata è stata valutata l'espressione di CD3 tramite tecnica citofluorimetrica. La purezza in CD3⁺ era stabilmente >95%.

3.2.2 Arricchimento di cellule T Naive CD4⁺ umane

Le cellule T Naive CD4⁺ necessarie per l'induzione in Treg e Th17 sono state isolate da PBMCs umani utilizzando il kit di arricchimento cellulare MACS (Miltenyi Biotec cat.: #130-094-131) e seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo l'isolamento, per verificare la purezza della popolazione selezionata è stata valutata l'espressione di CD4 tramite tecnica citofluorimetrica. La purezza in CD4⁺ era di circa il 94%.

3.2.3 Isolamento di Monociti CD14⁺ umani

Al fine di indurre co-stimolazione in colture cellulari per l'induzione di Treg sono stati usati monociti CD14⁺. Questi ultimi, sono stati isolati da PBMCs umani utilizzando il kit di arricchimento EasySep (Stem Cell cat.: #18058) seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo l'isolamento, per verificare la purezza della popolazione selezionata è stata valutata l'espressione di CD14 tramite tecnica citofluorimetrica. La purezza in CD14⁺ era > 90%.

3.2.4 Isolamento di cellule B umane

Al fine di indurre co-stimolazione in colture cellulari per l'induzione di Treg sono state usate cellule B umane. Quest'ultime, sono state isolate da PBMCs umani utilizzando il kit di arricchimento EasySep (Stem Cell cat.: #19054) seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo l'isolamento, per verificare la purezza della popolazione selezionata è stata valutata l'espressione di CD19 tramite tecnica citofluorimetrica. La purezza in CD19⁺ era > 90%.

3.3 COLTURE IN VITRO

3.3.1 Colture in vitro di PBMCs

PBMCs sono stati coltivati ad una concentrazione di 2×10^5 in piastre da 96 pozzetti. Le cellule sono state stimolate con anticorpo monoclonale solubile anti-CD3 (1 µg/ml; BD Biosciences, #555336) e coltivate in RPMI con aggiunta del 10% di siero umano inattivato al calore (Gemini Bio-Products), per 5 giorni a 37°C al 5% CO₂. Per determinare la funzione immunomodulante dell'EPO (1000U) e l'equivalente del veicolo, sono stati aggiunti alle culture dove indicato.

3.3.2 Colture in vitro di cellule T

Cellule T arricchite precedentemente tramite kit, coltivate ad una concentrazione di 2×10^5 in piastre da 96 pozzetti, sono state stimolate con anticorpi monoclonali solubili anti-CD3/anti-CD28 (1 µg/ml; BD Biosciences, #555336, #555725) o tramite biglie magnetiche rivestite con anticorpi anti-CD3/CD28 (15 µl/10⁶ cellule, Gibco, Life technologies), oppure tramite co-culture di cellule B ad una concentrazione di 1×10^5 per pozzetto.

Le cellule sono state coltivate con RPMI con aggiunta del 10% di siero umano inattivato al calore (Gemini Bio-Products) e IL-2 ricombinante umana (Cell Applications, #RP1012-10) per 5 giorni a 37 °C al 5% CO₂. L'EPO (1000U) e l'equivalente del veicolo, sono stati aggiunti alle culture dove indicato. La proliferazione cellulare è stata valutata tramite CFSE (Invitrogen).

3.4 POLARIZZAZIONE CELLULARE IN VITRO

3.4.1 Induzione di Treg

Cellule Treg FoxP3⁺ umane sono state generate da colture di Naïve CD4⁺ (2×10^5 per pozzetto) precedentemente isolate tramite kit e stimolate con monociti ad una concentrazione di 1×10^5 per pozzetto, anti-CD3 (1 µg/ml; BD Biosciences), IL-2 (10 ng/ml) e TGF-β (10 ng/ml, PeproTech, #100-

21C) per 5 giorni a 37 °C al 5% CO₂.

3.4.2 Induzione di Th17

Cellule Th17 umane sono state generate cellule T naïve CD4⁺ coltivate in piastre pre-coated con anticorpo solubile anti-CD3 (10 ug/ml) e stimulate tramite IL-6 (10 ng/ml, Cell Applications, #RP1010-10), TGF-β (10 ng/ml), IL-1β (10 ng/ml, Cell Applications, #RP1167-10), IL-23 (10 ng/ml, Prospec, #cyt-050), IL-21 (5 ng/ml, Cell Applications, #RP1090-10), anti-IL4 (10ug/ml, BD Biosciences #554481) e anti-INF-γ (10ug/ml, BD Biosciences #554698) in terreno privo di siero X-VIVO15 (BioWhittaker) per 6 giorni a 37 °C al 5% CO₂.

3.5 SAGGIO DI STABILIZZAZIONE DI CELLULE FOXP3

Cellule Treg FoxP3⁺ umane sono state generate da colture di Naïve CD4⁺ (2×10⁵ per pozzetto) precedentemente isolate tramite kit e stimulate con monociti ad una concentrazione di 1×10⁵ per pozzetto, anti-CD3, IL-2 (10 ng/ml) e TGF-β (10 ng/ml, PeproTech, #100-21C) per 5 giorni a 37 °C al 5% CO₂. In seguito ai cinque giorni le cellule sono state arricchite per CD4⁺ e CD25⁺, tramite sorter Sony Biotechnology SH800. Le cellule positive a tali markers sono state raccolte e messe in coltura ad una concentrazione 2×10⁵ per pozzetto e stimulate con monociti ad una concentrazione di 1×10⁵ per pozzetto, anti-CD3, IL-2 (10 ng/ml) per 3 giorni a 37 °C al 5% CO₂. Successivamente è stata valutata l'espressione di CD4⁺ FoxP3⁺ tramite analisi citofluorimetrica.

3.6 SAGGIO DELL'ANNESSINA V

Il saggio consente di rivelare lo stadio precoce di apoptosi e di distinguere l'apoptosi dalla necrosi in citofluorimetria. PBMCs sono stati coltivati ad una concentrazione di 2x10⁵ in piastre da 96 pozzetti. Le cellule sono state stimulate con anticorpo monoclonale solubile anti-CD3 e coltivate in RPMI con aggiunta del 10% di siero umano inattivato al calore (Gemini Bio-Products), per 5 giorni a 37°C al 5% CO₂. In seguito, le cellule sono state lavate prima con PBS e poi con buffer specifico per annessina V costituito da : 10mM di HEPES, 140 mM NaCl e 2,5 mM CaCl₂, pH 7.4. Successivamente i campioni sono stati risospesi in 100 µl di buffer annessina V e 5 µl di annessina V coniugata FITC e Fixable Viability Dye (eBioscience 65-0863-14) e incubati per 15 minuti a temperatura ambiente. Grazie a questa combinazione possiamo ottenere sia le cellule in apoptosi positive solo ad annessina V che le cellule necrotiche positive ad entrambi i markers. Dopo l'incubazione sono stati lavati con buffer annessina V e acquisiti con citometro a flusso Canto II tre-laser (BD Biosciences) e analizzati

utilizzando il software DIVA. Per campione sono stati acquisiti almeno 50.000 eventi.

3.7 SAGGIO DI PROLIFERAZIONE CON CFSE

La proliferazione dei PBMCs e delle cellule T è stata misurata mediante la valutazione della diminuzione dell'intensità di fluorescenza del CFSE (Invitrogen, Molecular Probes). PBMCs sono stati risospesi in PBS a 2×10^7 cellule/ml ed incubati con CFSE ad una concentrazione finale di $2 \mu\text{M}$ per 5 minuti a 37°C . Le cellule sono state quindi lavate ed al termine del lavaggio risospese nel terreno di coltura.

Per ottenere cellule T-CFSE sono stati separati PBMC e mancati con CFSE. La frazione cellulare risultante è stata contata ed arricchita per cellule T tramite kit EasySep. Le cellule T-CFSE (responder) sono state coltivate. Dopo 5 giorni a 37°C e al 5% CO_2 , le cellule sono state raccolte e analizzate in citofluorimetria a flusso.

3.8 CITOMETRIA A FLUSSO

PE-Cy5-anti-CD4 (#555348), PE-anti-CD8 (555367), PE-Cy7-anti-IFN- γ (557643) e FITC-anti-CD4 (555346) sono prodotti da BD Biosciences. PE-anti-FoxP3 (12-4776-42), PE-anti-FoxP3 ISO (12-4714-42), APC-anti-CD25(17-0259-42) e APC-IL17 (17-7179-42) sono prodotti da eBioscience. Secondo le istruzioni dei produttori per lo staining di superficie le cellule, precedentemente lavate con PBS, sono state trattate con anticorpi specifici per 15 minuti a temperatura ambiente.

Per il rilevamento di citochine intracellulari, sono stati aggiunti al terreno di coltura 5 ore prima dell'inizio dello staining: Golgi Plug (1: 1000; eBioscience) per il blocco dell'apparato del Golgi, 20 ng/ml PMA (Sigma-Aldrich) e $1 \mu\text{M}$ ionomicina (Sigma-Aldrich).

