

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE NEFROLOGICHE**

Ciclo XXI

Settore Concorsuale di afferenza: O6/D2

Settore Scientifico disciplinare: MED/14

**LA TERAPIA CON CELLULE MESENCHIMALI STROMALI E LISINOPRIL
RIDUCE LA FIBROSI TUBULOINTERSTIZIALE IN UN MODELLO DI
OSTRUZIONE URETERALE MONOLATERALE NEL RATTO**

Presentata da: Giulia Bedino

Coordinatore Dottorato

Chiar.mo Prof. S. Mattioli

Relatore

Chiar.mo Prof. G. La Manna

Esame finale anno 2014

INDICE

Introduzione	pag.1
Materiali e Metodi:	pag.8
<ul style="list-style-type: none">• Animali• Isolamento e coltura delle MSC• Immunocitochimica , caratterizzazione e differenziazione osteogenica e adipogenica delle MSC• Disegno sperimentale• Procedura chirurgica• Localizzazione delle cellule EGFP positive• Immunocistochimica (ED1, FSP1)• Ang II siero ELISA• TUNEL• RT-PCR• IL6 siero e TGFb tessuto	
Risultati:	pag. 21
<ul style="list-style-type: none">• Caratterizzazione MSC• Creatinina• Angiotensina II siero• Renina• TGF b• ED1• IL6 siero?• Diametri tubulari (manca 21)• FSP1(manca 21)• Fibrosi (sirius red/masson 21?)• Integrità membrane basale (%tubuli rotti)• TUNEL	
Discussione	pag. 25
Figure e legende	pag. 33
Bibliografia	pag. 47

INTRODUZIONE

La malattia renale cronica (MRC) è un problema emergente di salute pubblica su scala mondiale [1], la sua prevalenza è stimabile intorno al 20% negli USA [2] e al 13% in Italia [3] tanto che diversi Autori la definiscono ormai una vera e propria epidemia. Questo dato, insieme con la dimostrazione del suo importante effetto sulla morbilità e mortalità cardiovascolare [4] negli ultimi anni ha catalizzato sforzi convergenti di specialisti e ricercatori di diversi ambiti.

Tuttavia, nonostante nella maggior parte dei casi l'identificazione della MRC avvenga in stadi precoci non esistono al momento attuale farmaci in grado di bloccare la progressione della malattia renale.

Indipendentemente dalla eziologia, l'evoluzione finale della MRC conduce ad un quadro istopatologico comune di fibrosi renale con diffuso accumulo di matrice extracellulare e perdita della normale architettura dei comparti tubulointestiziale e glomerulare. In particolare la fibrosi tubulointerstiziale rappresenta la caratteristica tipica della insufficienza renale cronica e correla strettamente con il grado di deterioramento della funzione renale. Infatti, in un campione biotico, l'estensione della fibrosi tubulointerstiziale rappresenta il fattore prognosticamente più rilevante rispetto al coinvolgimento del comparto glomerulare [5].

Il modello sperimentale dell'ostruzione ureterale monolaterale (unilateral ureteral

obstruction, UUO) è il modello standard per lo studio della fibrosi tubulointerstiziale.

I vantaggi di usare l'UUO come modello di fibrosi includono: l'assenza di tossine esogene, la mancanza di un ambiente uremico, di ipertensione, proteinuria o iperlipemia. Inoltre la vita dell'animale non è compromessa perchè il rene controlaterale mantiene o addirittura incrementa la sua funzionalità come conseguenza di un'ipertrofia anatomica e funzionale compensatoria.

I meccanismi fisiopatologici che conducono al danno nell'UUO comprendono l'infiltrazione infiammatoria monocito-macrofagica e un'importante vasocostrizione del letto vascolare renale con conseguente riduzione del flusso plasmatico e del GFR. L'attivazione del sistema renina-angiotensina intrarenale determina la produzione di angiotensina II (ANG II) che rappresenta il mediatore chiave del danno. Infatti l'ANG II promuove la fibrosi attraverso l'attivazione del NF-Kb che determina l'aumentata produzione di citochine profibrotiche e proapoptotiche, tra le quali TNF α e TGF β . Queste citochine agiscono: - sulle cellule epiteliali tubulari determinando apoptosi e quindi atrofia tubulare, - sui fibroblasti interstiziali renali determinando attivazione e proliferazione, - sulle cellule infiammatorie con azione chemotattica e quindi automantenimento del danno, - sulle cellule renali residenti, epiteliali ed endoteliali, inducendo trasformazione fenotipica in senso fibromesenchimale. I fibroblasti attivati

aumentano la produzione di componenti della matrice extracellulare (ECM) portando ad una progressiva fibrosi interstiziale. Questo processo è ulteriormente aumentato da una diminuzione della degradazione degli ECM mediata dal plaminogen-activator inhibitor (PAI-1). L'ANG II determina inoltre produzione di specie reattive dell'ossigeno aumentando lo stress ossidativo e quindi aggravando il danno tubulare e l'apoptosi delle cellule endoteliali determinando perdita di capillari tubulari peggiorando l'ipossia e l'ischemia [6,7].

Nell'ambito di nuove strategie terapeutiche ha suscitato un enorme interesse l'utilizzo di cellule mesenchimali staminali (MSC). Per questo motivo nella prima parte di questo studio abbiamo voluto valutare l'effetto dell'infusione di MSC in un modello di nefropatia cronica quale l'UUO.

Le cellule mesenchimali staminali (MSC) sono cellule pluripotenti, che possono essere isolate dal midollo osseo dell'adulto, dal tessuto adiposo e dai tessuti fetali. In particolari condizioni di coltura esse sono in grado di differenziarsi in una grande varietà di linee cellulari quali osteociti, adipociti, condrociti, miociti, cellule epiteliali, cellule del tessuto nervoso **(8-10)** e, grazie alla loro capacità di aderire ad un substrato di materia plastica, sono facilmente espandibili *in vitro* in quantità potenzialmente utili per applicazioni terapeutiche **(11-16)**.

Recentemente la Società Internazionale della Terapia Cellulare ha rinominato le Mesenchymal Stem Cells in Mesenchymal Stromal Cells definendo come criteri di identificazione la capacità di aderire alla plastica, la capacità di differenziarsi in osteociti, condrociti e adipociti, l'espressione sulla superficie dei markers quali CD105, CD73, CD90, l'assenza sulla superficie dei markers CD45, CD34, CD14, CD79 e di HLA-DR (17).

Numerosi studi *in vivo* hanno dimostrato che l'infusione di MSC in seguito ad un danno d'organo contribuisce alla rigenerazione di tessuti come il rene, muscolo, cuore, osso, fegato (18-21). Tale effetto inizialmente è stato attribuito alla capacità di MSC di migrare nei tessuti danneggiati e di differenziarsi in cellule mature, successivamente è stato dimostrato un meccanismo di tipo paracrino e/o endocrino (22-25).

Le MSC non esprimono sulla loro superficie gli antigeni MHC classe I, le molecole costimolatorie CD40, CD80, CD86 ed esprimono solo moderatamente gli antigeni MHC della classe II; per tale motivo esse riescono a sfuggire al riconoscimento da parte dei linfociti T alloreattivi e delle cellule natural killer (26-32). Inoltre hanno un effetto inibitorio diretto sulle cellule del sistema immune: linfociti T, linfociti B, cellule dendritiche e natural killer (33-39). Considerati gli effetti antinfiammatori ed immunosoppressivi di MSC il loro uso è stato sperimentato in numerosi modelli di malattia renale, come l'insufficienza renale

acuta da cisplatino e glicerolo (40-43), l'insufficienza renale acuta da ischemia-riperfusion (44-45), la glomerulonefrite anti Thy1.1 nel ratto (46-47).

Se finora molti sono stati gli studi che hanno provato l'efficacia della terapia con MSC in modelli di malattia renale acuta il loro effetto nella malattia renale cronica è ancora in parte sconosciuto.

Choi et al hanno valutato l'effetto di MSC in un modello di nefrectomia 5/6 [48]. I risultati hanno mostrato una riduzione della proteinuria nel gruppo di ratti trattati con MSC, nessuna differenza nella estensione della fibrosi, atrofia tubulare ed infiltrato infiammatorio.

Nello stesso modello Semedo et al hanno dimostrato invece un ruolo antifibrotico delle MSC [49] attraverso la riduzione di TGF β e TNF α .

Asanuma et al [50] hanno studiato l'effetto delle MSC in un modello di UUO attraverso l'iniezione delle cellule nell'arteria renale. I risultati di questo studio hanno mostrato un miglioramento della fibrosi nel gruppo di ratti trattato verso i controlli in termini di riduzione dell'espressione di α -SMA, contenuto di collagene, numero di cellule FSP-1 positive ed una riduzione del TNF α su tessuto; non risultavano tuttavia modificati i livelli di TGF β e altre citochine profibrotiche. Un grosso limite di questo lavoro tuttavia è rappresentato dalla via di somministrazione che, se da un lato favorisce un diretto ingresso delle cellule nel rene, dall'altro risulta poco ripetibile in un contesto clinico sull'uomo.

Dati e i risultati incoraggianti ottenuti negli esperimenti preliminari sull'utilizzo delle MSC in UUO abbiamo voluto in un secondo tempo studiare una terapia di combinazione che prevedesse l'utilizzo di MSC insieme ad una classe di farmaci di prima linea nella MRC [51-52] e che sono stati ampiamente studiati in questo modello di fibrosi renale quali gli ACE inibitori. **Infatti i risultati in termini di riduzione della fibrosi e dell'apoptosi nel modello della UUO sono considerevoli per tutti i farmaci che hanno come target il sistema renina-angiotensina, inclusi inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (angiotensin-converting enzyme ACEi) e antagonisti recettoriali dell'ANG II (angiotensin receptor blockers, ARB [53-59].**

Tuttavia i loro effetti risultano al massimo in un rallentamento della progressione, non certo arresto o addirittura guarigione del danno cronico. In particolare uno dei maggiori svantaggi degli ACEi è l'aumento compensatorio della renina [60], enzima che promuove il danno renale non solo stimolando la produzione di ANG II, ma anche attraverso un'attività cellulare diretta attraverso il recettore renina/prorenina. E' stato dimostrato infatti che l'attivazione del recettore renina/prorenina determina una cascata intracellulare con effetti proliferativi e profibrotici indipendenti dalla ANGII e quindi non inibiti dagli ACEi o ARB [61-62].

Nella seconda parte dello studio quindi allo scopo di comprendere meglio il ruolo

di MSC nella malattia renale cronica abbiamo valutato l'effetto della infusione endovenosa di MSC in un modello sperimentale di ostruzione ureterale monolaterale nel ratto comparandolo alla terapia con ACEi e valutando se la combinazione delle due terapie producesse effetti sinergici e additivi e attraverso quali meccanismi questo si esplicasse.

MATERIALI E METODI

ANIMALI

L'ostruzione ureterale unilaterale è stata eseguita su ratti Sprague-Dawley femmine, di quattro settimane (Charles River, Calco, Italia), con peso corporeo compreso tra 200 e 250 gr.

Ratti Sprague-Dawley transgenici (SD), che esprimono enhanced green fluorescent protein (EGFP) (Japan Slc, Inc, Hamamatsu, Japan) (43), sono stati usati come donatori di MSC.

ISOLAMENTO E COLTURA DI MSC

Il sacrificio dei ratti Sprague Dawley transgenici per EGFP è stato eseguito mediante inalazione di CO₂. Il midollo osseo dei femori e delle tibie è stato prelevato dalle ossa usando una siringa con ago 26-gauge.

