



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN  
Area del Farmaco e Trattamenti Innovativi

CICLO XXVIII

COORDINATORE Prof. Elisabetta Teodori

**Ruolo della popolazione di  
progenitori tubulari Pax2+ nella  
rigenerazione del tubulo renale  
dopo insufficienza renale acuta**

Settore Scientifico Disciplinare MED/14

**Dottorando**

Dott. Lombardi Duccio

**Tutore**

Prof. Romagnani Paola

---

**Coordinatore**

Prof. Teodori Elisabetta

---

Anni 2012/2015

# INDICE

---

<b>1 INTRODUZIONE</b> .....	<b>3</b>
1.1 L'INSUFFICIENZA RENALE ACUTA.....	3
1.1.1 DEFINIZIONE DI AKI.....	4
1.1.2 CLASSIFICAZIONE CLINICA DELL'AKI.....	7
<b>1.2 LA NECROSI TUBULARE ACUTA</b> .....	<b>10</b>
1.2.1 IL DANNO DA NECROSI TUBULARE ACUTA.....	12
<b>1.3 LE CELLULE STAMINALI RENALI</b> .....	<b>20</b>
<b>1.4 MODELLI ANIMALI TRANSGENICI</b> .....	<b>30</b>
<b>1.5 ATTUALE DIBATTITO SULLA RIGENERAZIONE TUBULARE</b> .....	<b>37</b>
1.5.1 EPPUR SI MUOVE: DATI A SOSTEGNO DELL'ESISTENZA DEI PROGENITORI TUBULARI.....	41
1.5.2 CELLULE TUBULARI DIFFERENZIATE E RIGENERAZIONE TUBULARE.....	49
<b>1.6 I MODELLI TRANSGENICI PAX2 E PAX8</b> .....	<b>59</b>
<b>2 MATERIALI E METODI</b> .....	<b>65</b>
<b>3 RISULTATI</b> .....	<b>79</b>
3.1 L'IPERFILTRAZIONE TRANSIENTE CONSEGUENTE AD AKI PERMETTE IL RECUPERO IMMEDIATO DELLA GFR MA, A LUNGO TERMINE, E' ASSOCIATA AD UN GLOBALE DECLINO DELLA GFR E AD INSORGENZA DI CKD.....	79
3.2 LA RIGENERAZIONE TUBULARE DOPO AKI E' LIMITATA E PRINCIPALMENTE DOVUTA ALLA AMPLIFICAZIONE CLONALE DI UN <i>SUBSET</i> DI CELLULE TUBULARI.....	82
3.3 LE CELLULE PAX2 <sup>+</sup> RAPPRESENTANO UNA POPOLAZIONE DISTINTA E PRE- ESISTENTE DI CELLULE TUBULARI CHE CONTRIBUISCE AL TURNOVER TUBULARE E MOSTRA ALTA CAPACITA CLONOGENICA.....	87
3.4 LE CELLULE PAX2 <sup>+</sup> POSSIEDONO UNA ALTA CAPACITA' DI SOPRAVVIVENZA ALLA MORTE, FORTE CAPACITA' CLONOGENICA E SONO IN GRADO DI SOSTITUIRE LE CELLULE PERSE DOPO DANNO TUBULARE ACUTO ISCHEMICO.....	92
<b>4 DISCUSSIONE</b> .....	<b>98</b>
<b>5 MATERIALE SUPPLEMENTARE</b> .....	<b>104</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>105</b>

# 1 INTRODUZIONE

---

## 1.1 L'INSUFFICIENZA RENALE ACUTA

L'insufficienza renale acuta (o *Acute Renal Failure*, ARF) è una malattia renale multifattoriale contraddistinta da un rapido deterioramento della funzionalità renale, in termini di ore o settimane, che si manifesta principalmente sotto forma di una reversibile diminuzione della velocità di filtrazione glomerulare (*Glomerular Filtration Rate*, GFR) [1, 2]. La conseguenza nella riduzione della GFR ha come risultato un incremento nella ritenzione e nell'accumulo di scarti metabolici e di tossine quali l'urea (*Blood Urea Nitrogen*, BUN) e la creatinina, nonché l'alterazione della normale omeostasi del liquido extra cellulare e dell'equilibrio Acido-Base [3, 4]. Inoltre, in relazione alla gravità e alla durata dell'insufficienza renale, l'accumulo di scorie azotate è accompagnato da disturbi metabolici come acidosi metabolica, iperpotassiemia e ipervolemia, i cui effetti nocivi sono risentiti anche da altri organi ed apparati. L'insufficienza renale acuta può presentarsi sia con quadri severi, i quali richiedono l'intervento con terapie sostitutive della funzione renale (emodialisi extracorporea), sia con forme caratterizzate soltanto da lievi incrementi della creatinina sierica [5]. Pertanto, la definizione di questa patologia è attualmente oggetto di dibattito, dato che il termine "insufficienza" è legato principalmente alle conseguenze di un vasto spettro di alterazioni e condizioni cliniche che determinano la necessità del supporto dialitico [5]. Trattandosi di un'alterazione acuta della funzionalità renale causata da modifiche morfo-funzionali insorte a seguito del danno ed indipendenti dalle cause scatenanti, si parla ormai di Danno Renale Acuto o *Acute Kidney Injury* (AKI). Al contrario, con il termine ARF si vogliono individuare quei

pazienti affetti da AKI ma che necessitano di una terapia sostitutiva (*Renal Replacement Therapy*, RTT).

### **1.1.1 DEFINIZIONE DI AKI**

L'AKI è una condizione patologica sui cui è attualmente in corso un forte dibattito nel mondo scientifico, non solo per quanto riguarda la sua incidenza (dall'1 al 31% di casi riportati) e la sua mortalità (dal 19 all'83% dei soggetti colpiti), ma anche per quanto riguarda l'identificazione dei trattamenti e dei metodi di prevenzione maggiormente efficaci, nonché dei bersagli cellulari da utilizzare come *target* farmacologici per prevenire e/o curare una patologia che, comunque, nella maggior parte dei casi, va incontro ad una ripresa spontanea [1]. E' in ogni modo da notare che esiste una grande variabilità nelle percentuali di incidenza e prognosi dell'AKI, ed è possibile che ciò sia non solo dovuto a diversi quadri clinici che possono presentare i soggetti affetti dalla patologia, ma soprattutto che possa essere legato alla mancanza di una definizione universale di AKI. Per ovviare a tale deficienza è stata recentemente introdotta la classificazione RIFLE, la quale consiste di un insieme di parametri che permettono una stratificazione dell'AKI in grado di riflettere strettamente la realtà clinica dei differenti soggetti affetti da tale condizione clinica. L'acronimo RIFLE individua tre gradi di severità crescente dell'insufficienza renale acuta: il rischio (*Risk*), la lesione (*Injury*) e il fallimento d'organo (*Failure*), cui seguono due possibili esiti: la perdita di funzionalità renale (*Loss*) e l'insufficienza renale terminale (*End-stage renal disease*, *ESRD*). I tre gradi di severità dell'AKI individuati da questa classificazione sono definiti in base al decorso nel declino della formazione di urina nonché alle variazioni nei livelli di creatinina sierica (SCr), la quale permette di individuare l'andamento della GFR [1, 6]. La persistenza della condizione patologica,

invece, permette la classificazione delle due classi di esito. Secondo la classificazione RIFLE le differenti classi di dell'AKI sono così individuate [6]:

*RISK* (rischio): incremento dei valori della SCr di almeno 1,5 volte rispetto ai valori fisiologici, riduzione della GFR  $\geq 25\%$ , diuresi  $< 0,5 \text{ mL/kg/h}$  per almeno 6 ore.

*INJURY* (lesione): raddoppio dei valori di SCr, riduzione della GFR  $\geq 50\%$ , diuresi  $< 0,5 \text{ mL/kg/h}$  per almeno 12 ore.

*FAILURE* (fallimento d'organo): incremento dei valori della SCr superiore alle 3 volte rispetto ai valori normali, riduzione della GFR  $\geq 75\%$ , diuresi  $< 0,3 \text{ mL/kg/h}$  per almeno 24 ore o anuria per almeno 12 ore.

*LOSS* (perdita di funzionalità renale): perdita integrale della funzionalità renale per più di 4 settimane.

*ERDS* (insufficienza renale terminale): completa perdita della funzionalità renale per più di 3 mesi.

Tuttavia, la classificazione RIFLE presenta dei limiti intrinseci, soprattutto per quanto riguarda variazioni iniziali molto lievi dei livelli di SCr, le quali possono comunque risultare sufficienti per determinare danni di elevata entità [7, 8]. A partire dal 2007 la classificazione RIFLE è stata quindi integrata ad opera del gruppo multi-disciplinare AKIN (*Acute Kidney Injury Network*), che la ha modificata (1) ampliando sensibilità e fascia dei soggetti a rischio mediante inclusione di casi in cui è osservabile un incremento della SCr di  $0,3 \text{ mg/dL}$ ; (2) inserendo gli individui soggetti a RTT direttamente nella categoria *Failure* indipendentemente da diuresi e valori di SCr [9]. La classificazione AKIN prevede quindi tre differenti categorie le quali sono così suddivise e classificate [8]:

- ❖ Stadio 1: aumento della SCr maggiore o uguale a  $0,3 \text{ mg/dL}$  o aumento  $\geq 1,5-1,9$  volte rispetto al *range* fisiologico; diuresi  $< 0,5 \text{ mL/kg/h}$  per almeno 6 ore.

- ❖ Stadio 2: incremento nella S<sub>Cr</sub> >2–2.9 volte rispetto ai normalmente osservati; diuresi <0,5mL/kg/h per almeno 12 ore.
- ❖ Stadio 3: aumento della S<sub>Cr</sub> ≥ 3 volte rispetto al *range* fisiologico o ≥ 4 mg/dL; diuresi < 0,3 mL/kg/h per almeno 24 ore o anuria da almeno 12 ore; vi rientrano tutti i soggetti sottoposti a RRT, indipendentemente da entità della diuresi e da valori di S<sub>Cr</sub>.

Ciò che è maggiormente di rilievo, è che tali due classificazioni hanno ampliato la fascia di individui a rischio di sviluppare AKI includendo anche piccole variazioni nei valori di S<sub>Cr</sub>, le quali è stato dimostrato sono correlate ad aumento di morbilità e mortalità [10, 11]. Anche piccole variazioni nella S<sub>Cr</sub> possono, quindi, portare verso condizioni di disfunzione renale terminale a lungo termine. Ciò è maggiormente vero quanto maggiore è la variazione nei valori di S<sub>Cr</sub>, tantoché numerosi studi epidemiologici condotti in vari e differenti condizioni cliniche hanno dimostrato una forte associazione tra AKI ed ESRD [12-14]. La valutazione di una coorte di pazienti che hanno sviluppato, durante la loro permanenza ospedaliera, una forma di AKI tale da richiedere RRT, ha evidenziato come il rischio a lungo termine di tali soggetti di andare incontro ad ESRD fosse aumentata di 28 volte, indicando una forte perdita di nefroni associata all'AKI che avevano sviluppato [14]. Tuttavia, studi epidemiologici più recenti hanno dimostrato proprio come anche episodi di AKI di lieve entità indirizzino verso un maggior rischio di sviluppo di ESRD. In un gruppo di pazienti sottoposti ad angiografia coronarica che hanno successivamente sviluppato AKI è stato osservato, ad esempio, che il rischio di sviluppare ESRD era 4 volte superiore in quegli individui rientranti in fascia 1 AKIN [15] e fino a 12 volte superiore in pazienti di fascia AKIN 2 o 3 quando comparati con pazienti che non avevano avuto episodi di AKI [15, 16].

### 1.1.2 CLASSIFICAZIONE CLINICA DELL'AKI

Il danno renale acuto è classificato in base alla sede del danno: si distingue, ossia, in AKI pre-renale, intrinseca e post-renale. L'AKI pre-renale rappresenta circa il 55% dei casi totali ed è causata da tutte quelle condizioni che inducono una riduzione di apporto ematico al rene portando così verso un'insufficiente perfusione del parenchima renale. È una forma che va generalmente incontro a remissione, soprattutto se tempestivamente trattata, in quanto non causa un danno diretto del parenchima renale. Nella maggior parte dei casi di AKI pre-renale la funzionalità d'organo e l'afflusso di sangue si mantengono pressoché costanti, anche nel caso di sostenute variazioni della pressione perfusione (il *range* fisiologico varia tra 70 e 150 mm/Hg), grazie al sistema di autoregolazione che porta all'innescò del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone (R-A-A). In caso di ipovolemia e crollo della pressione arteriosa sono, infatti, attivate una serie di risposte neuro-mediate che portano in ultima analisi all'iperattivazione del R-A-A, al rilascio dell'ormone vasopressina e all'attivazione adrenergica, tutti eventi finalizzati al ripristino della normale pressione di perfusione glomerulare. L'ipovolemia, la quale può indurre danni renali acuti, è perlopiù indotta da eventi quali perdite di liquido extracellulare (emorragie), dispersioni di liquidi dal tratto gastro-intestinale (vomito/diarrea profusi), sequestri extra-vascolari (ustioni o pancreatiti) o dall'assunzione di diuretici, ACE inibitori (ACE-I) o sartanici i quali, in caso di pre-esistente ipovolemia o stenosi dell'arteria renale, possono portare a riduzioni sostenute della GFR. I casi appena citati possono causare gravissimi danni al parenchima renale con una necrosi tubulare acuta (ATN) ed un quadro di AKI intrinseca.

L'AKI intrinseca rappresenta il 40% circa dei casi. Essa presenta un quadro patologico caratterizzato da danno che coinvolge la struttura anatomo-funzionale del parenchima renale e che, in ultima analisi, può interessare tutte le strutture che compongono il nefrone (glomerulo, sistema tubulare, sistema vascolare ed interstizi). L' AKI intrinseca può essere determinato da:

- ❖ Insulti di natura nefrotossica o ischemica a livello tubulare. Si parla in questo caso di necrosi tubulare acuta (*Acute Tubular Necrosis*, ATN), la quale può essere indotta da stenosi dell'arteria renale, o da agenti tossici sia di natura extracorporea che da sostanze endogene.
- ❖ Patologie tubulo-interstiziali quali le glomerulonefriti.
- ❖ Malattie come vasculiti o microangiopatia trombotica, ossia inerenti la componente micro-circolatoria.
- ❖ Patologie che interessano i vasi renali di calibro maggiore.

L'AKI intrinseca è più frequentemente dovuto ad ATN e glomerulonefriti. Tuttavia questa forma di AKI può essere determinata anche da patologie neoplastiche (in particolar modo della componente immunitaria come le leucemie) o da nefriti di natura infettiva o allergica. Queste ultime infatti sono in grado di portare verso danno e fibrosi del parenchima renale, evento che in ultima analisi conduce a sclerosi del compartimento tubulare.

L'AKI post-renale (5% della casistica totale) è dovuta ad ostruzioni che coinvolgono qualsiasi livello delle vie escrettrici renali come pelvi renale, ureteri, vescica od uretra. Tra degli esempi maggiormente comuni vi sono quelli dell'ipertrofia prostatica benigna in soggetti maschili, la quale può indurre ostruzione a carico del collo vescicale, o patologie neoplastiche della parete retroperitoneale che, sia per compressione *ab estrinseco*, sia per invasione, possono portare ad occlusione ureterale.



Tali condizioni sono causa di un incremento nella pressione intraluminare a monte dell'ostruzione, evento che porta ad una progressiva distensione dell'uretere prossimale fino alla pelvi e che determina alterazione del gradiente pressorio a livello glomerulare con conseguente caduta della GFR.

## **1.2 LA NECROSI TUBULARE ACUTA**

---

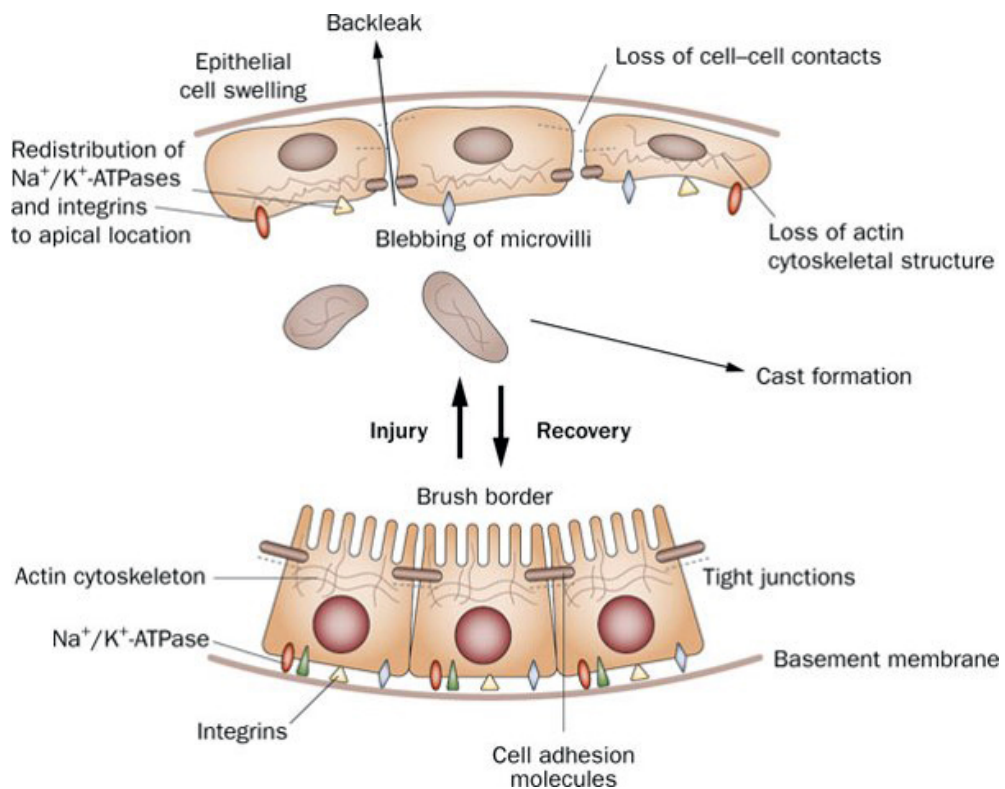
La necrosi tubulare acuta (*Acute Tubular Necrosis*, ATN) è la principale causa di AKI intrinseca, è perlopiù dovuta ad eventi ischemici e costituisce il quadro più comune di danno del parenchima renale (Figura 1). In particolare, l'AKI pre-renale e la ATN di natura ischemica hanno alla base gli stessi processi fisiopatologici e, insieme, costituiscono il 75% delle cause di Ischemia Renale Acuta. Il tasso di mortalità della necrosi tubulare acuta, il quale varia profondamente a seconda della sua causa, è mediamente superiore al 50%, mentre il tasso di comorbidità va dal 5% in pazienti senza altre serie condizioni morbose, fino al 90% in pazienti critici con insufficienza multiorgano. Tuttavia, nonostante alte percentuali nel tasso di mortalità, va riportato che circa la metà dei soggetti che sopravvivono ad un episodio di ATN è in grado di recuperare una buona funzionalità renale, così come evidenziato dal danno istologico residuo di natura subclinica verificabile soltanto mediante biopsia renale. Va però considerato che circa il 5% dei pazienti sopravvissuti mostra un progressivo declino della funzionalità renale, presumibilmente dovuto ad una parziale sostituzione del parenchima danneggiato con tessuto fibrotico e cicatriziale, e con conseguente *stress* emodinamico e sclerosi glomerulare dei nefroni residui [17, 18]. Vari studi epidemiologici condotti in pazienti con differenti quadri clinici hanno difatti dimostrato una sostanziale correlazione tra i danni legati alla necrosi tubulare acuta e la possibilità di sviluppo di ESRD [12-14]. E' stato ad esempio osservato che in una coorte di pazienti i quali, durante la loro permanenza in ospedale, sono andati incontro ad un danno renale acuto tale da richiedere la dialisi, il rischio a lungo termine di sviluppo di ESRD di livello 4 o 5 era aumentato di circa 28 volte. Questo si spiega molto bene considerando la massiva perdita di nefroni associata ad episodi di ATN [14, 19]. Date le caratteristiche dell'ATN, è possibile affermare che la necrosi tubulare

acuta sia un eccellente modello che consente non solo lo studio dei meccanismi che conducono verso l'insulto del parenchima renale, ma anche di quei processi che sono atti a ricostituire l'integrità e la riparazione, permettendo così il ripristino della funzionalità d'organo.

Qualora sia possibile identificare l'evento scatenante dell'AKI, è generalmente anche possibile predire il quadro clinico con cui la patologia si manifesterà ed il suo decorso, il quale solitamente consta di una successione di quattro fasi:

- Fase iniziale: è contraddistinta dall'instaurarsi di oliguria o, nei casi più gravi, anuria. La sintomatologia che accompagna questa fase, la quale è legata ad alterazioni dell'omeostasi idroelettrolitica, non sempre è immediatamente evidente e chiara, motivo per cui a questo stadio è difficile diagnosticare una AKI in corso d'opera. Tuttavia, durando questa fase da ore ad alcuni giorni, è possibile registrare un progressivo incremento nella concentrazione sierica di urea e creatinina.
- Fase di estensione: a causa del danno alla componente endoteliale e della conseguente congestione vascolare, questa seconda fase è caratterizzata da danno ischemico e infiammazione persistenti.
- Fase di mantenimento: coincide con l'espressione conclamata della classica sintomatologia associata ad AKI ed è contraddistinta dal crollo nel flusso plasmatico renale (*Renal Plasma Flow*, RPF) e dal conseguente calo nella velocità di filtrazione glomerulare. Entrambi questi parametri possono ridursi fino al 50% rispetto al valore basale [20]. Analogamente, la GFR si stabilizza ai livelli minimi (massimo 10 mL/min) come conseguenza delle alterazioni instauratesi a livello del *feedback* tubulo-glomerulare o a causa del mantenimento dell'agente eziologico. E' in questa fase che generalmente si manifestano le complicanze connesse ad alterazioni dell'equilibrio idro-elettrico, acido-base e di natura uremica.

- Fase di recupero (nei casi in cui, come in corso di necrosi tubulare acuta, l'AKI sia reversibile): è caratterizzata dalla ricostituzione dell'architettura e della funzionalità tubulare, eventi legati alla rigenerazione e sostituzione delle cellule epiteliali tubulari perse. In questa fase si ha anche un graduale ritorno della GFR ai livelli precedenti l'instaurarsi della condizione clinica.



**Figura 1.** Modifiche a carico delle cellule tubulari (come ri-organizzazione citoscheletrica e perdita di polarità di membrana) e del tubulo (formazione di *cast* intraluminali e perdita dell'orletto a spazzola) riscontrabili in caso di necrosi tubulare acuta conseguente ad ischemia. *Sharfuddin A.A. et al. Nat Rev Nephrol 2011, 7 : 189-200.*

### 1.2.1 IL DANNO DA NECROSI TUBULARE ACUTA

Come suggerito dal nome stesso, la necrosi tubulare acuta ha come principale *target* le cellule del tubulo, nelle quali si evidenzia in tempi molto rapidi la sofferenza

cellulare indotta dall'ipoperfusione legata all'instaurarsi del danno; ipoperfusione che diventa poi essa stessa causa del persistere e dell'aggravamento dell'insulto.

Da un punto di vista istologico il danno da ATN è caratterizzato da:

- Perdita dell'orletto a spazzola a livello del tubulo prossimale
- Alterazione nella polarità cellulare, come riscontrabile dalla disposizione anomala di molecole di adesione (ad esempio le integrine) e di altre proteine di membrana (come la Na/K ATPasi)
- Apoptosi e necrosi delle cellule epiteliali tubulari
- Parziale denudamento della membrana basale in conseguenza dell'esfoliazione di cellule vitali e non, che sono quindi perse e rinvenibili nel lume tubulare o nelle urine del soggetto
- Occlusione del lume tubulare con formazione di cilindri ialini.

Temporalmente e per gravità di danno, la porzione tubulare che per prima e in maniera più evidente risente della ATN dovuta ad eventi ischemici è il segmento S3 del tubulo prossimale (ossia la *pars recta* del tubulo prossimale ed il tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle). Ciò è dovuto al fatto che, per posizione anatomica, tale segmento è fisiologicamente meno irrorato rispetto ad altre porzioni tubulari (come la S1 e la S2), ma allo stesso tempo richiede un'intensa produzione di ATP per sostenere l'ampio numero di processi di trasporto ATP-dipendenti che caratterizzano le cellule epiteliali che lo compongono. Tuttavia, seppur il segmento S3 risenta in misura maggiore del danno ischemico da ATN, anche le altre porzioni tubulari risultano danneggiate dalla necrosi tubulare acuta [21]. Difatti, sono, riscontrabili, in tutti i segmenti, cellule gravemente danneggiate e pertanto necrotiche; ciò è reso evidente dalla vacuolizzazione cellulare, dalla disgregazione mitocondriale e dalla perdita dell'integrità della membrana plasmatica, evento, quest'ultimo, che determina il

rilascio di componenti intracellulari e, conseguentemente, l'attivazione della risposta infiammatoria. A seconda dell'intensità del danno ischemico, sono poi presenti un numero maggiore (per danni di lieve entità) o minore (all'aumentare della gravità del danno) di cellule apoptotiche, caratterizzate dalla formazione di corpuscoli a livello del plasmalemma, da picnosi, da frammentazione nucleare e da disintegrazione cellulare in vescicole che sono prontamente fagocitate affinché non sia innescata la risposta infiammatoria. I meccanismi molecolari che regolano la comparsa delle cellule apoptotiche, le quali compaiono generalmente nella fase di mantenimento dell'ATN, sono in questo momento oggetto di numerosi studi: il blocco specifico di questo tipo di morte cellulare sembra, infatti, rappresentare una strategia promettente per ridurre l'entità della perdita di elementi cellulari che caratterizza l'ATN [22, 23]. Tuttavia, la grande maggioranza delle cellule tubulari è soggetta ad un danno di entità sub-letale e mantiene, di conseguenza, la capacità di recupero morfo-funzionale, mentre le cellule più gravemente colpite dal danno sono perse per apoptosi e per necrosi. Ciononostante, anche le cellule con danno sub-letale subiscono modifiche strutturali e metaboliche responsabili di molte delle caratteristiche della ATN di natura ischemica. Ad esempio, la deplezione prolungata di ATP conseguente ad eventi ischemici porta a malfunzionamento della pompa di membrana  $\text{Ca}^{++}$ -ATPasi, evento che, conseguentemente, induce una cascata di eventi mediati proprio dall'incremento del  $\text{Ca}^{++}$  intracellulare. E' infatti noto come un alta concentrazione di  $\text{Ca}^{++}$  intracellulare sia responsabile di danno mitocondriale, di attivazione di proteasi e fosfolipasi e della generazione di ROS (*Reactive Oxygen Species*). Il  $\text{Ca}^{++}$  intracellulare è anche essenziale per il mantenimento dell'integrità del citoscheletro di actina [24], che a sua volta è cruciale in vari aspetti della biologia della cellula tubulare, tra cui il mantenimento della polarità cellulare, della disposizione delle

proteine di membrana e della struttura di microvilli e *tight-junctions*. A loro volta, le alterazioni dei microvilli portano al distacco e alla caduta nel lume tubulare dell'orletto a spazzola, con conseguente disfunzionalità cellulare ed ostruzione del lume tubulare stesso. Inoltre, l'allentamento delle *tight-junctions* ed il denudamento della membrana basale dovuto alla morte delle cellule di rivestimento sono responsabili della retrodiffusione del filtrato glomerulare, mentre il cambiamento nella disposizione delle  $\beta_1$ -integrine sulla membrana [25] porta alla sospensione nei rapporti di adesione cellula-cellula e cellula-membrana basale, nonché all'esfoliazione di cellule vitali nel lume tubulare, le quali sono poi responsabili dell'occlusione tubulare.