Per il rilevamento di proteine intracellulari le cellule, dopo marcatura di superficie, sono state fissate, permeabilizzate e trattate per 30 minuti a 4°C con anticorpi specifici.

I dati sono stati acquisiti con citometro a flusso Canto II tre-laser (BD Biosciences) e analizzati utilizzando il software DIVA. Per campione sono stati acquisiti almeno 50.000 eventi.

3.9 ANALISI STATISTICA

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando GraphPad Prism (versione 5 per Windows; GraphPad Software, Inc.). I gruppi in studio sono stati comparati tramite t test. Sono stati considerati significativi i valori con $P < 0,05$.

4. RISULTATI

4.1 EPO INIBISCE LA PROLIFERAZIONE DI PBMC INDOTTA DA NaCl

PBMC sono stati attivati con aCD3 (1µg/ml) mAb e trattati con NaCl (20 e 40 mEq) o Urea (40 e 80 mEq) (controllo per l'osmolarità) in presenza o meno di EPO. Dopo cinque giorni di trattamento è stata valutata la proliferazione misurando la diluizione del CFSE in citometria a flusso (**Fig.3**).

L'analisi è stata eseguita su 7 donatori differenti e i risultati sono stati normalizzati su valori ottenuti in cellule che avevano ricevuto solo il veicolo.

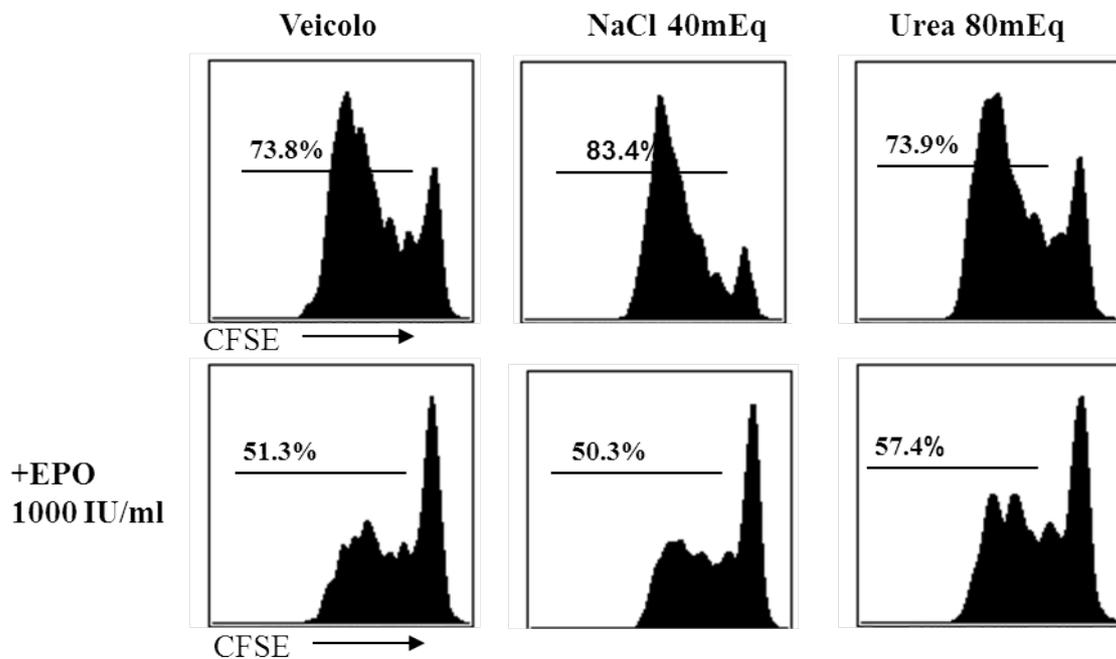


Fig. 3. Diluizione CFSE in PBMC coltivati con aCD3 e trattati con NaCl (20 e 40 mEq) o Urea (40 e 80 mEq). Esempio di gating eseguito sui CD4⁺. Risultati analoghi con CD8⁺.

I dati mostrano un aumento della proliferazione linfocitaria in presenza di NaCl rispetto al controllo con urea, che veniva prevenuto dalla presenza di EPO nella coltura. I valori sono stati normalizzati rispetto alla proliferazione delle cellule che avevano ricevuto solo il veicolo (**Fig.4 A**).

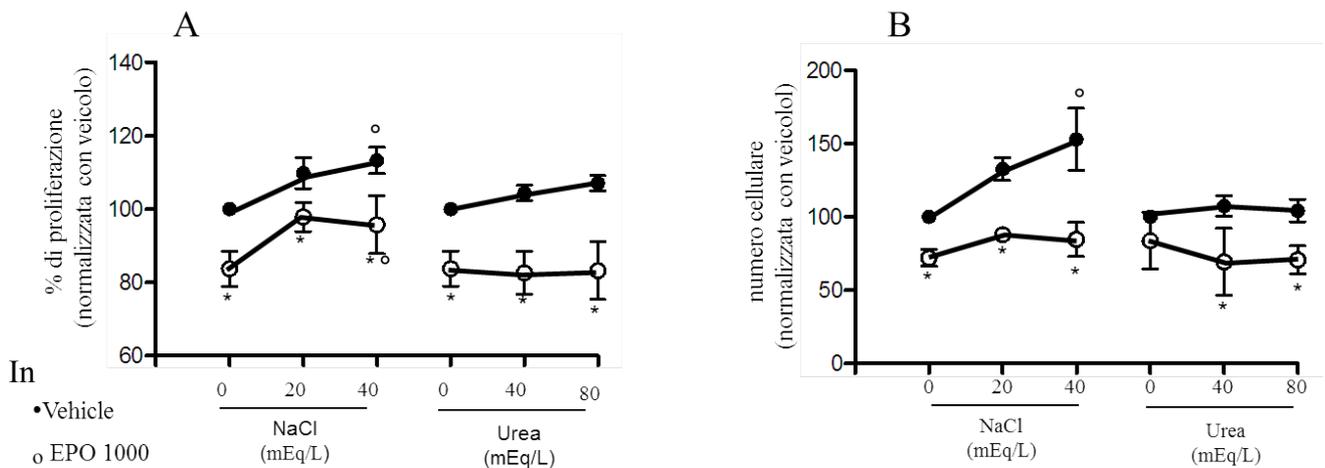


Fig. 4: (A) Andamento della proliferazione cellulare della popolazione CD4⁺: NaCl 20 mEq 108% ±8.5, NaCl 40 mEq 106.8% ±12.9, Urea 40 mEq 96% ±7.1, Urea 80 mEq 99.71% ±13.3. In presenza di EPO 1000 IU/ml e veicolo 87.54% ±14.6, NaCl 20 mEq 97.43% ±14.6, NaCl 40 mEq 95.82% ±9, Urea 40 mEq 87.9% ±19.6 e Urea 80 mEq 89.7% ±19. **(B)** Andamento del numero cellulare della popolazione CD4⁺: NaCl 20 mEq 116% ±7, NaCl 40 mEq 127% ±10.3, Urea 40 mEq 106% ±6.3, Urea 80 mEq 110.16% ±13.3. In presenza di EPO 1000 IU/ml e veicolo 76.12% ±17.3, NaCl 20 mEq 83.64% ±5.2, NaCl 40 mEq 81.06% ±15.2, Urea 40 mEq 70% ±15.3 e Urea 80 mEq 71.16% ±17.01. *P<0.05 vs. veicolo vs stessa quantità di NaCl/Urea; °P<0.05 NaCl/Urea vs 0mEq/L

Fig. 4B è rappresentato il numero delle cellule contate a fine coltura. I dati mostrano un aumento del numero dei linfociti in presenza di NaCl rispetto al controllo con urea, che diminuiva in presenza di EPO nella coltura.

4.2 EPO NON INFLUENZA L'APOPTOSI CELLULARE

Per studiare l'effetto di NaCl ed EPO sulla sopravvivenza cellulare, abbiamo marcato le cellule con annexin V (marcatore di apoptosi cellulare) e Viability probe. I dati in **Fig. 5** mostrano che non ci sono effetti significativi del NaCl o dell'EPO sulla sopravvivenza di cellule CD4⁺. Non vi sono differenze significative nella percentuale di cellule in apoptosi (**Fig. 5A**) in seguito a trattamento con NaCl (20 e 40 mEq) e Urea (40 e 80 mEq), né nella percentuale di cellule morte (**Fig. 5B**).

L'analisi è stata eseguita su 4 donatori differenti e i risultati sono stati normalizzati su valori ottenuti in cellule che avevano ricevuto solo il veicolo. Complessivamente, i dati supportano l'idea che EPO inibisce l'espansione linfocitaria indotta da NaCl diminuendo la proliferazione cellulare, senza influire sulla loro sopravvivenza.