Le cellule midollari EGFP positive sono state contate, piastrate ad una concentrazione di 10⁶ cellule/ml con mezzo di coltura Murine MesenCult (STEMCELL Technologies, Vancouver, BC, Canada) ed incubate a 37°C in atmosfera umidificata con CO₂ al 5%. Dopo 48 ore di coltura, le cellule non aderenti sono state eliminate, è stato aggiunto nuovo mezzo di coltura, che poi è

stato sostituito due volte a settimana. Raggiunta la subconfluenza, le cellule aderenti sono state lisate con tripsina 0,05% (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) e sono state nuovamente piastrate ad una concentrazione compresa tra $0,05 \times 10^5$ /ml e $0,15 \times 10^5$ /ml in mezzo MesenCult per diversi passaggi.

*IMMUNOISTOCHEMICA, CARATTERIZZAZIONE E
DIFFERENZIAZIONE OSTEOGENICA E ADIPOGENICA DI MSC*

Le MSC EGFP positive coltivate a partire dal terzo passaggio sono state valutate mediante citometria a flusso per CD90, CD73, CD105 e CD45, CD11b, CD34, CD79, HLADR (Becton Dickinson, San Josè, CA) usando il citometro a flusso FacsCalibur (BD Biosciences, San Josè, CA).

Al fine di indurre osteogenesi 3×10^6 cellule/cm² sono state seminate in mezzo standard e coltivate con mezzo osteogenico per MSC (Cambrex, Walkersville, MD) cambiando lo stesso ogni 3 giorni per un periodo di 14 giorni. L'analisi istochimica delle cellule è stata effettuata valutando i depositi di calcio (colorazione Alizarin rosso) al microscopio.

Per l'induzione della differenziazione in senso adipogenico 2×10^4 MSC/cm² sono state seminate in mezzo MesenCult. Raggiunta la confluenza le cellule sono state stimulate per 3 settimane con mezzo adipogenico, sostituendolo ogni 3 giorni. Le cellule sono state colorate con colorazione Oil-red O e successivamente

osservate al microscopio.

DISEGNO SPERIMENTALE

Nella prima fase dello studio sono stati valutati 3 gruppi di ratti:

- Gruppo A (sham): 8 ratti sham operati
- Gruppo B (vehicle): 8 ratti Sprague-Dawley sono stati sottoposti a ligatura dell'uretere destro al giorno 0, immediatamente dopo la UUO è stato somministrato 1 ml di soluzione fisiologica nella vena della coda.
- Gruppo C (MSC): 8 ratti Sprague-Dawley sono stati sottoposti a ligatura dell'uretere destro al giorno 0, immediatamente dopo la UUO è stato somministrato 1 ml di PBS contenente 3×10^6 MSC nella vena della coda.

Di ciascun gruppo 4 ratti sono stati sacrificati al giorno 6 e 4 ratti al giorno 21. Subito dopo il sacrificio sono stati prelevati sia il rene ostruito che il rene controlaterale per gli studi istomorfologici. I reni sono stati divisi a metà una parte è stata fissata in una soluzione neutra di formalina al 10% e l'altra congelata in azoto liquido.

Nella seconda fase dello studio sono stati aggiunti ai gruppi precedenti i seguenti gruppi:

- Gruppo D (ACEi): 8 ratti Sprague-Dawley sono stati sottoposti a ligatura dell'uretere destro al giorno 0 e trattati con lisinopril (100 mg/L) sciolto in acqua

da bere per tutto il periodo di osservazione

- Gruppo E (MSC+ACEi): 8 ratti Sprague-Dawley sono stati sottoposti a ligatura dell'uretere destro al giorno 0 e trattati con lisinopril (100 mg/L) sciolto in acqua da bere per tutto il periodo di osservazione e immediatamente dopo la UUO è stato somministrato 1 ml di PBS contenente 3×10^6 MSC nella vena della coda.

Anche in questo caso di ciascun gruppo 4 ratti sono stati sacrificati al giorno 7 e 4 ratti al giorno 21, subito dopo il sacrificio sono stati prelevati sia il rene ostruito che il rene controlaterale per gli studi istomorfologici. I reni sono stati divisi a metà una parte è stata fissata in una soluzione neutra di formalina al 10% e l'altra congelata in azoto liquido.

Gli esperimenti sono stati condotti secondo le linee guida del nostro comitato etico per gli studi su animali, con libero accesso all'acqua e dieta standard, a temperatura ambiente (20°C) e umidità costanti, con un ciclo luce/buio controllato.

I ratti sono stati stabulati in gabbie metaboliche nei giorni -1, 0, 6 e 20 al fine di raccogliere le urine delle 24 ore. Negli stessi giorni i ratti sono stati pesati, è stato misurata la quantità di cibo e di acqua introdotta e sono stati eseguiti i prelievi ematici. I campioni di urine e di siero sono stati conservati a -20°C.

PROCEDURA CHIRURGICA

L'anestesia è stata indotta e mantenuta con iniezione intramuscolo di Zolazepam-Tiletamina (Zoletil, Virbac, Milano). Dopo un'incisione mediana, il rene destro è stato delicatamente esposto; l'uretere è stato isolato ed è stato utilizzato un filo di seta 5-0 per eseguire la ligatura dell'uretere stesso. La laparotomia è stata quindi chiusa con un filo da sutura di seta 3/0. Al termine della procedura è stato somministrato nella vena della coda 1 ml di soluzione fisiologica nei ratti del gruppo MSC- e 1 ml di PBS contenente 3×10^6 MSC nei ratti del gruppo MSC+. Gli animali sono stati posizionati in gabbia metabolica per la raccolta della diuresi e monitorati attentamente fino al risveglio dall'anestesia.

FUNZIONE RENALE

La creatininemia è stata misurata al giorno 0, 6 e 21 con metodica automatizzata (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL).

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Sezioni sagittali di reni fissati in formalina ed inclusi in paraffina sono state tagliate al microtomo ad uno spessore di 3 μm e poi raccolte su vetrini "superfrost plus" (Thermo Scientific, Braunschweig, Germania). Dopo asciugatura in stufa a 60°C per circa 30 minuti, le sezioni sono state reidratate

mediante passaggi nella scala discendente degli alcoli (xilene, etanolo 100, 95, 80, 70%) e passate rapidamente in acqua distillata.

CONCENTRAZIONE PLASMATICA DI ANGIOTENSINA II

Per misurare la concentrazione plasmatica dell'Angiotensina II è stato utilizzato l'Angiotensin II-EIA kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA, USA).

IMMUNOISTOCHEMICA (ED1, FSP1)

Antigene ED1-Dopo idratazione nella scala discendente degli alcoli, le sezioni sono state incubate in H₂O₂ al 3% in acqua distillata per 10 min (inibizione delle perossidasi endogene). Dopo breve lavaggio in PBS, le sezioni sono state processate al microonde (2.5 cicli di 5 min a 480 watts in tampone citrato 10mM, pH 6.0) per lo smascheramento dell'antigene, nuovamente lavate in PBS ed incubate overnight a 4°C con anticorpo monoclonale anti-CD68 (ED1, AbD Serotec, Kidlington, UK) diluito 1:100 in Dako REAL Antibody Diluent (Dako, Glostrup, Danimarca). Gli immunocomplessi sono stati visualizzati mediante il complesso biotina-streptavidina-perossidasi (Dako), la immunocolorazione con 3,3 diaminobenzidina (Dako). Le sezioni sono state infine controcolorate con ematossilina di Harris (Carlo Erba).

Il controllo negativo consisteva nella omissione dell'anticorpo primario nella reazione antigene-anticorpo.

Le cellule positive per ED1 sono state contate ad alto ingrandimento (X400) utilizzando un microscopio Olympus IX8 collegato a CCD camera e software di analisi dell'immagine "Cell-R" .

FSP-1- Dopo idratazione nella scala discendente degli alcoli, le sezioni sono state incubate in H₂O₂ al 3% in acqua distillata per 10 min (inibizione delle perossidasi endogene). Dopo breve lavaggio in PBS, le sezioni sono state processate al microonde (2.5 cicli di 5 min a 480 watts in tampone citrato 10mM, pH 6.0) per lo smascheramento dell'antigene, nuovamente lavate in PBS ed incubate con anticorpo policlonale diretto contro S100-A4 (FSP-1, 1:200; DAKO Cyto- mation, Carpinteria, CA) per 1 ora a 37 gradi. Le sezioni sono state lavate e incubato con anticorpo secondario (goat anti rabbit; 1:50) per 30 minuti. Gli immunocomplessi sono stati visualizzati mediante il complesso biotina-streptavidina-perossidasi (Dako), la immunocolorazione con 3,3 diaminobenzidina (Dako). Le sezioni sono state infine controcolorate con ematossilina di Harris (Carlo Erba). Il controllo negativo consisteva nella omissione dell'anticorpo primario nella reazione antigene-anticorpo. Le cellule positive per FSP-1 sono state contate ad alto ingrandimento (X400) utilizzando un microscopio Olympus IX8 collegato a CCD camera e software di analisi dell'immagine "Cell-R" .

*IDENTIFICAZIONE DELLE CELLULE APOPTOTICHE CON
METODICA “TUNEL”*

I vetrini idratati in scala discendente degli alcoli sono stati permeabilizzati per 8 minuti in acqua distillata contenente lo 0.1% di Triton X-100 e lo 0.1% di sodio citrato e quindi incubati a 37°C per 30 minuti in una soluzione di proteinasi K 10 µg/mL in Tris/HCl 10 mM pH 7.4-7.8. Dopo lavaggi in PBS, ciascuna sezione è stata incubata con 20 µL di “TUNEL reaction mixture” (da “*In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein”, Roche, Mannheim, Germania) per 1 h a 37°, al buio in camera umida. Dopo lavaggi in PBS, i vetrini asciugati all’aria sono stati montati con VECTASHIELD® Mounting Medium con DAPI (VECTOR Laboratories, Burlingame, USA).

Le cellule tunel-positive sono state contate ad alto ingrandimento (X400) utilizzando un microscopio a fluorescenza Nikon E400 collegato con camera digitale (DN Digital Net Nikon) (Nikon, Giappone).

Sono state contate le cellule TUNEL + in 10 campi a 400X per ogni animale (corrispondenti a 1 mm² di tessuto) ed espresse quindi come media di positività per campo e come numero totale di cellule positive per mm².

DIAMETRI TUBULARI

I vetrini sono stati immersi per alcuni secondi in Ematossilina di Harris (Carlo Erba, Rodano, Italia), quindi sciacquati in acqua di rete tiepida per 5 minuti. Successivamente sono stati posti per 2 minuti in soluzione colorante di Eosina (Carlo Erba), infine sciacquati brevemente in acqua di rete fredda.

Dopo rapida disidratazione in scala ascendente degli alcoli, i vetrini sono stati montati con balsamo DPX (VWR International, Poole, Inghilterra) e lasciati asciugare. 10 campi/sezione sono stati osservati (ingrandimento X200) al microscopio ottico (Olympus BX51), si sono acquisite le immagini in formato digitale (Olympus Camedia Digital Camera) (Olympus, Segrate, Italia), e sono stati misurati i diametri tubulari mediante il programma Image J (NIH, Bethesda, USA). Con lo stesso metodo abbiamo quantificato la percentuale di tubuli con rottura della membrana basale.

FIBROSI RENALE: COLORAZIONE DI MASSON

Per la colorazione è stato utilizzato un kit commerciale (Bio-Optica, Milano). Dopo aver deparaffinato ed idratato le sezioni, sono state trattate per 10 minuti con Ematossilina ferrica sec. Weigert, sol. B ed Ematossilina ferrica sec. Weigert, sol. A. I vetrini sono stati sgocciolati e sulle sezioni è stato posto acido picrico in soluzione alcolica e lasciato agire per 4 minuti. In seguito ad un rapido lavaggio in acqua distillata è stata posta sulle sezioni fucsina di Ponceau B per 4

minuti. I vetrini sono stati lavati in acqua distillata e subito sono stati trattati con Acido fosfomolibdico al 1% per 10 minuti. Senza sciacquare, i vetrini sono stati sgocciolati e trattati con verde luce allo 0,3% per 5 minuti. Le sezioni sono state lavate in acqua distillata e quindi disidratate rapidamente attraverso la serie ascendente di alcol sostando 1 minuto nell'ultimo assoluto. L'ultimo passaggio è stato effettuato in xilene ed i vetrini sono poi stati montati con Histochoice® Mounting Media (Amresco). Con metodo semiquantitativo utilizzando il programma Image J (NIH, Bethesda, USA) e' stato quantificato il volume dell'interstizio in 10 separati campi microscopici non sovrapposti per ottenere uno score medio in ogni singolo animale. Lo score istologico indica l'estensione del volume interstiziale , Score 1 < 25%, score 2 26-50%, score 3 51-75%, score 4 >76%.