I radicali dell'ossigeno, o ROS, sono agenti altamente dannosi per il rene e sono generati da mitocondri danneggiati, da neutrofili polimorfonucleati richiamati nella sede della lesione, dall'interazione tra ione superossido e l'ossido nitrico sintetizzato dall'ossido nitrico-sintasi indotta da danno ischemico e nefrotossico, o da eccessiva disponibilità di ferro-ioni liberi [26] come ad nel caso di emoglobinuria o nefrotossicità da gentamicina. I ROS svolgono un ruolo centrale nel mediare il danno della necrosi tubulare acuta [27, 28] e sono capaci di alterare funzioni e vitalità cellulare in quanto responsabili dell'ossidazione delle proteine di membrana, della perossidazione dei lipidi o del danneggiamento diretto a carico del DNA. Infatti, studi condotti in modelli animali di ATN ischemica hanno evidenziato come la somministrazione di antiossidanti possieda un interessante ruolo protettivo [29-31]. L'effetto benefico di tale terapia è soprattutto legato all'azione che gli antiossidanti esercitano sui neutrofili polimorfonucleati che, richiamati in sede renale durante la riperfusione successiva ad eventi ischemici, amplificano il danno renale per produzione di una ampia pletora di ROS capaci poi di danneggiare direttamente l'endotelio renale ed il tessuto tubulare [32]. A sostegno di tale ipotesi sono le evidenze

ottenute da modelli sperimentali in cui la deplezione dei neutrofili o l'inibizione della loro adesione alle cellule endoteliali era capace di ridurre significativamente il danno renale [32].

La ATN indotta da sostanze nefrotossiche presenta molti aspetti simili a quella indotta da danno ischemico. Il prototipo di ATN nefrotossica è quella che insorge come complicanza della rabdomiolisi, quadro patologico in cui la mioglobina svolge un ruolo centrale. La rabdomiolisi causa, per perdita di sangue e siero, una forte riduzione della volemia efficace [33] la quale, a sua volta, determina l'attivazione dei vari sistemi atti a mantenere la pressione sistemica. Ne consegue un incremento nella funzionalità del sistema ortosimpatico e di quello R – A – A, la liberazione di molecole con azione vasocostrittrice (come vasopressina ed endotelina) e l'inibizione della formazione delle prostaglandine, tutti eventi che inducono uno stato globale di ipoperfusione renale che, in ultima analisi, riduce la biodisponibilità di ATP con conseguente necrosi tissutale [34-37]. Inoltre la rabdomiolisi porta alla precipitazione intra-tubulare di cilindri di mioglobina, con particolare riferimento al tubulo contorto distale, che in associazione alla deplezione di ATP sono i maggiori responsabili dello sfaldamento delle cellule tubulari [38]. La formazione di tali cilindri è influenzata, *in primis*, dalla severità della rabdomiolisi e della necrosi muscolare che determinano la quantità di mioglobina rilasciata in circolo [39] e, in secondo luogo, dal pH della pre-urina: maggiore è il suo grado di acidità e maggiore è la tendenza alla formazione di cilindri sia pigmentari (come quelli di mioglobina), sia di urati [40]. Ovviamente, l'ostruzione tubulare è causa di un netto incremento della pressione intraluminare tubulare, la quale porta ad una riduzione della GFR e facilita la retrodiffusione del filtrato attraverso l'epitelio danneggiato, evento in grado di indurre l'accumulo e l'aggregazione degli elementi desquamanti, con conseguente formazione di nuovi



cilindri. Oltre a tali effetti, la mioglobina mostra una azione citotossica diretta, in quanto capace di condurre alla formazione di ROS. L'eccesso di mioglobina filtrata a livello glomerulare è, infatti, contrastato dal tubulo contorto prossimale che tenta di riassorbire la proteina via endocitosi. L'ambiente acido presente all'interno delle cellule tubulari porta la mioglobina verso la separazione del gruppo eme dal ferro, il quale si accumula causando reazioni ossidoriduttive con vari costituenti cellulari o formando pertanto ROS [27, 41]. Infine, la deplezione di ATP, facilitando l'accumulo dell'eme intracellulare, aumenta la tossicità della mioglobina [37].

Indipendentemente dai meccanismi patogenetici cellulari e molecolari, la ATN è caratterizzata, sia in roditori che in uomo, da una notevole eterogeneità della risposta morfologica dei vari segmenti del nefrone. Le cellule che rivestono i dotti collettori della midollare interna ed i tratti corticali del tratto ascendente dell'ansa di Henle risultano frequentemente indenni. Al contrario, il tubulo prossimale ed il tratto midollare spesso dell'ansa di Henle subiscono sistematicamente varie alterazioni proporzionali al grado di severità del danno.

Successivamente alla fase acuta di danno cellulare, la ATN è caratterizzata da una fase di natura rigenerativa, o di recupero, in cui è dimostrabile la coesistenza di cellule rigeneranti e cellule con alterazioni morfo-funzionali, a dimostrazione dell'alternanza di più cicli di danno e di riparazione. In biopsie umane ottenute durante questa fase, oltre alla presenza di cellule rigeneranti, è infatti riscontrabile anche la comparsa di una seconda ondata di cellule apoptotiche. Questa seconda ondata apoptotica deriva molto presumibilmente da un meccanismo di controllo della iperproliferazione conseguente alla fase di danno e che, in ultima analisi, serve a facilitare il rimodellamento ed il ripristino dell'integrità tubulare. La fase di recupero, è istologicamente caratterizzata anche dalla riacquisizione della corretta polarità

cellulare e dell'integrità delle *tight-junctions* tra le cellule danneggiate ma sopravvissute, dalla rimozione dei detriti cellulari, dei frammenti apoptotici e dei cilindri intraluminari. Infine, questa fase è caratterizzata dalla aumentata espressione di geni in risposta allo *stress*, dall'accumulo di mononucleati nel tubulo e dalla forte rigenerazione delle cellule tubulari perdute [42], come dimostrato dal fatto che molte cellule tubulari entrano nel ciclo cellulare. La fase di recupero, che può durare da pochi giorni a circa un mese, è quindi associata a rigenerazione tubulare, ed è stata per la prima volta e finemente descritta da Hunter WC. nel 1928. Nel lavoro è infatti riportato come dopo un danno, il tubulo renale umano adulto sia contraddistinto dalla presenza di cellule "atipiche" particolarmente diverse dall'epitelio di origine per forma, dimensione ed espressione di marcatori. Sulla identità di queste cellule "atipiche" sono state fatte, nel corso degli anni, diverse teorie, ma studi più recenti hanno suggerito che la maggior parte dei fenomeni rigenerativi sono da attribuirsi alla presenza di una popolazione di cellule staminali all'interno del tessuto in questione. In accordo con questa ipotesi, il gruppo guidato da Lindgren D. ha identificato l'esistenza nel tubulo prossimale umano adulto di una rara popolazione cellulare esprime i marcatori CD133, CD24, Vimentina, Citocheratina 7 e Citocheratina 19, la quale prolifera fortemente durante la fase di recupero in pazienti affetti da ATN [43].

In conclusione, è possibile affermare che, nonostante la ATN rappresenti un importante modello di danno renale, essa sia ancora ampiamente da studiare e caratterizzare, in quanto, fino ad oggi, lo studio dei fattori in grado di impedire l'amplificazione del danno non ha dato risposte concrete. Infatti, in modelli sperimentali di ATN, la quasi totalità degli agenti farmacologici e biologici testati ha dato esiti contrastanti o di impatto non rilevante. È proprio a causa di ciò che, nella ultima decade, l'attenzione si è spostata sempre di più verso la fase di recupero e verso

i fattori in grado di attivare il processo rigenerativo. A questo proposito, le cellule staminali sembrano essere uno strumento promettente, in quanto potrebbero consentire di superare senza conseguenze episodi di AKI di varia entità e danno.

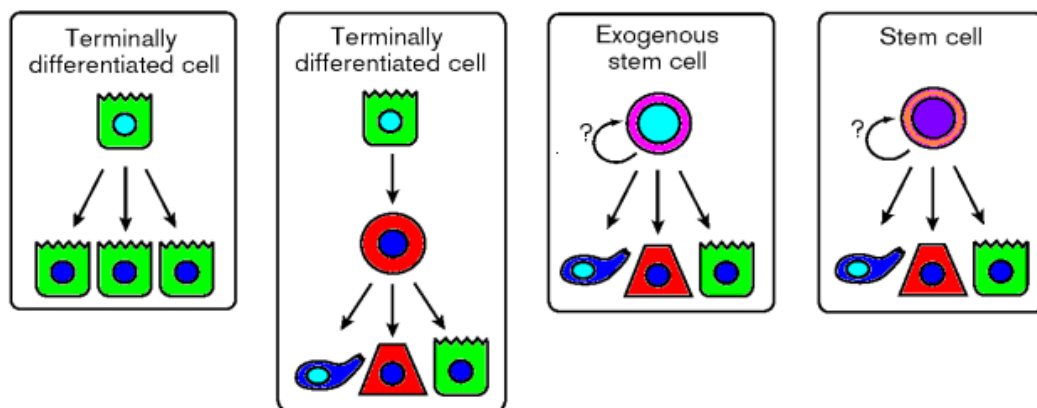
### **1.3 LE CELLULE STAMINALI RENALI**

---

Il rene ha la capacità, manifestata ormai dalla maggior parte degli organi, di dar luogo alla rigenerazione delle strutture di cui è costituito qualora queste siano sottoposte ad insulti di varia natura [44-48]. Nella grande maggioranza dei tessuti adulti, infatti, il mantenimento omeostatico ed i processi di riparazione e sostituzione delle cellule danneggiate o morte sono portati avanti da uno o più compartimenti di cellule staminali residenti [44, 46, 49-52], la cui prima descrizione, come noto, è stata fornita dallo studio del midollo osseo. Proprio basandosi sulle acquisizioni ottenute dallo studio del sistema ematopoietico, è stato successivamente possibile identificare in molti altri organi cellule staminali caratterizzate dalle proprietà di auto-rinnovamento (o *self-renewal*) e multipotenza, nonché dalla capacità di dar luogo a meccanismi rigenerativi. Tuttavia, l'identificazione del compartimento staminale renale ha presentato vari ostacoli e notevoli difficoltà [53-58]: nel tempo sono state infatti proposte varie teorie, non necessariamente mutualmente esclusive, ognuna delle quali proponeva differenti meccanismi su come possa avvenire la riparazione delle strutture soggette ad insulto (Figura 2):

- Cellule terminalmente differenziate potrebbero essere in grado di proliferare e di dar vita a cellule figlie identiche a loro stesse.
- Cellule terminalmente differenziate potrebbero andare incontro ad un processo di dedifferenziazione, proliferazione e, successivamente, re-differenziazione nelle linee cellulari che devono essere sostituite.
- Cellule staminali o progenitori di origine extra-renale (con particolare riferimento a quelle del *lineage* ematopoietico) potrebbero essere reclutate nel rene danneggiato per differenziare in vari o in un solo tipo di cellulare.

- Cellule staminali multipotenti residenti nel rene potrebbero essere in grado di differenziare in tutti i tipi cellulari necessari per il ripristino della integrità morfo-funzionale del nefrone
- Progenitori residenti in differenti compartimenti del nefrone potrebbero essere in grado di differenziare verso il *lineage* della struttura in cui risiedono (glomerulo, tubulo contorto prossimale, ansa di Henle, e via dicendo) così da garantire il recupero della sezione danneggiata.



**Figura 2.** Sommario dei putativi meccanismi alla base dei processi di rigenerazione renale. Modificato da Oliver J.A. *Curr Opin Nephrol Hypertension*,2004;13:17–22

La notevole complessità anatomica e funzionale del rene lo hanno reso un organo in cui effettuare studi sul contributo dei singoli processi ai fini della comprensione dei meccanismi rigenerativi è un compito particolarmente arduo. Nonostante ciò, sono state condotte ricerche estensive finalizzate alla comprensione delle reali capacità rigenerative associate al rene e, attualmente, l'opinione attualmente più accreditata è che il recupero morfo-funzionale renale sia legato all'azione specifica di cellule endogene renali [59].

I primi tentativi effettuati al fine di individuare la presenza di *pool* staminali nel rene adulto prendevano spunto dalle analisi sulle caratteristiche e le proprietà funzionali

specifiche alle cellule staminali di altri tessuti, come il basso ma continuo indice mitotico (che conferisce la capacità di *label-retaining cells*), l'abilità di estrudere il colorante fluorescente Hoechst (*side population cells*) [60], la capacità di crescita e duplicazione in condizioni di coltura selettive e l'espressione di *markers* caratteristici di altri di cellule staminali o del rene in via di sviluppo [53, 54, 61]. Proprio grazie al concetto di *label-retaining* e grazie all'impiego dell'analogo della timidina 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) Olivier *et al.* hanno proposto l'esistenza di una popolazione staminale localizzata nell'interstizio della papilla renale di ratto adulto [53]. Questa molecola, incorporata nel DNA durante la fase S del ciclo cellulare delle cellule in duplicazione, va incontro a diluizione ad ogni successiva divisione mitotica, motivo per cui cellule con un basso *rate* replicativo, come le cellule staminali, ritengono un'alta concentrazione di BrdU così da permettere la loro identificazione (*label-retaining cells*). Al contrario, le cellule che vanno incontro a molteplici divisioni cellulari diluiscono il segnale della molecola radiomarcata tra le cellule figlie, impedendone così la rilevazione o restituendo comunque un segnale a minor intensità. In accordo a quanto già dimostrato in altri studi [54, 55], l'identificazione di tali cellule suggerisce che cellule localizzate nell'interstizio extra-tubulare possano attraversare la membrana basale dell'epitelio tubulare ed integrarsi nel tubulo contribuendo così alla sua riparazione. Tuttavia, è stato ripetutamente provato che la capacità di ritenzione della BrdU può rivelarsi non specifica per l'identificazione di cellule staminali, e che l'analogo della timidina può essere incorporato e non diluito anche da cellule terminalmente differenziate, motivo per il quale questa metodica è sempre più in disuso [62, 63].

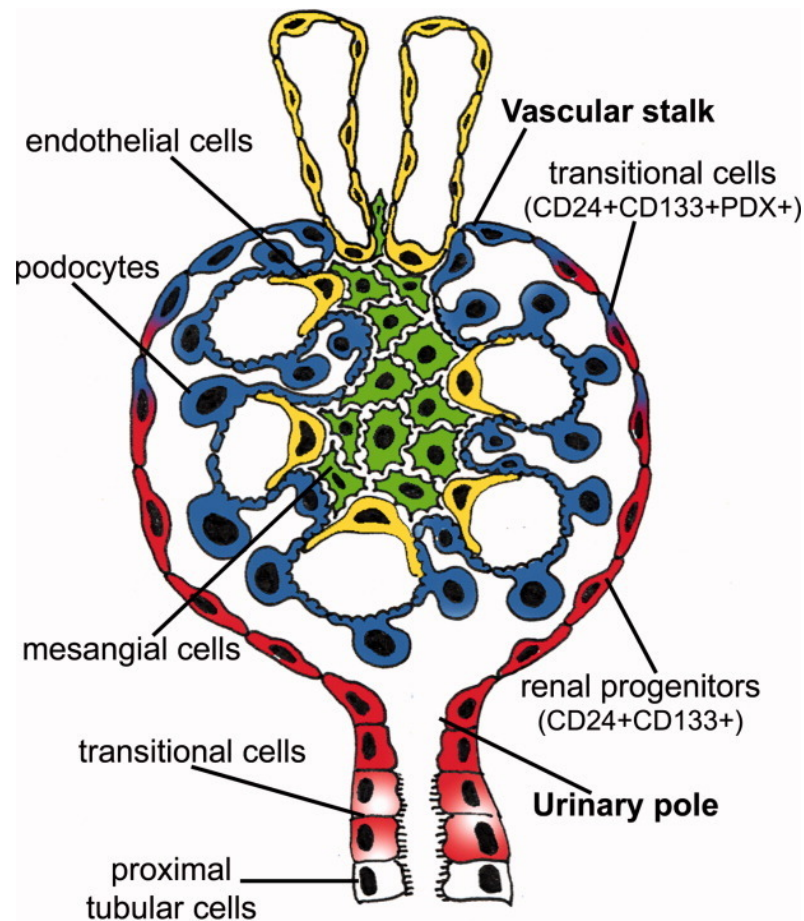
Studi recentemente condotti su tessuti umani hanno portato all'identificazione e alla caratterizzazione di una popolazione di cellule staminali/progenitori localizzata nella

capsula di Bowman [57]. Questo compartimento staminale è stato inizialmente individuato grazie alla co-espressione selettiva di CD24, una molecola di superficie precedentemente utilizzata per identificare altri tipi di cellule staminali umane renali durante la sua fase di sviluppo, e CD133, un *marker* di cellule staminali ematopoietiche e di altri tipi di cellule staminali adulte. Le cellule CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> sono cellule epiteliali parietali selettivamente localizzate al polo urinario della capsula di Bowman. Queste cellule mancano di espressione di marcatori specifici di *lineage*, esprimono fattori di trascrizione caratteristici di cellule staminali multipotenti, come Oct-4 e Bmi-1, e possiedono proprietà morfologiche e funzionali caratteristiche delle cellule staminali, quali *self-renewal*, elevata capacità clonogenica e potenziale multidifferenziativo. Questa popolazione può essere infatti indotta a differenziare verso fenotipi sia renali, in particolare cellule dell'epitelio di tubulo sia prossimale che distale, che extra-renali, come gli adipociti, gli osteoblasti o cellule che esibiscono marcatori fenotipici e proprietà funzionali dei neuroni, come stato riportato per altri tipi di cellule staminali adulte [64, 65].

La scoperta dei progenitori CD24<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> e la loro specifica localizzazione al polo urinario della capsula di Bowman del rene adulto, l'unica regione del nefrone in continuità sia con le strutture tubulari che con i podociti glomerulari [57], suggeriscono che queste cellule possano fungere da cellule progenitrici comuni che, proprio grazie a questa postazione avvantaggiata, possono raggiungere sia il compartimento tubulare che quello glomerulare, fungendo da riserva sostitutiva per cellule danneggiate e morte di entrambe queste sedi. In particolare, in accordo con studi precedentemente condotti nei quali è stata ipotizzata l'esistenza di una popolazione di transizione con fenotipo intermedio tra le cellule epiteliali parietali CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> e i podociti, localizzata al polo vascolare del glomerulo [66-68], nell'uomo è stato dimostrato che le cellule

CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> rappresentano effettivamente una popolazione eterogenea e gerarchica di progenitori, caratterizzata da una precisa e definita organizzazione tissutale e da capacità differenziativa verso differenti fenotipi cellulari renali [69]. Ne consegue, quindi, che questi i progenitori hanno la capacità di rigenerare differenti strutture del nefrone. Infatti, come provato da Ronconi *et al.*, nell'uomo le cellule situate al polo urinario della capsula di Bowman esprimono elevati livelli dei marcatori staminali CD24 e CD133, sono negative per l'espressione di marcatori tipici podocitari come la podocalixina (PDX) e mostrano elevata capacità clonogenica e differenziativa, sia in senso tubulare che in senso podocitario [69] (Figura 3). Le cellule con localizzazione intermedia tra polo urinario e polo vascolare sono invece identificabili grazie alla co-espressione di CD133, CD24 e PDX, esibiscono un fenotipo *borderline* tra quello del progenitore e quello del podocita maturo, hanno una capacità clonogenica decisamente minore rispetto alle cellule solo CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> e sono in grado di rigenerare soltanto cellule podocitarie. Infine, le cellule localizzate al polo vascolare della capsula sono CD133<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup>PDX<sup>+</sup>, hanno un fenotipo simile a quello del podocita maturo e presentano caratteristiche funzionali di cellule post-mitotiche: mancano di capacità clonogenica e possono essere mantenute in coltura solo per pochi giorni in appositi terreni, in accordo con la loro natura di cellule terminalmente differenziate [69]. I dati ricavati in uomo sono stati successivamente confermati da Appel *et al.* in modelli sperimentali murini in cui è stato possibile dimostrare come una popolazione di transizione, con caratteristiche sia morfologiche che immuno-fenotipiche intermedie tra quelle delle cellule epiteliali parietali CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> e quelle dei podociti, può essere individuata in prossimità delle diramazioni capillari del glomerulo di topo [70].

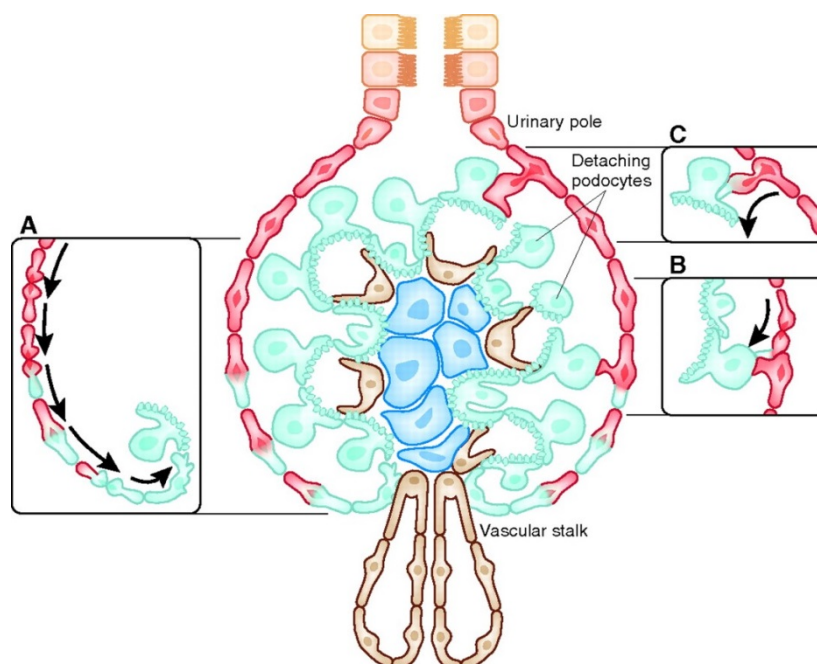




**Figura 3. Distribuzione gerarchica dei progenitori renali umani adulti.** I progenitori  $CD133^+CD24^+$  (in rosso) sono localizzati al polo urinario, in continuità sia con i podociti (in blu), che con le cellule tubulari (in bianco) dal lato opposto. Una popolazione di cellule di transizione ( $CD133^+CD24^+PDX^-$ , rosso/blu) con caratteristiche fenotipiche intermedie a tra quelle associate ai progenitori renali (rosso) e quelle tipiche dei podociti differenziati (blu) si localizza, invece, tra il polo urinario e quello vascolare. Presso il polo vascolare glomerulare la popolazione di transizione è in contiguità di cellule che mancano dell'espressione di *markers* di progenitori ma che risultano positive per l'espressione di quelli di podociti maturi (blu). Sono rappresentate anche le cellule endoteliali (in giallo) e le cellule mesangiali (in verde). Romagnani P. *Stem Cells*, 2009;27(9): 2247-2253.

Di maggior interesse è il fatto che il *tagging* genetico delle cellule epiteliali parietali nel topo ha confermato, in modo inequivocabile, che i podociti sono generati da cellule dell'epitelio parietale capsulare, le quali proliferano e differenziano spostandosi dal polo urinario in direzione del polo vascolare. Ciò avviene attivamente, ed in particolar modo, durante la crescita del rene nelle fasi di infanzia ed adolescenza, ma può aver

luogo anche a seguito di induzione di un danno che consenta una lenta e regolata generazione *de novo* di podociti, come ad esempio un nefrectomia monolaterale [70]. I progenitori renali umani  $CD133^+CD24^+$ , quando inoculati in topi SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) affetti da nefropatia da adriamicina, modello sperimentale della glomerulosclerosi focale segmentale umana, sono inoltre capaci di integrarsi a livello delle strutture glomerulari danneggiate, ove ne facilitano il recupero morfo-funzionale [69] (Figura 4).



**Figura 4.** I progenitori glomerulari sono in grado di sostituire i podociti persi. **A-** Popolazione cellulare di transizione localizzata tra il polo urinario e il polo vascolare. **B-** Formazione di ponti cellulari che possono guidare la migrazione veloce, la proliferazione e la differenziazione di un progenitore in un adiacente podocita perso. **C-** La formazione del ponte cellulare può direttamente far differenziare il progenitore in podocita. Modificato da *Lasagni L et al. J Am Soc Nephrol 21,1612-1619,2010.*

Quando, invece, le stesse cellule  $CD133^+CD24^+$  site al polo urinario della capsula di Bowman vengono iniettate in topi SCID affetti da AKI, sono capaci di differenziare verso un fenotipo tubulare e di rigenerare le strutture di differenti porzioni del tubulo

renale, riducendo l'entità del danno tubulare sia dal punto di vista morfologico che funzionale [57].

Successivamente, i progenitori CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> sono stati ulteriormente distinti in due sottopopolazioni grazie all'espressione della molecola CD106 [71]. Angelotti e colleghi hanno infatti caratterizzato la popolazione localizzata al polo urinario della capsula di Bowman umana come CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>+</sup>, mentre nel tubulo prossimale e nel tubulo convoluto distale sono presenti dei progenitori raramente sparsi CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>-</sup>. Nello studio [71] è dimostrato che le cellule CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>+</sup> esibiscono un elevato tasso proliferativo e sono in grado di differenziare sia verso il *lineage* podocitario che verso quello tubulare. Per contro, le cellule CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>-</sup> mostrano un tasso proliferativo minore ed un fenotipo già commissionato verso la linea epiteliale tubulare. A differenza delle restanti popolazioni renali, sia le cellule CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>+</sup> che le cellule CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>-</sup> possiedono un'alta resistenza all'apoptosi e, se iniettate in topi SCID affetti da ATN, sono in grado di generare nuove cellule tubulari promuovendo il miglioramento della funzione renale [71]. Questi dati confermano che, almeno in uomo, il fenotipo dei progenitori CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>-</sup> è distinto da quello delle cellule tubulari differenziate, ma anche da quello dei progenitori bipotenti CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>+</sup>. Pertanto, grazie a quanto provato da Angelotti *et al.* è stato possibile, per la prima volta, non solo dimostrare che esiste una specifica popolazione di cellule progenitrici residenti nel tubulo di origine umana, ma anche che tale *pool* è in grado di promuovere il recupero strutturale e morfologico del tubulo murino a seguito ad induzione di danno acuto, esercitando così effetti terapeutici sulla funzionalità renale.

In conclusione, è pertanto possibile ipotizzare che almeno una parte della giunzione tubulo-glomerulare, presentando un'area di aspetto intermedio tra quello glomerulare e quello tubulare, con microvilli prominenti sulle cellule parietali sia nell'uomo che in altre specie, possa attivarsi con il fine di riparare strutture tubulari. Ciò avverrebbe, in particolare, durante il periodo di sviluppo e di crescita del rene, in corso di patologie croniche o nell'invecchiamento [72-74]. Tuttavia, la presenza, nell'uomo, di cellule progenitrici con un fenotipo parzialmente commissionato verso il *lineage* tubulare e raramente sparse lungo tutto il tubulo fa pensare che sia tale compartimento cellulare CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>-</sup> quello specificamente adibito alla sostituzione di cellule morte e che, per primo e maggiormente, si attiva in caso di AKI. Ciò nonostante, per molto tempo si è pensato che la rigenerazione tubulare dipendesse dalla migrazione diretta delle cellule epiteliali adiacenti alla sede del danno, in analogia a quanto descritto a livello della cute [75, 76]. L'epitelio tubulare ha, infatti, capacità auto-rigenerativa a seguito di un danno acuto e le cellule epiteliali tubulari sono in grado di proliferare così da rimpiazzare le cellule morte [77, 78]. Vogetseder *et al.* hanno proposto che la pronta risposta proliferativa dell'epitelio tubulare danneggiato sia dovuta al blocco del ciclo cellulare in fase G1 tipico delle cellule epiteliali del tubulo, le quali, se opportunamente stimolate, possono avviare i processi duplicativi e, di conseguenza, rigenerativi [79, 80]. Al momento, tuttavia, è ancora poco chiaro se le cellule con capacità rigenerative appartengano all'epitelio tubulare differenziato o rappresentino un *subset* di cellule progenitrici raramente sparse lungo il nefrone: la loro presenza è stata finora descritta solo nell'uomo, e il loro reale contributo ai processi rigenerativi in modelli sperimentali non è stato del tutto risolto. Molti studi suggeriscono comunque l'esistenza di una popolazione di progenitori tubulari anche nel topo [56, 61, 81, 82].