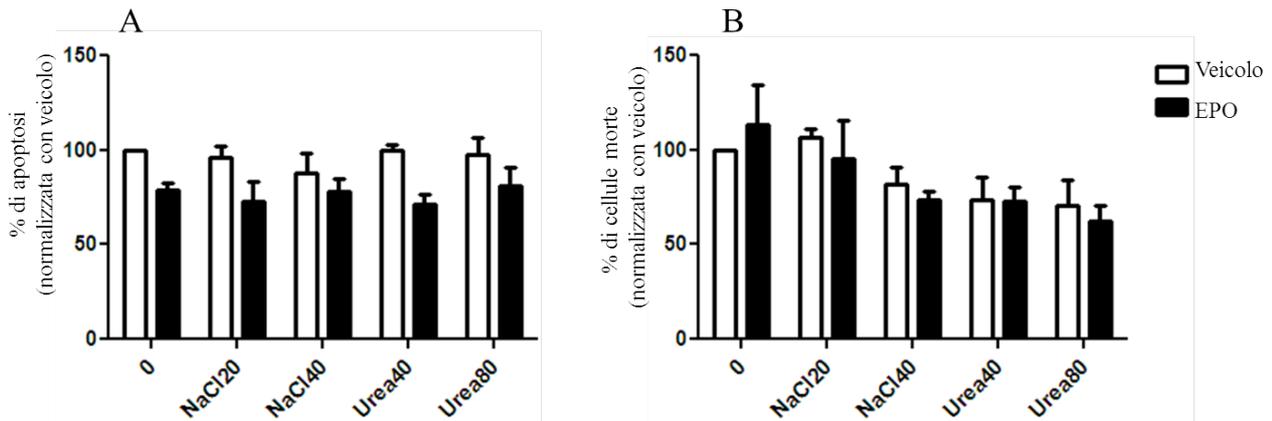


Fig. 5: (A) cellule in apoptosi Annessina V⁺ CD4⁺: NaCl 20 mEq 96.25% ±9.8, NaCl 40 mEq 88.10% ±17.3, Urea 40 mEq 99.78% ±5.7, Urea 80 mEq 97.95% ±14.8. In presenza di EPO 1000 IU/ml e veicolo 78.82% ±6.9, NaCl 20 mEq 72.97% ±18.3, NaCl 40 mEq 78.17% ±11.8, Urea 40 mEq 71.01% ±9.6 e Urea 80 mEq 80.8% ±16.9.

(B) cellule in necrosi Viability⁺Annessina V⁺: NaCl 20 mEq 106.5% ±8.5, NaCl 40 mEq 82.14% ±16.74, Urea 40 mEq 73.53% ±23.1, Urea 80 mEq 70.88% ±26.7. In presenza di EPO 1000 IU/ml e veicolo 113.63% ±42.2, NaCl 20 mEq 95.02% ±41.72, NaCl 40 mEq 73.96% ±9.0, Urea 40 mEq 72.93% ±15.2 e Urea 80 mEq 62.4% ±17.1.

*P<0.05 vs. veicolo vs stessa quantita di NaCl/Urea; °P<0.05 NaCl/Urea vs 0mEq/L

4.3 EPO INIBISCE LA PROLIFERAZIONE DI CELLULE T IN RISPOSTA AD UNO STIMOLO ALLOGENICO IN PRESENZA DI NaCl

Cellule T CD4⁺, marcate con CFSE⁺, sono state attivate con cellule B e trattate con NaCl (20 e 40 mEq) o Urea (40 e 80 mEq). Dopo cinque giorni di trattamento è stata valutata la proliferazione misurando la diluizione del CFSE. L'analisi è stata eseguita su 5 donatori differenti e i risultati sono stati normalizzati su valori ottenuti in cellule che avevano ricevuto solo il veicolo (**Fig. 6**).

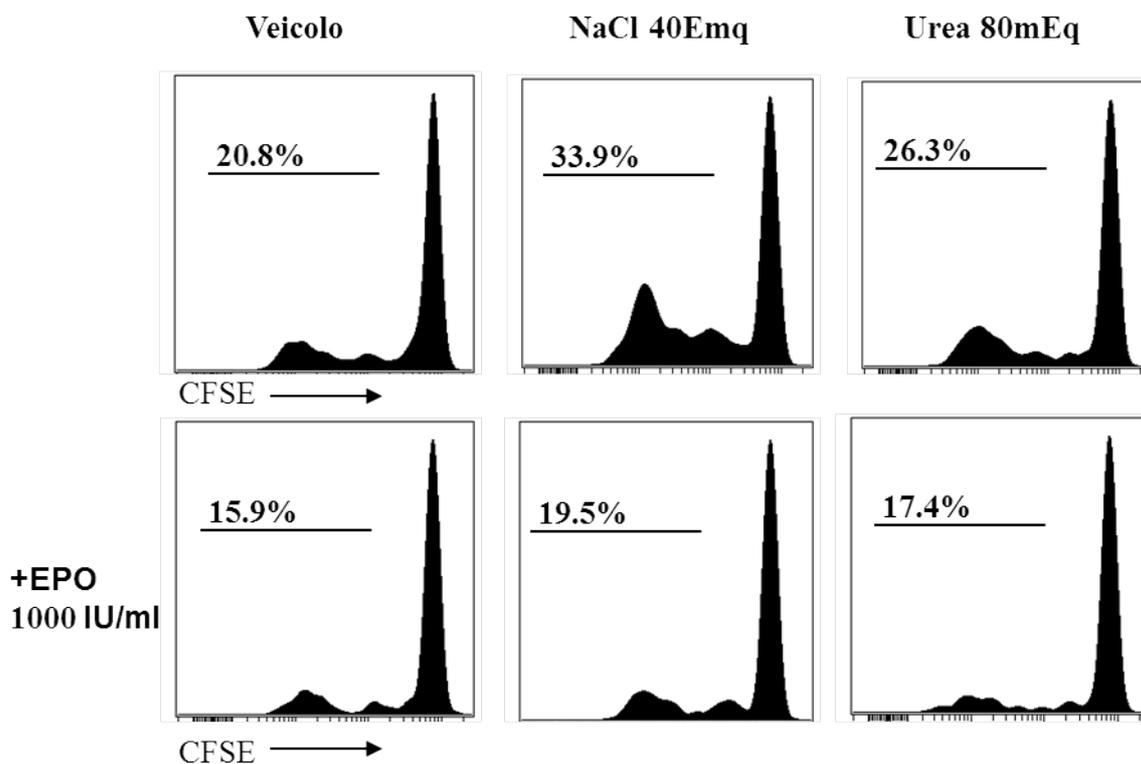


Fig 6. . Diluizione CFSE in cellule T CD4⁺ attivate con cellule B e trattati con NaCl (20 e 40 mEq) o Urea (40 e 80 mEq). Esempio di gating eseguito sui CD4⁺. Risultati analoghi con CD8⁺.

Dall' analisi citofluorimetrica risulta un aumento della proliferazione delle cellule T CD4⁺, trattate con NaCl a qualsiasi concentrazione, rispetto a cellule trattate con Urea e con solo terreno. La proliferazione diminuisce in presenza di NaCl ed EPO (**Fig. 7**).

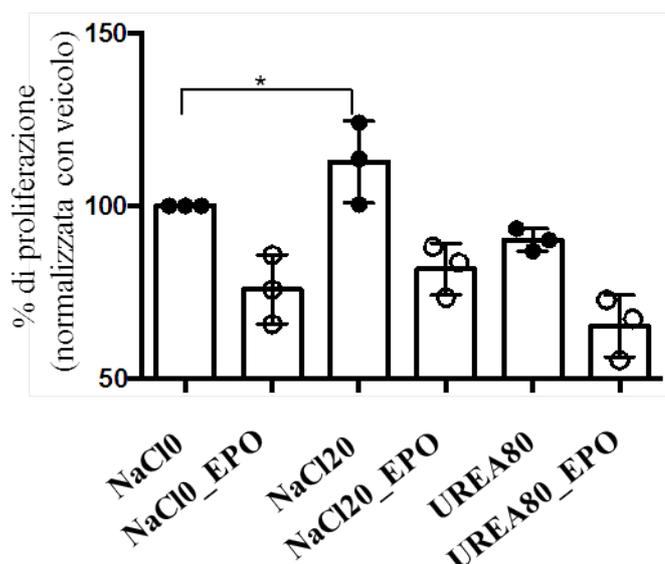


Fig. 7: Andamento della proliferazione cellulare della popolazione T CD4⁺. Mostrati in figura solo dati piu' significativi ma riportate i risultati di tutte le concentrazioni: NaCl 20 mEq 112.7% ±9.3, NaCl 40 mEq 89.9% ±6.6, Urea 40 mEq 90% ±2.3, Urea 80 mEq 72.14% ±3.9. In presenza di EPO 1000 IU/ml e veicolo 75.78% ±7.11, NaCl 20 mEq 81.7% ±3.1, NaCl 40 mEq 70.8% ±2.4, Urea 40 mEq 65.13% ±3.9 e Urea 80 mEq 59% ±14. *P<0.05 vs. veicolo vs stessa quantità di NaCl/Urea; °P<0.05 NaCl/Urea vs 0mEq/L

4.4 EPO INIBISCE LA PROLIFERAZIONE DI CELLULE T, STIMOLATE CON aCD3/CD28, INDOTTA DA NaCl

Per valutare l'effetto diretto di NaCl ed EPO sulle cellule T, abbiamo stimolato con aCD3/aCD28 mAb cellule T CD4⁺, marcate con CFSE, in presenza di NaCl (20 e 40 mEq) o Urea (40 e 80 mEq). Dopo cinque giorni di trattamento è stata valutata la proliferazione misurando CFSE e l'espressione di CD4 in citometria a flusso. L'analisi è stata eseguita su 4 donatori differenti e i risultati sono stati normalizzati su valori ottenuti in cellule che avevano ricevuto solo il veicolo (Fig. 7).