LIVELLI TESSUTALI DI TGF β

Sono stati determinati i livelli tessutali di e TGF β su proteine estratte da omogenato di corticale renale usando metodica ELISA (R and D Systems, Minneapolis, MN). Il TGF β latente e' stato attivato aggiungendo HCl 1 N ad ogni campione in una diluizione 1:25 per 60 min. Ogni campione e' stato poi neutralizzato con NaOH 1 N e immediatamente testato. Ogni campione e' stato

testato in duplicato. I risultati finali sono stati espressi come pg di TGF β per mg di proteina.

ESTRAZIONE DELL'RNA e REAL TIME-PCR

L'RNA totale e' stato estratto dal tessuto renale usando trizol e guanidine-based RNeasy® Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Tutto l'RNA e' stato trattato con DNase dal RNase-Free DNase Set (QIAGEN) e dissolto in acqua nuclease free. L' RNA estratto e' stato testato per quantita' ed integrita' con analisi spettrofotometrica (NanoDrop, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Un totale di 1 μ g of RNA per condizione e' stato retrotrascritto a complementare DNA (cDNA) attraverso 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche Applied Science, USA). cDNA e' stato usato per effettuare la real-time PCR in piastra da 96-well, usando ABI prism 5700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) e il 5_exonuclease assay (TaqMan technology) in un volume di 25 μ l di reazione contenente Taqman Universal Master Mix, e gli specifici reverse primers per beta-actina e renina dall' Assay on Demand (Applied Biosystems). Controlli includevano real-time PCR acqua al posto di cDNA. I risultati venivano analizzati usando un metodo comparativo, e i valori normalizzati per l'espressione di beta-actina e convertiti in fold change.

ANALISI STATISICA

ANOVA seguita dal test Newman-Keuls è stata utilizzata per paragonare le variabili non parametriche mentre il t test di Student è stato utilizzato per paragonare le medie delle variabili continue.

RISULTATI

CARATTERIZZAZIONE DELLE MSC DI RATTO

MSC isolate dal midollo osseo di ratti Sprague-Dawley EGFP sono state caratterizzate con metodiche di immunistochemica per la loro capacità di differenziare in cellule osteogeniche ed adipogeniche quando coltivate in condizioni appropriate (figura 1). L'analisi citofluorometrica ha mostrato che le MSC erano positive per CD90 ($\geq 95\%$), CD73 ($\geq 95\%$) e CD105 ($\geq 95\%$), ed erano negative per CD45 ($< 5\%$), CD11b ($< 5\%$), CD34 ($< 5\%$), CD79 ($< 5\%$), e HLA DR.

FUNZIONE RENALE

Abbiamo valutato la funzione renale misurando i livelli di creatininemia. I risultati sono rappresentati nella figura 2. La creatinina non mostrava differenze significative tra i diversi gruppi di trattamento, tuttavia risultava incrementata in tutti i gruppi sottoposti a UUO rispetto ai controlli sham operati (sham operativi vs tutti i gruppi UUO $p < 0.05$).

CONCENTRAZIONE PLASMATICA DI ANGIOTENSINA II

Abbiamo valutato la concentrazione di ANGII plasmatica per comprendere se MSC

avessero effetti sul RAS. I livelli sierici dell'ANGII aumentavano significativamente nel gruppo di ratti sottoposti a UUO e trattati con solo veicolo (B 1.50 ± 0.49 ng/ml) rispetto al gruppo di ratti sham operati (A 0.6 ± 0.27 ng/ml, $p < 0.001$), la monoterapia con MSC induceva una riduzione dell'ANGII rispetto al gruppo B (C 1.27 ± 0.56 ng/ml), ma la terapia con ACEi (D 0.31 ± 0.01 ng/ml) e la terapia combinata MSC+ACEi E (0.6 ± 0.16 ng/ml) riducevano ulteriormente i livelli sierici di ANGII rispetto a B ($p < 0.05$ D e E vs B). Dopo 21 giorni dalla UUO i livelli sierici di ANGII si riducevano in tutti i gruppi di ratti.

ESPRESSIONE DI RENINA m-RNA

L'espressione di m-RNA della renina valutata al giorno 7 non aumentava significativamente nei ratti del gruppo B (0.92 ± 0.66 fold increase) e C (0.67 ± 0.3 fold increase), rispetto ad A usato come calibratore, mentre, come atteso, aumentava nei ratti trattati con ACEi (D 3.82 ± 2 fold increase). I ratti trattati con la terapia combinata tuttavia mostravano una riduzione dell'espressione della renina (E 2.62 ± 0.65 fold increase) rispetto a D.

INFILTRAZIONE MONOCITARIA

Al giorno 7 nei ratti del gruppo B (22.1 ± 10.6) l'infiltrazione monocitaria era significativamente maggiore rispetto ai ratti trattati con MSC (10.3 ± 6.3) e ACEi (15.8 ± 9.2) ($p < 0.01$). La terapia combinata (5.12 ± 4.4) riduceva significativamente l'infiltrato anche rispetto alla monoterapia con solo ACEi o MSC ($p < 0.001$). L'andamento era del tutto simile anche al giorno 21 (numero di cellule ED1 positive/campo B : 22.3 ± 2.4 , C: 6.1 ± 0.5 , D: 10.5 ± 1.02 , $p < 0.05$). Nel gruppo E era ulteriormente ridotto (E: 7.2 ± 1.5 , $p < 0.005$ vs B) .

APOPTOSI DELLE CELLULE TUBULARI

La valutazione del numero di cellule apoptotiche/HPF ha mostrato: un aumento significativo dell'apoptosi nel gruppo sottoposto a UUO e trattato con solo veicolo a 7 giorni rispetto ai ratti sham operati come atteso (A 1.25 ± 0.34 , B 3.12 ± 0.49 , $p < 0.05$). Il trattamento combinato riduceva significativamente il grado di apoptosi (E 1.8 ± 0.36 , $p < 0.05$ E vs B). Al 21 giorno anche il trattamento con MSC oltre alla terapia combinata determinava una riduzione significativa dell'apoptosi rispetto al solo veicolo (vehicle D21 4.4 ± 0.3 , MSC D21 1.77 ± 0.21 , MSC+ACEi D21 2.7 ± 0.27 , $p < 0.005$ E vs A, C e E vs B)

DIAMETRI TUBULARI

La misura dei diametri tubulari al giorno 7 risultava significativamente inferiore nei gruppi C (48.96 ± 29.13), D (65.21 ± 40.21), E (61.79 ± 43.02) rispetto al gruppo B (81.29 ± 54.3) ($p < 0.01$). Il trattamento con MSC risultava più efficace della terapia con ace-inibitore e combinata ($p < 0.01$).

GRADO DI FIBROSI

Per valutare il grado di fibrosi abbiamo definito uno score di danno in base all'estensione dell'area fibrotica per campo microscopico. Score 1 < 25%, score 2 26-50%, score 3 51-75%, score 4 > 76%. Il grado di fibrosi valutato al giorno 21 come volume dell'interstizio era significativamente meno severo nei ratti del gruppo C e D, rispetto al gruppo B (B: 3.4 ± 0.1 , C: 2.3 ± 0.16 , D: 2.8 ± 0.13 , $p < 0.05$). La terapia combinata determinava un'ulteriore riduzione della fibrosi (E: 1.6 ± 0.18 , $p < 0.001$ vs B, $p < 0.05$ vs C and D).

FIBROBLASTI INTERSTIZIALI:FSP-1

Il numero di fibroblasti era significativamente ridotto dalla terapia combinata (gruppo E) rispetto al gruppo B e C e D ($p < 0.001$). Percentuale dell'area positiva per FSP1/HPF: A 0.06, B 1.65 ± 0.9 , C 1.65 ± 0.7 , D 1.26 ± 0.39 , E 0.49 ± 0.34 .

LIVELLI TESSUTALI DI TGFβ

I livelli di TGFβ su tessuto hanno mostrato un aumento significativo incremento del TGFβ sui reni dei ratti sottoposti a UUO e trattati con solo veicolo rispetto ai ratti sham operati (B 2259± 129.7 pg/mg, A 398.7±68.51, p< 0.0001), il trattamento con ACEi (D 677.3±485) e con MSC+ACEi (E 1050±193.1) riducevano significativamente (p<0.05 D e E vs B) i livelli di TGFβ anche se nei nostri esperimenti la terapia con MSC (C 580.3±19.6 pg/mg) risultava ancora piu' efficace (p<0.005 C vs B)

INTEGRITA' MEMBRANA BASALE TUBULARE

La valutazione dell'integrita' della membrane basale tubulare al 21 giorno espresso come percentuale di tubuli con rottura della TMB/campo microscopico era significativamente ridotta nel gruppo trattato con ACEi rispetto al gruppo trattato con solo veicolo e anche rispetto al gruppo trattato con MSC (p<0.05). Tuttavia nel gruppo di ratti trattato con la terapia combinata la percentuale di tubuli con rottura della TMB era ulteriormente significativamente ridotto (B: 45.7±4.2, C:43±4, D: 31±4.8, E: 20.2±2.4, p<0.005 E vs B)

DISCUSSIONE

Tutte le malattie renali croniche, come la nefroangiosclerosi da danno ipertensivo, nefropatia diabetica, glomerulonefrite cronica, vasculiti, patologie ostruttive, rigetto cronico, indipendentemente dall' eziologia evolvono verso un quadro istopatologico comune: la nefrite tubulointerstiziale. Quest'ultima è caratterizzata da atrofia tubulare, fibrosi interstiziale e glomerulosclerosi.

Fino ad oggi le terapie di cui disponiamo per rallentare e/o bloccare la progressione dell'insufficienza renale cronica sono ancora inefficaci ed il trattamento dialitico sostitutivo resta una scelta terapeutica obbligata. Il trapianto di rene sarebbe il trattamento ottimale, ma purtroppo è limitato dalla scarsa disponibilità di organi, pertanto la sperimentazione di nuove strategie terapeutiche è richiesta e necessaria.

Nell'ambito della terapia cellulare le MSC sono attualmente le cellule più studiate e più promettenti.

I risultati presentati in questo studio dimostrano che l'infusione endovenosa di MSC produce un significativo effetto renoprotettivo in un modello sperimentale di fibrosi tubulointerstiziale nel ratto e che tale effetto è del tutto paragonabile a quello ottenuto dalla somministrazione di lisinopril, un ACE inibitore di comune uso nella pratica clinica per il trattamento della malattia renale cronica e con ben noti effetti antiapoptotici e antifibrotici. Inoltre i nostri risultati dimostrano che la

terapia combinata ACEi+MSC produce un effetto addizionale rispetto alla singola monoterapia nel ridurre l'infiammazione, l'apoptosi e la fibrosi suggerendo quindi una possibile alternativa terapeutica che potrebbe migliorare l'outcome della malattia renale cronica nell'uomo.

Gli effetti renoprotettivi di MSC in un modello di UUO nel ratto sono stati dimostrati recentemente da Asanuma et al [50] e i nostri risultati sono pienamente in linea con quelli da loro ottenuti. Tuttavia il nostro lavoro presenta elementi innovativi nella conoscenza dei meccanismi alla base dell'effetto delle MSC in UUO.