Lo scopo di questo studio è quello di dirimere la controversia legata alla rigenerazione tubulare così da determinare, mediante l'impiego di modelli murini transgenici, se la rigenerazione tubulare osservata in seguito ad AKI sia sostenuta dalle cellule tubulari differenziate o da un *subset* di progenitori raramente distribuiti (detti *scattered*) lungo il tubulo.

## **1.4 MODELLI ANIMALI TRANSGENICI**

---

I modelli animali transgenici sono uno strumento molto potente che permette di comprendere e risolvere finemente le gerarchie e le dinamiche cellulari sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Per questo motivo, nell'ultimo decennio il loro sviluppo in ambito scientifico ha avuto un incremento esponenziale: il loro impiego permette, ad esempio, di studiare *in vivo* quale sia l'effetto della delezione di un determinato gene in uno specifico tipo cellulare e come ciò correli con un dato fenotipo, quale sia il ruolo fisiologico di uno specifico gene durante lo sviluppo d'organo o quale sia la risposta di cellule staminali organo-specifiche nel contesto di un particolare tipo di insulto [83-86]. Inoltre, grazie ai modelli transgenici è oggi possibile non solo tracciare il movimento, la morte e la sostituzione di ogni singola cellula all'interno di una più ampia popolazione, ma anche studiare come differenti *pool* cellulari si interfacciano ed interagiscono tra loro in varie condizioni sperimentali [84]. Ciò che rende possibile l'osservazione dei sopra citati fenomeni è l'introduzione nel genoma animale di transgeni codificanti, generalmente, per proteine fluorescenti che permettono di marcare ed individuare le singole cellule. Questi sono chiamati transgeni *reporter* e sono perlopiù codificanti per proteine fluorescenti che garantiscono una sensibilità ed una specificità di vari ordini di grandezza superiore all'impiego di proteine come la  $\beta$ -galattosidasi; queste ultime sono infatti rilevabili solamente mediante immunostochimica o con metodi basati su anticorpi, i quali sono però soggetti a legame non specifici, possono marcare più cloni e non permettono di mantenere la marcatura di eventuali cellula figlia qualora vi sia una divisione cellulare, tutti dettagli che impediscono analisi di natura clonale [87].

Tuttavia, per marcare in maniera univoca la popolazione cellulare di interesse senza che questa sia confusa con altre popolazioni, è essenziale che i meccanismi genetici

che portano all'espressione del *reporter* siano controllati in maniera cellulo-specifica. Per questo motivo sono introdotti nel genoma animale dei promotori, ossia dei transgeni che servono ad attivare l'intero meccanismo che porta all'espressione dei *reporter* e che ne determina il controllo spaziale d'espressione, ossia in quale cellula ciò avverrà. I promotori sono generalmente geni espressi solo ed unicamente dal tipo cellulare d'interesse ma che sono stati ingegnerizzati di modo che, quando la cellula esprime fisiologicamente il gene in questione, sarà attivato anche il transgene-promotore. Pertanto i promotori sono costruiti in modo da essere identici per sequenza al gene fisiologicamente presente nel genoma animale, cosa che ne determina la simultanea espressione, ma a cui sono stati aggiunti elementi che sono in grado di attivare l'intero sistema di modifiche genetiche desiderate in base all'*end point* sperimentale. Per far sì che sia marcata dal *reporter* la sola popolazione di interesse è fondamentale che il promotore scelto sia espresso selettivamente ed unicamente dal *pool* cellulare desiderato: solo così è infatti possibile colorare una singola cellula o una data popolazione senza confonderla con altre [84, 88].

Per raggiungere questo obiettivo i promotori, oltre ad essere tessuto- o cellula-specifici, sono ingegnerizzati così da indurre l'espressione di un enzima di ricombinazione nelle sole cellule positive al promotore scelto. Questo enzima, a sua volta, è in grado di modificare in maniera irreversibile la sequenza acidonucleica del transgene *reporter* inducendone l'espressione. Il sistema più comunemente usato per indurre la ricombinazione genetica è il sistema Cre ricombinasi-LoxP, il quale si basa sull'azione dell'enzima Cre ricombinasi (*causes recombination of the bacteriophage P1 genome*) e sulla sua capacità di riconoscere i siti LoxP (*locus of X-over P1*) [88, 89]. La Cre ricombinasi riconosce una sequenza nucleotidica di 34 paia di basi, chiamata appunto LoxP, che è introdotta nel genoma murino generalmente assieme al

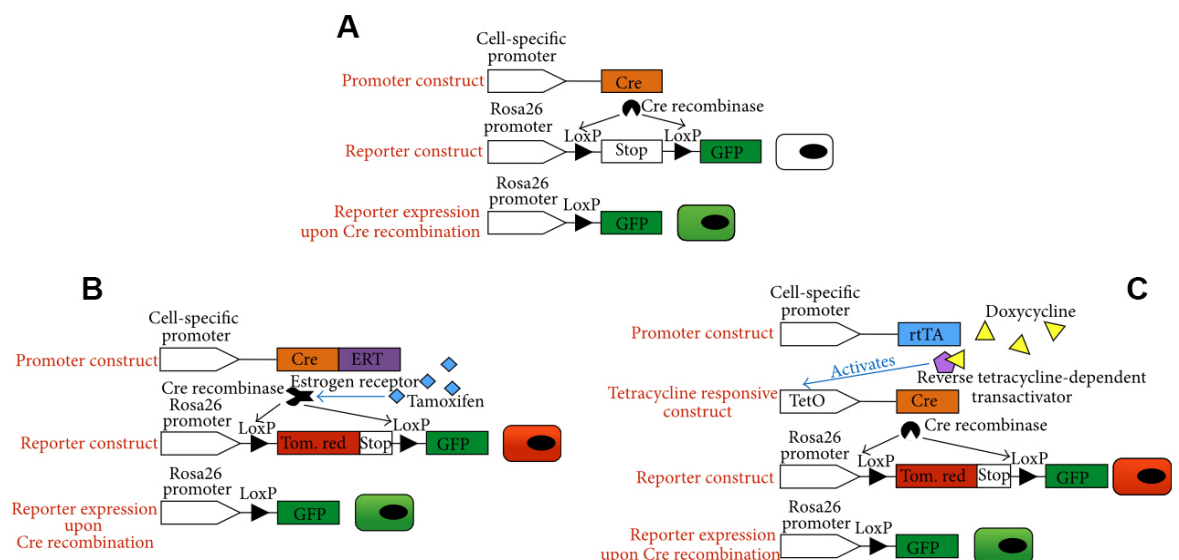
transgene *reporter*, ed è in grado di rimuovere sequenze interposte (o floxate) tra due siti LoxP con lo stesso orientamento (entrambe 5'→3' o 3'→5') (Figura 5A) [84, 88-90]. Nel caso in cui, ad esempio, una sequenza di stop fosse floxata tra i due siti LoxP posti a monte del gene *reporter*, in seguito alla delezione operata dalla Cre ricombinasi, il *reporter* sarà svincolato dallo stop e potrà quindi essere espresso dalla cellula e da tutta la sua progenie (Figura 5A).

L'uso dei transgeni *reporter* ha acquisito un ruolo di primaria rilevanza in un *tool* molto importante per analisi di rigenerazione tissutale eseguite in modelli *in vivo*: il *lineage tracing*. Con il termine *lineage tracing* si intende la possibilità di marcare con un *reporter* una singola cellula, o una popolazione di interesse, e di identificare tutta la progenie derivante da quella cellula originaria. Infatti, dal momento che la modifica al DNA che porta all'espressione del gene *reporter* è irreversibile, l'espressione del *reporter* sarà ereditata da tutte le cellule figlie, rendendo possibile la quantificazione della progenie derivata da una singola cellula madre, così come studiare il comportamento delle cellule neo-generate sia in condizioni fisiologiche che patologiche [88]. Le analisi di *lineage tracing* rendono pertanto possibile non solo tracciare eventuali espansioni clonali dovute ad eventi rigenerativi, ma anche ottenere informazioni sull'estensione della duplicazione della popolazione marcata o capire lo stato differenziativo di una cellula, sia basandosi sull'espressione di determinati geni che per effetto posizionale [83, 84]. Grazie al *lineage tracing* sono quindi ottenibili livelli di informazioni senza precedenti sull'organizzazione di popolazioni differenziate o su *pool* staminali sia nei tessuti post-natali che in fase sviluppo, motivo per cui sempre più modelli murini sono costruiti in modo da permettere tali tipi di analisi. Ciò che caratterizza questi modelli, chiamati inducibili, è la possibilità di avere una regolazione temporale oltre che spaziale (data dal promotore scelto per marcare la



popolazione di interesse) sull'evento di ricombinazione Cre-mediato [84, 88, 89]. Difatti, mentre nei modelli chiamati costitutivi, per contrapposizione a quelli inducibili, la ricombinazione genetica che porta all'espressione del *reporter* avviene in ogni cellula che, in qualsiasi momento della sua vita o in qualsiasi condizione dovesse esprimere il promotore cellula-specifico, nei modelli inducibili è l'operatore a scegliere quando avverrà l'evento ricombinativo. Nel caso dei modelli costitutivi si parla perciò di *in vivo genetic fate mapping*, il quale è frequentemente ed erroneamente confuso con il concetto di *lineage tracing*, circostanza che può indurre verso un'erronea interpretazione dei risultati sperimentali. Infatti, nei modelli costitutivi un'eventuale upregolazione o attivazione transiente del promotore cellula-specifico (come in caso di dedifferenziazione) sia nella popolazione desiderata, che in differenti *pool* cellulari, è in grado di indurre la ricombinazione genetica che porta all'espressione del *reporter*, falsando così le successive analisi. Al contrario, nei modelli inducibili il promotore cellula-specifico porta all'espressione della Cre ricombinasi solo in seguito alla somministrazione di molecole esogene che agiscono da induttori, come nei sistemi regolati da tamossifene (CreER<sup>T</sup>), o nei sistemi regolati da tetraciclina (Tet) [84, 88]. Per entrare maggiormente nel dettaglio, i sistemi basati sulla somministrazione di tamossifene sono costruiti di modo che il promotore cellula-specifico dia luogo, quando espresso dal *pool* cellulare desiderato, all'espressione costitutiva di una proteina di fusione costituita da una forma inattivata della Cre ricombinasi fusa ad una forma modificata del recettore per gli estrogeni (ER<sup>T</sup>). Quando il tamossifene è somministrato via iniezione intraperitoneale o mediante dieta, la molecola si lega al recettore per gli estrogeni inducendo una modifica conformazionale che si trasmette anche alla Cre ricombinasi attivandola e garantendone l'accesso all'interno del nucleo, ove può agire sul DNA (Figura 5B) [84, 88]. Nei sistemi

controllati da tetraciclina, invece, il promotore cellula-specifico induce l'espressione del fattore trascrizionale *reverse tetracycline-controlled transactivator* (rtTA). Qualora tale fattore trascrizionale sia legato dalla Doxicilina somministrata via dieta, acqua o iniezione, ne risulterà attivato e sarà in grado di legare la sequenza del transgene Tet (*Tetracycline-controlled transcriptional activation-elements*), evento che porta all'espressione della Cre ricombinasi codificata subito a valle degli elementi Tet e che determina, in ultima analisi, la marcatura della cellula (Figura 5C) [84, 88]. I sistemi inducibili permettono, quindi, di marcare il *pool* cellulare di interesse solo durante la finestra di somministrazione dell'induttore, rendendo impossibile qualsiasi nuovo evento di ricombinazione genetica in seguito alla rimozione della molecola, anche qualora la cellula in oggetto fosse promotore-positiva [84, 88]. E' così possibile marcare solo le cellule desiderate, e solo nel momento richiesto in base all'*end point* sperimentale, senza che cellule che dovessero ad esempio andare incontro a dedifferenziazione ed esprimere il promotore in momenti successivi alla finestra di somministrazione risultino marcate.

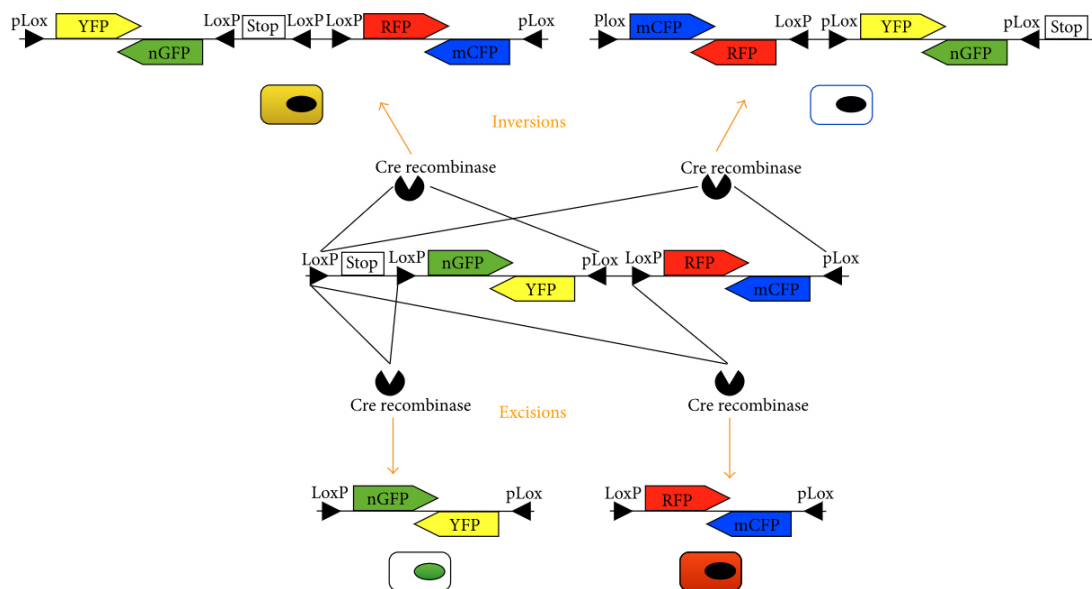


**Figura 5.** Rappresentazione schematica dei principali meccanismi e strategie transgeniche discusse. Ogni linea rappresenta un differente ceppo transgenico murino che deve essere incrociato con gli altri affinché si possa ottenere il modello desiderato nella sua completezza. **A-** Il promotore cellula-specifico

controlla direttamente l'attività della Cre ricombinasi creando così un modello costitutivo. Quando il promotore sarà attivato la Cre ricombinasi sarà espressa ed avrà accesso ai siti LoxP, rimuovendo così la cassetta di Stop floxata tra due siti LoxP. Questo evento ricombinatorio svincola la sequenza della GFP dal sito di Stop, permettendo la sua espressione. **B-** Modello inducibile basato sulla proteina di fusione costituita dal recettore per gli estrogeni (ER<sup>T</sup>) e dalla Cre ricombinasi. Se il promotore scelto risultasse attivato la proteina di fusione sarebbe costitutivamente espressa, ma sarebbe attivata solo in seguito a somministrazione di tamossifene che, legando l'ER<sup>T</sup>, induce un cambio conformazionale che garantisce l'ingresso della proteina nel nucleo, dove la Cre potrebbe agire sui siti LoxP. **C-**Modello inducibile basato sul fattore trascrizionale rtTA, il quale è costitutivamente espresso in forma inattiva nelle cellule positive al promotore scelto. Il legame con la Doxiciclina permetterebbe il legame della rtTA alle sequenze TetO (*Tetracycline-Controlled Transcriptional Activation-On*) che controllano l'espressione della Cre ricombinasi, attivando così i meccanismi ricombinatori già descritti in A e B. Modificata da Lombardi D et al. *Stem Cells Int.* 2015;2015:678347.

Nell'ultimo decennio l'introduzione dei *reporter* multicolore ha fortemente incrementato l'*output* di dati derivanti dalle analisi di *lineage tracing*. Tra i *reporter* multicolore maggiormente impiegati per meglio capire e risolvere le dinamiche rigenerative, l'organizzazione dei compartimenti staminali e per evidenziare putative espansioni clonali è stato sviluppato nel 2007 da Livet *et al.* il sistema Confetti, chiamato anche Rainbow [91-93]. Questo *reporter* permette l'espressione casuale di uno tra quattro fluorofori, ossia GFP, RFP (*Red Fluorescent Protein*), YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) e CFP (*Cyan Fluorescent Protein*) grazie all'impiego di varianti incompatibili dei siti LoxP (LoxP e PLox) poste in maniera alternata con orientamento invertito (5'→3' e 3'→5'), e grazie al fatto che i geni *reporter* sono posti *in tandem* tra tali siti con orientamento opposto (5'→3' e 3'→5') [84, 88]. In questo modo è possibile ottenere delle excisioni (se la Cre ricombinasi lega due siti LoxP) o delle inversioni di sequenza acidonucleica (se la Cre Ricombinasi lega un sito Loxp ed un PLox) mutualmente esclusive dei transgeni *reporter*, evento che forza le cellule ad acquisire in maniera stabile solo uno tra i 4 colori possibili (Figura 6) [91]. La casualità di ricombinazione, determinando la possibilità di taggare le cellule con differenti

fluorofori, permette ai sistemi costruiti con il *reporter* Rainbow di rendere evidenti in maniera univoca le espansioni clonali derivanti da una singola cellula madre: queste appariranno difatti come *cluster* continui di cellule dello stesso colore [84, 89]. Inoltre, siccome cellule adiacenti saranno presumibilmente e statisticamente marcate con differenti fluorofori, il transgene Rainbow permette non solo lo studio di più cellule staminali nel contesto della nicchia di residenza, ma consente anche di disettare come differenti effetti posizionali all'interno della nicchia stessa possano influire sulla capacità differenziativa e sul destino di cellule staminali o progenitori, sia in condizioni fisiologiche che patologiche [87, 92, 93].



**Figura 6.** Rappresentazione schematica del sistema *reporter* Rainbow. Al centro, il costrutto transgenico completo prima di eventi ricombinativi. In basso, le excisioni eliminano alcuni dei geni *reporter* portando la cellula verso una data colorazione. In alto, le inversioni si basano sui siti PLox e sono impiegate per invertire il costrutto, o parti di esso, così da favorire l'una o l'altra colorazione della cellula (la Cre ricombinasi inverte quei segmenti floxati tra due siti Lox posti con orientamento testa-a-testa). Sia i segmenti excisi che quelli invertiti possono continuare ad essere invertiti finché vi sia attività della Cre ricombinasi, dal momento in cui i siti LoxP sono rimossi dall'evento ricombinatorio, mentre i PLox no. Di conseguenza, questo sistema *reporter* necessita di modelli inducibili in quanto solo la rimozione dell'induttore è in grado di stabilizzare la colorazione di una data cellula. Modificata da Lombardi D et al. *Stem Cells Int.* 2015;2015:678347.

## **1.5 ATTUALE DIBATTITO SULLA RIGENERAZIONE TUBULARE**

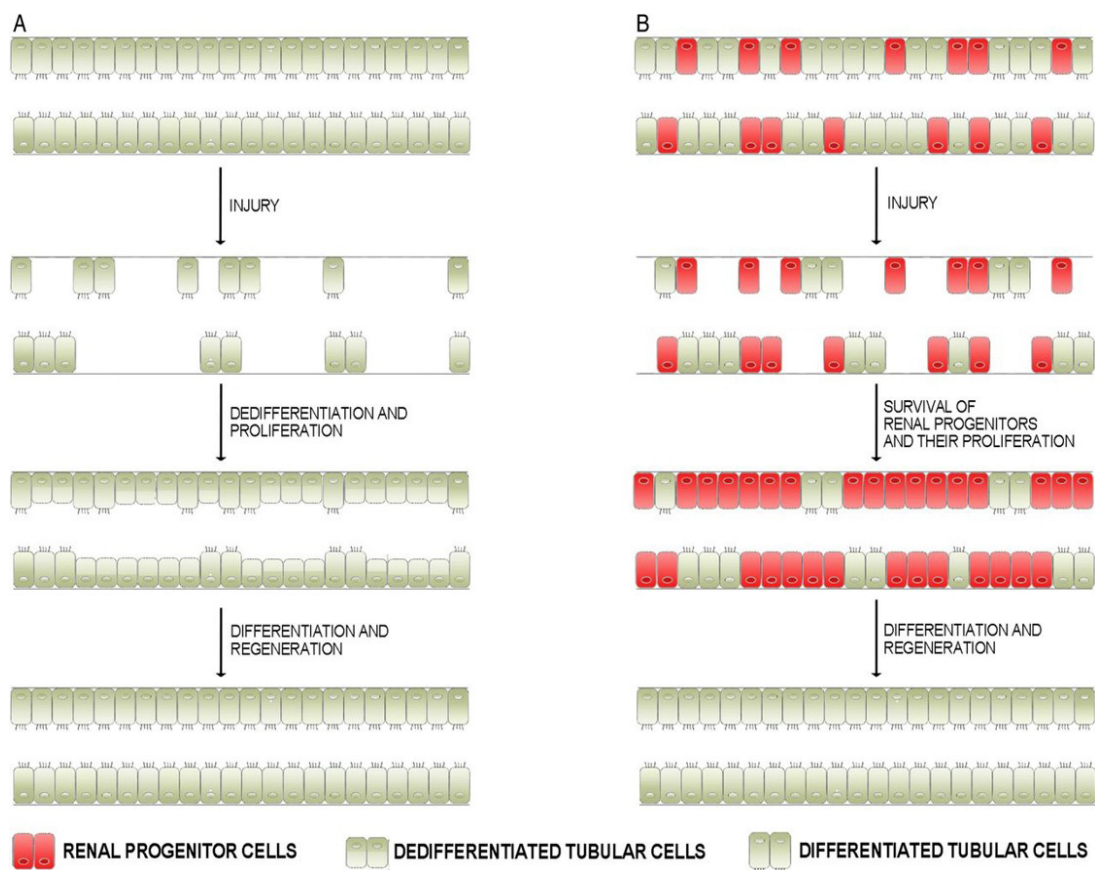
---

Tradizionalmente l'AKI è stata considerata una patologia facilmente reversibile, in particolar modo dopo danni tubulari di lieve entità che permettono persino una completa *restitutio ad integrum* della funzionalità tubulare [19]. L'alta capacità rigenerativa attribuita al tubulo e alle cellule epiteliali che lo compongono è stata ipotizzata in quanto è frequentemente osservabile una rapida ripresa funzionale in seguito ad episodi di AKI di lieve-media entità: infatti, in modelli sperimentali animali a distanza di 3-4 settimane dall'induzione del danno tubulare era riportabile un'apparente integrità tissutale, e inoltre si osservava una rapida e robusta attività proliferativa del tessuto tubulare, così come evidenziabile con marcatori del ciclo cellulare [94]. Tuttavia, nel rene il recupero funzionale non rispecchia necessariamente l'effettiva integrità tissutale, come dimostrato dal fatto che una normale funzionalità renale è riscontrabile anche in pazienti sottoposti ad uninefrectomia, i quali possiedono però solo metà del patrimonio di nefroni che avevano inizialmente [16]. Analogamente, il recupero funzionale può avvenire anche in caso persista un danno significativo ed un'importante perdita di nefroni, e questo dà ragione della forte associazione tra AKI e rischio di sviluppo di ESRD riscontrata in studi epidemiologici condotti su pazienti affetti da varie condizioni cliniche [12-14]. Ciò non è vero soltanto per quei pazienti che abbiano avuto episodi particolarmente severi di AKI, nei quali il rischio a lungo termine di sviluppo di ESRD di grado 4 o 5 risulta essere incrementato fino a 28 volte [14], ma anche per coloro che abbiano avuto danni di lieve entità, ossia pazienti nei quali il rischio di sviluppo di ESRD aumenta fino a 4 volte rispetto alla popolazione generale non affetta da AKI. Per esempio, in una coorte di pazienti

sottoposti ad angiografia coronarica e che avevano sviluppato AKI, il rischio di sviluppo di ESRD cresceva fino a 4 volte se erano pazienti che si attestavano in AKIN (*Acute Kidney Injury Network*) di fascia 1 [15], e raggiungeva addirittura le 12 volte in pazienti in AKIN di fascia 2-3 rispetto ad individui non colpiti da AKI [15, 16]. E' quindi evidente che l'apparente integrità tissutale riscontrata a distanza di alcune settimane dall'insorgenza del danno non sia in grado di dare informazioni su quanti nefroni siano andati perduti e quanti di questi siano stati funzionalmente danneggiati in modo irreversibile. Inoltre, i marcatori del ciclo cellulare sono in grado di indicare l'ingresso nel ciclo cellulare ma non il suo effettivo completamento, come sarò discusso più avanti, e ciò può portare a sovrastimare la reale capacità proliferativa delle cellule tubulari. Ci si interroga quindi sulle possibilità che tutte queste osservazioni siano compatibili con un'alta capacità rigenerativa del tubulo e con una diffusa capacità delle cellule tubulari sopravvissute di andare incontro a proliferazione al fine di sostituire le cellule adiacenti che siano state perse. Cosa accade realmente in seguito al danno tubulare e quale è la reale entità della rigenerazione tubulare? [19].

A tal proposito, negli ultimi anni, si è registrato un forte dibattito sull'origine delle cellule proliferanti che permettono la ripresa istologica e funzionale del compartimento tubulare. Infatti, per quanto sia ormai sia stato ampiamente accertato che il potenziale rigenerativo sia da attribuirsi esclusivamente ad una fonte intratubulare, vi sono visioni divergenti sulla reale natura ed origine di queste cellule. Attualmente, due sono le ipotesi che sono state proposte e sono sotto vaglio. La prima trova le sue fondamenta nel concetto che il ridotto livello basale di proliferazione cellulare del tubulo prossimale adulto non richieda una popolazione di progenitori per il mantenimento omeostatico, oltre al fatto che le cellule epiteliali tubulari sono bloccate nella fase G1 del ciclo cellulare, come se fossero pronte a progredire nel ciclo in caso di danno [80].

In uno scenario del genere, le cellule tubulari differenziate andrebbero transientemente incontro ad un ciclo di dedifferenziazione, proliferazione ed, infine, re-differenziazione (Figura 7A). La seconda ipotesi propone l'esistenza di una popolazione di progenitori tubulari quiescenti e pronti a rientrare nel ciclo cellulare al fine di rimpiazzare le cellule perse a causa del danno tubulare (Figura 7B) [58, 71, 81]. Sono quindi le cellule terminalmente differenziate a rimpiazzare le cellule adiacenti perse, o una popolazione pre-esistente di progenitori tubulari è responsabile di tale *restitutio ad integrum*? [19].