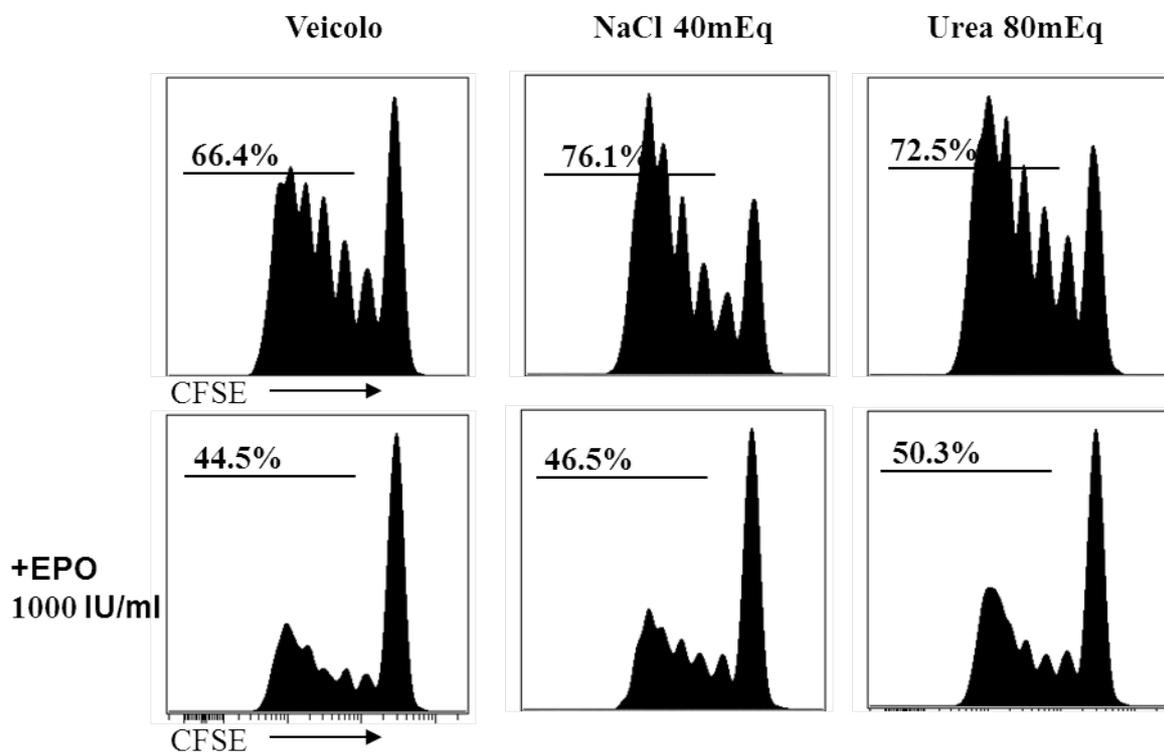


Fig 7. Diluizione CFSE in cellule T CD4⁺ attivate con cellule aCD3/aCD28 mAb con NaCl (20 e 40 mEq) o Urea (40 e 80 mEq). Esempio di gating eseguito sui CD4⁺. Risultati analoghi con CD8⁺.

Dall'analisi citofluorimetrica risulta un aumento della proliferazione delle cellule T CD4⁺, trattate con NaCl a qualsiasi concentrazione, rispetto a cellule trattate con Urea e con solo terreno. La proliferazione diminuisce in presenza di NaCl ed EPO (Fig. 8).

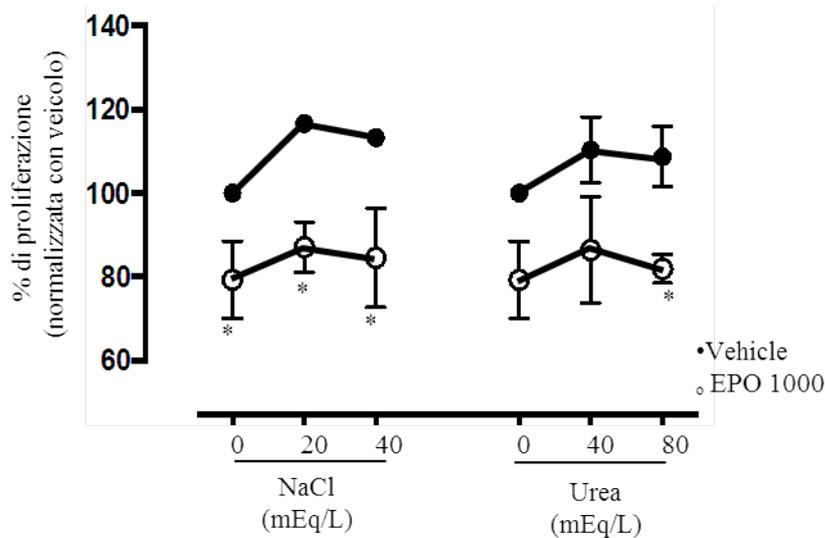


Fig. 8: Andamento della proliferazione cellulare della popolazione T CD4⁺ attivate con cellule aCD3/aCD28 mAb: NaCl 20 mEq 110% ±0.8, NaCl 40 mEq 92.96% ±1.8, Urea 40 mEq 105±7.1, Urea 80 mEq 99.94% ±0.6. In presenza di EPO 1000 IU/ml e veicolo 86.71% ±3.3, NaCl 20 mEq 96.77% ±2.7, NaCl 40 mEq 92.41% ±3.55, Urea 40 mEq 97.6% ±1.9 e Urea 80 mEq 96.9% ±2.8. *P<0.05 vs. veicolo vs stessa quantità di NaCl/Urea; °P<0.05 NaCl/Urea vs 0mEq/L

4.5 EPO INIBISCE LA PRODUZIONE DI INF- γ IN CELLULE T, STIMOLATE CON aCD3/CD28, INDOTTA DAL NaCl

Abbiamo poi valutato l'effetto di NaCl ed EPO sulla produzione di IFN- γ da parte delle cellule T. Cellule T CD4⁺, marcate con CFSE, sono state attivate con aCD3/CD28 e trattate con NaCl (20 e 40 mEq) o Urea (40 e 80 mEq). Dopo cinque giorni di trattamento è stata valutata la proliferazione misurando CFSE, l'espressione di CD4 e quella di INF- γ in citometria a flusso. L'analisi è stata eseguita su 4 donatori differenti e i risultati sono stati normalizzati su valori ottenuti in cellule che avevano ricevuto solo il veicolo (**Fig. 9**).