Inizialmente l'effetto benefico delle MSC è stato attribuito alla loro capacità di migrare nei tessuti sede di danno e di differenziarsi nel fenotipo cellulare danneggiato al fine di ripopolare l'organo malato con cellule sane, tuttavia la scarsa numerosità delle cellule riscontrate nei tessuti danneggiati non permetteva di giustificare gli effetti osservati. Successivamente è stato definitivamente chiarito che il meccanismo alla base degli effetti di MSC è indipendente dall'homing delle cellule nel tessuto sede di danno, ma è mediato da fattori solubili. Infatti, in un elegante lavoro, Cantley e collaboratori [24] hanno dimostrato che la somministrazione del solo mezzo di coltura condizionato con MSC permetteva di ottenere lo stesso effetto della somministrazione delle MSC in un modello di IRA da cisplatino in ratti.

Il $TNF\alpha$ è una potente citochina proinfiammatoria prodotta prevalentemente dalle cellule tubulari epiteliali che svolge un ruolo fondamentale nel reclutamento di cellule infiammatorie. I macrofagi reclutati ed attivati a loro volta producono $TNF\alpha$ stimolando la produzione di altri ulteriori fattori chemiotattici, molecole di adesione e pro-apoptotiche [7].

Tuttavia lo stimolo a monte della produzione di $TNF\alpha$ è l'attivazione del sistema renina-angiotensina che, attraverso l' $NF-\kappa B$ promuove l'attivazione delle cellule tubulari, l'infiltrazione monocito-macrofagica, il rilascio di $TNF\alpha$ e l'apoptosi delle cellule tubulari, il rilascio di $TGF\beta$, la deposizione di ECM e quindi la fibrosi.

I risultati del nostro studio dimostrano, per la prima volta, che le MSC riducono l'espressione della renina e la produzione di angiotensina II in UUO. In particolare dimostrano un effetto sinergico tra le MSC e gli ACE inibitori indicando come probabile meccanismo alla base di questa sinergia l'inibizione da parte delle MSC della renina. E' noto infatti che gli ACE inibitori inducono un aumento compensatorio dei livelli di renina a causa della mancanza del feedback negativo dell'angiotensina e che questo rappresenta il principale meccanismo di perdita di efficacia degli ACEi. Anche nel nostro studio infatti il trattamento con lisinopril determina un aumento dell'espressione della renina. La renina promuove la fibrosi non solo grazie alla sua capacità enzimatica di stimolo alla produzione di

angiotensina II ma anche attraverso un'attività cellulare diretta ANGII-indipendente attraverso il legame con il recettore renina/prorenina (PRR, prorenin receptor). Infatti il legame renina-PRR innesca una cascata intracellulare che coinvolge il sistema ERK 1/ERK 2 inducendo una upregolazione di geni profibrotici quali TGF β , PAI-1, collagene e fibronectina [63-66].

Quindi l'inibizione dell'espressione di renina da parte delle MSC aumenta l'efficacia degli ACEi in termini di nefroprotezione, bloccando la produzione di ANGII e prevenendo l'incremento della renina portando così ad un'azione sinergica nel migliorare l'infiammazione e la fibrosi.

Dopo aver dimostrato l'inibizione sul sistema renina angiotensina abbiamo verificato se in effetti questo si traducesse in una riduzione dei meccanismi a valle: infiammazione, apoptosi, livelli di citochine profibrotiche e proinfiammatorie e danno istologico.

L'infiammazione tubulointerstiziale è stata osservata in numerose forme di malattia renale cronica ed è noto che contribuisca in maniera determinante allo sviluppo della fibrosi attraverso il rilascio di citochine profibrotiche e pronfiammatorie, specie reattive dell'ossigeno e fattori del complemento [67-69].

I nostri esperimenti indicano che l'infiltrazione monocitaria aumenta significativamente dopo l'ostruzione ureterale rispetto ai ratti sham operati, ma che è significativamente ridotta sia dalla terapia con MSC che dalla terapia con

ACEi rispetto al gruppo di ratti UUO controllo. Inoltre la terapia di combinazione MSC+ACEi determina un'ulteriore significativa riduzione delle cellule ED1 positive anche rispetto alle singole monoterapie.

L'apoptosi delle cellule tubulari epiteliali è un momento patogenetico molto significativo nella UUO poichè determina il quadro di atrofia tubulare. Il principale stimolo pro-apoptotico è costituito dal TNF α prodotto dalle cellule tubulari attivate e dalle cellule infiammatorie infiltranti, ma lo stress meccanico indotto dall'aumento della pressione intratubulare, lo stress ossidativo, l'ipossia e altre citochine sono ulteriori fattori che contribuiscono in maniera determinante all'apoptosi e quindi allo sviluppo di atrofia [70]. I nostri esperimenti dimostrano che sia le MSC che gli ACEi riducono l'apoptosi e inoltre che la terapia combinata presenta un ulteriore effetto sinergico nella inibizione della apoptosi stessa riducendo quindi una delle possibili cause di progressivo deterioramento della funzione renale.

Il TGF β è la citochina profibrotica per eccellenza: determina attivazione dei fibroblasti interstiziali promuovendone lo switch fenotipico a miofibroblasti, favorisce l'epithelial mesenchymal transition e l'endothelial mesenchymal transition con aumento della deposizione di componenti della matrice extracellulare. L'accumulo degli ECM è favorito non solo dall'aumentata produzione ma anche dall'alterata degradazione. Infatti il TGF β riduce le

metalloproteinasi e aumenta gli inibitori delle metalloproteinasi come il PAI-1. Inoltre contribuisce all'attivazione dell'apoptosi e stimola l'aumento dell'infiltrato infiammatorio con ulteriore danno tubulointerstiziale [71-72]. Nei nostri esperimenti i livelli tissutali di TGF β risultano significativamente aumentati nei ratti sottoposti a ostruzione ureterale non trattati rispetto agli sham operati, mentre la terapia con ACEi, MSC o MSC+ACEi determina una significativa riduzione dei livelli di TGF β , riducendo uno dei principali mediatori del danno.

Abbiamo valutato il numero dei fibroblasti, compresi quelli che derivano dall'EMT con l'immunoistochimica per FSP1. I nostri risultati mostrano come gli ACEi riducano il numero delle cellule FSP1 positive mentre la singola terapia con MSC non ha lo stesso effetto. Tuttavia la terapia combinata MSC+ACEi produce una riduzione significativa del numero di fibroblasti anche rispetto alla terapia con ACEi mostrando che gli effetti dei due agenti combinati risultano amplificati rispetto alle singole monoterapie.

Infine i nostri risultati mostrano come sia la terapia con MSC, che con ACEi e ancor di più la terapia combinata migliora il quadro istopatologico tipico della UUO. Infatti due importanti indicatori di atrofia tubulare, quali il grado di dilatazione tubulare e il grado di integrità della membrana basale tubulare risultano significativamente migliorati dai tre tipi di trattamento. Inoltre l'espansione del volume interstiziale come indicatore della fibrosi risultava

significativamente ridotto sia dalla terapia con MSC che dalla terapia con ACEi. La terapia di combinazione tuttavia produceva un significativo miglioramento della fibrosi tubulointerstiziale.

In conclusione il nostro lavoro mostra che le cellule mesenchimali staminali riducono la fibrosi tubulo interstiziale in un modello di ostruzione ureterale monolaterale attraverso l'inibizione del sistema renina angiotensina. La terapia combinata MSC-ACE inibitori potenzia gli effetti di reno-protezione e rappresenta una promettente alternativa nella terapia della malattia renale cronica.

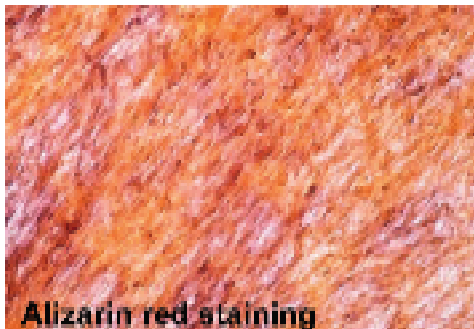
FIGURE E LEGENDE

Figura 1

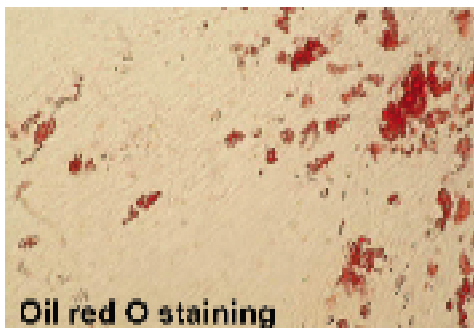
Differenziazione osteogenica ed adipogenica di MSC



Pannello A: MSC coltivate in mezzo standard mostrano una morfologia allungata tipica delle cellule mesenchimali staminali indifferenziate (X100).



Pannello B: La differenziazione osteogenica di MSC è dimostrata dalla formazione di aree di calcio idrossiapatite colorate in rosso da Alizarin (X100).



Pannello C: La differenziazione adipogenica di MSC è dimostrata dalla presenza di vacuoli di lipidi intracellulari colorati in rosso da Oil Red O(X100).

Figura 2

CREATININA SIERICA

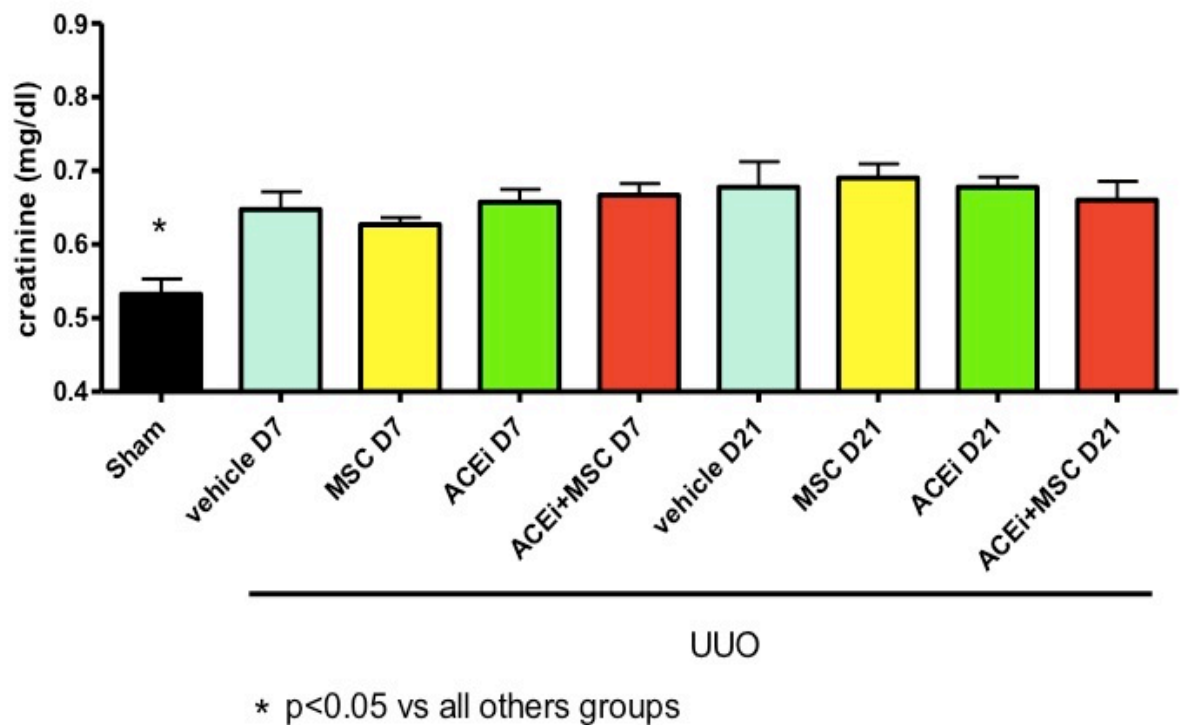


Figura 2 Creatinina sierica.