**Figura 7.** Rappresentazione schematica delle differenti ipotesi proposte per spiegare la rigenerazione tubulare in seguito ad AKI. **A-** In seguito a danno tubulare le cellule tubulari differenziate sopravvissute dedifferenziano e diventano capaci di proliferare, migrare e re-differenziare, sostituendo così le cellule tubulari perse. **B-** Nel rene sano, i progenitori tubulari si trovano *scattered* tra le cellule tubulari differenziate ma, in seguito al danno, essendo maggiormente resistenti alla morte, sopravvivono preferenzialmente al danno, proliferano, migrano e rimpiazzando infine le unità perse. *Lombardi D et al. Nephrol Dial Transplant. 2015 Jul 13. pii: gfv262. Epub ahead of print.*

Seppur inizialmente fosse stato ipotizzato anche un contributo da parte di cellule del midollo osseo, nel 2008 Humphreys *et al.* hanno dimostrato, per primi, che la capacità rigenerativa del tubulo prossimale è totalmente derivante da una fonte cellulare intratubulare che gli autori hanno chiamato “*Intrinsic epithelial cells*” [95]. Per fare ciò Humphreys *et al.* sono ricorsi ad una strategia di *lineage tracing* basata su di un modello murino guidato dal promotore Six2 (*Six homeobox 2*). Six2 è un gene *homeobox* espresso esclusivamente dalle cellule del mesenchima metanefrico che stanno differenziando nel futuro epitelio renale e che, nel modello transgenico costruito dagli autori, quando attivato, portava all’espressione di una proteina di fusione costituita dalla Cre ricombinasi unita alla GFP [95]. La proteina di fusione, in questi animali, è transientemente espressa nei precursori renali epiteliali durante il periodo di sviluppo di attiva nefrogenesi, ma non è espressa nell’animale adulto o come conseguenza di danno. Nello studio, topi Six2.GFP-Cre sono stati incrociati con le linee *reporter* LacZ o RFP, in cui la sequenza codificante il *reporter* è preceduta da una cassetta di stop floxata. Di conseguenza, in tutta la progenie derivante dall’incrocio dei due modelli, in seguito alla rimozione della cassetta di stop ad opera della Cre ricombinasi, tutte le cellule epiteliali renali di derivazione mesenchimale, dalle cellule della capsula di Bowman a quelle della giunzione tra segmento di connessione del tubulo e dotti collettori, acquisivano l’espressione costitutiva ed ereditabile del *marker*. Nel topo adulto, quindi, il compartimento tubulare era completamente marcato, mentre quello interstiziale e tutte le cellule tubulari extrarenali erano negative all’espressione del transgene *reporter* [95, 96]. Nell’articolo è evidenziato come, in seguito ad un insulto di natura ischemica (*Ischemia-Reperfusion Injury*, IRI), non sia riportabile alcuna diluizione del *reporter* e che le cellule sopravvissute al danno sono positive sia al *reporter* che al *marker* di proliferazione Ki-67. Gli autori hanno così



dimostrato che la riparazione del compartimento tubulare è sostenuta unicamente da cellule LacZ o RFP<sup>+</sup> che, nel topo adulto, possono avere unicamente origine tubulare, escludendo così qualsiasi contributo midollare [95, 97]. Questa elegante strategia tuttavia non permette di distinguere le cellule epiteliali tubulari terminalmente differenziate da putativi progenitori tubulari già commissionati verso il fenotipo tubulare, dal momento in cui tutte le cellule che formano il tubulo sono marcate al momento dell'embriogenesi, rendendo impossibile distinguere tra eventuali differenti potenziali rigenerativi di putative *subpopulations* tubulari. Inoltre, la divisione cellulare era evidenziata mediante iniezione di BrdU e marcatura per Ki-67, soluzione che permette però solo di individuare le cellule che sono entrate nel ciclo cellulare, ma non dimostra necessariamente che queste abbiano completato la divisione mitotica [19].

### **1.5.1 EPPUR SI MUOVE: DATI A SOSTEGNO DELL'ESISTENZA DEI PROGENITORI TUBULARI**

Vari dati ottenuti in uomo hanno fatto tuttavia permesso di ipotizzare che all'interno di queste “*Intrinsic epithelial cells*” fossero presenti differenti popolazioni con differenti capacità rigenerative e potenzialità proliferative. Lindgren *et al.* nel 2011 hanno suggerito l'esistenza, nel rene dell'adulto umano, di progenitori tubulari *scattered* nel contesto delle cellule cilindriche differenziate dell'epitelio tubulare prossimale [43]. Gli autori sono stati infatti capaci di dimostrare che tali cellule hanno una elevata attività dell'aldeide deidrogenasi (ALDH), caratteristica associata a staminalità negli organismi complessi, che coesprimono i marcatori di superficie CD133 e CD24, già descritti per i progenitori renali presenti nella capsula di Bowman [98-101], e che esprimono Citocheratina 7, Citocheratina 19, il gene antiapoptotico

BCL2 e la Vimentina, anche questi tutti geni associati ad un fenotipo staminale. In aggiunta, in biopsie di pazienti affetti da necrosi tubulare acuta in fase di recupero, gli autori sono stati in grado di provare che le cellule CD133<sup>+</sup>Vimentina<sup>+</sup> rappresentano la popolazione in attiva proliferazione, lasciando presupporre che tali cellule rappresentino effettivamente un *pool* di progenitori. In accordo con queste osservazioni, Sallustio *et al.* hanno confermato l'esistenza nel rene umano adulto di rare cellule CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> sparse lungo l'epitelio tubulare, sia nel segmento del tubulo prossimale che distale, e hanno osservato che tali cellule hanno un profilo di espressione genica non statisticamente diverso da quello delle cellule CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> già individuate nella capsula di Bowman [102].

Successivi studi hanno ulteriormente deposto a favore dell'esistenza di progenitori tubulari *scattered*. In molti di questi lavori è stato dimostrato come siano presenti a livello del tubulo prossimale, del *thick ascending limb*, del tubulo convoluto distale e del dotto connettore cellule positive a CD133 e CD24 ed esprimenti bassi livelli di marcatori tipicamente associati a cellule tubulari differenziate [55, 71, 103]. Tra gli altri, Smeets *et al.* non solo hanno confermato la presenza di questa popolazione di progenitori CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>, ma hanno anche dimostrato come tali cellule siano contraddistinte dall'espressione di un'ampia gamma di marcatori tipicamente associati ad un fenotipo staminale, quali Vimentina, Annessina 3 e Pax2 (*Paired Box 2*), e che possiedono caratteristiche morfologiche tipiche di popolazioni staminali, quali la presenza di un ridotto citoplasma, uno scarso numero di mitocondri e, nel caso specifico, una forma appiattita con assenza delle invaginazioni basolaterali tipiche delle cellule tubulari differenziate [103]. Analogamente, Hansson *et al.* hanno dimostrato, usando campioni bioptici umani adulti, che le cellule CD133<sup>+</sup> intratubulari hanno nuclei più piccoli e scuri, indice di uno stato maggiormente condensato della

cromatina, rispetto alle cellule circostanti CD133<sup>-</sup>, e che a livello basale presentano della materia filamentosa costituita da Vimentina e COL7A1 (collagene7 catena  $\alpha$ 1), la quale conferisce una maggior capacità di adesione alla membrana basale tubulare [104].

Un notevole passo avanti per quanto riguarda la caratterizzazione di questi progenitori *scattered* nel tubulo è stato fatto grazie allo studio di Angelotti *et al.*, i quali sono riusciti a identificare e caratterizzare specificamente tale sottopopolazione in reni umani adulti [71]. Nel lavoro gli autori hanno dimostrato come, a differenza della popolazione di progenitori CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>+</sup> localizzati al polo urinario della capsula di Bowman, i progenitori tubulari sono sì caratterizzati dall'espressione di CD133 e CD24 ma mancano invece dell'espressione di CD106, o V-CAM1 (*vascular cell adhesion molecule 1*). Le cellule CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>-</sup> sono inoltre presenti principalmente come entità raramente distribuite nel tubulo prossimale e nel tubulo convoluto distale, ed esibiscono una capacità differenziativa unipotente verso il fenotipo epiteliale tubulare, come dimostrato mediante xenotrapianto effettuato in un modello SCID di AKI indotta da iniezione intramuscolare di glicerolo. Infatti, quando progenitori umani CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>-</sup> erano iniettati nei topi mostravano non solo un'alta capacità proliferativa, ma anche un'alta capacità di *homing* e di integrazione a livello dell'epitelio tubulare in fase rigenerativa, di cui diventano successivamente la porzione preponderante [71]. Questi dati sono a forte sostegno dell'ipotesi che, almeno in uomo, esista un *pool* di progenitori parzialmente commissionati verso il fenotipo tubulare ed in grado di sostituire le cellule perse in caso di insulto a carico dell'epitelio del tubulo. Inoltre, in molti degli studi già citati è evidenziato come, rispetto alle cellule terminalmente differenziate, i progenitori tubulari mostrino una maggiore capacità di resistenza alla morte grazie all'espressione ad alti livelli di geni con funzione

antiapoptotica come BCL-2 o grazie ad un ridotto numero di mitocondri [103, 104]: difatti, quando cellule CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>-</sup> sono esposte *in vitro* ad agenti tossici come l'emoglobina, si ha un minor tasso di morte rispetto a quanto osservabile nelle stesse condizioni con la controparte differenziata [71]. Tutto ciò è ulteriormente comprovato dallo studio di Hansson *et al.*, i quali hanno sviluppato un sistema di coltura *ex vivo* per l'induzione di AKI mediante Ischemia/Riperfusione di reni umani derivanti da nefrectomia: con questo sistema è stato possibile dimostrare che, nonostante la massiva necrosi tubulare, la popolazione di progenitori CD133<sup>+</sup> rimaneva perlopiù intatta grazie alle già evidenziate caratteristiche di resistenza alla morte cellulare [104].

E' pertanto possibile affermare che, nel rene umano adulto, esistano due popolazioni tubulari con differente capacità proliferativa, distinta capacità rigenerativa e diversa sensibilità ad insulti. L'esistenza di questi progenitori tubulari, i quali sono presenti non solo in individui di tutte le età indipendentemente da eventuali nefropatie, ma che sono riscontrabili anche in animali come il maiale o le scimmie, permette di ipotizzare che tali cellule rappresentino realmente una sub-popolazione distinta atta alla rigenerazione tubulare che si è conservata nel corso dell'evoluzione, e che non rappresentino uno stato funzionale derivato da dedifferenziazione conseguente all'instaurarsi di un danno tubulare [19, 105].

Tuttavia, gli studi condotti su tessuti e campioni umani hanno trovato un basso riscontro nei modelli animali più frequentemente usati in laboratorio: i roditori. Nonostante siano noti i marcatori che permettono l'identificazione univoca dei progenitori renali umani, la caratterizzazione di putativi *pool* staminali in ratto o in topo non può essere effettuata mediante marcatura con anticorpi o *lineage tracing* basati sulle glicoproteine di membrana CD133 e CD24, in quanto molecole altamente

specie-specifiche e, pertanto, impiegabili solo nell'uomo, come sarà discusso più dettagliatamente in seguito [19, 106]. Nondimeno, nelle ultime decadi sono stati effettuati vari tentativi per caratterizzare questo *pool* di progenitori tubulari anche nei roditori. La maggior parte degli studi condotti in proposito si è proposto di identificare questa popolazione mediante l'uso di metodologie comunemente impiegate per la caratterizzazione di cellule con caratteristiche staminali, primo tra tutti il basso tasso di indice proliferativo associato a molti compartimenti di “*stem cells*”. Di conseguenza, la tecnica a cui, nel tempo, è stato fatto maggiormente ricorso è stata quella del trattamento degli animali con BrdU, molecola trattenuta nel nucleo di cellule non ciclanti o con basso indice mitotico, chiamate appunto “*label-retaining cells*” (LRC).

Uno dei primi studi che ha sfruttato questa strategia per cercare di identificare in ratto la presenza di eventuali progenitori con localizzazione tubulare è stato condotto da Maeshima *et al.* che, nel 2003, hanno iniettato BrdU giornalmente per una settimana sia in ratti sani che in ratti con danno tubulare indotto da ischemia [58]. Dopo due settimane di pulizia (o “*wash out*”) dalla molecola gli animali erano sacrificati e, dall'analisi dei reni espantati, gli autori erano in grado di dimostrare la presenza di rare LRC *scattered* a livello del tubulo prossimale e del tubulo convoluto distale sia nell'animale sano che in quello sottoposto a danno tubulare. Nell'articolo era inoltre verificato che, in seguito ad IRI, le LRC acquisivano l'espressione del marcatore di proliferazione PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) e dei marker Vimentina ed E-Caderina, tipicamente associati ai compartimenti staminali, lasciando pertanto ipotizzare che le LRC rappresentino una popolazione di progenitori tubulari che si attivano in seguito a danno per rigenerare il tubulo [58]. Tuttavia, è da considerarsi che il tubulo prossimale adulto ha un basso *turnover* cellulare in condizioni omeostatiche

[107], e che ciò potrebbe viziare la valutazione sul numero effettivo di divisioni cellulari in quanto la BrdU, nell'arco di due settimane, potrebbe non essere andata incontro a diluizione, specialmente negli animali sani. Infine, è anche verosimile che alcune cellule siano divenute BrdU<sup>+</sup> perché in fase proliferativa durante il periodo di inoculo dell'induttore ma che, durante il *wash out*, non vi sia stata diluizione della BrdU perché tali cellule non hanno effettuato alcuna divisione mitotica [108]. Ciò nonostante le cellule BrdU<sup>+</sup> erano le stesse cellule che, come conseguenza dell'IRI, acquisivano l'espressione di PCNA, Vimentina ed E-Caderina, lasciando effettivamente spazio per ipotizzare che si tratti di una sottopopolazione che specificamente si attiva in seguito al danno e che media la rigenerazione del tubulo. Le limitazioni intrinseche che le analisi basate su BrdU presentano, specialmente in un tessuto con *turnover* estremamente basso in condizioni omeostatiche come il tubulo, fanno sì che tale metodica sia sempre meno impiegata: se nessuna cellula è in fase tardiva G1 o in fase S del ciclo cellulare è possibile che nessuna cellula incorpori la molecola [107]. Ciò è stato ulteriormente confermato da studi condotti sul compartimento staminale ematopoietico, le cui cellule non vanno incontro ad una segregazione bilanciata dei cromosomi e, pertanto, suddividono asimmetricamente il proprio contenuto di BrdU. Ne consegue, contrariamente a quanto creduto fino a pochi anni fa, che solo lo 0,5% del putativo 5% di staminali ematopoietiche marcate dalla BrdU sia effettivamente costituito da cellule staminali [63].

Tuttavia, la sempre maggiore diffusione dei modelli animali transgenici ha permesso di passare da soluzioni basate sul *label-retaining* a strategie con risultati meno erroneamente interpretabili e la cui sensibilità e specificità rendessero in grado di condurre studi maggiormente dettagliati. In questa linea si pone il lavoro di Langworthy *et al.*, i quali, grazie all'impiego di un modello murino costitutivo guidato

dal promotore NFATc1 (*Nuclear factor of activated T-cells*), hanno proposto l'esistenza di una sottopopolazione di progenitori localizzati nel tubulo prossimale [109]. Gli autori hanno infatti provato che il *subset* cellulare NFATc1<sup>+</sup> è composto da cellule resistenti all'apoptosi e capaci di un'intensa proliferazione successivamente all'induzione di AKI mediata da HgCl<sub>2</sub>, e che l'espressione di questo gene è upregolata come conseguenza del danno tubulare fino al momento in cui istologia e funzionalità tubulare vanno incontro ad una forte ripresa (decimo giorno dalla somministrazione di HgCl<sub>2</sub>). Inoltre, al fine di quantificare la rigenerazione indotta dalla popolazione NFATc1, Langworthy *et al.* hanno somministrato BrdU a topi NFATc1.Cre-LacZ trattati con HgCl<sub>2</sub>, nei quali è stato possibile osservare che a distanza di 5 giorni le cellule LacZ<sup>+</sup>BrdU<sup>+</sup> erano circa 3 volte di più rispetto alla controparte solo BrdU<sup>+</sup>, mentre a 10 giorni più del 25% del tubulo prossimale risultava essere derivato da cellule NFATc1<sup>+</sup> [109]. Ciò ha permesso di concludere non solo che le cellule NFATc1<sup>+</sup> rappresentano una sottopopolazione di cellule tubulari capaci di alta proliferazione in seguito a danno, ma anche che è presente una sottopopolazione tubulare con differenti capacità proliferative, evento a forte supporto dell'ipotesi che esista una popolazione di progenitori tubulari.

Un altro lavoro eseguito in modelli animali a sostegno della teoria che la rigenerazione tubulare sia sostenuta da un popolazione pre-esistente di progenitori tubulari è stato recentemente pubblicato da Rinkevich e colleghi [110]. Nell'articolo gli autori hanno dimostrato che il rene di topo adulto è in grado, se danneggiato, di dar luogo a tubulogenesi mediante l'espansione di quelli che si ipotizza siano precursori clonali segmento-specifici. Ciò che ha reso possibili tali conclusioni è stato l'uso di un modello murino transgenico inducibile guidato dal promotore ubiquitariamente espresso dell'actina, tramite cui gli autori sono riusciti a marcare con il *reporter*

Rainbow tutte le cellule dell'epitelio tubulare, le quali sono state poi sottoposte a danno ischemico *in vivo*. L'impiego di tale modello ha permesso di effettuare analisi clonali in un contesto di danno ischemico indipendentemente da *marker* candidati, strategia che ha evidenziato come siano presenti, all'interno del tubulo, delle cellule capaci di espandersi clonalmente sia in senso perpendicolare che longitudinale rispetto all'asse del tubulo di origine. Questi cloni, tuttavia, sono in grado di rigenerare le differenti porzioni tubulari in maniera segmento-specifica, come dimostrato dal fatto che l'espansione clonale era limitata alla sola porzione tubulare in cui risiedeva il clone originario [110]. L'espansione monoclonale è stata dimostrata anche in condizioni fisiologiche a lungo termine in seguito ad induzione subottimale: a 7 mesi dalla somministrazione dell'induttore negli animali sono stati riscontrati tubuli monoclonali, che in tale lasso temporale si erano espansi longitudinalmente e perpendicolarmente rispetto all'asse tubulare. Così facendo, per gli autori è stato possibile provare che l'epitelio renale è capace di tubulogenesi anche nel rene di topo adulto, con la particolarità che i cloni neo-generati mantengono il *lineage* e il fenotipo della porzione tubulare di appartenenza [110]. Nuovamente, questi dati supportano l'ipotesi che i progenitori tubulari esistano come entità sparse lungo tutto il tubulo (fino al dotto collettore) anche in mammiferi differenti dall'uomo; tuttavia gli autori, per primi, introducono la possibilità che ogni putativo progenitore possa essere responsabile del *turnover* e della riparazione del solo segmento di appartenenza, dando così una ragione biologica alla disposizione *scattered*. Ciò nonostante, avendo marcato tutto il tubulo grazie all'impiego del promotore dell'actina, gli autori non hanno potuto dimostrare univocamente che la rigenerazione tubulare fosse da attribuirsi ad una popolazione di progenitori tubulari, la cui presenza può essere dedotta solo "indirettamente": non è difatti identificata la fonte delle entità rigeneranti, né è tantomeno effettuata una



caratterizzazione *in vitro* ed *in vivo* su questo putativo *pool* di progenitori. Si rendono perciò necessari ulteriori studi che permettano di individuare un marcatore che permetta di costruire modelli murini in cui sia marcata la controparte murina del sistema di progenitori renali umani, così da poterne studiare la fisiopatologia nel loro contesto d'organo e così da poter cercare soluzioni terapeutiche per modularne l'attività al fine di garantire un miglior *outcome* in caso di insorgenza di AKI.

E' tuttavia da considerare che, quanto dimostrato finora in uomo possa non essere vero anche per i roditori, e che ciò che è stato osservato da Langworthy *et al.* [109] e da Rinkevich *et al.* [110] possa non essere dovuto all'azione di progenitori tubulari ma alla dedifferenziazione e successiva proliferazione e re-differenziazione di cellule tubulari già pienamente differenziate e capaci di rigenerare il solo segmento di appartenenza. E' infatti possibile che vi siano differenze tra uomo e roditori, e potrebbe essere plausibile che l'ipotesi dell'esistenza di progenitori tubulari sia corretta se applicata ai grandi mammiferi, ma che si riveli erronea nel caso di mammiferi di piccola taglia [19]. Tuttavia, è anche possibile che le differenze sorgano non tanto dalle differenti strategie rigenerative messe in atto dai differenti mammiferi, ma che siano dovute a differenze nell'espressione di marcatori staminali, nelle dinamiche di popolazione o, addirittura, nelle tecniche impiegate per caratterizzare i progenitori [19, 87, 111].

### **1.5.2 CELLULE TUBULARI DIFFERENZIATE E RIGENERAZIONE TUBULARE**

L'osservazione che nel tubulo in fase post-ischemica le cellule in attiva proliferazione acquisiscono un fenotipo mesenchimale immaturo, e ri-esprimono sia marcatori tipici mesenchimali, quali la Vimentina, sia *marker* associati ad un fenotipo embrionale

renale, come Pax2, ha indotto a pensare che le cellule proliferanti si originino a partire dal dedifferenziamento di cellule epiteliali terminalmente differenziate: queste ultime attivano successivamente un programma che ricapitola alcuni aspetti della formazione embrionale del mesonefro e re-differenziano, rigenerando così le cellule tubulari irreversibilmente danneggiate dall'insulto [112]. Inoltre, nonostante sia stato provato che, almeno nell'uomo, esiste una popolazione di progenitori *scattered* nel tubulo, il loro reale contributo nella rigenerazione del compartimento tubulare in seguito a danno è stato più volte messo in discussione. In questo quadro, l'assenza di modelli sperimentali animali in cui sia possibile marcare specificamente questa putativa popolazione di progenitori endogeni non solo non ha permesso di verificare univocamente se siano presenti o meno anche in mammiferi di piccola taglia come i roditori, ma ha anche impedito, finora, di studiarne la fisiologia, di valutarne la reale capacità rigenerativa *in vivo* e di testare terapie farmacologiche volte ad attivarle.

Tuttavia, non essendo possibile impiegare le glicoproteine di membrana CD133 e CD24 per costruire appropriati modelli animali in grado di marcare i progenitori renali murini [19, 106], così come fatto per individuare i progenitori umani, recentemente sono state valutate ed impiegate differenti strategie che permettessero di ovviare a tale *deficit*. Le soluzioni maggiormente impiegate sono state quelle basate sull'impiego di analoghi della timidina o sull'utilizzo di animali transgenici in cui, invece che cercare di marcare il *pool* staminale, era marcato tutto il compartimento epiteliale tubulare di cui gli autori si proponevano di studiare la rigenerazione. Una di queste strategie è stata adottata da Rinkevich *et al.* che, come descritto nel precedente paragrafo, impiegando il promotore dell'actina sono riusciti a dimostrare come la rigenerazione tubulare avviene grazie all'azione di precursori clonali segmento-specifici [110].

Tuttavia, l'impiego di strategie transgeniche basate sulla marcatura globale della

struttura di cui si intende studiare la rigenerazione prevedono una “deduzione indiretta” delle dinamiche d’azione intraprese da eventuali differenti popolazioni cellulari, analisi che presenta vari punti deboli e che può facilmente essere viziata da errori concettuali e metodologici [19, 87]. Nondimeno, va tenuto in considerazione che la maggior parte degli studi che hanno fatto ricorso alla strategia di marcatura dell’intero epitelio tubulare sono giunti alla medesima conclusione: la rigenerazione del tubulo è mediata dalle cellule differenziate che, in seguito al danno, dedifferenziano, si dividono stocasticamente e re-differenziano ricostituendo architettura e funzionalità tubulare.

A sostegno di questa ipotesi è un recente lavoro di Humphreys *et al.*, nel quale è stata effettuata, in un modello murino di IRI monolaterale, un’analisi di proliferazione delle cellule epiteliali del tubulo prossimale mediante l’impiego dei due analoghi della timidina 5-cloro-2-deossipuridina (CldU) e 5-iodo-2-deossipuridina (IdU), molecole che hanno permesso di tracciare cicli sequenziali di proliferazione delle cellule tubulari e di distinguere le cellule a ciclo cellulare rapido da quelle con ciclo lento [97]. Gli autori, per comprendere se le cellule tubulari differenziate siano la fonte delle cellule epiteliali neo-generate osservabili in seguito a danno, a 24 ore dall’induzione dell’IRI hanno iniettato agli animali una singola dose di CldU, la quale è stata seguita, a distanza di 21 ore, dalla somministrazione di IdU. Questa procedura ha consentito di provare che, 3 ore dopo l’inoculo di IdU, era presenti rare cellule positive ad entrambi i composti, mentre la maggioranza delle cellule epiteliali aveva incorporato l’uno o l’altro analogo della timidina. Tale osservazione ha permesso di concludere che la proliferazione delle cellule del tubulo prossimale, sito maggiormente colpito dall’IRI, avviene in maniera stocastica ad opera delle cellule epiteliali differenziate sopravvissute che, in seguito al danno, si attivano per dedifferenziare, proliferare, re-

differenziare e quindi rigenerare il tubulo. Gli autori avevano infatti ipotizzato che, se la rigenerazione tubulare fosse stata attuata da una popolazione di progenitori con caratteristiche staminali, la maggior parte delle cellule rigenerate avrebbero dovuto essere CldU<sup>+</sup>IdU<sup>+</sup>: il danno dovrebbe infatti attivare i progenitori affinché proliferino rapidamente così da rigenerare le cellule perse, evento che farebbe incorporare a tali cellule entrambi gli analoghi della timidina [97]. Al contrario, se la maggior parte delle cellule risultassero singole positive ad uno solo dei due analoghi, questo vorrebbe dire che le cellule differenziate, avendo tempistiche di proliferazione maggiori a causa del fatto che devono dedifferenziare, proliferare e re-differenziare, sarebbero gli autori responsabili della ricostituzione tubulare [97]. Nondimeno, questa elegante strategia non permette di escludere la possibilità che cellule tubulari differenziate, attivatesi nel tentativo di riparare il tubulo, abbiano incorporato uno dei due composti ma non siano poi riuscite a completare la divisione cellulare, rimanendo perciò dei semplici spettatori nel processo rigenerativo. La positività ad uno solo tra CldU e IdU indica infatti che le cellule sono entrate nella fase S del ciclo cellulare presumibilmente nel tentativo di riparare al danno, ma non permette di concludere che tali cellule abbiano effettivamente completato il ciclo cellulare, dividendosi e quindi dando luogo ad una progenie [19]. Al contrario, solo le cellule CldU<sup>+</sup>IdU<sup>+</sup>, che nello studio di Humphreys *et al.* rappresentano solo il 5% di tutte le cellule marcate [97], hanno certamente completato almeno un ciclo cellulare: è quindi possibile che solamente una componente limitata dell'epitelio tubulare riesca effettivamente a dividersi per rigenerare il tubulo. In un simile scenario, le cellule differenziate del tubulo apparirebbero coinvolte nella rigenerazione tubulare ma sarebbero, di fatto, bloccate in una precisa fase del ciclo cellulare senza possibilità di completare la mitosi e, conseguentemente, di proliferare per partecipare agli eventi rigenerativi. Osservazioni

analoghe sono già state effettuate per quanto riguarda il compartimento podocitario in seguito a danno [113, 114], o in altri organi come il fegato, in cui nonostante la maggior parte degli epatociti entri nel ciclo cellulare dopo epatectomia, solo una quota minore riesce a dividersi, mentre la maggior parte delle cellule non arriva ad eseguire la citodieresi così come dimostrato dalla presenza di epatociti binucleati o con nuclei con maggior contenuto di DNA e maggiori dimensioni [115]. Pertanto, nonostante numerosi lavori abbiano dimostrato che le cellule tubulari sottoposte a danno entrino nel ciclo cellulare e che tale evento può essere facilmente dimostrato e quantificato mediante marcatura con BrdU [58, 116], non è possibile affermare che le cellule che hanno incorporato questo o altri analoghi della timidina siano andate effettivamente incontro a mitosi. Analoghe considerazioni possono essere fatte per i più storicamente accettati marcatori del ciclo cellulare, come Ki-67, fosfoistone H3 o PCNA [117, 118], i quali sono upregolati dalle cellule tubulari in seguito a danno [119, 120], ma che sono generalmente rilevati mediante marcatura anticorpale, la quale non può essere trasmessa alla cellule figlie per dimostrare univocamente che si abbia avuto citodieresi [19]. Va anche considerata la possibilità che putativi progenitori tubulari murini siano capaci di sopravvivere preferenzialmente al danno e, successivamente, diventino la popolazione predominante nel tubulo, situazione che renderebbe teoricamente capace ogni progenitore di dividersi solo una o due volte per ricostituire l'architettura e la funzionalità del tubulo e che renderebbe ragione del 5% di cellule CldU<sup>+</sup>IdU<sup>+</sup>. Infine, è possibile che gli analoghi della timidina vengano assimilati da cellule adiacenti a quelle morte, o che, data la corta tempistica intercorsa tra le iniezioni e il sacrificio degli animali, non siano stati marcati progenitori pre-esistenti ma a ciclo lento.