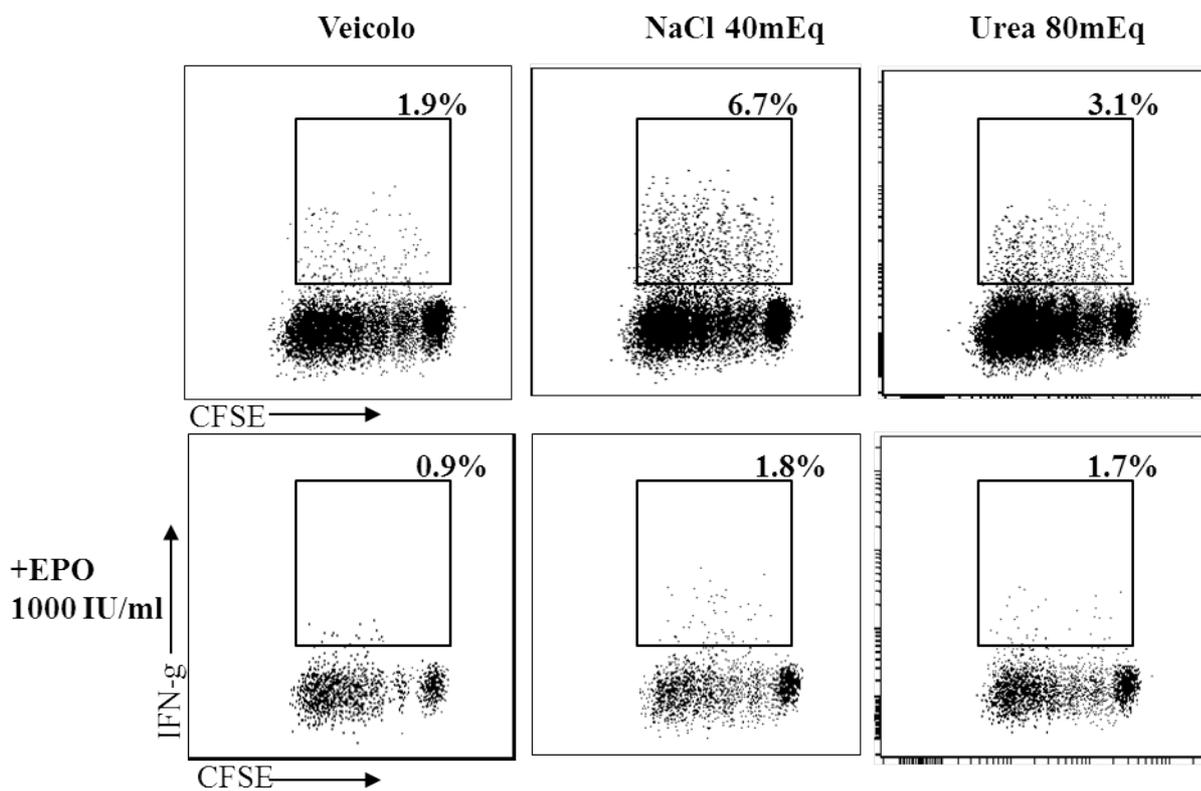


Fig. 9 Diluizione CFSE ed espressione di INF- γ in cellule T CD4⁺ attivate con cellule aCD3/aCD28 mAb con NaCl (20 e 40 mEq) o Urea (40 e 80 mEq). Esempio di gating eseguito sui CD4⁺.

Dall'analisi citofluorimetrica risulta un aumento della produzione di INF- γ da parte delle cellule T, CD4⁺, trattate con NaCl a qualsiasi concentrazione, rispetto a cellule trattate con Urea e con solo terreno. L'espressione di INF- γ da parte delle cellule T diminuisce in presenza EPO (**Fig. 10**).

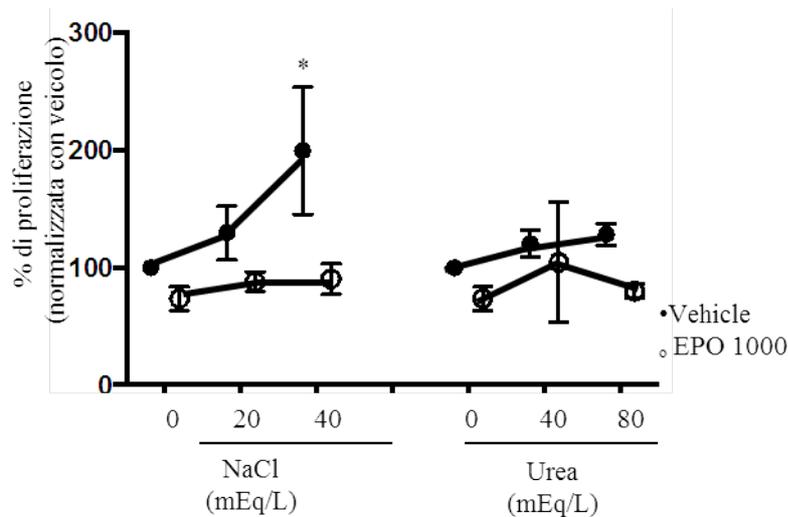


Fig. 10: Andamento dell'espressione di della popolazione T CD4⁺ attivate con cellule aCD3/aCD28 mAb: NaCl 20 mEq 129% ±2.3, NaCl 40 mEq 210% ±1.9, Urea 40 mEq 102.3±0.6, Urea 80 mEq 111.3% ±03.6. In presenza di EPO 1000 IU/ml e veicolo 87.7% ±3, NaCl 20 mEq 90% ±2.6, NaCl 40 mEq 89.6% ±4, Urea 40 mEq 102% ±28 e Urea 80 mEq 89.6% ±0.8.
 *P<0.05 vs. veicolo vs stessa quantità di NaCl/Urea; °P<0.05 NaCl/Urea vs 0mEq/L

4.6 EPO INIBISCE L'INDUZIONE DI CELLULE Th17, INDOTTA DAL NaCl

I dati pubblicati mostrano che il NaCl aumenta la conversione delle cellule CD4⁺ verso un fenotipo Th17. Per valutare l'effetto di NaCl ed EPO Cellule Naïve CD4⁺ sono state indotte verso un fenotipo Th17 attivate con aCD3/CD28, TGF-β, IL-6, IL-1β, IL-21, IL-23, anti-IL4 and anti-IFN-γ. Le cellule sono state trattate con NaCl (20 e 40 mEq) o Urea (40 e 80 mEq). Dopo sei giorni di trattamento è stata valutata l'espressione di IL-17 in citometria a flusso.

L'analisi è stata eseguita su 6 donatori differenti e i risultati sono stati normalizzati su valori ottenuti in cellule che avevano ricevuto solo il veicolo (**Fig. 11**).

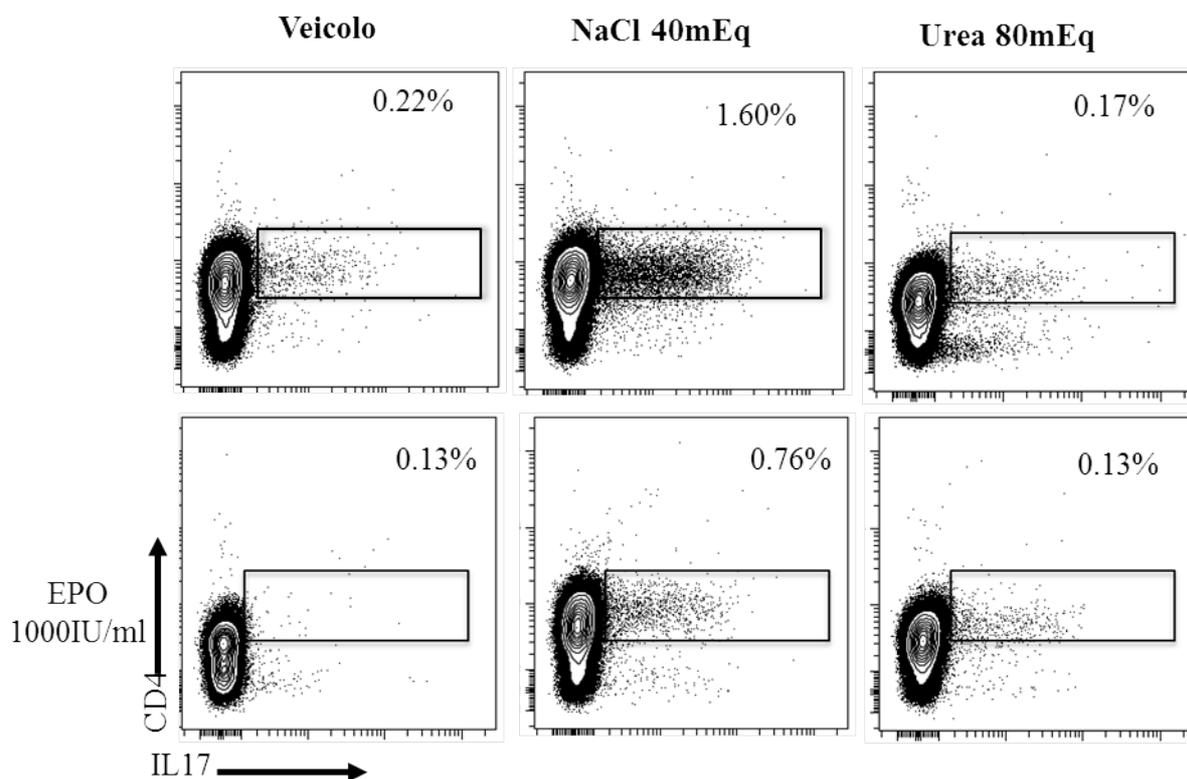


Fig. 11 Espressione di IL17 e CD4 in cellule Th17 indotte da Naïve CD4⁺. Le cellule sono state trattate con NaCl (20 e 40 mEq) o Urea (40 e 80 mEq). Esempio di gating eseguito sui CD4⁺ e IL17⁺

Dall' analisi citofluorimetrica risulta un aumento della proliferazione delle cellule CD4⁺ e IL17⁺, trattate con NaCl a qualsiasi concentrazione, rispetto a cellule trattate con Urea e con solo terreno. La proliferazione diminuisce in presenza di NaCl ed EPO (**Fig.12**).