Gruppo A (sham): 8 ratti sham operati

Gruppo B (vehicle): 8 ratti sottoposti a UUO al giorno 0, immediatamente dopo la UUO è stato somministrato 1 ml di soluzione fisiologica (veicolo) nella vena della coda.

Gruppo C (MSC): 8 ratti sottoposti a UUO al giorno 0, immediatamente dopo la UUO è stato somministrato 1 ml di PBS contenente 3×10^6 MSC nella vena della coda.

Gruppo D (ACEi): 8 ratti sottoposti a UUO al giorno 0 e trattati con lisinopril (100 mg/L) sciolto in acqua da bere per tutto il periodo di osservazione

Gruppo E (MSC+ACEi): 8 ratti sottoposti a UUO al giorno 0 e trattati con lisinopril (100 mg/L) sciolto in acqua da bere per tutto il periodo di osservazione e immediatamente dopo la UUO è stato somministrato 1 ml di PBS contenente 3×10^6 MSC nella vena della coda.

Le colonne rappresentano le medie \pm DS.

Figura 3

CONCENTRAZIONE PLASMATICA DI ANGIOTENSINA II

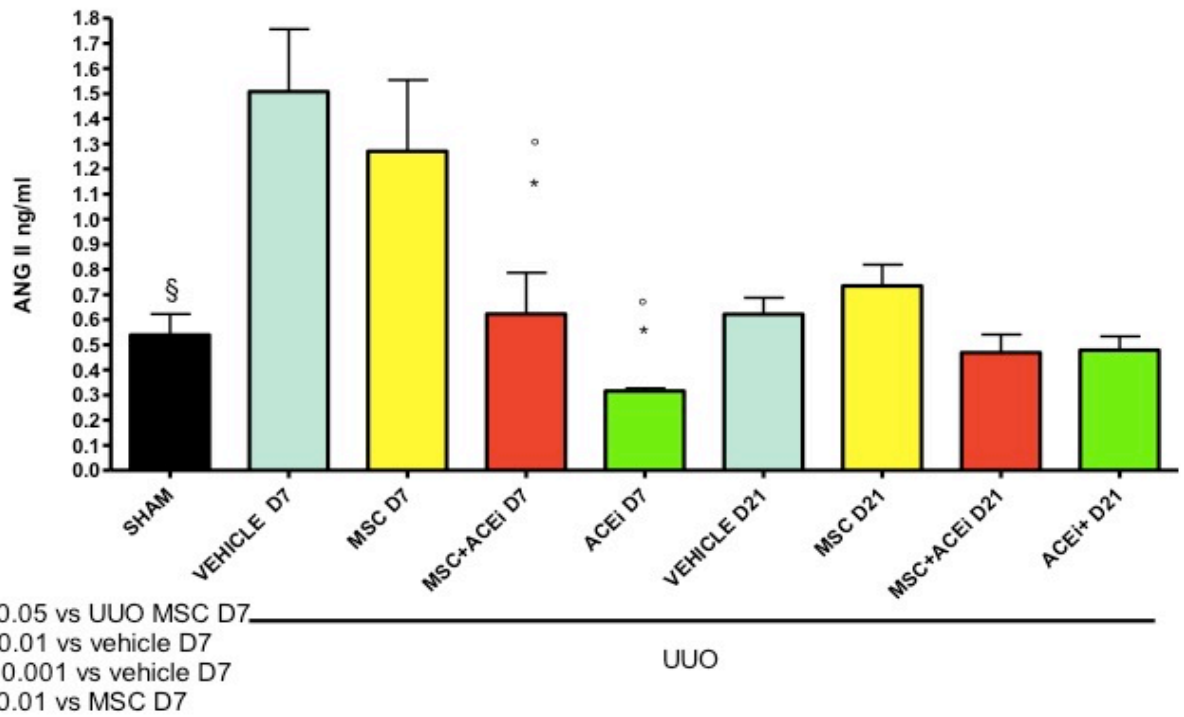


Figura 3 Concentrazione plasmatica di Angiotensina II.

I gruppi sono stati definiti in Fig.2. Le colonne rappresentano le medie \pm DS.

Figura 4

ESPRESSIONE DI mRNA DI RENINA

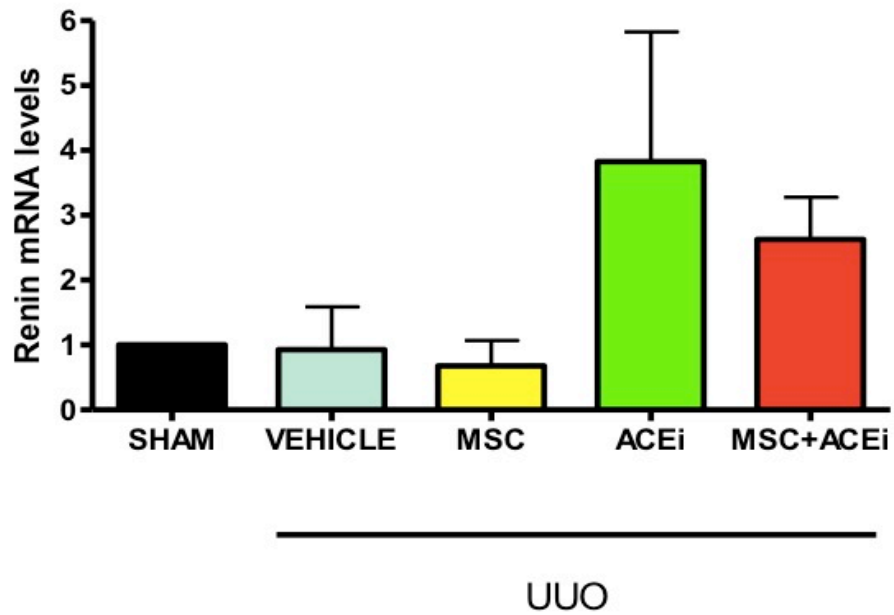
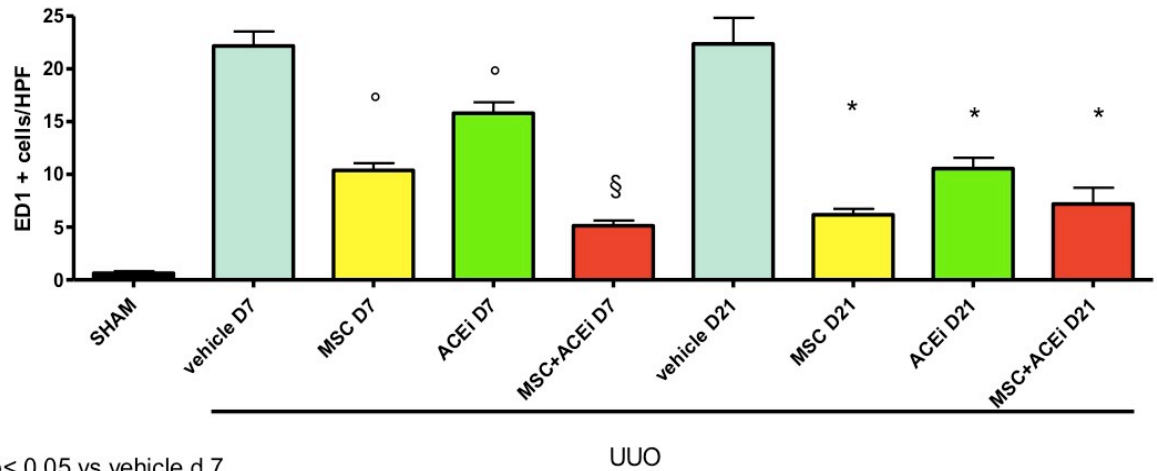


Figura 4. Espressione di mRNA di Renina.

I gruppi sono stati definiti in Fig.2. Le colonne rappresentano le medie \pm DS.

Figura 5 a

INFILTRATO MONOCITARIO



° p < 0.05 vs vehicle d 7
§ p < 0.001 vs vehicle d 7
* p < 0.05 vs vehicle d 21

Figura 5 a. Infiltrato monocitario.

I gruppi sono stati definiti in Fig.2. Le colonne rappresentano le medie ± DS.

Figura 5 b

INFILTRATO MONOCITARIO: sezioni istologiche rappresentative

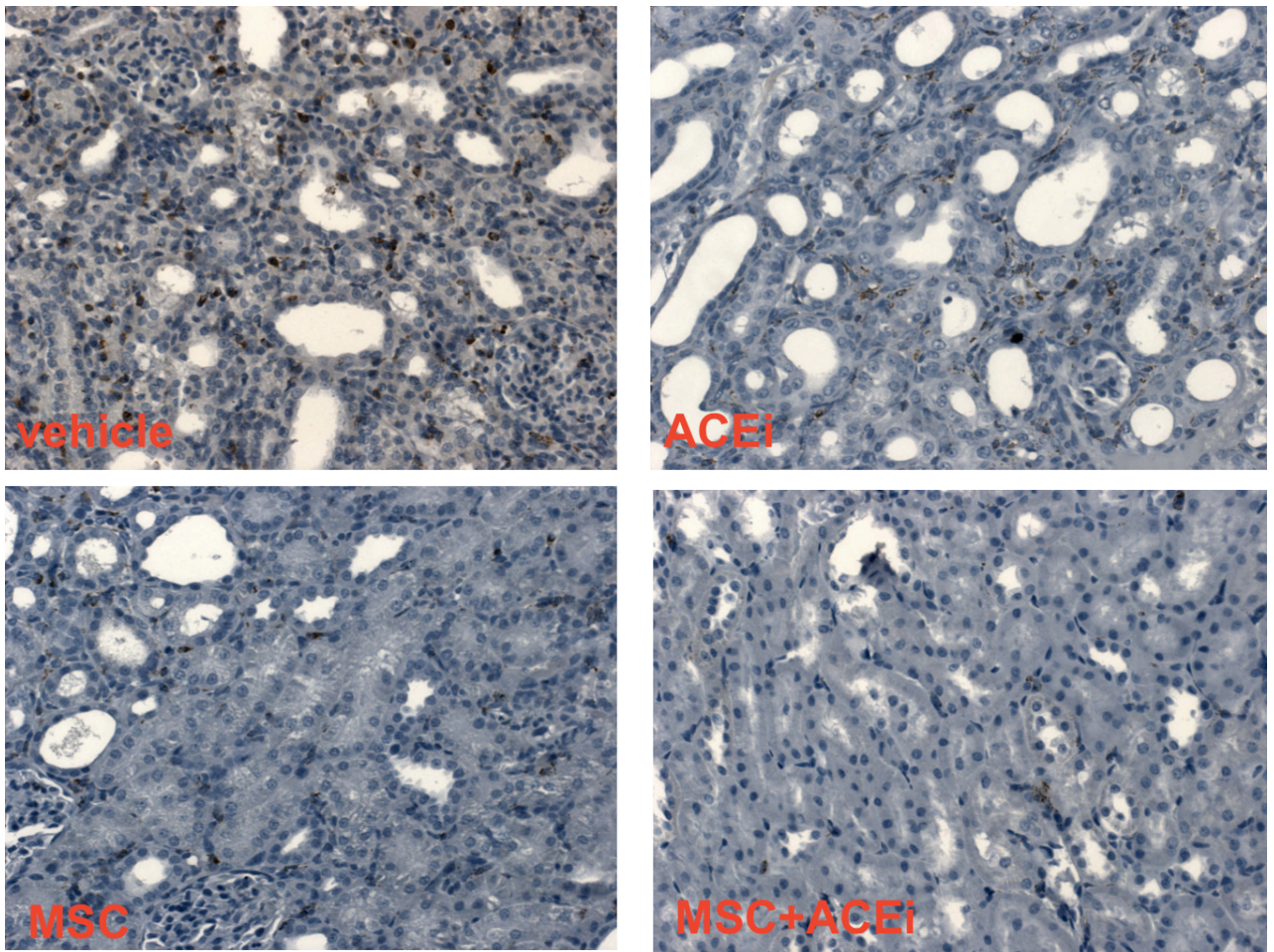
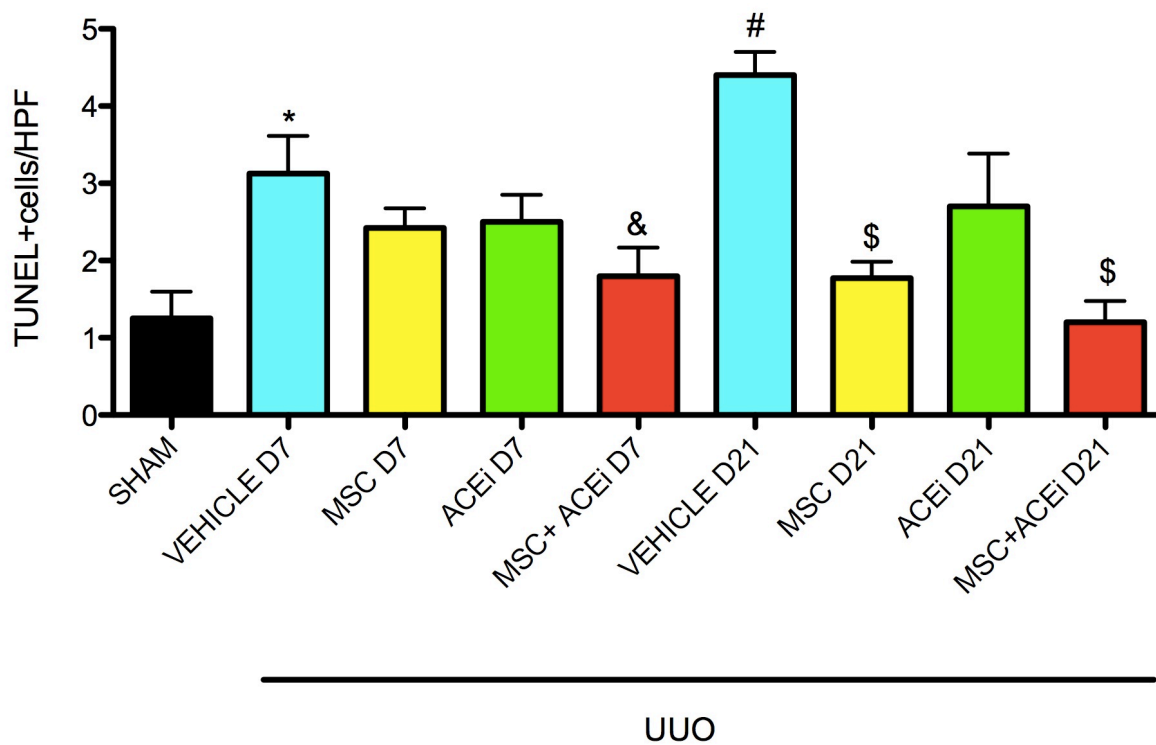