L'ipotesi che le cellule tubulari differenziate siano responsabili della rigenerazione del tubulo ha trovato ulteriore sostegno grazie ad un recente articolo di Berger e colleghi

[121], in cui è stato impiegato il modello murino inducibile già descritto nel paragrafo sulle cellule staminali renali ed originariamente impiegato per l'identificazione dei progenitori renali capsulari di topo [122]. Tale modello, guidato da un promotore costituito dalla fusione dei geni esogeni della podocalixina umana e di coniglio, si era rivelato capace di marcare, oltre ai progenitori presenti nella capsula di Bowman, anche altri tipi cellulari, incluse alcune cellule rare tubulari, motivo per cui Berger *et al.* hanno pensato che potesse essere il modello corretto per studiare la controparte murina dei progenitori tubulari CD133<sup>+</sup> umani. L'analisi del compartimento tubulare di reni sani di questo modello murino, chiamato PEC-rtTA, ha permesso di evidenziare la presenza di cellule tubulari raramente sparse positive al transgene *reporter* LacZ ed esprimenti, allo stesso tempo, marcatori che caratterizzano anche i progenitori tubulari umani quali l'Annessina A3, CD44, KIM-1 e SSECKS [121]. Tuttavia, nonostante queste cellule condividano virtualmente gli stessi marcatori già descritti per i progenitori glomerulari e, come ipotizzato dagli autori, sia presumibile un comune programma trascrizionale tra i due tipi di cellula, nell'articolo era negato il loro contributo in fase rigenerativa. Topi indotti, lasciati in *wash out* e poi sottoposti a danno di natura ischemica non mostravano alcun incremento nel numero di cellule LacZ<sup>+</sup>, inducendo Berger *et al.* a supporre che le cellule che rigenerano il tubulo derivino dalle cellule epiteliali tubulari differenziate che acquisiscono transitoriamente un fenotipo pro-rigenerativo, e non da una popolazione di progenitori pre-esistenti. Nonostante questo va considerato che Annessina A3, CD44, KIM-1 e SSECKS sono *marker* espressi anche da altri tipi di cellule renali, soprattutto come conseguenza della loro attivazione a causa di un danno, e che le cellule marcate dal transgene *reporter* non sono state caratterizzate da un punto di vista né fenotipico né funzionale dagli autori. Infatti, non è stato eseguito su questa popolazione alcun saggio di espansione

clonale o di differenziazione *in vitro*, così come non sono stati eseguiti xenotrapianti *in vivo*, tutti *test* essenziali quando si caratterizza una popolazione staminale o di progenitori [19]. Non è quindi possibile concludere definitivamente che le cellule positive al promotore PEC-rtTA rappresentino la controparte murina dei progenitori tubulari umani CD133<sup>+</sup>, i quali sono stati invece caratterizzati fenotipicamente ed hanno mostrato di possedere capacità di *self-renewal*, di *differenziazione* e di *homing* e integrazione nel tubulo danneggiato quando trapiantati in modelli di AKI *in vivo* [55, 71, 106]. In aggiunta, la differente localizzazione anatomica tra le cellule PEC-rtTA<sup>+</sup> e i progenitori tubulari umani fa supporre che le cellule marcate non rappresentino la medesima popolazione individuata in uomo: i progenitori umani sono principalmente localizzati nel segmento S3 del tubulo prossimale e nel tubulo distale, mentre cellule LacZ<sup>+</sup> erano rinvenute nei soli segmenti S1 ed S2 del tubulo prossimale di topo [87]. Questo lavoro evidenzia come l'assenza di un *marker* noto che permetta di identificare univocamente la popolazione di progenitori tubulari sia il principale limite che impedisce la loro individuazione e caratterizzazione in modelli murini *in vivo*. Tuttavia, per studiare un compartimento staminale di cui non è noto un marcatore che la identifichi in maniera non ambigua, è possibile scegliere una differente strategia di *lineage tracing*: marcare tutta la struttura anatomica di cui interessa valutare la rigenerazione e poi valutare indirettamente le dinamiche cellulari del compartimento taggato. Questa tattica è stata scelta da Kusaba *et al.*, i quali hanno messo a punto un modello murino inducibile guidato dal promotore SLC34a1 (*Solute Carrier Family 34 member 1*) che codifica per la proteina di co-trasporto Na/P di tipo II espressa dalle cellule differenziate del tubulo prossimale [123]. Avendo marcato tutta la componente epiteliale differenziata del tubulo prossimale gli autori hanno ipotizzato che, qualora il tubulo renale contenga una popolazione di progenitori, questi non dovrebbero

teoricamente essere marcati perché non differenziati e pertanto non esprimono il *marker* di differenziazione SLC34a1. Ne consegue che, qualora tali progenitori non taggati fossero gli attori responsabili della rigenerazione tubulare, in seguito all'induzione di danno tubulare sarebbe osservabile una diminuzione nel numero di cellule marcate dal transgene *reporter* all'interno del tubulo, a causa sia della morte delle cellule differenziate e danneggiate, che della proliferazione dei progenitori. Al contrario, l'assenza di diluizione del *marker*, nonostante l'intesa proliferazione post-IRI, indicherebbe che tutte le cellule terminalmente differenziate sono in grado di dividersi, o che alcune vanno incontro a dedifferenziazione, divisione e successiva re-differenziazione al fine di rigenerare le cellule perse. Il modello murino, una volta indotto ed in seguito a *wash out*, è stato quindi sottoposto a danno ischemico di differente entità (IRI monolaterale di 25 o 30 minuti) così da poter valutare sia in caso di danno lieve, che in caso di intensa necrosi tubulare, la risposta rigenerativa del tubulo. Tuttavia, dal momento in cui in nessuna delle due condizioni era osservabile una diluizione del *reporter*, e dato che la quota di cellule marcate pre-IRI era identica a quella delle cellule riscontrabili dopo l'induzione dell'IRI, gli autori hanno concluso che non esiste una popolazione di progenitori tubulari murini [123]. Ad ulteriore supporto di questa ipotesi erano i dati relativi all'incremento dei cloni positivi a SLC34a1 marcati in condizione di diluizione limite, i quali andavano incontro ad una forte proliferazione soprattutto nel caso di danno severo.

Tuttavia, nell'ipotesi della "diluizione del *reporter*" su cui si è basato questo studio non è stata presa in considerazione la possibilità che i progenitori tubulari potrebbero esprimere, anche se a bassi livelli, marcatori tipici di cellule terminalmente differenziate, come già dimostrato per i progenitori di altri tessuti renali e non renali. Si tratta, in questi casi, di cellule già parzialmente commissionate e che sono state



deputate alla rigenerazione di un singolo o pochi compartimenti, o di progenitori in fase differenziativa, generalmente identificabili grazie al *co-staining* tra *marker* staminali e marcatori specifici della *pool* cellulare verso cui il progenitore sta differenziando [19]. Un ottimo esempio ci è dato dall'epidermide interfollicolare di topo ove, grazie all'impiego di analisi clonali e di dinamiche proliferative, è stato possibile rivelare la presenza di progenitori già indirizzati verso la differenziazione e che già esprimevano marcatori generalmente associati allo strato soprabasale costituito da cellule differenziate [124]. Simili osservazioni sono state fatte in topo anche per il sistema ematopoietico, il sistema nervoso centrale ed il follicolo pilifero [125, 126] o, come già descritto, per quanto riguarda i progenitori della capsula di Bowman umana [106]. Questi progenitori commissionati, oltre ad essere spesso essenziali nell'organizzazione strutturale e gerarchica delle differenti nicchie staminali, sono generalmente la prima componente che è attivata in caso di danno, ossia la componente che risulterà maggiormente espansa a fine rigenerazione e l'unica in attività nei primi momenti dopo l'insulto [127]. Quindi, se popolazioni di progenitori possono esprimere *marker* tipicamente associati a cellule pienamente differenziate, è possibile che la strategia impiegata da Kusaba *et al.* [123] permetta di marcare anche putativi progenitori tubulari, evento che spiega perché non sia stata osservata alcuna diluizione del *reporter* e perché non vari il rapporto nel numero cellule terminalmente differenziate tra prima e dopo il danno ischemico: i progenitori marcati, sopravvivendo al danno e proliferando, riporterebbero la quota di cellule taggate al valore pre-ischemico [19]. Di conseguenza, neanche basandosi su quanto osservato in questo modello murino, uno dei più recentemente sviluppati per lo studio della rigenerazione del tubulo, è possibile escludere definitivamente l'esistenza di progenitori tubulari nei roditori [43, 71, 103].

Se quindi da un lato non è possibile traslare in topo quanto già riportato per uomo, dall'altro non sono ancora stati sviluppati modelli murini adeguati che permettano di identificare definitivamente il *pool* di progenitori tubulari da tempo identificato nell'uomo. Per questo motivo non è attualmente stata trovata una risposta alla domanda di partenza: sono le cellule tubulari terminalmente differenziate che dedifferenziano, proliferano e re-differenziano per rimpiazzare le cellule adiacenti perse, o una popolazione pre-esistente di progenitori tubulari sparsa lungo il tubulo è responsabile di tale *restitutio ad integrum*? [19].

## **1.6 I MODELLI TRANSGENICI PAX2 E PAX8**

---

Di fronte a dati così contrastanti riguardo l'esistenza di una popolazione di progenitori nel rene adulto di roditori è necessario, innanzitutto, capire se le differenze osservate tra uomo e topo siano da ricondurre unicamente a diverse strategie rigenerative o se sia piuttosto una questione di modelli impiegati, tecniche sperimentali o marcatori utilizzati [111]. E' infatti possibile che distribuzione temporale e modalità di espressione dei marcatori differiscano tra uomo e topo e che, in quanto animali di ridotte dimensioni e minor longevità rispetto ad altri mammiferi, in topo non sia richiesta l'attivazione di progenitori per garantire l'omeostasi di organi con un basso *turnover* cellulare come cuore o rene [111, 128]. E' anche verosimile che uomo e topo utilizzino differenti strategie di rigenerazione tubulare e che, a differenza dell'uomo ove i progenitori tubulari rappresentano una popolazione pre-esistente, nel topo la dedifferenziazione permetta alle cellule tubulari differenziate di acquisire transientemente un fenotipo pro-rigenerativo analogo a quello dei progenitori umani [111]. Tuttavia, studi recenti suggeriscono che cellule con caratteristiche di progenitori siano presenti nel compartimento tubulare di differenti classi di animali, come insetti e pesci, ove tali cellule rappresentano la principale fonte responsabile degli eventi rigenerativi in seguito ad insulto a danno del tubulo [129, 130]. Altra possibile spiegazione che potrebbe motivare le differenze sin ora riportate tra uomo e topo è che, per permettere la rigenerazione di un organo tanto complesso quanto il rene mammifero adulto, siano coinvolti entrambi i meccanismi ipotizzati e che i progenitori tubulari agiscano in concerto con la de-differenziazione di cellule tubulari terminalmente differenziate. Il coinvolgimento di più meccanismi rigenerativi ai fini della riparazione di un singolo tessuto è già stato documentato, ad esempio, per il fegato, ove tale soluzione conferisce un notevole vantaggio evolutivo [131, 132]. Se

fosse così anche per il tubulo renale la de-differenziazione delle cellule epiteliali differenziate potrebbe avvenire in risposta a un danno lieve, mentre i progenitori, che mostrano alta resistenza alla morte [71, 103], risulterebbero attivati in presenza di un danno esteso che comporta una forte perdita delle cellule differenziate [133].

Il dibattito sull'esistenza, la reale identità e l'effettiva capacità dei progenitori tubulari di dar luogo alla rigenerazione del tubulo danneggiato trovano il loro terreno più fertile nell'attuale assenza di modelli sperimentali che permettano di marcare selettivamente tale popolazione. Infatti, i marcatori usati nell'uomo per individuare selettivamente queste cellule, ossia le glicoproteine di membrana CD133 e CD24, sono specie-specifiche e non possono essere impiegate per la creazione di appropriati modelli animali transgenici. CD133 ad esempio, che in uomo è stato ampiamente utilizzato per la caratterizzazione di vari compartimenti staminali (primo tra tutti quello ematopoietico), nel topo è invece frequentemente espresso anche da componenti epiteliali terminalmente differenziate [134, 135]. Non potendo impiegare i *marker* già usati per la caratterizzazione dei progenitori tubulari umani ma, allo stesso tempo, non essendo attualmente noto un marcatore murino che permetta di individuare univocamente questa popolazione tramite la creazione di appropriati modelli murini transgenici, la risposta finale alla domanda su quale sia l'effettivo potenziale rigenerativo del tubulo nei mammiferi rimane aperta. Per valutare *in vivo* la fisiopatologia di tale *pool* cellulare sono pertanto richieste nuove strategie sperimentali che permettano di risolvere definitivamente gli aspetti ancora meno noti inerenti la rigenerazione tubulare mediante la creazione di modelli animali in cui sia effettivamente marcata la controparte murina del sistema di progenitori renali umani. Tuttavia, avendo analizzato le principali limitazioni delle strategie percorse fino a questo momento nelle scelte dei modelli transgenici murini volti a studiare la

rigenerazione tubulare, è auspicabile che i modelli *in vivo* che saranno impiegati in futuro possedano alcune caratteristiche che garantiscano di marcare univocamente i progenitori tubulari. Un requisito essenziale è che il modello animale permetta di identificare l'eventuale controparte murina dei progenitori umani CD133<sup>+</sup> “in maniera diretta”, ossia sfruttando come promotore un gene espresso fisiologicamente e specificamente dalla sola popolazione di progenitori [19, 87]. Ottimo esempio di tale soluzione è stato recentemente fornito da Barker e colleghi, i quali hanno identificato una popolazione staminale all'interno del rene in fase di sviluppo grazie all'espressione del marcatore di natura staminale *Lgr5* (*Leucine-Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5*) [136]. Al contrario, sono da evitarsi quelle strategie che si basano su di una “marcatura indiretta” del *pool* staminale (vedi Kusaba *et al.* [123]) in quanto, grazie all'impiego di *marker* di differenziazione, permettono sì di taggare tutta la struttura anatomica d'interesse, ma possono risultare anche nella marcatura dei progenitori parzialmente commissionati, conducendo verso un'interpretazione erronea dei dati e del loro significato biologico [19]. Altro aspetto fondamentale è che il promotore scelto per la costruzione del modello transgenico non solo sia omologo tra uomo e topo, ma che consenta anche di creare un modello inducibile di *lineage tracing*, così da garantire un controllo temporale sull'attivazione dei meccanismi genetici finalizzati a marcare la popolazione di progenitori.

L'assenza di un marcatore con le suddette caratteristiche, la necessità di creare modelli transgenici di *lineage tracing* che permettano di fare chiarezza su fisiologia e dinamiche della rigenerazione tubulare, e la possibilità di impiego del modello animale nella ricerca di natura farmacologica sono state lo scopo specifico della attività di ricerca che ha condotto allo sviluppo di questo elaborato. Pertanto, per realizzare un modello murino adeguato ai miei obiettivi, ho cercato di individuare se fossero noti da

letteratura dei marcatori che sempre ed unicamente co-espressi assieme a CD133 e CD24 dalla popolazione di progenitori renali adulti umani. Tra i geni con tale caratteristica spiccava il fattore trascrizionale Pax2, gene fondamentale per sviluppo nefrogenico e regolatore adibito al controllo della popolazione di progenitori embrionali durante l'accrescimento renale dei vertebrati [137] che, analogamente a CD133 e CD24, decresce in espressione al progredire dello sviluppo renale sin quando non resta confinato alle sole cellule CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> [55, 102, 120, 138]. Inoltre Pax2 ha un noto ruolo antiapoptotico [139], è coinvolto in fenomeni di proliferazione cellulare [140] ed è implicato nei processi che portano alla rigenerazione del rene adulto in quanto transientemente ri-espresso in cellule di tubulo prossimale in seguito ad ATN [141]. Tutto ciò mi ha portato ad ipotizzare che Pax2 potesse essere un ottimo candidato come promotore per il *lineage tracing* dei progenitori renali adulti di topo e che potesse essere un eccellente sostituto del CD133 umano al fine di marcare tale *pool* cellulare *in vivo*. Quindi, per verificare se Pax2 potesse essere impiegato come marcatore per tracciare i progenitori renali di topo, ho costruito il modello murino transgenico inducibile Pax2.rtTA-TetO.Cre-ROSA26.Rainbow2.1. Questo modello è stato ottenuto incrociando il ceppo transgenico guidato dal promotore Pax2 (denominato Pax2.rtTA) [142], ipoteticamente capace di individuare le cellule progenitrici renali, con la linea TetO.Cre che rende il sistema condizionale, ed infine con la linea ROSA26.Rainbow2.1 già analizzata nel paragrafo sui modelli transgenici. Di conseguenza, negli animali tripli transgenici ricavati da questi incroci l'espressione del transgene *reporter* Rainbow avviene per azione della Cre Recombinasi, posta sotto il controllo dell'elemento responsivo alla Doxiciclina (TetO), ed unicamente nelle cellule Pax2<sup>+</sup>.

Tuttavia, per valutare quello che potrebbe essere il differente contributo rigenerativo del *pool* staminale e di quello terminalmente differenziato, così come per capire se entrambe o solo uno delle due popolazioni cellulari siano coinvolte negli eventi rigenerativi e per studiare la diversa resistenza alla morte tra le due popolazioni già dimostrata nell'uomo [43, 71, 103], si è posta la necessità della creazione di un “modello di controllo”, in cui tutte le cellule epiteliali tubulari fossero marcate. Ho quindi creato una linea murina inducibile guidata dal promotore Pax8, in grado di taggare tutte le cellule differenziate del tubulo, incrociando la linea Pax8.rtTA, con il ceppo transgenico TetO che rende il sistema condizionale, e quindi con la linea *reporter* Rainbow2.1. Il derivante modello Pax8.rtTA-TetO.Cre-ROSA26.Rainbow2.1 esprime la Cre Recombinasi in seguito ad attivazione dell'elemento responsivo alla Doxiciolina (TetO) ed in maniera specifica in tutte le cellule Pax8<sup>+</sup>, ossia tutte le cellule epiteliali differenziate del compartimento tubulare [143, 144]. La scelta di questi due modelli è stata fatta allo scopo di studiare tutto il compartimento tubulare ed esaminarne le dinamiche di rigenerazione “indirettamente” (grazie al modello Pax8) e, al contempo, per analizzare “direttamente” la popolazione di progenitori tubulari teoricamente individuati dalla positività all'espressione di Pax2. Inoltre, essendo stati entrambi i modelli costruiti con il sistema *reporter* Rainbow, è possibile effettuare analisi clonali con la finalità di discernere quanto la popolazione di progenitori Pax2<sup>+</sup>, le cellule differenziate Pax8<sup>+</sup> o entrambi i *pool* cellulari proliferino in conseguenza del danno e quale sia l'entità dell'espansione clonale in entrambi i modelli. In questo modo sarebbe possibile dimostrare, qualora in seguito a danno il numero assoluto di cellule e l'entità dell'espansione clonale nel ceppo Pax2 corrisponda a quella osservata nel modello Pax8, che la popolazione Pax2<sup>+</sup> è un *subset* dell'epitelio tubulare deputato specificamente alla rigenerazione del tubulo,

escludendo invece l'ipotesi che le cellule differenziate vadano incontro a dedifferenziazione, proliferazione e successiva re-differenziazione. Infine, la conta cellulare, estremamente accurata nei modelli *in vivo* costruiti con il transgene Rainbow, consentirebbe di valutare la differente resistenza alla morte delle due differenti popolazioni, caratteristica chiave se si vuole affermare che Pax2 sia capace di marcare la controparte murina dei progenitori tubulari umani.



## 2 MATERIALI E METODI

---

### 2.1 Modelli Animali

In questo lavoro sono stati allestiti due modelli murini transgenici in cui l'espressione della Cre ricombinasi avviene, in cellule Pax8-positive o Pax2-positive, sotto il controllo di un elemento con un promotore capace di rispondere alla tetraciclina (TRE o TetO). L'attivazione della Cre ricombinasi, che può essere regolata mediante somministrazione di Doxyciclina (molecola della famiglia delle tetracicline), promuove la ricombinazione di sequenze di DNA fiancheggiate da specifici siti chiamati LoxP, permettendo di marcare irreversibilmente la cellula esprimente Pax2 o Pax8.

I topi Pax2.rtTA-TetO.Cre-ROSA26.Rainbow2.1 (abbreviato Pax2-Rain) e Pax8.rtTA-TetO.Cre-ROSA26.Rainbow2.1 (abbreviato Pax8-Rain) sono stati creati incrociando la linea Rainbow Gt(ROSA)26Sor<sup>tm1(CAG-Brainbow2.1)Cle/J</sup> con il ceppo TetO.Cre B6.Cg-Tg(TetO-Cre)1Jaw/J, entrambi acquistati dalla ditta The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Gli animali doppio-transgenici sono poi stati incrociati con il topo Pax2.rtTA, gentilmente concesso da Burger A. [142] o con il modello Pax8.rtTA (B6.Cg-Tg(Pax8-rtTA2S\*M2)1Koes/J) acquistato dalla ditta The Jackson Laboratory, così da ottenere i relativi modelli triplo-transgenici, tutti con *background* C57BL/6 al 100%. Per gli esperimenti sono stati impiegati solo animali con tutti e tre i transgeni in emizigosi: eventuali omozigosità per uno o più transgeni, verificate mediante Real-Time quantitative RT-PCR (vedi paragrafo successivo), hanno comportato l'esclusione degli animali dalla sperimentazione. Ulteriori 10 topi C57BL/6 sono stati acquistati dalla ditta Envigo (S. Pietro al Natisone, Italy) e sono serviti per condurre esperimenti sull'andamento della GFR in seguito ad induzione di

AKI. Tutti gli animali sono stati mantenuti, in condizioni conformi al Decreto Legislativo 116/92, nello stabulario CeSAL dell'Università degli Studi di Firenze, usufruendo di accesso *ad libitum* a cibo ed acqua, temperatura controllata e cicli giorno/notte di 12 ore. Gli esperimenti su animali sono stati eseguiti in accordo alle linee guida istituzionali, regionali e statali, nonché in accordo alla guida "For the Care and Use of Laboratory Animals" del National Institute of Health (NIH).

## **2.2 Estrazione del DNA**

Il DNA di ciascun animale è stato ottenuto mediante biopsia caudale effettuata in regime di anestesia con isoflurano (*2-cloro-2,2,2-trifluoroetil-difluorometil- etere*) per via inalatoria. Le biopsie sono state incubate *overnight* a 55°C in apposito tampone di lisi (1M TrisHCl a pH 8.5; 0.5 EDTA, 20% SDS, 4M NaCl, 0.1 mg/mL proteinasi K neutralizzata con 40 mM TrisHCl), successivamente vortexate e centrifugate; infine, il DNA è stato estratto mediante deidratazione in isopropanolo (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), risospeso in 100 µL di ddH<sub>2</sub>O (acqua bi-distillata, DNase-free) e conservato a -20°C, o usato immediatamente per le analisi di PCR (Polymerase Chain Reaction) e Real-Time quantitative RT-PCR.

## **2.3 PCR e Analisi Elettroforetica**

L'eventuale presenza di ognuno dei transgeni è stata discriminata mediante PCR utilizzando la polimerasi Dream Taq Green PCR Master Mix 2X (Thermo Fisher, CA, USA) contenente addensante e colorante. I *primers* senso e antisenso sono stati usati alla concentrazione 10 µM ciascuno in ddH<sub>2</sub>O. Per l'amplificazione dei vari transgeni

impiegati nella costruzione dei diversi modelli murini sono stati usati i seguenti protocolli:

**Pax2.rtTA**: *Primer Forward* (F) 5'-AACGCACTGTACGCTCTGTC -3', *Primer Reverse* (R) 5'-GAATCGGTGGTAGGTGTCTC-3'. T° *annealing* (T<sub>a</sub>) dei *primers*: 53°C. Taglia dell'amplicone: 100 bp. Taglia del frammento di controllo interno (Ctrl) di PCR: 323 bp.

**Pax-8.rtTA**: (F) 5'-AACGCACTGTACGCTCTGTC -3', (R) 5'-GAATCGGTGGTAGGTGTCTC-3'. T<sub>a</sub> dei *primers*: 53°C. Taglia dell'amplicone: 100 bp. Taglia del frammento di Ctrl di PCR: 323 bp.

**TetO.Cre**: (F) per il Transgene (Tg) 5'-TCGCTGCATTACCGGTCGATGC-3', (R) Tg 5'-CCATGAGTGAACGAACCTGGTCG-3', (F) Ctrl 5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT -3', (R) Ctrl 5'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3'. T<sub>a</sub> dei *primers*: 57°C. Taglia dell'amplicone: 420 bp. Taglia del frammento di Ctrl di PCR: 324 bp.

**ROSA26.Rainbow2.1**: (F) 5'-GAATTAATTCCGGTATAACTTCG-3', Wt (F) 5'-AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT-3'. *Common Primer* 5'-CCAGATGACTACCTATCCTC-3'. T<sub>a</sub> dei *primers*: 58°C. Taglia dell'amplicone: 300 bp. Taglia dell'amplicone Wt: 386 bp.

Sono stati impiegati, per tutti i transgeni, i seguenti cicli di amplificazione: denaturazione iniziale a 94°C per 5 min, successivamente 35 cicli di: **A**- denaturazione a 94°C per 30 secondi, **B**- *Annealing* a T<sub>a</sub> (variabile a seconda dei *primer* usati) per 30 secondi, **C**- Sintesi del DNA a 72°C per 30 secondi. Questi 35 cicli sono stati seguiti da una denaturazione di fine reazione a 72°C per 7 minuti. Il risultato della PCR è stato poi valutato mediante corsa elettroforetica su gel di Agarosio al 2% in EDTA-Tris-Borato (TBE, Sigma-Aldrich) 0,5X. Per la rilevazione degli acidi nucleici, al gel, è

stato aggiunto il colorante non tossico GreenSafe Premium MB13201 (Nzytech, Lisboa, Portugal). Per la determinazione del peso molecolare del frammento amplificato, sono stati utilizzati 10  $\mu$ L di 100 bp DNA Ladder (Promega, Madison, WI, USA) in rapporto 1:5 con il Blue/Orange 6X Loading Dye (Promega).

## 2.4 REAL TIME RT-PCR

Per i transgeni inseriti mediante *knock-in*, Pax2.rtTA, Pax8.rtTA e TetO.Cre, non essendo possibile discriminare mediante PCR se il transgene sia presente in emizigosi o in omozigosi, si è rivelato necessario eseguire un'analisi quantitativa di Real Time RT-PCR. Per verificare la quantità assoluta di copie di DNA del transgene in analisi, è stata eseguita una curva di calibrazione interna ed è stata condotta una quantificazione relativa con il gene di riferimento (gene *housekeeping*) TCR $\alpha$  (*T-cell receptor alpha*). I campioni sono stati analizzati in triplicato e il valore medio di Ct (*threshold cycle*) è stato usato per l'analisi dei dati, seguendo il modello matematico della comparazione dei cicli soglia [145]. La Real Time RT-PCR è stata eseguita con LightCycler® 480 System (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Swiss). La reazione è stata effettuata con 10pM di *Primer Forward* e 10pM di *Primer Reverse* in 7,5  $\mu$ L LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics) ed un totale di 5 ng di DNA a campione. Sono stati scelti gli stessi *primers* già impiegati per l'analisi di PCR, a parte per quanto inerente il gene *housekeeping* TCRalfa: (F): 5'-CAAATGTTGCTTGTCTGGTG-3', (R): 5'-GTCAGTCGAGTGCACAGTTT-3'. I parametri per la corsa sono stati impostati come segue: denaturazione iniziale a 95°C per 10 minuti, cui sono seguiti 40 cicli di amplificazione ripartiti in 15 secondi a 95°C, 60°C per 45 secondi e 72°C per 60 secondi. Infine, per ottenere la curva di *melting*, la macchina ha lavorato a 95°C per 10 secondi, quindi 1 minuto a 65°C.