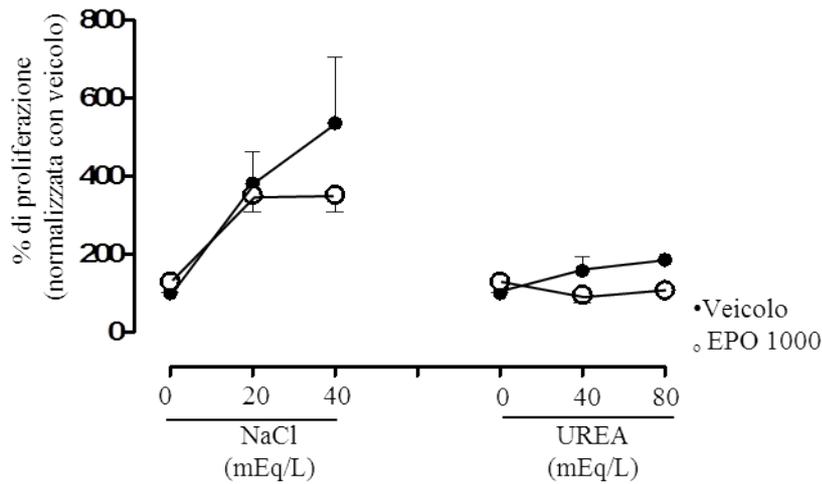


Fig. 12: Andamento dell'espressione di CD4⁺IL17⁺ in cellule Th17 indotte da Naïve CD4⁺: NaCl 20 mEq 380% ±114.2, NaCl 40 mEq 535.93% ±237.7, Urea 40 mEq 157.1±51.7, Urea 80 mEq 185.28% ±23.9. In presenza di EPO 1000 IU/ml e veicolo 130% ±42.2, NaCl 20 mEq 352.15% ±77.1, NaCl 40 mEq 352.1% ±77.1, Urea 40 mEq 96.15% ±42.42 e Urea 80 mEq 107.69% ±0.
*P<0.05 vs. veicolo vs stessa quantità di NaCl/Urea; °P<0.05 NaCl/Urea vs 0mEq/L

4.7 EPO INCREMENTA LA PERCENTUALE DI CELLULE T REGOLATORIE.

Le cellule T regolatorie (Treg) svolgono un ruolo cruciale nel controllo della risposta immune allogenica e nella prevenzione delle malattie autoimmune. Esistono due subset di cellule Treg: le Treg timiche, generate direttamente nel timo, e quelle indotte in periferia in presenza di TGF-β. Per testare l'effetto di NaCl ed EPO sull'induzione di queste Treg, abbiamo coltivato cellule T CD4⁺ naïve in presenza di monociti e con aCD3 mAb, IL2 e TGF-β in presenza di NaCl (20 e 40 mEq) o Urea (40 e 80 mEq) +/- EPO. Dopo cinque giorni di coltura è stato valutato l'espressione di FoxP3 in citometria.

Dall'analisi citofluorimetrica risulta un aumento della popolazione FoxP3⁺ in cellule trattate con EPO, rispetto a quelle trattate con NaCl, Urea o solo terreno. La popolazione T regolatoria aumenta ulteriormente in presenza di EPO e NaCl (**Fig. 14**).

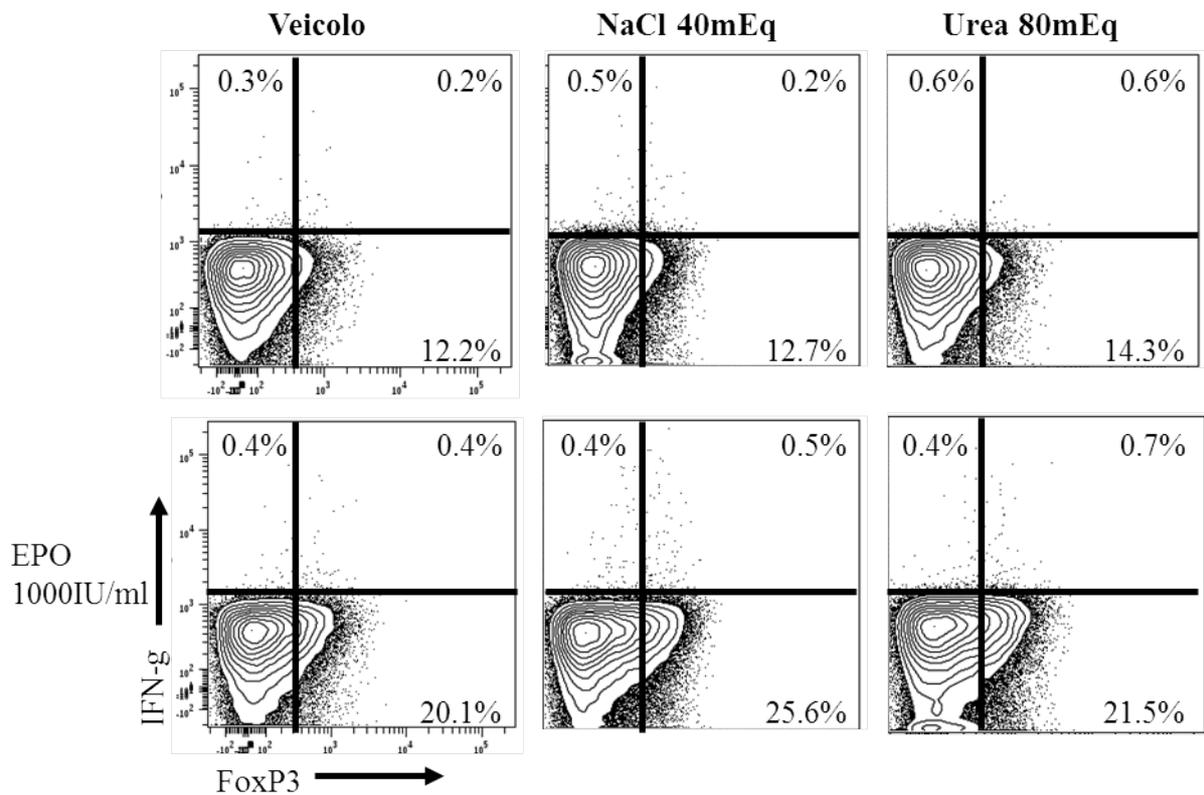


Fig. 13 Espressione di IFN- γ e FoxP3 in cellule T regolatorie indotte da Naïve CD4⁺. Le cellule sono state trattate con NaCl (20 e 40 mEq) o Urea (40 e 80 mEq). Esempio di gating eseguito sui CD4⁺, IFN- γ ⁺ e FoxP3⁺.

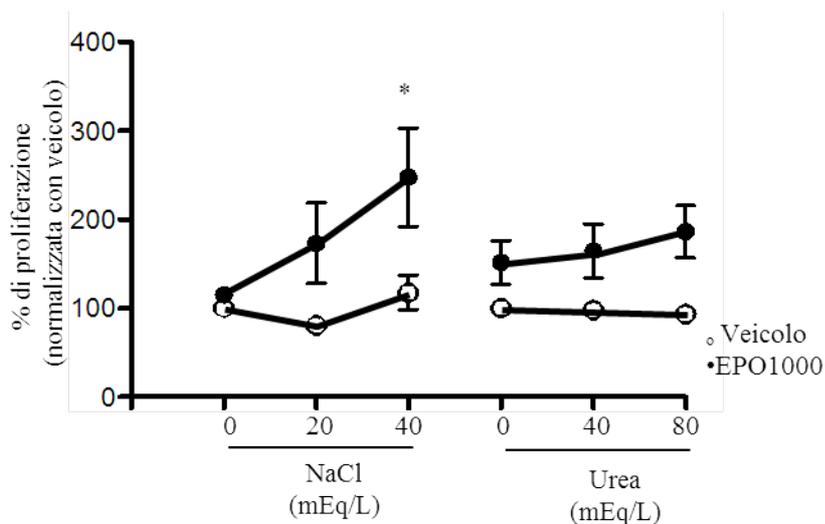


Fig. 14: Andamento della proliferazione di cellule CD4⁺, IFN- γ ⁺ e indotte da Naïve CD4⁺: NaCl 20 mEq 98% \pm 0.3, NaCl 40 mEq 101.3% \pm 2.6, Urea 40 mEq 98 \pm 0, Urea 80 mEq 97% \pm 0. In presenza di EPO 1000 IU/ml e veicolo 106% \pm 3.7, NaCl 20 mEq 113% \pm 7.9, NaCl 40 mEq 226.8% \pm 15.9, Urea 40 mEq 105.6% \pm 6.6 e Urea 80 mEq 107.22% \pm 6.3.
*P<0.05 vs. veicolo vs stessa quantità di NaCl/Urea; °P<0.05 NaCl/Urea vs 0mEq/L

4.8 EPO ED NaCl NON INFLUENZANO LA STABILITA' DELLE CELLULE T REGOLATORIE

Le cellule Treg generate da cellule T naïve hanno un fenotipo instabile e, in presenza di citochine infiammatorie, perdono l'espressione di Foxp3 e si convertono in cellule T effettrici. Per testare l'effetto di NaCl ed EPO sulla stabilità delle cellule Treg, abbiamo indotto Treg, e le abbiamo stimulate in colture secondarie con aCD3/aCD28 e IL-2, senza TGF- β . A distanza di tre giorni, circa il 50% delle cellule aveva perso l'espressione di Foxp3, un fenomeno che non era modificato da NaCl o EPO (Fig. 15).