Figura 5b.

Sezioni renali rappresentative (10X). L'infiltrato monocitario era significativamente ridotto dalla terapia con MSC, ACEi e in misura maggiore dalla terapia combinata MSC+ACEi. I gruppi sono stati definiti in Fig.2.

Figura 6

APOPTOSI



* p<0.05 vs SHAM

\$ p<0.005 vs VEHICLE D21

& p< 0.05 vs VEHICLE D7

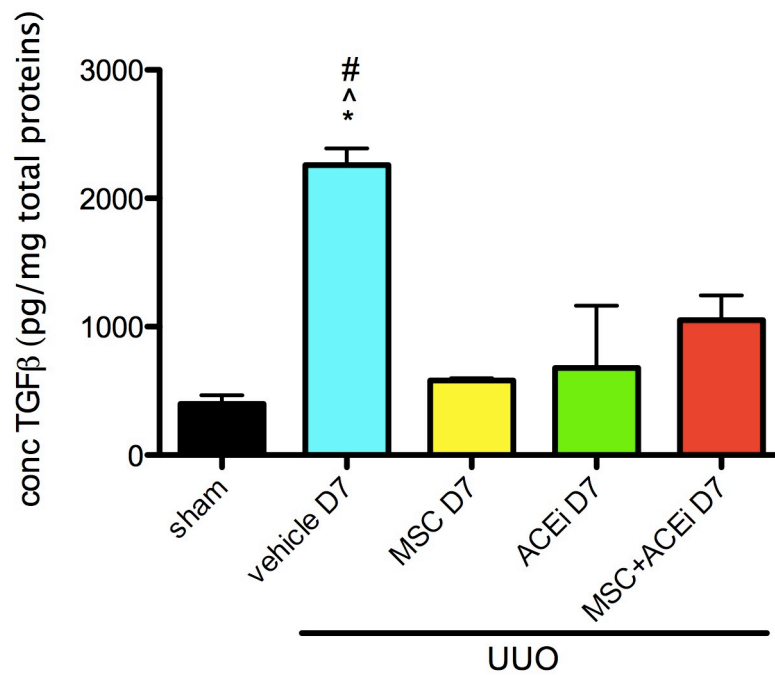
p< 0.005 vs SHAM

Figura 6. Apoptosi.

I gruppi sono stati definiti in Fig.2. Le colonne rappresentano le medie ± DS. L'apoptosi veniva ridotta dalla terapia con MSC e con ACEi e in misura più significativa dalla terapia combinata MSC+ACEi.

Figura 7

LIVELLI TESSUTALI DI TGF β



* $p < 0.0001$ vs sham

^ $p < 0.005$ vs MSC D7

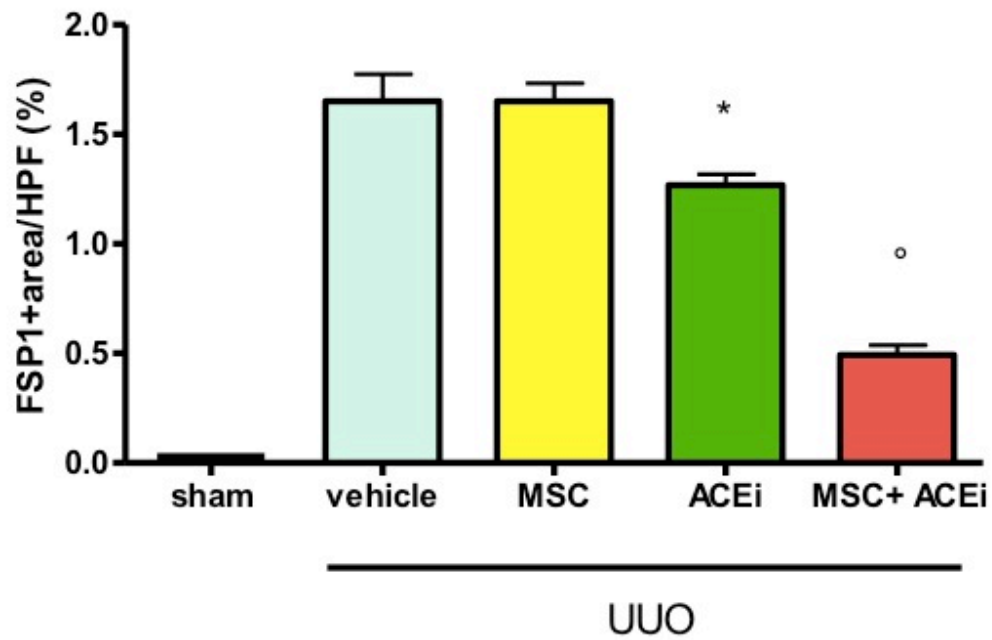
$p < 0.05$ vs ACEi D7 and MSC+ACEi D7

Figura 7. Livelli tissutali di TGF β .

I gruppi sono stati definiti in Fig.2. Le colonne rappresentano le medie \pm DS.

Figura 8 a

FSP1



* $p < 0.05$ vs vehicle controls and MSC alone

° $p < 0.0001$ vs vehicle controls, MSC and ACEi alone

Figura 8°. Fibroblasti interstiziali.

I gruppi sono stati definiti in Fig.2. Le colonne rappresentano le medie \pm DS.

Figura 8 b

FSP-1:sezioni istologiche rappresentative

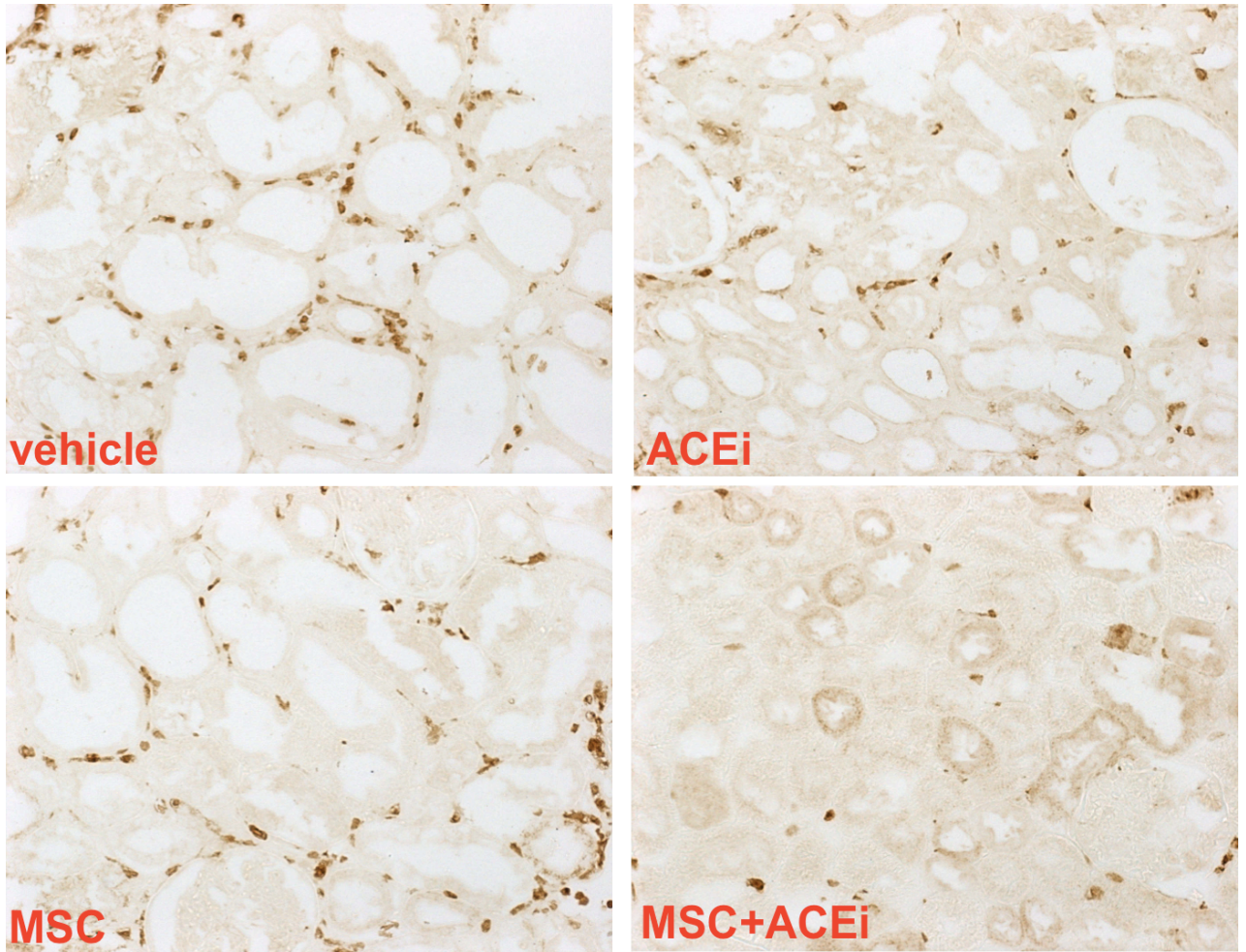
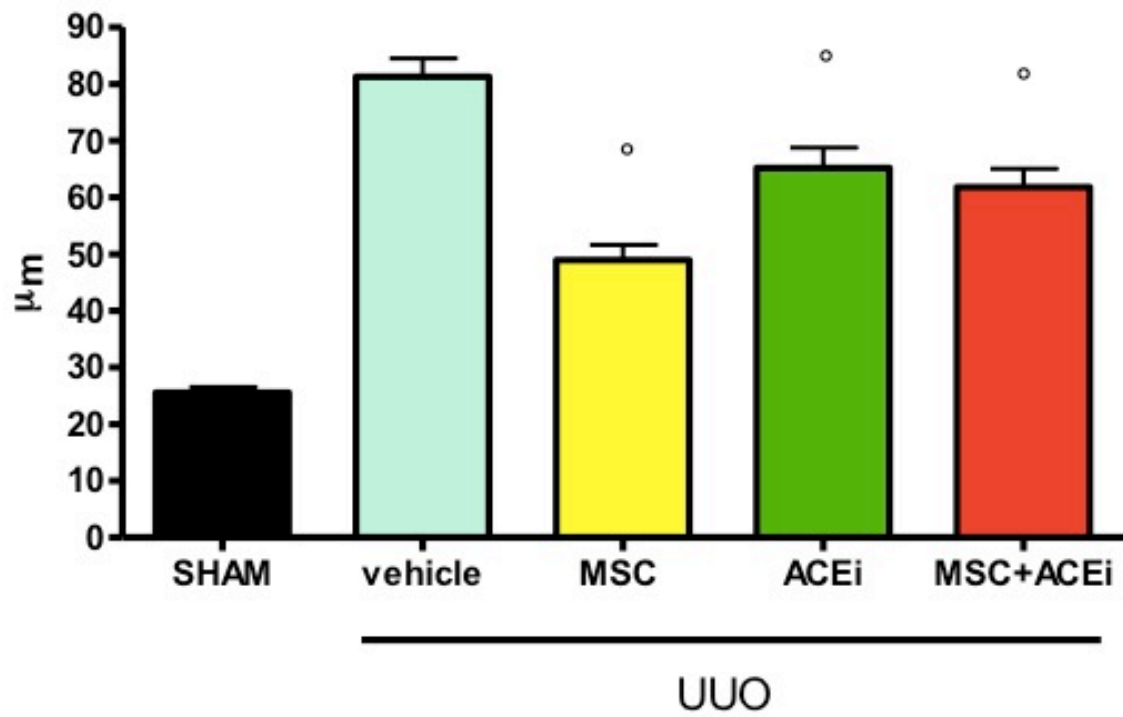