## 2.5 Induzione dei differenti modelli transgenici

Per attivare i meccanismi genetici che portano all'espressione del transgene *reporter*, topi maschi Pax2-Rain e Pax8-Rain sono stati indotti, dalla 5 settimana di vita postnatale, con Doxiciclina (Doxycycline hyclate, Sigma-Aldrich) disciolta in acqua addizionata con saccarosio al fine di addolcire e mascherare il sapore amaro dell'antibiotico. Per il modello Pax2-Rain sono stati somministrati 2 mg/mL (700 mg/Kg) di Doxiciclina disciolta in acqua addizionata con saccarosio al 2,5% (Sigma-Aldrich); mentre per il modello Pax8-Rain è stata somministrata Doxiciclina alla concentrazione di 0,25 mg/mL (71,4 mg/Kg) disciolta in acqua addizionata con saccarosio al 2,5%. Gli animali, successivamente alla finestra temporale d'induzione, sono stati mantenuti in *wash out* per un periodo totale di 7 giorni, così da permettere l'eliminazione dall'organismo della molecola induttrice ed impedire che avvenissero ulteriori ricombinazioni durante le procedure sperimentali.

Lo studio ha coinvolto 24 topi maschi Pax2-Rain tripli emizigoti che sono stati assegnati a 7 gruppi: un primo gruppo ( $n=4$ ) ha effettuato l'induzione con Doxiciclina per 10 giorni ed è stato sacrificato dopo 1 settimana di *wash out* ( $T_0$ ). Un secondo gruppo ( $n=4$ ) ha effettuato l'induzione con Doxiciclina per 10 giorni, a cui è seguito un periodo di *wash out* di 30 giorni ( $T_{30}$ ). Un terzo gruppo ( $n=4$ ) ha effettuato l'induzione con Doxiciclina per 40 giorni senza essere sottoposto il periodo di *wash out*. Un quarto gruppo di animali ( $n=6$ ) ha effettuato l'induzione per 10 giorni e successivamente, dopo 1 settimana di *wash out*, gli animali sono stati sottoposti ad un intervento di Ischemia/Riperfusione unilaterale di 30 minuti e sacrificati 30 giorni dopo l'intervento ( $T_{30}$ ). Un totale di ulteriori 2 topi sono serviti da controllo *sham-operated*: dopo di 10 giorni di induzione con Doxiciclina ed 1 settimana di *wash out*, gli animali sono stati sottoposti alle stesse procedure chirurgiche già descritte, con la

differenza che non è stato indotto il danno renale per clampaggio dell'arteria renale e sono stati sacrificati a T<sub>30</sub>. Per verificare eventuali espressioni aspecifiche dei transgeni (*leakage*), due ulteriori gruppi di animali sono stati sacrificati senza essere prima stati indotti con Doxyciclina, a T<sub>0</sub> (n=2), o a T<sub>30</sub> dopo essere stati sottoposti ad intervento di Ischemia/Riperfusione unilaterale di 30 minuti (n=2).

Lo studio ha coinvolto 18 topi maschi Pax8-Rain tripli emizigoti che sono stati suddivisi in 6 gruppi: un primo gruppo (n=4) ha effettuato l'induzione con Doxyciclina per 10 giorni ed è stato sacrificato dopo 1 settimana di *wash out*. Un secondo gruppo (n=3) ha effettuato l'induzione per 10 giorni a cui è seguito un periodo di *wash out* di 30 giorni. Un terzo gruppo di maschi (n=4) ha effettuato l'induzione per 10 giorni e successivamente, dopo 1 settimana di *wash out*, gli animali sono stati sottoposti ad un intervento di Ischemia/Riperfusione unilaterale di 30 minuti e sacrificati 30 giorni dopo l'intervento. Un totale di ulteriori 3 topi sono serviti da controllo *sham-operated*: dopo di 10 giorni di induzione con Doxyciclina ed 1 settimana di *wash out*, gli animali sono stati sottoposti alle stesse procedure chirurgiche già descritte, con la differenza che non è stato indotto il danno renale per clampaggio dell'arteria renale sinistra e sono stati sacrificati a T<sub>30</sub>. Per verificare eventuale *leakage* dei transgeni, due aggiuntivi gruppi di animali sono stati sacrificati a T<sub>0</sub> senza essere prima stati indotti con Doxyciclina (n=2), o a T<sub>30</sub> dopo essere stati sottoposti ad intervento di Ischemia/Riperfusione unilaterale di 30 minuti, anch'essi senza induzione con Doxyciclina (n=2). In nessuno degli animali non indotti è stata osservata espressione del transgene *reporter*, a dimostrazione della specificità dei costrutti transgenici. I controlli sani sono stati sempre sacrificati al termine della settimana di *wash out*, fatta eccezione per i controlli sani sacrificati ad 1 mese dalla fine del *wash out* ed impiegati

per valutare se la popolazione Pax2<sup>+</sup> fosse una *fixed population* o andasse incontro a modifiche parallelamente all'invecchiamento dell'animale.

Tutti gli animali sono stati sacrificati mediante camera a CO<sub>2</sub>, sono quindi stati prelevati campioni di sangue per analisi ematochimiche; i reni, una volta espianati, sono stati incubati in paraformaldeide al 4% (Sigma-Aldrich) per 2 ore a 4°C, quindi sono stati immersi in una soluzione di saccarosio al 15% in PBS per altre 2 ore a 4°C, ed infine sono stati mantenuti in saccarosio al 30% in PBS a 4°C *overnight*. Terminata questa procedura i reni sono stati congelati in azoto liquido in attesa delle successive analisi di microscopia.

I tempi sperimentali sono stati calcolati dal momento della fine della settimana di *wash out*, corrispondente a T<sub>0</sub>.

## **2.6 Procedure chirurgiche e danno da Ischemia/Riperfusione**

Topi maschi con *background* 100% C57BL/6 sono stati sottoposti ad intervento di Ischemia/Riperfusione mediante clampaggio unilaterale dell'arteria renale sinistra per un periodo totale di 30 minuti. Questa procedura è stata la medesima per tutti i modelli animali utilizzati (C57BL/6 *wild type*, Pax2-Rain e Pax8 Rain). La scelta del modello di ischemia unilaterale è stata adottata, oltre che per ottenere danni tubulari di lieve-media entità, per poter disporre del rene controlaterale come controllo e poterlo confrontare con il rene ischemico o con reni sani [146].

Gli animali sono stati anestetizzati mediante inoculo intraperitoneale di una soluzione di Ketamina (100mg/Kg)/ Xylazina (10 mg/Kg, Bio98 S.r.L, Italia) in PBS, la quale garantisce un'anestesia chirurgica a breve termine con una buona analgesia. Per evitare ipotensione, depressione respiratoria ed ipotermia, la temperatura corporea degli animali è stata mantenuta a 37°C per tutta la durata dell'intervento utilizzando un

tavolo chirurgico riscaldato ed una coperta termica. La temperatura corporea era costantemente registrata mediante sonda rettale. *In primis*, dopo l'anestesia e il mantenimento sul tavolo chirurgico riscaldato, i topi sono stati rasati sul fianco sinistro, la cute è stata disinfettata con etanolo al 70% e successivamente è stata fatta un'incisione cutanea di circa 1,5 cm per permettere l'esteriorizzazione del rene sinistro. Successivamente è stato inciso il sottostante peritoneo ed il rene è stato esteriorizzato, quindi è stato liberato il tessuto intorno al peduncolo renale dal grasso e dal tessuto connettivo così da garantirsi l'accesso all'arteria renale. Il rene è stato poi rimesso in sede e mantenuto umido grazie all'uso di una garza sterile imbevuta di soluzione fisiologica allo 0,7% di NaCl. Ciò ha permesso la stabilizzazione della temperatura corporea (circa 5-10 minuti). Stabilizzata la temperatura, il rene sinistro è stato nuovamente esteriorizzato dalla cavità addominale e, la sola arteria renale è stata clampata, così da fermare il flusso sanguigno diretto al rene. L'avvenuta ischemia è stata confermata otticamente valutando il viraggio di colorazione del rene (da rosso a viola scuro), ed è stata confermata sia dall'andamento della BUN che, al momento del sacrificio, mediante valutazione della dimensione del rene ischemizzato, il quale era sempre di dimensioni nettamente inferiori rispetto al rene controlaterale. Dopo 30 minuti di ischemia il *clamp* è stato rimosso e l'avvenuta riperfusione è stata confermata dal viraggio di colore del rene dal viola scuro al rosso. Il rene è stato quindi riposto nella sua sede anatomica, il peritoneo e lo strato muscolare sono stati suturati, e la cute è stata richiusa utilizzando *clip* metalliche. Gli animali sono stati immediatamente reidratati mediante inoculo sottocutaneo di 0,5 mL di soluzione fisiologica allo 0,7% di NaCl e sono stati mantenuti, fino a quando non hanno ripreso conoscenza, in presenza del calore generato mediante una lampada chirurgica rossa (circa 30 minuti). Dopo 10 giorni le *clip* metalliche usate per permettere alla cute di suturarsi sono state



rimosse. Il rene controlaterale destro di controllo non è stato in alcun modo manipolato durante le suddette operazioni. I topi *sham-operated* sono andati incontro alle stesse procedure chirurgiche con la differenza che non è avvenuta l'occlusione dell'arteria renale sinistra.

## **2.7 Valutazione e monitoraggio del danno ischemico**

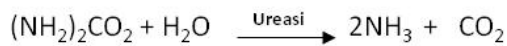
Peso e dimensioni dei reni sono stati valutati sul gruppo di 10 topi C57BL/6 *wild type* ( $n=5$  IRI;  $n=5$  *sham-operated*). Il peso dei reni, sia ischemici che controlaterali, è stato valutato immediatamente dopo l'espianto con la bilancia di precisione EW-N/EG-N (Kern & Sohn GmbH, Germany). Le dimensioni sono state valutate immediatamente dopo la registrazione del peso grazie ad un millimetro chirurgico (Fine Science Tools GmbH, Germany).

Durante il periodo post-ischemico, la funzionalità renale di ciascun animale è stata monitorata mediante prelievo ematico (circa 30  $\mu$ l) eseguito con un *blood lancet* dal plesso sottomandibolare. I campioni ematici, prelevati in basale, a 3 e 30 giorni dall'operazione, sono stati usati per determinare i livelli di azotemia.

Il *test* per la determinazione quantitativa dell'urea in campioni di sangue murino è stato effettuato mediante l'ausilio dello strumento Reflotron (Roche Diagnostics).

Il campione applicato sulla striscia reattiva Reflotron Urea (Roche Diagnostic) penetra nella zona di reazione costituita da ureasi (canavaglia ensiforme  $\geq 4,7$  U), tetraclorofenoltetrabromosulfaleina (indicatore, 20,4  $\mu$ g) ed un tampone. L'Urea contenuta nel campione viene idrolizzata in carbonato di ammonio che sviluppa ammoniaca nell'ambiente tamponato a pH alcalino. L'ammoniaca causa un viraggio parziale dell'indicatore tamponato in una colorazione che passa dal giallo al verde e quindi al blu, e che è proporzionale alla concentrazione di urea presente nel campione.

Il principio su cui si basa questo *test* è descritto dalla reazione:



Ad una temperatura di 37°C il colore sviluppato dalla reazione viene misurato a 642 nm. La concentrazione di Urea viene espressa in unità convenzionali (mg/dL).

La GFR è stata misurata in topi coscienti, così da evitare il decremento della stessa a causa dello stato di anestesia. Per la lettura della GFR è stato usato un *device* miniaturizzato, chiamato NIC (Mannheim Pharma & Diagnostics GmbH, Germany), capace di misurare per via transcutanea la cinetica di eliminazione della molecola fluorescente FITC (Fluorescein isothiocyanate) coniugata alla sinistrina (Fresenius-Kabi, Austria). Il *device* riesce a visualizzare la fluorescenza del FITC grazie alla presenza di due diodi capaci di emettere a 470 nm (lunghezza d'onda di eccitazione del FITC), e di un fotodiodo in grado di rilevare la fluorescenza in emissione a 525 nm [147]. La sinistrina è infatti liberamente filtrata dal glomerulo e non è riassorbita o secreta a livello tubulare, caratteristiche che la rendono una molecola ideale per valutare la *clearance* renale. 5 topi C57BL/6 di 6 settimane sono stati sottoposti ad un danno da Ischemia/Riperfusione monolaterale di 30 minuti come già descritto, mentre un gruppo parallelo di topi ( $n=5$ ) è servito da controllo *sham-operated*. Prima di ogni tempo scelto per la misurazione della GFR (basale, 12 ore, 7 giorni, 14 giorni, 21 giorni, 30 giorni) i topi sono stati pesati (per la normalizzazione della GFR in fase di analisi) ed, in seguito, anestetizzati in una camera da narcosi mediante inalazione di una soluzione gassosa al 2% di Isoflurano, così da poter proseguire con la rasatura della regione dorsale posta direttamente dietro la testa del topo. In particolare è stata effettuata una rasatura di circa 3cm x 3cm così che il NIC potesse alloggiarvi con ampio margine. Successivamente alla pulizia della regione con etanolo al 70%, il

*device* è stato fissato in questa finestra mediante l'uso di un nastro biadesivo e grazie all'impiego di nastro chirurgico posto sopra il NIC e sulla cute rasata dell'animale. Nessuno dei due nastri adesivi è stato fissato in maniera troppo stretta, cosa che potrebbe determinare l'ipoperfusione o l'assenza totale di perfusione della cute, invalidando ogni lettura; né tantomeno nessuno dei due nastri è stato fissato in modo lasso così da far sì che il NIC potesse spostarsi e leggere valori alterati. Successivamente all'impianto del NIC è stata avviata una prima lettura di 5 minuti così da poter registrare e, poi, sottrarre il segnale di *background* della cute e del *device*. E' stata a questo punto somministrata la sinistrina coniugata al FITC alla concentrazione di 7,5 mg/100g di peso del topo [147] per via endovenosa nel plesso retroorbitale. L'inoculo è stato effettuato in regime di anestesia momentanea, procurata con una piccola quantità di isoflurano (perdita di coscienza per circa 45 secondi), e mediante l'uso di una siringa Becton Dickinson in polipropilene (27 × ½ gauge) (Sigma-Aldrich). Nei successivi 60 minuti i topi sono stati mantenuti singolarmente in differenti gabbie, così che l'interazione con altri animali non influisse sulla lettura della *clearance* della sinistrina. L'analisi dei dati è avvenuta mediante il software MPD Lab Ver 1.0RC6, e la GFR è stata così calcolata [147]:

$$\text{GFR}[\mu\text{L}\cdot\text{min}\cdot 100\text{g body weight}] = \frac{14616.8[\mu\text{L}/100\text{g bw}]}{t_{1/2}(\text{FITC-sinistrin})}$$

## 2.8 Immunofluorescenza e Microscopia Confocale

Le analisi di microscopia confocale sono state condotte su sezioni tissutali congelate di 10 µm con il microscopio confocale Leica SP5 AOBS (Leica Microsystems Srl, Wetzlar, Germany) equipaggiato con il laser Chameleon Ultra-II two-photon (Coherent, Italy).

Sono stati usati i seguenti anticorpi (Ab) primari: anti-Aquaporina1 pAb (Merck-Millipore, Germany, concentrazione 10ug/mL), anti-THP (*Tamm-Horsfall Protein*) mAb (clone 1032AP, Cedarlane, Canada, diluizione 1:20), anti-Aquaporina2 pAb (C-17, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, MA, USA, diluizione 5ug/mL). Come anticorpi secondari sono stati usati: goat anti-rabbit IgG marcato con Alexa Fluor® 647, goat anti-mouse IgG2b marcato con Alexa Fluor® 647 (Molecular Probes, Life Technologies, NC, USA) tutti usati ad una diluizione 1:100 rispetto alla soluzione madre, così come da istruzioni della ditta. Per la colorazione dei nuclei è stato usato DAPI (Life Technologies, NC, USA) diluito 1:500 come indicato dalla casa madre, il quale è stato eccitato e letto grazie all'impiego di un laser ad infrarossi con lunghezza d'onda di 689 nm. L'incubazione di tutti gli Ab primari è stata eseguita *overnight* a 4°C in camera umida, mentre le incubazioni con gli Ab secondari sono state effettuate a T° ambiente per 30 minuti al buio. Al termine delle marcature con gli anticorpi, i vetrini sono stati montati con un mezzo anti-*fading* (Vectashield, Vector Laboratories, CA, USA) ed esaminati a 25X ad immersione in acqua o a 63X ad immersione in glicerina. Le immagini sono state acquisite ad una risoluzione 1024 x 1024 pixel con una velocità di acquisizione di 100Hz. Per il sistema *reporter* Rainbow, sono state scelte le seguenti lunghezze d'onda di eccitazione ( $\lambda_{ecc}$ ) ed emissione ( $\lambda_{em}$ ):

-CFP  $\lambda_{ecc}$  405 nm,  $\lambda_{em}$  460-510 nm

-GFP  $\lambda_{ecc}$  488 nm,  $\lambda_{em}$  480-510 nm

-RFP  $\lambda_{ecc}$  543 nm,  $\lambda_{em}$  555-600 nm

-YFP  $\lambda_{ecc}$  514 nm,  $\lambda_{em}$  520-570 nm

E' stato scelto di non mostrare il segnale della GFP in quanto, come riportato da Snippert *et al.* [92], nei topi tripli emizigoti la ricombinazione che porta all'espressione

della GFP è meno probabile degli altri colori, mentre rosso, giallo e blu risultano egualmente probabili.

## 2.9 Analisi di frequenza clonale

Nei modelli Pax8.rtTA-TetO.Cre-ROSA26.Rainbow2.1 e Pax2.rtTA-TetO.Cre-ROSA26.Rainbow2.1, i cloni sono stati acquisiti in reni sani, in reni controlaterali (destra) ed in reni ischemici (sinistra) grazie all'uso del microscopio confocale Leica SP5 AOBS (Leica Microsystems Srl) equipaggiato con il laser Chameleon Ultra-II two-photon (Coherent).

I cloni a singola cellula, o costituiti da due o più cellule, sono stati contati nel solo segmento S3 del tubulo prossimale, il quale è stato individuato grazie a marcatura con Ab  $\alpha$ -AQP1 (*Acquaporin1*) e alle caratteristiche morfo-fisiologiche. Per cloni si intendono cellule dello stesso colore adiacenti.

La frequenza clonale è stata calcolata dividendo il numero di cloni a singola cellula o di cloni costituiti da due o più cellule dello stesso colore per il numero totale dei cloni (ossia cloni singoli totali + doppietti totali + tripletti totali, ecc). Quindi, l'indice di *Clone Frequency* percentuale è stato derivato rapportando il numero di cloni costituiti da n° cellule al numero totale di cloni, come descritto dalla seguente relazione:

$$\frac{\text{n° cloni di N cellule}}{\text{n° totale dei cloni}} \times 100 = \text{Clone Frequency}$$

Per ogni topo sono stati acquisiti 30 campi dell'*outer stripe* dell'*outer medulla* (sito di localizzazione del segmento S3) da almeno 5 differenti sezioni consecutive; le relative immagini sono state usate per la conta dei cloni da due osservatori indipendenti. La dimensione dei cloni è stata stabilita mediante marcatura nucleare con DAPI.

## 2.10 Analisi Statistica

I risultati sono stati espressi come  $\text{media} \pm \text{SEM}$ . Il confronto tra i diversi gruppi sperimentali è stato effettuato mediante Wilcoxon Mann-Whitney *test*, o tramite analisi della varianza per comparazioni multiple (ANOVA per misure ripetute) con analisi Bonferroni post-hoc. Le frequenze clonali sono state comparate per test del  $\chi^2$  con correzione di Fisher quando necessario. Sono stati considerati statisticamente significativi risultati con  $*p < 0.05$ . Il confronto dei livelli di BUN a tempi diversi tra i topi trattati e i topi non trattati è stato eseguito mediante il *test* ANOVA per comparazioni multiple o mediante Wilcoxon Mann-Whitney  $*p < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo.

## 3 RISULTATI

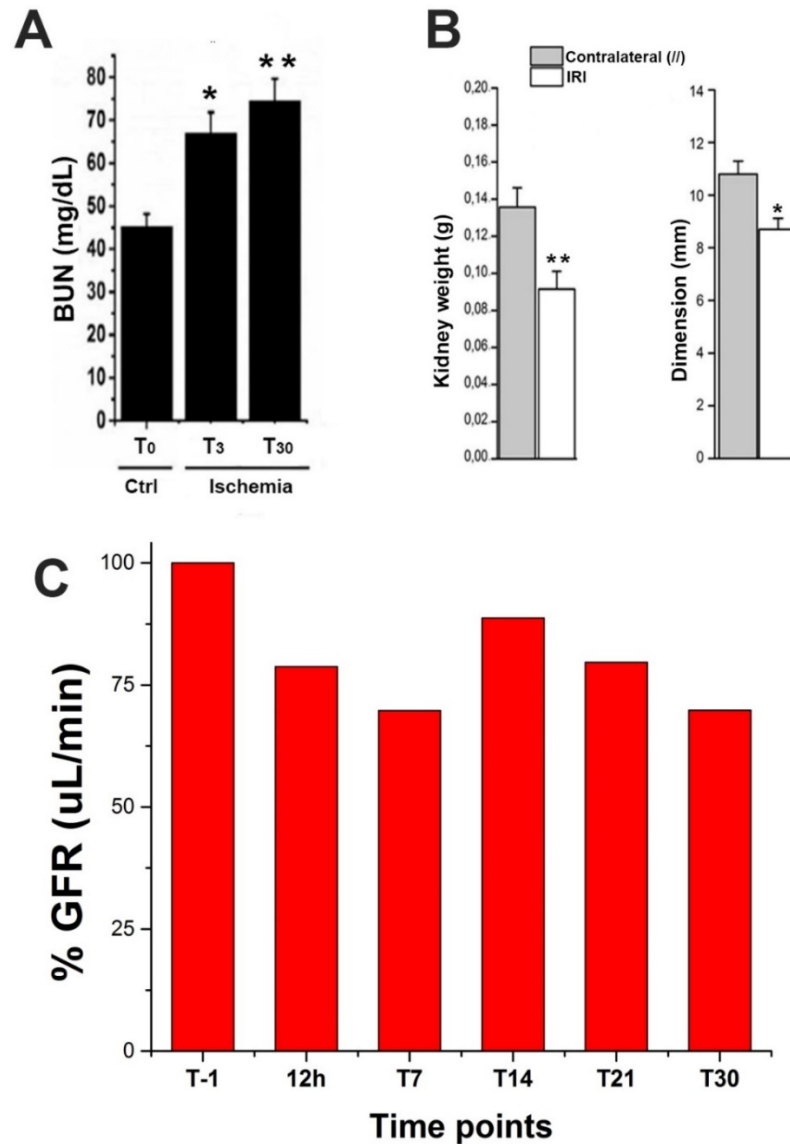
---

### 3.1 L'IPERFILTRAZIONE TRANSIENTE CONSEGUENTE AD AKI PERMETTE IL RECUPERO IMMEDIATO DELLA GFR MA, A LUNGO TERMINE, E' ASSOCIATA AD UN GLOBALE DECLINO DELLA GFR E AD INSORGENZA DI CKD

Per simulare un danno renale ischemico acuto, che rappresenta la forma più comune di AKI riscontrata nell'uomo, ho indotto un danno selettivo al compartimento tubulare mediante clampaggio della sola arteria renale sinistra per un totale di 30 minuti in topi adulti maschi C57BL/6 ( $n=5$ ). Ho così ottenuto un modello murino di Ischemia/Riperfusione monolaterale sinistra, il quale permette di ricapitolare tutte le fasi che contraddistinguono l'AKI umana, e che mi ha permesso di sfruttare il rene controlaterale come controllo interno [148]. L'intervento di ischemia monolaterale è stato sufficiente a portare verso un quadro di ATN con un aumento della BUN, già evidente a 72 ore dall'operazione chirurgica, e maggiormente significativo ad un mese dall'*onset* del danno (Figura 8A). La creatininemia, la quale risulta essere meno sensibile rispetto alla BUN per la diagnosi di danno tubulare di natura ischemica, non ha mostrato invece alcuna significativa variazione per tutta la durata sperimentale (dato non mostrato). Ad ulteriore sostegno che il compartimento tubulare sia stato colpito un forte danno strutturale, sono i dati relativi alla sostanziale riduzione di peso e dimensioni del rene ischemizzato quando comparato al rene controlaterale (Figura 8B). Tuttavia, siccome la valutazione della GFR è un indicatore di funzionalità renale molto più accurato rispetto a BUN e creatininemia, ho valutato se l'IRI fosse in grado di portare a variazioni della GFR e come questa si comportasse in risposta all'evento ischemico. Ho così dimostrato che il danno da Ischemia/Riperfusione è in grado di

ridurre significativamente, già a 12 ore dall'intervento chirurgico, la GFR; ma che, dopo un suo primo calo, la GFR degli animali ischemizzati va incontro ad un incremento (con picco a 14 giorni dall'IRI) a causa dell'iperfiltrazione renale, meccanismo compensatorio che permette agli animali di sopravvivere nel breve periodo (Figura 8C). Successivamente al picco a T<sub>14</sub>, la GFR cala nuovamente in maniera graduale verso valori, che a T<sub>30</sub>, si attestano del 25% al di sotto del *range* basale (Figura 8C). Ciò indica che si ha recupero di funzionalità tubulare in un mese dall'induzione del danno, ma che tuttavia persiste un significativo danno ed atrofia renale, come testimoniato dalla significativa perdita di peso da parte del rene post-ischemico. Questi dati mi hanno permesso di concludere che la ATN dà luogo ad una immediata riduzione della GFR, cui segue una fase di iperfiltrazione transitoria dei nefroni residui; tuttavia l'AKI, per quanto sia associata ad un recupero dell'integrità morfo-funzionale del compartimento tubulare, ha un *outcome* a lungo termine che prevede la perdita di massa renale totale, cui si associa una disfunzione renale persistente che, a sua volta, è plausibile ipotizzare predisponga verso una maggior probabilità di sviluppo di CKD [13, 14, 19, 149]. Inoltre ho potuto provare che BUN e creatininemia, i bio-marcatori clinicamente più impiegati per la diagnosi di AKI, mancano della sensibilità necessaria a quantificare la gravità del danno, non permettono di individuare il recupero attraverso iperfiltrazione transitoria ed, infine, non chiariscono perché si abbia atrofia renale post-ischemica e maggior incidenza di CKD rispetto ad animali non ischemizzati.