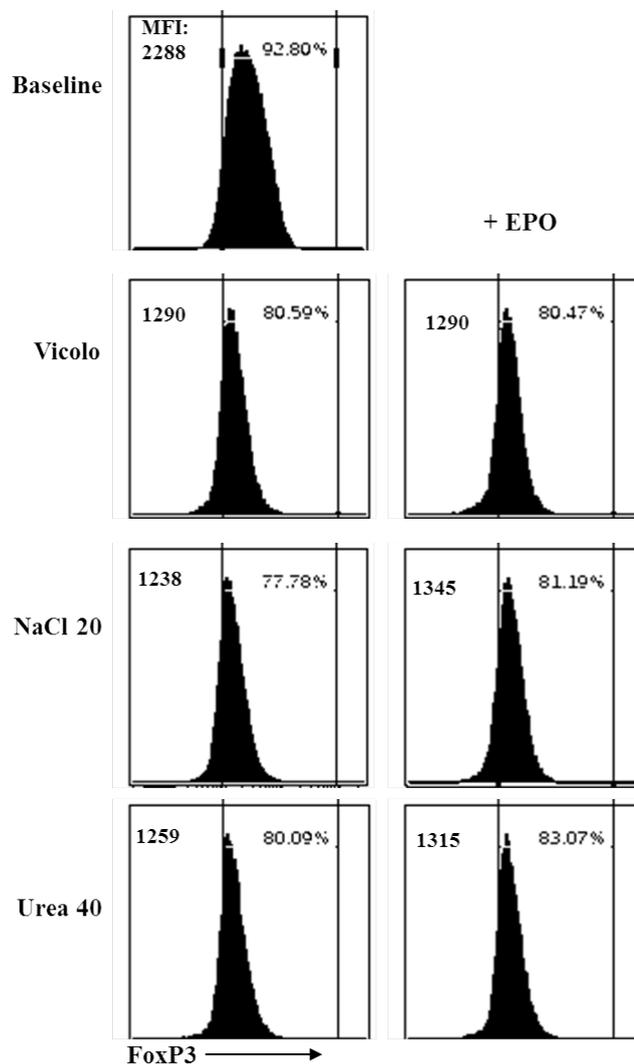


Fig.15. Stabilità delle cellule iTreg in presenza di NaCl +/- EPO. Cellule Treg indotte a partire da cellule T naïve CD4+ sono state isolate con metodica di flow-sorting e poi ristimate con aCD3/aCD28 mAb, IL-2 senza TGF- β , in presenza di NaCl, urea, con o senza EPO. Il flow plot è rappresentativo di esperimenti condotti su 2 donatori indipendenti.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Questo studio dimostra che il sale induce un aumento della proliferazione e del numero dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ attivati che viene prevenuto dalla presenza in coltura di EPO. L'immunosoppressione non è dovuta ad un aumento della apoptosi o necrosi cellulare, che rimangono invariate in cellule trattate con EPO, ma ad un diminuzione della proliferazione cellulare. Possiamo affermare che l'EPO non ha un effetto pro-apoptico in cellule CD4⁺ e CD8⁺ ma anti-proliferativo. Questo effetto è stato ulteriormente chiarito, in questo studio, anche in cellule T indotte in risposta sia ad uno stimolo allogenico sia tramite stimolo con aCD3/CD28. Inoltre, EPO è in grado di diminuire la produzione di IFN- γ , fondamentale per lo sviluppo di Th1, in seguito ad attivazione dei linfociti T, mentre non modifica l'induzione di cellule Th17. Da notare, EPO ed NaCl hanno effetti sinergistici sull'induzione di cellule iTreg.

Studi precedenti hanno dimostrato che EPO inibisce l'espansione di linfociti T umani inibendo il signaling dell'IL2. Questo finding ci ha indotti a ipotizzare che la produzione di EPO nel rene (organo dove i livelli di questo ormone sono più elevati) potesse costituire un meccanismo di tolleranza periferica. A livello renale, tuttavia, sono anche presenti elevati livelli di NaCl che potrebbero contrastare gli effetti di EPO. Gli studi presentati qui dimostrano che EPO continua ad esercitare effetti immunomodulanti anche in presenza di alte concentrazioni di NaCl.

La risposta immunitaria è mediata dall'interazione tra APC, cellule T CD4⁺ helper (Th) e cellule T regolatorie (Treg). Durante il priming le cellule T CD4⁺ possono essere polarizzate verso distinte sottopopolazioni di cellule effettrici: Th1, Th17 e Th2. Una polarizzazione corrispondente esiste anche per le cellule CD8⁺ citotossiche (Salgame et al., 1991). La polarizzazione a cellule Th1 è indotta da interferone- γ (IFN- γ) e interleuchina-12 (IL-12) e soppressa da IL-4; le cellule Th1 producono principalmente IL-2, IL-3, TNF- α (fattore α di necrosi tumorale) e IFN- γ e sono i principali regolatori della risposta cellulo-mediata per distruggere cellule tumorali o patogeni intracellulari (come virus e alcuni batteri). Le cellule Th1 sono coinvolte nello sviluppo di patologie autoimmuni e nelle reazioni di ipersensibilità ritardata (Abbas et al., 1996) e sono importanti anche nella patogenesi del rigetto acuto durante trapianto d'organo. Il fatto che EPO inibisca la proliferazione e la produzione di IFN- γ da parte di queste cellule anche in presenza di alte concentrazioni di NaCl supporta l'ipotesi che EPO sia implicata nel controllo della risposta immune a livello renale e possa spiegare perché il rene sia un organo immunologicamente meglio tollerato di altri che non producono EPO (ad esempio il cuore).

Un altro risultato importante della ricerca è la capacità dell'EPO di inibire l'induzione di Th17 indotta dal sale. Le cellule Th17 rappresentano una sottopopolazione identificata di recente (Harrington et al., 2005), il loro sviluppo è indotto da TGF- β e IL-6 (Bettelli et al., 2006), stabilizzato

e amplificato da IL-23 e inibito da IL-4 e IFN- γ . Sono la principale fonte di produzione di IL-17, un potente mediatore infiammatorio, ma secernono anche IL-22, IL-6 e TNF- α (Iwakura et al., 2006). I linfociti Th17 attivano le cellule coinvolte nella distruzione di batteri extracellulari e nell'infiammazione cronica, essi sono inoltre implicati nella patogenesi di malattie autoimmuni, come sclerosi multipla e psoriasi (Ye et al., 2001).

In altri lavoro, è stato dimostrato che un aumento delle concentrazioni di NaCl è in grado di promuovere la generazione di un tipo cellule Th17 ad alta patogenicità (O'Connell, R. M. et al, 2010) e queste in parte riescono a resistere alla soppressione delle cellule Treg grazie alla produzione di TNF- α e IL-6. Inoltre, le stesse Treg producono TGF- β che da un lato sopprime le cellule Th1 e Th2 regolando negativamente i loro rispettivi fattori di trascrizione (T-bet e GATA3), dall'altro regola positivamente ROR γ T e Foxp3 inducendo fenotipo Th17 e Treg. I nostri studi dimostrano che, l'effetto EPO

L'effetto di EPO e NaCl sulle cellule Treg è particolarmente interessante. Questa sottopopolazione specializzata di linfociti T controlla l'omeostasi dei linfociti T e mantiene la tolleranza verso il *self*. Le cellule Treg possono essere divise in due sottopopolazioni: le Treg naturali (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) che maturano nel timo, e le Treg inducibili, derivate o da cellule CD8⁺CD25⁻ o da CD4⁺ CD25⁻ in periferia, sotto l'influenza di cellule dendritiche semi-mature, IL-10, TGF- β e IL-2 (Mills et al., 2004). Queste cellule migrano selettivamente nelle sedi dove è richiesta un'azione immunosoppressiva, dove riconoscono e sono attivate dal loro antigene specifico. Qui interagiscono con le cellule effettrici autoreattive sia di tipo CD4⁺ che CD8⁺ per sopprimerne reversibilmente la funzionalità grazie alla produzione di citochine immunosoppressive o all'interazione cellula-cellula (Mempel et al., 2006). Qui abbiamo dimostrato, per la prima volta, che EPO è in grado di aumentare l'induzione di cellule regolatorie FoxP3⁺ in presenza di NaCl. Dati di soppressione cellulare dimostrano che le Treg indotte in presenza di EPO e/o NaCl sono funzionalmente simili alle Treg controllo indotte in assenza di questi stimoli.

A differenza delle cellule Treg naturali, le cellule Treg indotte in periferia hanno un fenotipo instabile ed in presenza di citochine infiammatorie possono acquisire caratteristiche di cellule T effettrici. In questo studio ci siamo quindi chiesti se NaCl ed EPO, che promuovono l'induzione di Treg, hanno anche un effetto sulla loro stabilità. Gli esperimenti in vitro non hanno dimostrato alcun effetto di NaCl o EPO sulla stabilità delle cellule Treg, a supporto del fatto che le Treg indotte in presenza di NaCl ed EPO sono simili a quelle controllo sia dal punto di vista funzionale che per quanto concerne la loro stabilità.