Figura 8b. Sezioni renali rappresentative (10X).

Il numero di fibroblasti era significativamente ridotto dalla terapia combinata MSC+ACEi.

Figura 9 a
DILATAZIONE DIAMETRI TUBULARI



° p<0.05 vs vehicle controls

Figura 9°. Dilatazione dei diametri tubulari.
I gruppi sono stati definiti in Fig.2. Le colonne rappresentano le medie ± DS.

Figura 9 b

DILATAZIONE DIAMETRI TUBULARI: sezioni istologiche rappresentative

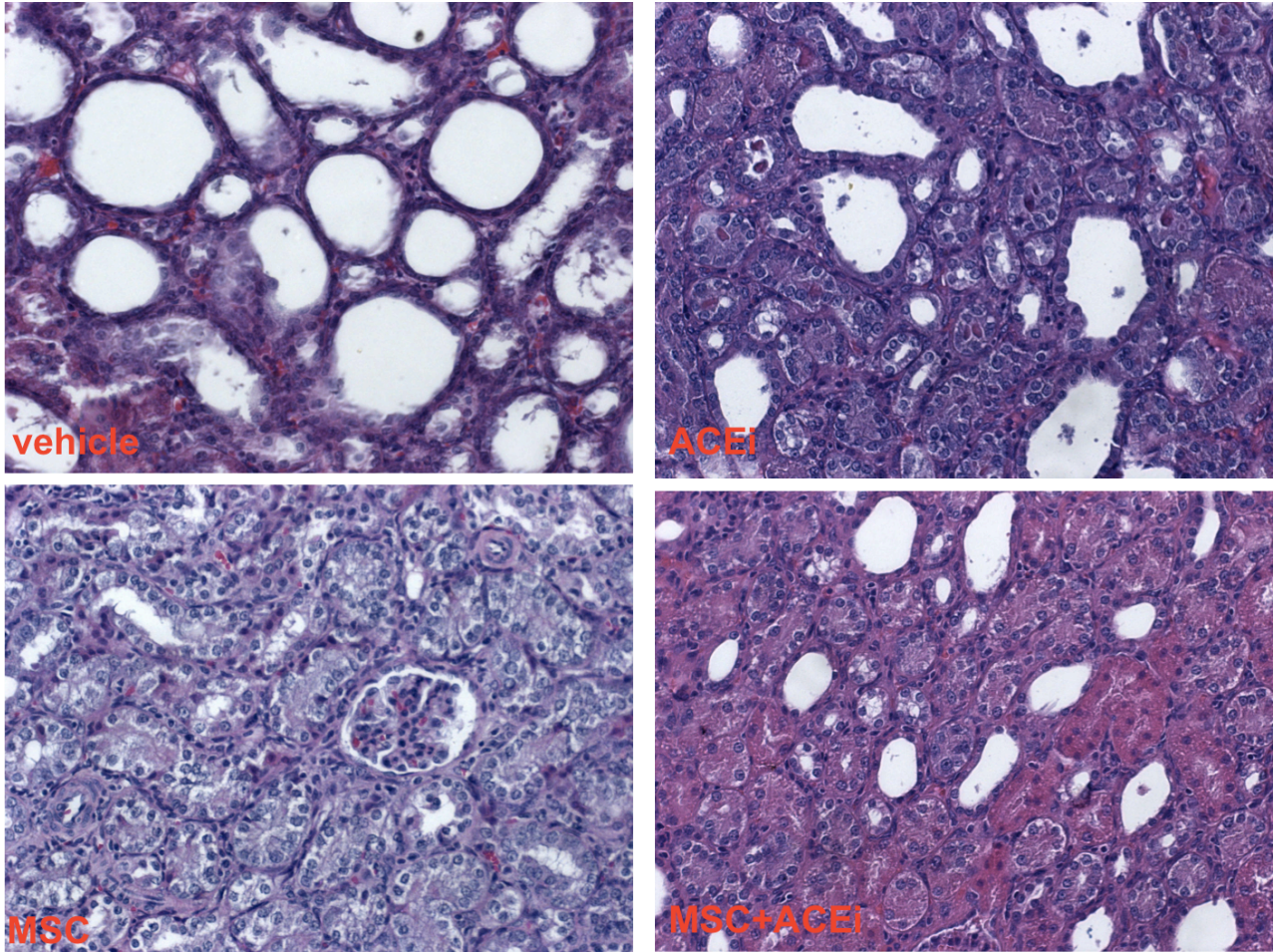
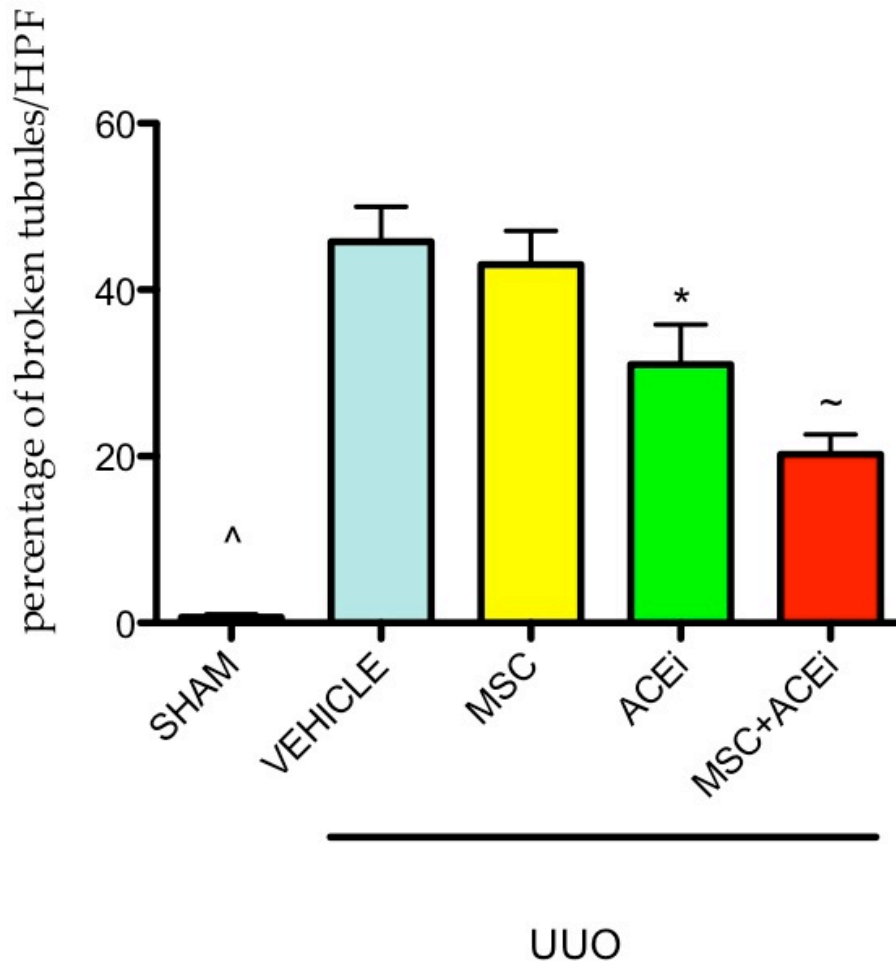


Figura 9 b. Sezioni renali rappresentative (10X) colorate con ematossilina-eosina.

Figura 10

INTEGRITA' DELLE MEMBRANE BASALI TUBULARI



*p < 0.05 vs vehicle and MSC
~ p < 0.005 vs vehicle
^ p < 0.0005 vs vehicle and MSC

Figura 10. Integrità delle membrane basali tubulari.
I gruppi sono stati definiti in Fig.2. Le colonne rappresentano le medie ± DS.