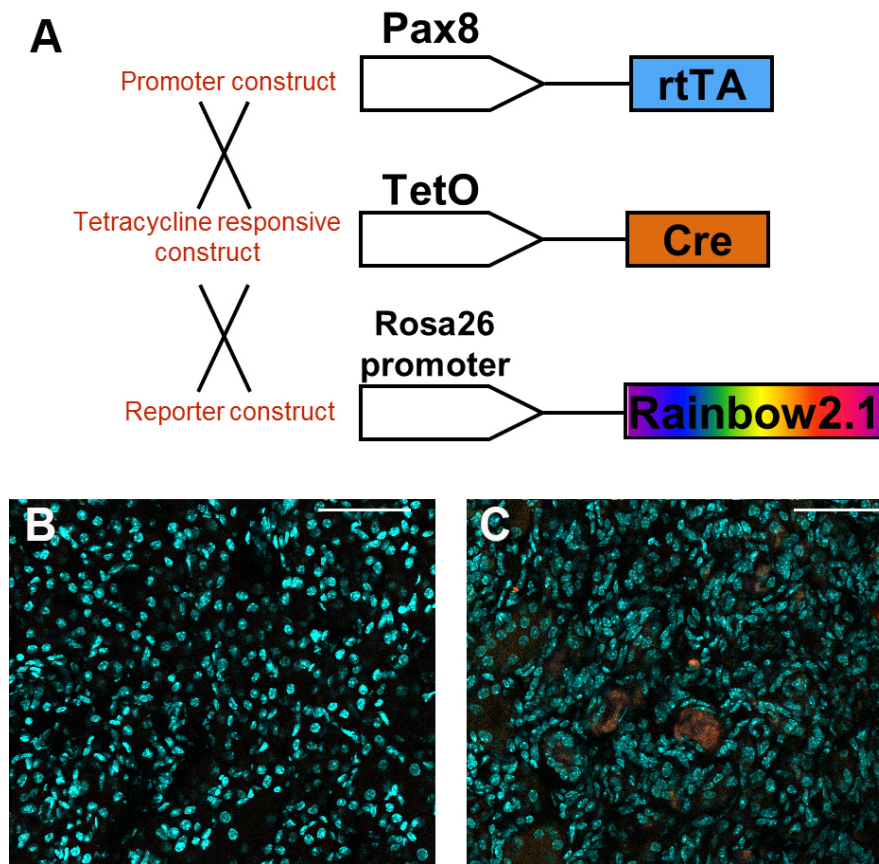


**Figura 8. L'AKI induce una condizione di iperfiltrazione transitoria che permette il recupero a breve termine della GFR.** **A-** L'induzione dell'IRI è capace di portare a danno tubulare in breve periodo: la misurazione della BUN a 72 ore dall'intervento chirurgico mostra già un netto incremento della azotemia nei topi sottoposti ad Ischemia/Riperfusione monolaterale ( $n=5$ ). Analisi statistica eseguita mediante Mann-Whitney Test ( $*p<0,05$ ,  $**p<0.01$ ). **B-** Peso e dimensioni dei reni ischemizzati ( $n=5$ ) e controlaterali (//) ( $n=5$ ) permettono di confermare ulteriormente l'avvenuto danno al rene sinistro sottoposto a 30 minuti di Ischemia/Riperfusione. Analisi statistica eseguita mediante Mann-Whitney Test ( $*p<0,05$ ,  $**p<0.01$ ). **C-** Andamento della GFR del gruppo sottoposto ad IRI ( $n=5$ ) normalizzato sul gruppo *sham-operated* ( $n=5$ ). Nonostante il calo della GFR nelle ore immediatamente successive all'intervento chirurgico, è possibile notare il suo successivo incremento fino a raggiungere il picco di iperfiltrazione compensatoria attorno al giorno 14. Successivamente la GFR cala nuovamente e gradualmente. *Si ringraziano Marschner JA ed il Prof. Anders HJ (Nephrologisches Zentrum, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Klinikum der Universität München, Munich, Germany) per la collaborazione volta ad ottenere i dati riportati in figura.*

### **3.2 LA RIGENERAZIONE TUBULARE DOPO AKI E' LIMITATA E PRINCIPALMENTE DOVUTA ALLA AMPLIFICAZIONE CLONALE DI UN SUBSET DI CELLULE TUBULARI**

Per analizzare la capacità delle cellule tubulari di rigenerare il compartimento tubulare in seguito a danno da AKI, ho effettuato un'analisi di *lineage tracing* “*at single cell level*” di tutte le cellule epiteliali tubulari utilizzando il modello transgenico condizionale Pax8-Rain. In questo topo, la regione che regola l'espressione del fattore trascrizionale Pax8, gene ubiquitariamente espresso da tutte le cellule tubulari del rene adulto [143, 144], controlla le ricombinazioni che portano all'espressione di uno tra i quattro fluorofori (GFP, YFP, RFP, CFP) codificati dal transgene ROSA26.Rainbow2.1 [92] (Figura 9A). Il modello murino Pax8-Rain permette pertanto di tracciare singole cellule Pax8<sup>+</sup> e consente di quantificare tutta la progenie derivante tali cellule. Tuttavia, per verificare che non vi fosse alcun *leakage* nel sistema transgenico creato, topi Pax8-Rain sono stati sacrificati senza che fossero stati indotti sia a T0 ( $n=2$ ), che a T<sub>30</sub> dopo IRI ( $n=2$ ) (Figura 9B e 9C rispettivamente).

Per differenziare il contributo alla generazione di cloni da parte di cellule tra loro adiacenti casualmente marcate dallo stesso colore, ho condotto le analisi di *lineage tracing* in seguito a somministrazione di Doxicilina a basso dosaggio (0,25 mg/mL), garantendo così una frequenza di ricombinazione inferiore al 30% di tutte le cellule tubulari. Così facendo ho fatto in modo che le cellule epiteliali tubulari fossero marcate, da differenti *reporter*, in maniera sparsa all'interno di domini non colorati: mi sono così garantito che fossero presenti meno del 5% di doppietti dello stesso colore o, comunque sia, meno del 5% di cellule adiacenti marcate dallo stesso *reporter* (Figura 10 A).



**Figura 9. Costruzione e validazione del modello Pax8.rtTA-TetO.Cre-ROSA26.Rainbow2.1.**

**A**-Rappresentazione schematica del modello Pax8-Rain e delle differenti linee usate per la sua creazione. **B**- Immagine rappresentativa di un topo Pax8-Rain non indotto e sacrificato ( $T_0$ ) al fine di verificare che non vi fosse *leakage* da parte di nessuno dei transgeni. **C**- Rene ischemizzato di animale sacrificato a  $T_{30}$  e non indotto con Doxiciiclina, in cui si dimostra l'assenza di *leakage* nonostante la presenza di danno tubulare. In rosso autofluorescenza derivante da aggregati proteici classicamente associati ad AKI. *Scale bar* 60  $\mu\text{m}$ .

E' stato così possibile discernere una reale amplificazione clonale dall'evento statistico che determina, invece, che due cellule adiacenti possano casualmente risultare marcate dallo stesso fluoroforo.

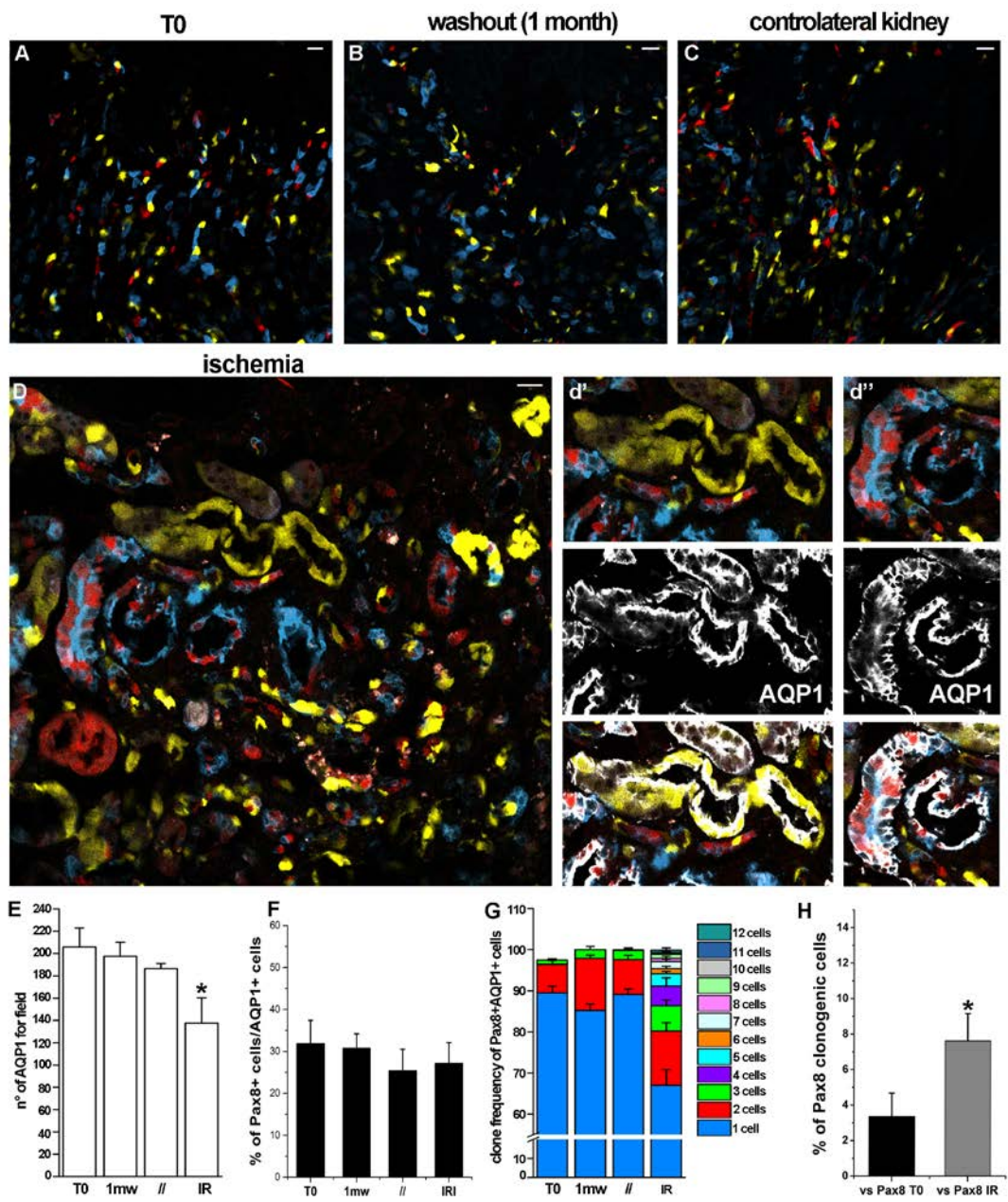
Topi Pax8.rtTA-TetO.Cre-ROSA26.Rainbow2.1 ( $n=4$ ), a partire dalla quinta settimana di età, sono stati trattati per 10 giorni con Doxiciiclina a 0,25 mg/mL disciolta in acqua, così da indurre la ricombinazione del transgene Rainbow2.1 e colorare in maniera casuale e permanente ogni singola cellula con un solo colore (Figura 10A). Dopo i 10 giorni di induzione gli animali sono stati mantenuti in *wash out* per una

settimana, al termine della quale sono stati sacrificati così da fungere da controlli T<sub>0</sub> (Figura 10A). Per studiare le risposte clonali associate all'insulto tubulare, è stata somministrata Doxiciolina a 0,25 mg/mL a topi Pax8-Rain, i quali sono poi stati sottoposti ad una settimana di *wash out* e, in seguito, ad intervento di ischemia monolaterale di 30 minuti ( $n=4$ ). I reni degli animali sono stati espianati a distanza di 1 mese (T<sub>30</sub>) dall'intervento chirurgico, così da permettere la rappresentazione cumulativa di tutti i potenziali cloni (precoci e tardivi) attivati dalla risposta all'insulto (Figura 10D). Tuttavia, per discernere la rigenerazione tubulare da tutte le attività cellulari coinvolte nella fisiologica omeostasi tissutale che possono incorrere durante il periodo precedente all'*end point* sperimentale, è stato impiegato un gruppo parallelo di animali ( $n=3$ ), non operati e sacrificati anch'essi a T<sub>30</sub> (Figura 10B). Il rene controlaterale di ogni topo è stato impiegato come un controllo interno per il rene sottoposto ad IRI (Figura 10C). L'*outer stripe* dell'*outer medulla* dei reni controlaterali o dei topi sani sacrificati a T<sub>30</sub> dalla fine del *wash out* erano caratterizzati dalla presenza sia di singoli cloni Pax8<sup>+</sup>, che dalla presenza di cloni monocromatici costituiti da 3-4 cellule (Figura 10B e 10C). Al contrario, grazie all'analisi dei reni sottoposti ad Ischemia/Riperfusione, mi è stato possibile documentare la presenza di una sostanziale tubulogenesi localizzata, in particolar modo, nelle aree maggiormente colpite dall'insulto, ossia l'*outer stripe* dell'*outer medulla* ove sono siti la maggior parte dei segmenti S3 del tubulo prossimale (Figura 10D). In particolare, in tale area del rene, ho potuto osservare la presenza di cloni che hanno contribuito a ricostituire l'architettura del tubulo sia in senso circonferenziale che longitudinale rispetto all'asse tubulare, con alcuni cloni monocromatici che hanno addirittura contribuito alla totale ricostituzione circonferenziale di un intero tubulo (10-12 cellule adiacenti dello stesso colore) (Figura 10D). Ciò evidenzia che singole cellule Pax8<sup>+</sup> hanno dato

effettivamente luogo ad amplificazioni di natura clonale nell'arco di un mese dall'induzione dell'IRI. La conta quantitativa dei cloni positivi ad AQP1 eseguita in immunofluorescenza su sezioni tissutali congelate mi ha permesso di dimostrare che, mentre in seguito ad IRI il numero del totale delle cellule tubulari (AQP1<sup>+</sup>) cala drasticamente a causa dell'insulto tubulare, al contrario la percentuale di cellule Pax8<sup>+</sup> sul totale delle cellule AQP1<sup>+</sup> è rimasta simile in tutti i gruppi di topi analizzati: sani T<sub>0</sub> 31,90%±5,5%, sani T<sub>30</sub> 30,81%±3,37%, rene controlaterale 25,4%±5,1%, IRI T<sub>30</sub> 27,17%±4,93% (nessuna significatività statistica secondo Mann-Whitney Test) (Figura 10F). Questo dato evidenzia come la positività a Pax8 sia stocasticamente associata a tutte le cellule epiteliali tubulari e non individui una specifica sottopopolazione dell'epitelio tubulare con maggiori capacità di crescita o di resistenza alla morte. Tuttavia, l'analisi della frequenza clonale ha evidenziato che le cellule epiteliali tubulari Pax8<sup>+</sup> del rene ischemico hanno proliferato, come conseguenza del danno, maggiormente rispetto a quanto osservabile nel rene controlaterale o, ad esempio, a quanto attribuibile all'omeostasi tissutale del rene nello stesso arco di tempo (Figura 10G). Il confronto tra il numero di cellule Pax8<sup>+</sup> che hanno generato cloni ad 1 mese di distanza dall'IRI, ed il numero di cellule Pax8<sup>+</sup> marcate dal costrutto Rainbow a T<sub>0</sub> ha permesso di rivelare che solo una piccola sottopopolazione di cellule epiteliali tubulari è andata incontro a divisione cellulare generando cloni (Figura 10G). Ciò che è maggiormente interessante notare, è che tale sottopopolazione risulta altamente arricchita quando confrontata con il numero totale delle cellule Pax8<sup>+</sup> sopravvissute ad un mese dall'*onset* dell'IRI (Figura 10H). Ciò suggerisce che il 40,48% delle cellule tubulari siano state perse e non siano state sostituite dopo il danno tubulare: se difatti confronto il rapporto tra il numero di cellule clonogeniche Pax8<sup>+</sup>/totale delle cellule Pax8<sup>+</sup> a T<sub>0</sub> (3,36±1,31), ed il rapporto tra cellule

clonogeniche Pax8<sup>+</sup>/totale delle cellule Pax8<sup>+</sup> a T<sub>30</sub> (7,61±1,54), è possibile notare che il rapporto cellule clonogeniche Pax8<sup>+</sup>/totale delle cellule Pax8<sup>+</sup> a T<sub>30</sub> risulta aumentato di 2,26 volte, indicando pertanto che il denominatore, ossia il numero globale di cellule Pax8<sup>+</sup>, è drasticamente calato tra T<sub>0</sub> e T<sub>30</sub> (Figura 10H).

Nel complesso, questi dati dimostrano che solo una piccola frazione (3,36±1,31) delle cellule epiteliali del tubulo è in grado di dividersi per sostituire le cellule perse come conseguenza del danno. Il potenziale rigenerativo del tubulo è quindi limitato: circa la metà delle cellule tubulari perse non sono infatti sostituite.



**Figura 10. La rigenerazione tubulare post-AKI è da attribuirsi ad una circoscritta sottopopolazione tubulare con limitate capacità rigenerative.** **A-** Immagine presa dal rene di un topo Pax8.rtTA-TetO.Cre-ROSA26.Rainbow2.1 indotto per 10 giorni, mantenuto in *wash out* una settimana e, quindi, sacrificato. **B-** *Outer stripe* dell'*outer medulla* renale del modello Pax8-Rain indotto per 10 giorni e mantenuto per un mese in *wash out*. **C-** Rene controlaterale di un topo Pax8-Rain sottoposto ad ischemia unilaterale di 30 minuti e sacrificato a T<sub>30</sub>. **D-** *Outer stripe* dell'*outer medulla* di un rene ischemizzato nel modello Pax8-Rain. A differenza di quanto osservabile in A, B e C, è possibile notare come il rene sottoposto ad IRI sia andato incontro ad una forte espansione clonale che ha permesso di ricostituire l'architettura tubulare sia in senso circonferenziale che in senso longitudinale rispetto all'asse del tubulo. Negli ingrandimenti **d'** e **d''** è visibile come l'espansione di un solo clone (**d'**) o due cloni (**d''**) Pax8<sup>+</sup>AQP1<sup>+</sup> del segmento S3 abbia portato alla rigenerazione di un intero tubulo prossimale. **E-** Numero di cellule AQP1<sup>+</sup> del tubulo contorto prossimale, segmento S3, contate per campo da due diversi operatori in animali sani sacrificati a T<sub>0</sub> (205,72±17,10) e T<sub>30</sub> (197,5±12,55), e in animali sottoposti ad IRI (122,58±20,7) di cui è stato valutato anche il rene controlaterale (//) (186,52±5,59) Analisi statistica eseguita mediante Mann-Whitney Test con \*p<0,05 quando IRI T<sub>30</sub> è stato confrontato con ognuno degli altri gruppi. **F-** Frequenza di induzione (percentuale di cellule Pax8<sup>+</sup> su cellule AQP1<sup>+</sup>) nel modello Pax8-Rain: sani T<sub>0</sub> 31,90%±5,5%; sani T<sub>30</sub> 30,81%±3,37%; rene controlaterale 25,4%±5,1%; IRI T<sub>30</sub> 27,17%±4,93%. Nessuna significatività statistica evidenziata dal Mann-Whitney Test. Le cellule Pax8<sup>+</sup> non rappresentano una sottopopolazione delle cellule epiteliali tubulari in quanto, indipendentemente dalla condizione sperimentale, il rapporto tra cellule Pax8<sup>+</sup> e cellule totali tubulari (AQP1<sup>+</sup>) rimane invariato. **G-** Frequenza dei cloni Pax8<sup>+</sup>AQP1<sup>+</sup> nei vari gruppi sperimentali. Per numeri e SEM vedere Figura Supplementare 1. **H-** Percentuale di cellule clonogeniche Pax8<sup>+</sup>/totale delle cellule Pax8<sup>+</sup> a T<sub>0</sub> e quella di cellule clonogeniche Pax8<sup>+</sup>/totale delle cellule Pax8<sup>+</sup> a T<sub>30</sub> (3,36±1,31 *versus* 7,61±1,54, (\*p<0,05, Mann-Whitney Test). *Scale bar* 20 μm.

### **3.3 LE CELLULE PAX2<sup>+</sup> RAPPRESENTANO UNA POPOLAZIONE DISTINTA E PRE-ESISTENTE DI CELLULE TUBULARI CHE CONTRIBUISCE AL *TURNOVER* TUBULARE E MOSTRA ALTA CAPACITA' CLONOGENICA**

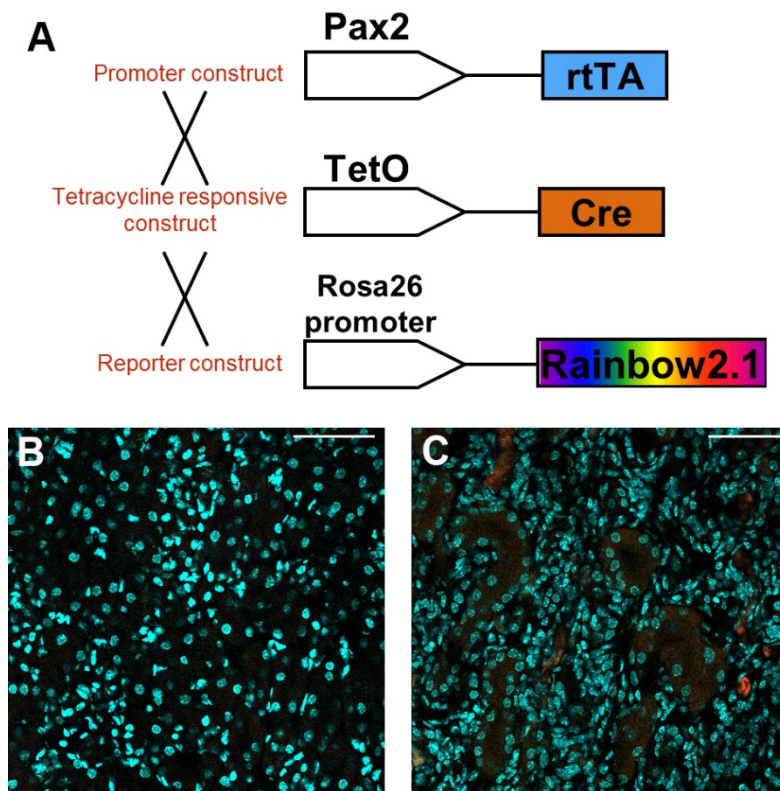
Per verificare se la risposta rigenerativa osservata dopo IRI possa essere ascritta ad una putativa popolazione di progenitori ho usato il modello transgenico inducibile Pax2.rtTA-TetO.Cre-ROSA26Rainbow2.1. Infatti, Pax2 è un fattore trascrizionale espresso dalla popolazione di progenitori embrionali derivati dal mesenchima metanefrico, dai quali si originano poi tutte le componenti epiteliali del nefrone [137,

140]. Inoltre l'espressione di Pax2 è inibita dalla differenziazione cellulare e decresce gradualmente con il graduale sviluppo del rene. Tuttavia, nel nefrone del topo adulto, un sottoinsieme di cellule epiteliali della capsula di Bowman e di cellule tubulari *scattered* continuano ad esprimere Pax2, suggerendo un fenotipo maggiormente immaturo da parte di questi *pool* cellulari [55, 102, 120, 138]. Infatti, abbiamo recentemente dimostrato, impiegando lo stesso modello murino, che le cellule Pax2<sup>+</sup> presenti nella capsula di Bowman costituiscono una popolazione di progenitori renali che fungono da riserva podocitaria nel caso in cui debbano essere sostituiti i podociti persi come conseguenza di un insulto [142, 150]. Ho pertanto ipotizzato che lo stesso modello murino potesse essere impiegato anche per individuare i putativi progenitori *scattered* all'interno del tubulo già individuati in uomo [43, 71, 81, 103]. Pertanto, ho *in primis* costruito il modello murino (Figura 11A) e verificato che non vi fosse alcun *leakage* dei differenti transgeni impiegati, sia in condizioni fisiologiche in animali sacrificati a T<sub>0</sub> (Figura 11B), che in seguito ad IRI in topi sacrificati a T<sub>30</sub> (Figura 11C). Questi esperimenti hanno provato che non vi è alcun *leakage* del sistema transgenico usato per tracciare i putativi progenitori tubulari, come già riportato in precedenza [150].

Successivamente, topi transgenici Pax2-Rain sono stati indotti con 2mg/mL di Doxiciolina a partire dalla 5<sup>a</sup> settimana di età per un totale di 10 giorni, cui è seguita la settimana di *wash out* dalla molecola induttrice. I reni dei topi sacrificati al termine della settimana di *wash out* (n=4) mi hanno permesso di provare che si ha espressione del transgene *reporter* Rainbow non solo nei progenitori renali della capsula di Bowman [150], ma anche in singole e rare cellule sparse all'interno del compartimento tubulare (Figura 12A, 12B, 12C). La marcatura con anticorpi diretti verso *marker* specifici dei differenti segmenti tubulari ha dimostrato che le cellule Pax2<sup>+</sup> sono



principalmente localizzate nel segmento S3 del tubulo prossimale (AQP1<sup>+</sup>), nel *thick ascending limb* (THP<sup>+</sup>) e nel tubulo contorto distale fino al *connecting segment* (THP<sup>+</sup>) prima del dotto collettore (Figura 12A e 12B). Tuttavia, i dotti collettori della zona midollare profonda, individuabili grazie alla positività per Acquaporina2 (*Acquaporin2*, AQP2), sono risultati fortemente popolati da cellule Pax2<sup>+</sup> (Figura 12C); ciò si spiega in quanto tali strutture derivano embriologicamente dalla regione dell'*ureteric bud*, e mantengono la positività a Pax2 anche durante tutto il corso della vita adulta. Per questo motivo le cellule Pax2<sup>+</sup>AQP2<sup>+</sup> non sono state considerate nelle successive analisi.

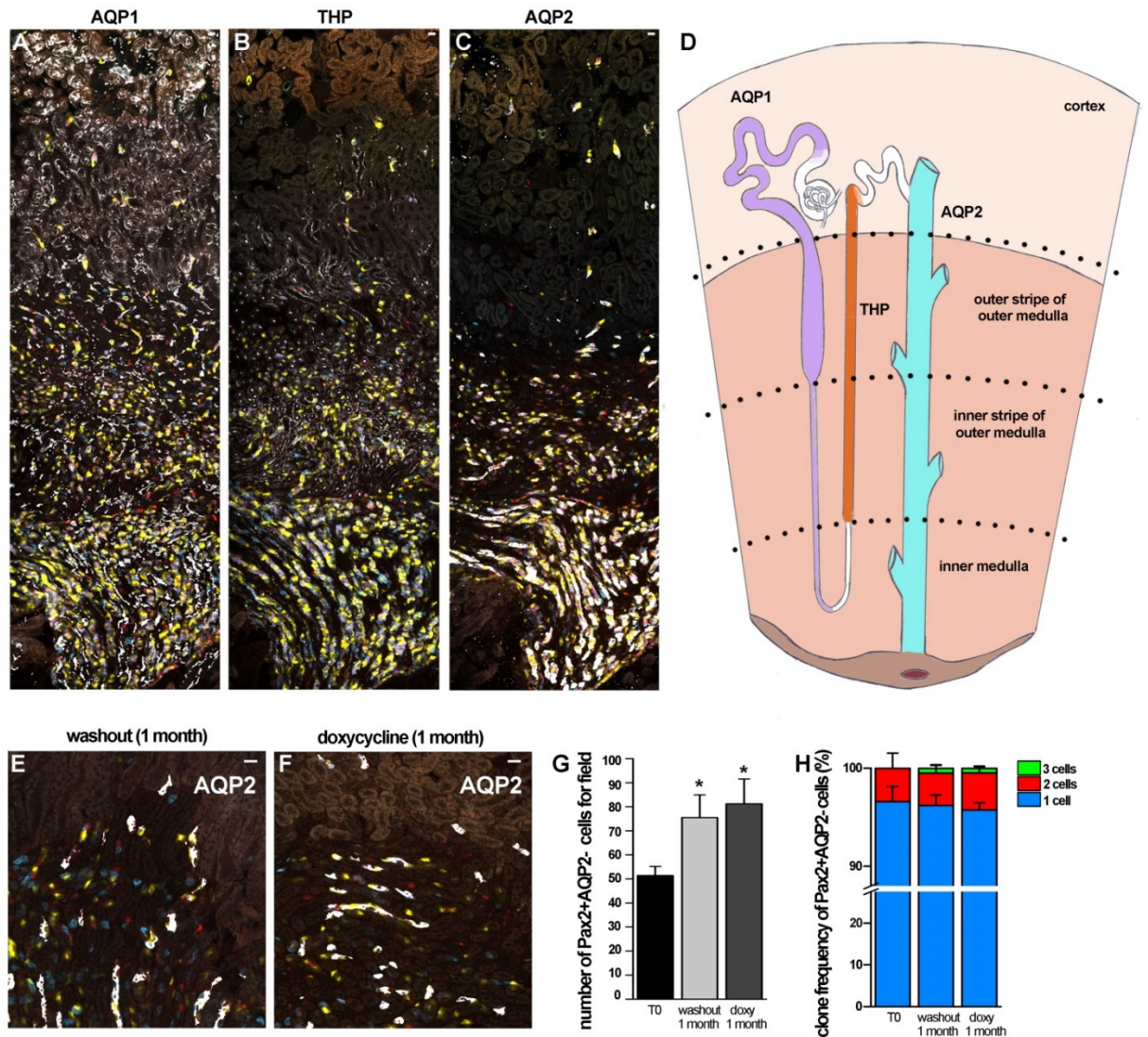


**Figura 11. Costruzione e validazione del modello Pax2.rtTA-TetO.Cre-ROSA26.Rainbow2.1.**

**A**-Rappresentazione schematica del modello Pax2-Rain e delle differenti linee usate per la sua creazione. **B**- Immagine rappresentativa di un topo Pax2-Rain non indotto e sacrificato (T<sub>0</sub>) per appurare che non vi fosse *leakage* da parte di nessuno dei transgeni impiegati nel modello murino. **C**- Rene ischemizzato di animale sacrificato a T<sub>30</sub> e non indotto con Doxyciclina, in cui si dimostra l'assenza di *leakage* nonostante la presenza di danno tubulare. In rosso aggregati proteici classicamente associati ad AKI. Scale bar 60 μm.