Nel complesso, i nostri dati rafforzano l'idea che EPO sia in grado di contenere l'effetto pro-infiammatorio indotto del sale, inibendo direttamente le cellule Th1 e Th17 e promuovendo l'induzione di Treg. Questo suggerisce che a livello renale, dove massime sono le concentrazioni sia

di NaCl che di EPO, EPO potrebbe svolgere un'azione di tolleranza periferica, analoga all'acido retinoico a livello intestinale (Cassani B. et al., 2011). I nostri studi quindi costituiscono un importante razionale per ulteriori lavori volti a caratterizzare ulteriormente gli effetti immunosoppressivi di EPO e ad esplorarne le potenzialita' terapeutiche come molecola antiinfiammatoria.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abbas AK, Murphy KM & Sher A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.
- Adeegbe D, Bayer AL, Levy RB, Malek TR. Cutting edge: allogeneic CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells suppress autoimmunity while establishing transplantation tolerance. *J Immunol* 2006; 176: 7149-53.
- Ascherio, A. & Munger, K. L. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann. Neurol.* 61, 504–513 (2007)
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL & Kuchroo VK. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.
- Blake T. J., Jenkins B. J., D'Andrea R. J., Gonda T. J. (2002). Functional cross-talk between cytokine receptors revealed by activating mutations in the extracellular domain of the beta-subunit of the GM-CSF receptor. *J. Leukoc. Biol.* 72, 1246–1255
- Boutin A.T., Weidemann A., Fu Z., Mesropian L., Gradin K., Jamora C., Wiesener M., Eckardt K.U., Koch C.J., Ellies L.G., Haddad G., Haase V.H., Simon M.C., Poellinger L., Powell F.L., Johnson R.S. Epidermal sensing of oxygen is essential for systemic hypoxic response. *Cell.* 2008;133:223–234.
- Brines M., Grasso G., Fiordaliso F., Sfracteria A., Ghezzi P., Fratelli M., et al. (2004). Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 14907–14912 10.1073/pnas.0406491101
- Buemi M, Nostro L, Romeo A, et al. From the oxygen to the organ protection: erythropoietin as protagonist in internal medicine. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2006; 4: 299-311.
- Cassani B, Villablanca EJ, De Calisto J, Wang S, Mora JR. Vitamin A and immune regulation: role of retinoic acid in gut-associated dendritic cell education, immune protection and tolerance. *Mol Aspects Med.* 2012 Feb;33(1):63-76. doi: 10.1016/j.mam.2011.11.001. Epub 2011 Nov 22. Review.
- Chen Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17 producing cells. *Nat Rev Immunol* 2006;6:329-33.
- Chen, S. et al. Tonicity-dependent induction of Sgk1 expression has a potential role in dehydration-induced natriuresis in rodents. *J. Clin. Invest.* 119, 1647–1658 (2009).
- Christensen B., Lundby C., Jessen N., Nielsen T. S., Vestergaard P. F., Moller N., et al. (2012a). Evaluation of functional erythropoietin receptor status in skeletal muscle in vivo:

acute and prolonged studies in healthy human subjects. PLoS ONE 7:e31857
10.1371/journal.pone.0031857

- Chu CY, Cheng CH, Yang CH, Huang CJ. Erythro- poietins from teleosts. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 3545-52.
- Codarri, L. et al. ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature Immunol.* 12, 560–567 (2011).
- Cravedi P., Manrique J., Hanlon KE., Reid-Adam J., Brody J., Prathuangsuk P., Mehrotra A., Heeger PS.. Immunosuppressive effects of erythropoietin on human alloreactive T cells. *J Am Soc Nephrol.* 2014 Sep;25(9):2003-15. doi: 10.1681/ASN.2013090945. Epub 2014 Mar 27.
- De Maria R., Zeuner A., Eramo A., Domenichelli C., Bonci D., Grignani F., Srinivasula S.M., Alnemri E.S., Testa U., Peschle C. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature.* 1999;401:489–493.
- Eckardt K.U., Kurtz A. Regulation of erythropoietin production. *Eur. J. Clin. Invest.* 2005;35(Suppl 3):13–19.
- Haase V.H. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 2010;299:F1–13
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM & Weaver CT. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6, 1123-1132.
- Hirose S, Takahashi M, Ogawa R, Morimoto H, Izawa A, Sato H, Ise H, Hongo M, Ikeda U.: Erythropoietin attenuates the development of experimental autoimmune myocarditis. *Cardiovasc Drugs Ther* 21: 17–27, 2007
- Iwakura Y & Ishigame H. (2006). The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 116, 1218-1222.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; 292: 468-72. Epub 2001 Apr 5.
- Jelkmann W. Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production. *J. Interferon Cytokine Res.* 1998;18:555–559.
- Krantz SB. Erythropoietin. *Blood* 1991; 77: 419–434
- La Ferla K., Reimann C., Jelkmann W., Hellwig-Burgel T. Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF-kappaB. *FASEB J.* 2002;16:1811–1813.

- Lisowska KA, Frackowiak JE, Mikosik A, Witkowski JM: Changes in the expression of transcription factors involved in modulating the expression of EPO-R in activated human CD4-positive lymphocytes. *PLoS ONE* 8:e60326, 2013
- Liu Y., Pop R., Sadegh C., Brugnara C., Haase V.H., Socolovsky M. Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. *Blood*. 2006;108:123–133
- Machnik, A. et al. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nature Med.* 15, 545–552 (2009).
- Markus Kleinewietfeld, Arndt Manzel, Jens Titze, Heda Kvakan, Nir Yosef, Ralf A. Linker, Dominik N. Muller & David A. Hafler, Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. doi:10.1038/nature11868, 2013
- Mempel TR, Pittet MJ, Khazaie K, Weninger W, Weissleder R, von Boehmer H & von Andrian UH. (2006). Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. *Immunity* **25**, 129-141.
- Mills KH. (2004). Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* **4**, 841-855.
- Noguchi C. T., Bae K. S., Chin K., Wada Y., Schechter A. N., Hankins W. D. (1991). Cloning of the human erythropoietin receptor gene. *Blood* 78, 2548–2556
- O’Connell, R. M. et al. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity* 33, 607–619 (2010).
- Paus R, Bodó E, Kromminga A, Jelkmann W. Erythropoietin and the skin: a role for epidermal oxygen sensing? *Bioessays* 2009; 3: 344-8.
- Penta K., Sawyer S. T. (1995). Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation, nuclear translocation, and DNA binding of STAT1 and STAT5 in erythroid cells. *J. Biol. Chem.* 270, 31282–31287 10.1074/jbc.270.52.31282
- Pevny L., Simon M.C., Robertson E., Klein W.H., Tsai S.F., D’Agati V., Orkin S.H., Costantini F. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature*. 1991;349:257–260.
- Ramadori P., Ahmad G., Ramadori G. Cellular and molecular mechanisms regulating the hepatic erythropoietin expression during acute-phase response: a role for IL-6. *Lab. Invest.* 2010;90:1306–1324.
- Rebecchi, M.J. and S.N. Pentylala, Structure, function, and control of phosphoinositide specific phospholipase C. *Physiol Rev*, 2000. 80(4): p. 1291-335.

- Rocha S. Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends Biochem Sci* 2007;32(8):389-97
- Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL & Bloom BR. (1991). Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* **254**, 279-282.
- Semenza GL. Involvement of oxygen-sensing pathways in physiological and pathological erythropoiesis. *Blood* 2009 Jun 3.
- Singh S, Verma R, Pradeep A, Leu K, Mortensen RB, Young PR, Oyasu M, Schatz PJ, Green JM, Wojchowski DM: Dynamic ligand modulation of EPO receptor pools, and dysregulation by polycythemia-associated EPOR alleles. *PLoS ONE* 7: e29064, 2012
- Waldmann H, Adams E, Fairchild P, Cobbold S. Infectious tolerance and the long-term acceptance of transplanted tissue. *Immunol Rev* 2006; 212: 301-13.
- Wan G, Wei B. Erythropoietin regulates Treg cells in asthma through TGF β receptor signaling. *Am J Transl Res.* 2015 Nov 15;7(11):2305-15.
- Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 1995; 270: 1230-7.
- Weiss G., Goodnough L.T. Anemia of chronic disease. *N. Engl. J. Med.* 2005;352:1011–1023.
- Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* 2003; 17: 271-3. Epub 2002 Dec 17.
- Wu H et al. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 1995; 83: 59–67.
- Wu Y., Borde M., Heissmeyer V., Feuerer M., Lapan A.D., Stroud J.C., Bates D.L., Guo L., Han A., Ziegler S.F., Foxp3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. 2006. *Cell.* 126:375-387
- Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ & Kolls JK. (2001). Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXCL12/CXCL13 chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 194, 519-527.