Figura 11

GRADO DI FIBROSI

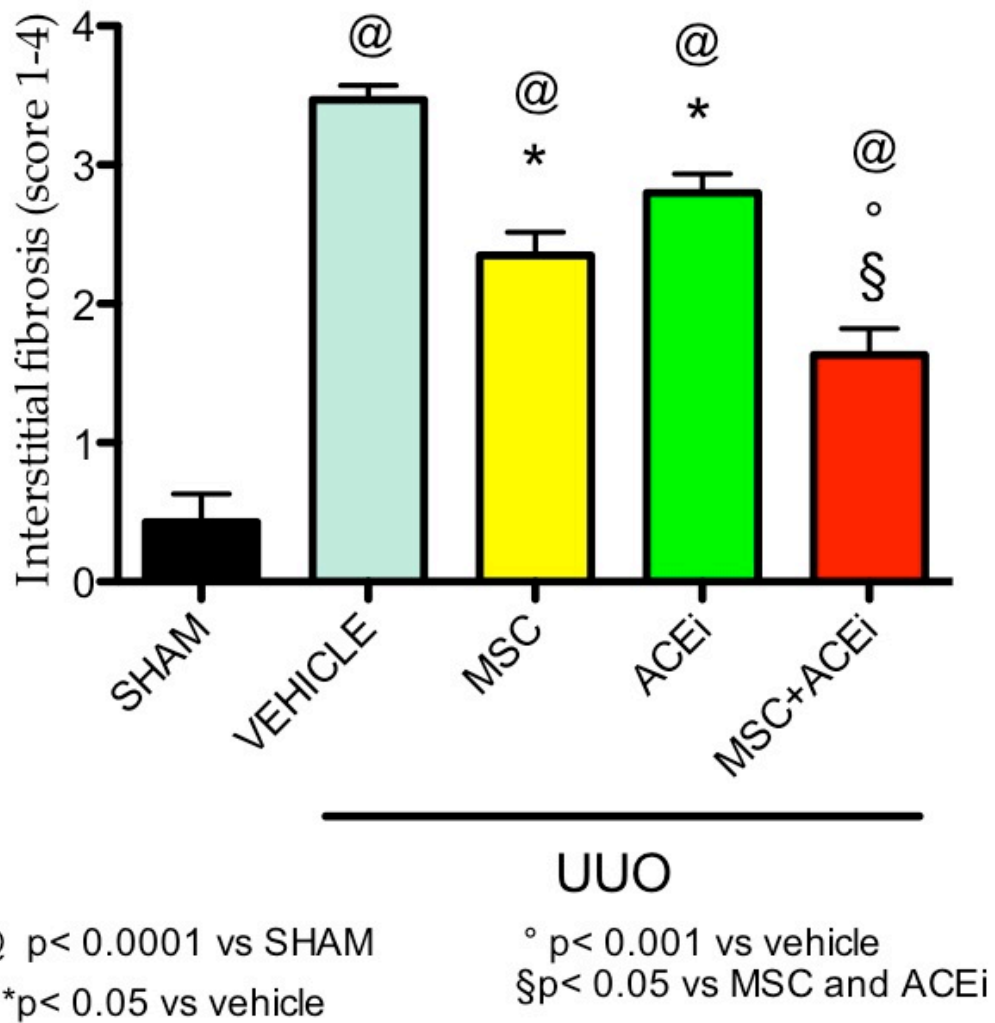


Figura 11. Grado di fibrosi.

I gruppi sono stati definiti in Fig.2. Le colonne rappresentano le medie ± DS.

BIBLIOGRAFIA

1. El Nahas AM, Bello AK Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet* 365(9456):331–341. 2005
2. Coresh J, Selvin E, Stevens LA et al (2007) Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA* 298(17):2038–2048
3. Gambaro G, Yabarek T, Graziani MS, Gemelli A, Abaterusso C, Frigo AC, Marchionna N, Citron L, Bonfante L, Grigoletto F, Tata S, Ferraro PM, Legnaro A, Meneghel G, Conz P, Rizzotti P, D'Angelo A, Lupo A; INCIPE Study Group. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5:1946-53
4. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. *N Engl J Med* 2004; 351: 1296-1305.
5. Bohle, A., strutz, F. & Müller, G. A. On the pathogenesis of chronic renal failure in primary glomerulopathies: a view from the interstitium. *Exp. Nephrol.* 2, 205–210 (1994).
6. Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 2009 Jun;75(11):1145-52.
7. Klahr S., Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J*

Physiol Renal Physiol. 2002 Nov;283(5):F861-75.

8. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143-147, 1999.
9. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Experimental and biological Medicine*, 226: 507-520, 2001.
10. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, 105: 93-98, 2002.
11. Morigi M, Imberti B, Zoja C, et al. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 15: 1794-1804, 2004.
12. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 284: 1168-1170, 1999.
13. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*, vol. 8, n. 3: 301-316, 2004.
14. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry and cell biology* 36: 568-584, 2006.

15. Roufosse CA, Direkze NC, Otto WR et al. Circulating mesenchymal stem cells. *The International Journal of Biochemistry and cell biology* 36: 585-597, 2004.
16. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 45: 115-202, 2008 .
17. Dominici M, Le Blanc K, Muller I, Slaper-Cortenbach I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, vol.8, n. 4: 315-317, 2006.
18. Pulsom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K et al. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol*, 195: 229-235, 2001.
19. Nagaya N, Fujii T, Iwase T et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287: H2670-H2676, 2004.
20. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S et al. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *International Journal of Molecular Medicine*, 14: 1035-1041, 2004.

21. Morigi M, Introna M, Imberti B et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. *Stem Cells*, 26(8): 2075-82, 2008.
22. Kunter U, Rong S, Djuric Z et al. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 17: 2202-2212, 2006.
23. Tögel F, Hu Z, Weiss K et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F31-F42, 2005.
24. Bi B., Schmitt R, Israilova M et al. Stromal cells protect against acute tubular injury *via* an endocrine effect. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18:2486-2496, 2007.
25. Humphreys BD, and Bonventre, J.V. Mesenchymal stem cells in acute kidney injury. *Annu. Rev. Med.* 59:311-325, 2008.
26. Le Blanc K and Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J. Intern. Med.* 262 (5): 509-525, 2007.
27. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*, 31: 890-896, 2003.

28. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* vol. 5, n. 6: 485-489, 2003.
29. Stagg J. Immune regulation by mesenchymal stem cells: two side of the coin. *Tissue Antigens*, 69(1): 1-9, 2007.
30. Uccelli A, Pistoia V and Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends in immunology*, vol.28, n. 5:219-226, 2007.
31. Jones BJ and McTaggart SJ. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Exp Hematol*, 36 733-741, 2008.
32. McTaggart SJ and Atkinson K. Mesenchymal stem cells: Immunobiology and therapeutic potential in kidney disease. *Nephrology*, 12: 44-52, 2007.
33. Aggarwal S and Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell response. *Blood*, 19: 1815-1822, 2004.
34. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*, 57: 11-20, 2003.
35. Jang XX, Zhang Y, Liu B et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, vol.105, n. 10: 4120-4126, 2005.

36. Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V et al. T cell responses to allogenic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *Journal of Biomedical Science* 12:47-57, 2005.
37. Spaggiari MG, Capobianco A, Abdelrazik H et al. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamina 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*, vol. 111, n. 3: 1327-1333, 2008.
38. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*, vol. 106, n. 5: 1755-1761, 2005.
39. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, vol. 107, n. 1: 367-372, 2006.
40. Morigi M, Imberti B, Zoja C, et al. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(7): 1794-1804.
41. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, et al. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med* 2004; 14:1035-1041

42. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, et al. Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury. *Kidney Int* 2007;72:430-441
43. Morigi M, Introna M, Imberti B, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute kidney injury and prolonged survival in mice. *Stem Cells* 2008;26:2075-2082.
44. Tögel F, Hu Z, Weiss K, et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:F31-F42
45. Lange C, Tögel F, Ittrich H, et al. Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Kidney Int* 2005;68:1613-1617
46. Kunter U, Rong S, Djuric Z, et al. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2202-2212.
47. Rampino T, Gregorini M, Bedino G, et al. Mesenchymal stromal cells improve renal injury in anti-Thy 1 nephritis by modulating inflammatory cytokines and scatter factors. *Clin Sci (Lond)*. 2011 Jan;120(1):25-36.

48. [Choi S](#), [Park M](#), [Kim J](#), [Hwang S](#), [Park S](#), [Lee Y](#); The role of mesenchymal stem cells in the functional improvement of chronic renal failure. [Stem Cells Dev](#). 2009 Apr;18(3):521-9.
49. Semedo P, Correa-Costa M, Cenedeze MA et al. Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model. *Stem Cells*. 2009 Dec;27(12):3063-73
50. Asanuma H, Vanderbrink BA, Campbell MT, Hile KL, Zhang H, Meldrum DR, Meldrum KK. Arterially delivered mesenchymal stem cells prevent obstruction-induced renal fibrosis. *J Surg Res*. 2011 Jun 1;168(1):e51-9.
51. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 2001; 345: 861–869.
52. Hou FF, Zhang X, Zhang GH et al. Efficacy and safety of benazepril for advanced chronic renal insufficiency. *N Engl J Med* 2006; 354: 131–140.
53. Moridaira K, Morrissey J, Fitzgerald M, Guo G, McCracken R, Tolley T, Klahr S. ACE inhibition increases expression of the ETB receptor in kidneys of mice with unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Jan;284(1):F209-17.

54. Morrissey JJ, Klahr S. Effect of AT2 receptor blockade on the pathogenesis of renal fibrosis. *Am J Physiol.* 1999 Jan;276(1 Pt 2):F39-45.
55. Morrissey JJ, Klahr S. Differential effects of ACE and AT1 receptor inhibition on chemoattractant and adhesion molecule syntheses. *Am J Physiol.* 1998 Mar;274(3 Pt 2):F580-6.
56. Morrissey JJ, Klahr S. Enalapril decreases nuclear factor kappa B activation in the kidney with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 1997 Oct;52(4):926-33.
57. Morrissey JJ, Ishidoya S, McCracken R, Klahr S. The effect of ACE inhibitors on the expression of matrix genes and role of p53 and p21 (WAF1) in experimental renal fibrosis. *Kidney Int Suppl.* 1996 May;54:S83-7.
58. Ishidoya S, Morrissey J, McCracken R, Klahr S. Delayed treatment with enalapril halts tubulointerstitial fibrosis in rats with obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 1996 Apr;49(4):1110-9.
59. Ishidoya S, Morrissey J, McCracken R, Reyes A, Klahr S. Angiotensin II receptor antagonist ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 1995 May;47(5):1285-94.
60. Muller DN, Luft FC. Direct renin inhibition with aliskiren in hypertension and target organ damage. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1: 221–228.

61. Nguyen G, Contrepas A. Physiology and pharmacology of the (pro)renin receptor. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8: 127–132.
62. Nguyen G, Delarue F, Burckle C et al. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 2002; 109: 1417–1427.
63. Sakoda, M., Ichihara, A., Kaneshiro, Y., Takemitsu, T., Nakazato, Y., Nabi, A. H. M. N., Nakagawa, T., Suzuki, F., Inagami, T. and Itoh, H. (2007) (pro)Renin receptor- mediated activation of mitogen-activated protein kinases in human vascular smooth muscle cells. *Hypertens. Res.* 30, 1139–1146
64. 12 Feldt, S., Batenburg, W. W., Mazak, I., Maschke, U., Wellner, M., Kvakan, H., Dechend, R., Fiebeler, A., Burckle, C., Contrepas, A. et al. (2008) Prorenin and renin-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes is not blocked by aliskiren or the handle-region peptide. *Hypertension* 51, 682–688
65. Vernon, M. A., Mylonas, K. J. & Hughes, J. Macrophages and renal fibrosis. *Semin. Nephrol.* 30, 302–317 (2010).
66. Duffield, J. S. Macrophages and immunologic inflammation of the kidney. *Semin. Nephrol.* 30, 234–254 (2010).

67. Ricardo, S. D., van Goor, H. & Eddy, A. A. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J. Clin. Invest.* 118, 3522–3530 (2008).
68. Wang, Y. & Harris, D. C. Macrophages in renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22, 21–27 (2011).
69. Grande, M. T., Pérez-Barriocanal, F. & López-Novoa, J. M. Role of inflammation in tubulo-interstitial damage associated to obstructive nephropathy. *J. Inflamm.* 7, 19 (2010).
70. Docherty NG, O'Sullivan OE, Healy DA, Fitzpatrick JM, Watson RW. Evidence that inhibition of tubular cell apoptosis protects against renal damage and development of fibrosis following ureteric obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006 Jan;290(1):F4-13
71. López-Hernández FJ, López-Novoa JM. Role of TGF β in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell Tissue Res.* 2012 Jan;347(1):141-54.
72. Samarakoon R, Overstreet JM, Higgins SP, Higgins PJ. TGF β > SMAD/p53 > PAI-1 transcriptional axis in ureteral obstruction-induced renal fibrosis. *Cell Tissue Res.* 2012 Jan;347(1):117-28.