In un gruppo parallelo di animali ( $n=4$ ), dopo induzione con 2 mg/mL di Doxiciolina per 10 giorni ed una settimana di *wash out*, ho tracciato il destino di singole cellule Pax2<sup>+</sup> per un tempo totale di un mese in condizioni fisiologiche. I reni di questo gruppo di topi mi hanno permesso di dimostrare che, a livello della corticale renale, nei 30 giorni successivi all'induzione, sono stati generati piccoli cloni, generalmente costituiti da non più di due o tre cellule (Figura 12E e 12H). Ciò suggerisce che, nel mese trascorso tra la fine del *wash out* e l'*end point* sperimentale in condizioni omeostatiche, le cellule Pax2<sup>+</sup> siano andate incontro a mitosi e, quindi, ad una minima espansione clonale. Pertanto, per stabilire se le cellule Pax2<sup>+</sup> rappresentino una popolazione pre-esistente e distinta di progenitori tubulari, o se piuttosto l'espressione di Pax2 sia legata ad uno stato funzionale che può essere transitoriamente acquisito da qualsiasi cellula tubulare, un altro gruppo di topi è stato costantemente mantenuto in induzione con Doxiciolina 2mg/mL per un ulteriore mese oltre ai canonici 10 giorni di induzione ( $n=4$ ) (Figura 12 F). Il confronto tra topi T<sub>0</sub> ( $n=4$ ), topi trattati con Doxiciolina e successivamente mantenuti in *wash out* per un mese ( $n=4$ ) e topi mantenuti per lo stesso periodo di tempo continuamente con acqua addizionata di Doxiciolina 2 mg/mL ( $n=4$ ) ha evidenziato che le cellule Pax2<sup>+</sup> sono coinvolte nell'omeostasi tissutale (Figura 12G). Infatti, sia i topi mantenuti in *wash out* per un mese che i topi mantenuti continuativamente con Doxiciolina hanno mostrato un incremento significativo nel numero di cellule Pax2<sup>+</sup>AQP2<sup>-</sup> (rispettivamente  $75,52 \pm 9,43$  e  $81,21 \pm 10,34$ ) in confronto ai controlli basali a tempo zero ( $51,4 \pm 3,77$ ). Ciononostante, tra il gruppo *wash out* T<sub>30</sub> e i topi mantenuti con Doxiciolina per 30 giorni non è stato possibile evidenziare alcuna differenza statisticamente significativa, evento che suggerisce che, nonostante il contributo al *turnover* cellulare del rene, la popolazione Pax2<sup>+</sup> rappresenti una popolazione pre-esistente e *fixed*. Ciò è stato

ulteriormente confermato dall'analisi della *clone frequency* delle cellule Pax2<sup>+</sup>AQP2<sup>-</sup> (Figura 12H). Pertanto, nel loro complesso, questi dati dimostrano che le cellule Pax2<sup>+</sup> rappresentano una popolazione pre-esistente e distinta di progenitori tubulari, i quali esibiscono capacità clonogenica e contribuiscono al *turnover* tubulare.



**Figura 12. Il pool Pax2<sup>+</sup> è costituito da una pre-esistente popolazione dell'epitelio tubulare che contribuisce al turnover tissutale e possiede alta capacità clonogenica.** A- Immagine panoramica (dalla corticale all'*inner medulla*) marcata per AQP1 presa dal rene di un topo Pax2.rTetO.Cre-ROSA26.Rainbow2.1 indotto per 10 giorni, mantenuto in *wash out* una settimana e, quindi, sacrificato. E' da notarsi la forte colocalizzazione tra il segnale associato a Pax2 e quello dell'Ab  $\alpha$ -AQP1, a dimostrazione che le cellule Pax2<sup>+</sup> sono localizzate principalmente nel segmento S3 del tubulo prossimale. B- Immagine panoramica marcata per THP presa dal rene di un topo Pax2-Rain sano T<sub>0</sub>. Anche in questo caso si ha una intensa colocalizzazione tra il segnale associato a Pax2 e quello della

THP, evento che prova le cellule Pax2<sup>+</sup> sono localizzate anche nel *thick ascending limb* e nel tubulo contorto convoluto distale fino al *connecting segment*. **C**-Immagine panoramica marcata per AQP2 presa dal rene di un topo Pax2-Rain sano T<sub>0</sub>. Il segnale associato a Pax2 mostra colocalizzazione con la marcatura per AQP2 nella sola regione della *inner medulla*, zona che rimane Pax2<sup>+</sup> anche nell'adulto in quanto derivante dall'*ureteric bud*, e dove fortemente presenti i dotti collettori (AQP2<sup>+</sup>). **D**-Rappresentazione schematica delle diverse regioni del rene e delle differenti strutture del nefrone rinvenibili in ciascuna di tali regioni. **E**- Immagine dell'*outer stripe* dell'*outer medulla* di un topo Pax2-Rain indotto con Doxyciclina, mantenuto in *wash out* per una settimana, e poi mantenuto in condizioni fisiologiche per un ulteriore mese. Sono presenti rare cellule Pax2<sup>+</sup> che, tuttavia, in alcuni casi hanno dato luogo a piccoli cloni (2-3 cellule). In bianco è marcata l'AQP2, a dimostrare che le cellule Pax2<sup>+</sup> riscontrabili in questa regione del rene non appartengono ai dotti collettori e non sono pertanto derivate embriologicamente dall'*ureteric bud*. **F**- Immagine dell'*outer stripe* dell'*outer medulla* di un topo sano Pax2-Rain indotto con Doxyciclina, e poi mantenuto per altri 30 giorni con acqua addizionata con 2 mg/mL di Doxyciclina. Nuovamente, sono presenti rare cellule Pax2<sup>+</sup> che, in alcuni casi, hanno dato luogo a piccoli cloni (2-3 cellule). In bianco è marcata l'AQP2. **G**- Numero di cellule Pax2<sup>+</sup> contate per campo in topi Pax2-Rain sacrificati a T<sub>0</sub> (n=4), mantenuti per un mese in *wash out* e sacrificati a T<sub>30</sub> (n=4) o mantenuti per un mese con Doxyciclina e poi sacrificati a T<sub>30</sub> (n=4). Il grafico mostra come la popolazione Pax2<sup>+</sup> sia coinvolta nell'omeostasi tissutale, in quanto il numero di cellule Pax2<sup>+</sup> nei due gruppi sacrificati a T<sub>30</sub> aumenta significativamente rispetto al T<sub>0</sub> (\*p<0.05 secondo Mann Whitney Test). Tuttavia, le cellule Pax2<sup>+</sup> rappresentano una popolazione pre-esistente e distinta di progenitori tubulari, in quanto, oltre a dare cloni, il mantenimento per un mese con Doxyciclina non fa variare il numero di cellule Pax2<sup>+</sup> (81,21±10,34) rispetto allo stesso numero (75,52±9,43) contato nei topi mantenuti in *wash out* per un mese (NS). **H**- Analisi di frequenza clonale delle cellule Pax2<sup>+</sup>AQP2<sup>-</sup> nei tre gruppi descritti, la quale evidenzia come si abbia una minima amplificazione clonale (NS) nei gruppi "one month wash out" e "one month Doxycycline" a causa del mantenimento omeostatico del tessuto renale operato dal pool Pax2<sup>+</sup>. Scale bar 20 µm.

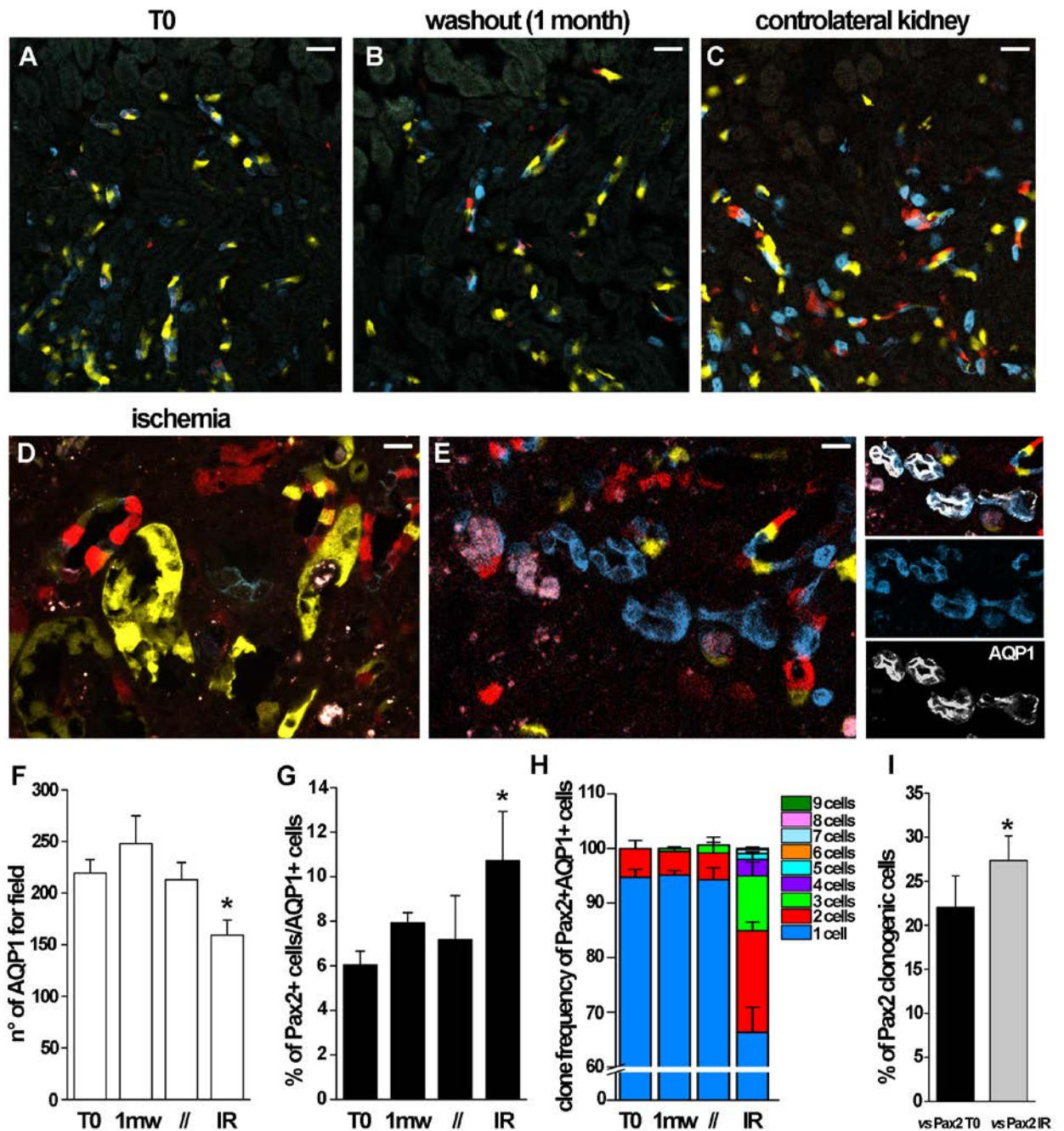
### **3.4 LE CELLULE PAX2<sup>+</sup> POSSIEDONO UNA ALTA CAPACITA' DI SOPRAVVIVENZA ALLA MORTE, FORTE CAPACITA' CLONOGENICA E SONO IN GRADO DI SOSTITUIRE LE CELLULE PERSE DOPO DANNO TUBULARE ACUTO ISCHEMICO**

Grazie al modello di IRI unilaterale descritto in precedenza, ho valutato il contributo del pool Pax2<sup>+</sup> nel processo di tubulogenesi normalmente associato ad episodi di AKI. Per questo scopo, topi Pax2.rTA-TetO.Cre-ROSA26.Rainbow2.1 (n=6) sono stati trattati con 2 mg/mL di Doxyciclina per 10 giorni, cui è seguita una settimana di *wash*

*out*, e quindi, o il sacrificio a T<sub>0</sub> al fine di creare i controlli basali (Figura 13A), o l'induzione dell'IRI mediante blocco della arteria renale sinistra per un totale di 30 minuti. I topi sono stati seguiti per un mese e, dopo 30 giorni dall'operazione, i reni sono stati espianati per consentire le analisi di microscopia confocale (Figura 13D). La valutazione delle immagini dei reni ischemizzati mi ha permesso di individuare tutti i potenziali cloni (precoci e tardivi) attivati in risposta all'insulto. Tuttavia, per discernere la rigenerazione tubulare post-insulto da tutte le attività cellulari coinvolte nella fisiologica omeostasi tissutale che possono incorrere durante il periodo precedente all'*end point* sperimentale, è stato impiegato un gruppo parallelo di animali ( $n=2$ ), non operati e sacrificati anch'essi a T<sub>30</sub> (Figura 13B). Il rene controlaterale di ogni topo è stato analizzato come ulteriore confronto interno (Figura 13C). Grazie alla valutazione dei reni ischemizzati ho potuto provare che, nei 30 giorni successivi all'IRI, è avvenuta una significativa tubulogenesi (Figura 13D) localizzata, in particolar modo, nelle aree maggiormente colpite dall'insulto, ossia l'*outer stripe* dell'*outer medulla* ove sono siti la maggior parte dei segmenti S3 del tubulo prossimale (Figura 13E-13e''). In particolare, ho potuto osservare la presenza di cloni che hanno contribuito a ricostituire l'architettura del tubulo sia in senso circonferenziale che longitudinale rispetto all'asse tubulare, con alcuni cloni hanno addirittura contribuito alla totale ricostituzione circonferenziale di un intero tubulo (Figura 13D e Figura 13E). L'*outer stripe* dell'*outer medulla* di questi animali era, infatti, caratterizzata dalla presenza sia di singoli cloni Pax2<sup>+</sup>, che dalla presenza di cloni monocromatici costituiti da 8-9 cellule adiacenti dello stesso colore (Figura 13D), a riprova che è avvenuta una forte tubulogenesi a partire da singoli cloni Pax2<sup>+</sup> presenti all'interno del tubulo prossimale. La stima quantitativa dei cloni AQP1<sup>+</sup> eseguita in immunofluorescenza mi ha permesso di provare che, mentre in seguito ad IRI il

numero totale di cellule tubulari (AQP1<sup>+</sup>) cala drasticamente a causa dell'insulto tubulare (Figura 13F), al contrario la percentuale di cellule Pax2<sup>+</sup> è andata incontro ad un incremento di 1,77 volte come conseguenza del danno a carico del compartimento tubulare (Figura 13G, per numeri e SEM vedere Figura Supplementare 1). Ciò suggerisce che l'espressione di Pax2 individua selettivamente una particolare sottopopolazione di cellule tubulari con differenti caratteristiche e comportamento rispetto alla maggior parte delle cellule dell'epitelio tubulare; tali cellule hanno, infatti, una forte capacità di resistenza alla morte ed notevole capacità clonogenica, le quali sono particolarmente evidenti dopo insulto tubulare. L'analisi della frequenza clonale ha evidenziato, inoltre, che le cellule epiteliali tubulari Pax2<sup>+</sup> del rene ischemico hanno proliferato in maniera statisticamente maggiore, in seguito ad AKI, rispetto a quanto osservato alla stessa tempistica nel rene controlaterale o, ad esempio, a quanto attribuibile all'omeostasi tissutale renale nello stesso arco di tempo (Figura 13H). Infatti, il confronto tra il numero di cellule clonogeniche Pax2<sup>+</sup> dopo danno ischemico/totale delle cellule Pax2<sup>+</sup> a T<sub>0</sub>, ed il rapporto tra il numero di cellule clonogeniche Pax2<sup>+</sup>/totale delle cellule Pax2<sup>+</sup> a T<sub>30</sub>, ha permesso di rivelare che il 22,03% delle cellule Pax2<sup>+</sup> dell'epitelio tubulare di un rene sano sono in grado di andare incontro a divisione cellulare, in risposta all'insulto, generando cloni (Figura 13I). Al contrario, la percentuale di cellule Pax8<sup>+</sup> che hanno generato cloni in risposta all'IRI era 6,55 volte inferiore rispetto a quanto osservato nel modello Pax2-Rain ischemizzato, motivo per cui le cellule Pax2<sup>+</sup> risultano arricchite in seguito a danno ischemico. Inoltre, queste cellule rispondono all'insulto tubulare dando luogo alla formazione di un ampio numero di cloni: è quindi evidente che le cellule Pax2<sup>+</sup> rappresentano il *pool* cellulare adibito alla rigenerazione del compartimento epiteliale tubulare danneggiato dalla condizione ischemica. È interessante notare che, anche

quando analizzata in confronto alla quantità totale di cellule tubulari Pax2<sup>+</sup> sopravvissute a distanza di un mese dall'IRI, la capacità clonale delle cellule Pax2<sup>+</sup> è rimasta invariata, suggerendo pertanto una elevata capacità di resistenza alla morte. Il *pool* Pax2<sup>+</sup> è quindi in grado non solo di sopravvivere più facilmente a condizioni di ATN, ma è anche capace di proliferare nonostante la condizione di danno tubulare. Al contrario, il confronto tra il rapporto del il numero di cellule clonogeniche Pax8<sup>+</sup>/totale delle cellule Pax8<sup>+</sup> a T<sub>0</sub>, ed il rapporto tra il numero di cellule clonogeniche Pax8<sup>+</sup>/totale delle cellule Pax8<sup>+</sup> sopravvissute a T<sub>30</sub>, mi ha permesso di dimostrare che l'epitelio tubulare differenziato Pax8<sup>+</sup> ha una minor capacità di resistenza alla morte cellulare indotta da eventi ischemici. Questo suggerisce che una larga percentuale di cellule Pax8<sup>+</sup> dell'epitelio tubulare sia andata incontro a morte cellulare, evidenziando la scarsa capacità dell'epitelio tubulare differenziato di resistenza ad eventi ischemici. Presi nel loro complesso, questi dati dimostrano che il *pool* Pax2<sup>+</sup> rappresenta una sottopopolazione ben delineata di progenitori tubulari che, in caso di insulto tubulare, non solo risulta arricchita grazie alla sua alta capacità di resistenza alla morte, ma anche grazie alla forte capacità clonogenica. Le cellule Pax2<sup>+</sup> sono quindi gli attori responsabili che conferiscono capacità rigenerativa al compartimento tubulare e che, dopo insulto, si attivano per ripristinare morfologia e funzionalità renale.



**Figura 13.** Le cellule Pax2<sup>+</sup> possiedono una forte capacità di resistenza alla morte, sono caratterizzate da alta capacità clonogena e sono in grado di sostituire le cellule tubulari perse. **A-** Immagine dell'*outer stripe* dell'*outer medulla* di un topo Pax2.rTA-TetO.Cre-ROSA26.Rainbow2.1 indotto per 10 giorni, mantenuto in *wash out* una settimana e, quindi, sacrificato. E' visibile un ridotto numero di cellule Pax2<sup>+</sup> raramente sparse lungo il tubulo prossimale. **B-** Immagine dell'*outer stripe* dell'*outer medulla* del modello Pax2-Rain indotto per 10 giorni, mantenuto in *wash out* una settimana e sacrificato a T<sub>30</sub>. E' possibile notare come il numero globale di cellule marcate da Pax2 non sia variato rispetto al controllo sano T<sub>0</sub>. **C-** *Outer stripe* dell'*outer medulla* del rene controlaterale di un topo Pax2.rTA-TetO.Cre-ROSA26.Rainbow2.1 **D-** *Outer stripe* dell'*outer medulla* di un rene ischemizzato nel modello Pax2-Rain. A differenza di quanto osservabile in A, B e C, è possibile notare come il rene sottoposto ad IRI sia andato incontro ad una forte espansione clonale che



ha permesso di ricostituire l'architettura tubulare sia in senso circonferenziale che in senso longitudinale rispetto all'asse del tubulo. **E-Outer stripe** dell'*outer medulla* di un rene ischemizzato nel modello Pax2-Rain. Anche in questo caso è possibile notare come cloni Pax2<sup>+</sup> abbiano contribuito alla sostituzione circonferenziale delle cellule perse, e come tali cellule siano Pax2<sup>+</sup> e AQP1<sup>+</sup> (e' ed e'') evidenziando la loro appartenenza al segmento S3 del tubulo contorto prossimale. **F-** Numero di cellule AQP1<sup>+</sup> del modello Pax2-Rain nel tubulo contorto prossimale, segmento S3, contate per campo da due diversi operatori in animali sani sacrificati a T<sub>0</sub> (219,38± 13,01) e T<sub>30</sub> (247,79±27,07), e in animali sottoposti ad IRI (159,29±14,52) di cui è stato valutato anche il rene controlaterale (212,94±16,54). Analisi statistica eseguita mediante Mann-Whitney Test con \*p<0,05 quando IRI T<sub>30</sub> è stato confrontato con ognuno degli altri gruppi. **G-** Frequenza di induzione (percentuale di cellule Pax2<sup>+</sup> su cellule AQP1<sup>+</sup>) nel modello Pax2-Rain: Sani T<sub>0</sub> 6,03±0,62 %; Sani T<sub>30</sub> 7,93±0,45%; Rene controlaterale T<sub>30</sub> 7,17±1,97%; IRI T<sub>30</sub> 10,72±2,20%). Analisi statistica eseguita mediante Mann-Whitney Test con \*p<0,05 quando IRI T<sub>30</sub> è stato confrontato con ognuno degli altri gruppi. Le cellule Pax2<sup>+</sup> rappresentano una specifica sottopopolazione di cellule epiteliali che, a differenza della maggior parte delle cellule tubulari, possiedono alta capacità clonogenica che si manifesta, in particolar modo, dopo insulto tubulare. **H-** Analisi di frequenza clonale delle cellule Pax2<sup>+</sup>AQP2<sup>-</sup> nei gruppi descritti. Per numeri e SEM vedere Figura Supplementare 1. **I-** La percentuale di cellule clonogeniche Pax2<sup>+</sup>/totale delle cellule Pax2<sup>+</sup> a T<sub>0</sub> e quella di cellule clonogeniche Pax2<sup>+</sup>/totale delle cellule Pax2<sup>+</sup> a T<sub>30</sub> (22,03±3,57 versus 27,36±2,77, \*p<0,05, Mann-Whitney Test) ha permesso di dimostrare che il pool Pax2<sup>+</sup> positivo non solo presenta alta capacità clonogenica, ma possiede anche una maggiore resistenza alla morte rispetto alle cellule Pax8<sup>+</sup>. *Scale bar* 20 µm.

## 4 DISCUSSIONE

---

L'AKI è una sindrome dovuta a molte differenti cause eziologiche. Essa è caratterizzata da un rapido deterioramento della funzionalità renale che determina, in ultima analisi, l'accumulo di scarti metabolici e tossine che possono portare a danno e fallimento di vari organi [151, 152]. La sua incidenza a livello globale fa sì che il suo trattamento rappresenti una spesa considerevole: la sua prevalenza è alta (fino al 22% dei pazienti ospedalizzati) ed il suo *outcome* a breve termine è caratterizzato da una mortalità che si aggira attorno al 25% nei casi di lieve entità, fino al 60% in caso di danno più severo [152, 153]. Nonostante sia potenzialmente letale, l'AKI è considerata generalmente completamente reversibile, come è possibile osservare nella maggior parte dei pazienti con danno di lieve entità, in cui il pieno recupero funzionale avviene frequentemente [154, 155]. Infatti, le attuali conoscenze della fisiopatologia renale suggeriscono che l'AKI sia una malattia potenzialmente reversibile grazie all'elevata capacità rigenerativa delle cellule dell'epitelio tubulare, le cui cellule, teoricamente, sembrano in grado di dividersi per sostituire le cellule adiacenti che sono state perse a causa di un danno. Contrariamente a quanto assunto fino a questo momento, in questo elaborato ho dimostrato che:

**1-** Anche qualora il danno tubulare acuto non porti a significative variazioni della funzionalità renale, misurata in base ai marcatori attualmente disponibili (BUN, creatininemia), si ha comunque una perdita permanente e non recuperabile di massa funzionale renale.

**2-** La capacità rigenerativa della componente epiteliale del tubulo renale è limitata, in quanto solo una piccola percentuale delle cellule epiteliali tubulari sopravvissute al danno si divide in risposta all'AKI.

**3-** Una sottopopolazione dell'epitelio tubulare di topo, la quale può essere identificata grazie all'espressione del fattore trascrizionale Pax2, è dotata di un'elevata resistenza alla morte e di una significativa capacità clonogenica. Questo *pool* cellulare è il principale responsabile degli eventi rigenerativi che si verificano come conseguenza di danno ischemico a carico del tubulo.

Pertanto, al fine di mettere a punto un danno che permettesse di riprodurre una condizione di AKI di media intensità in modelli murini, ho indotto un danno da ATN che colpisse selettivamente il compartimento tubulare mediante Ischemia/Riperfusione unilaterale sinistra di 30 minuti in topi C57BL/6 *wild type* [148]. Lo studio dell'andamento dei parametri ematochimici del modello di danno settato ha evidenziato che la condizione di necrosi tubulare ischemica insorge rapidamente: già a 3 giorni dall'intervento d'Ischemia/Riperfusione la BUN aumentava in maniera statisticamente significativa. Ad un mese dall'IRI non solo la BUN degli animali sacrificati è ulteriormente cresciuta, ma è stato possibile anche dimostrare la sostanziale riduzione di peso e dimensioni del rene ischemizzato quando confrontato con il rene controlaterale, ad ulteriore conferma dell'avvenuto danno. Per di più, la GFR è un indicatore di funzionalità renale tra i più accurati: la sua valutazione mi ha infatti permesso di dimostrare che l'evento ischemico conduce ad una immediata riduzione della GFR già a poche ore dall'*onset* del danno (riduzione del 21,27% a 12 ore, e del 30,23% a 7 giorni). A questo temporaneo decremento segue però una fase di iperfiltrazione transitoria che si manifesta con una ripresa della GFR, la quale, a T<sub>14</sub>, appare ridotta solo dell'11,27% rispetto ai valori basali. Dal quattordicesimo giorno in poi però, la GFR riprende a calare gradualmente e ed in maniera costante, fino ad attestarsi al 69,83% di quella originaria ad un mese dall'induzione del danno

ischemico. Tuttavia l'AKI, classicamente associata ad un rapido recupero dell'integrità morfo-funzionale del compartimento tubulare [1], ha un *outcome* che, nel lungo periodo, porta alla perdita di massa renale funzionale, è plausibile perciò ipotizzare che a questa perdita si associ una disfunzione renale persistente che predispone verso una maggior probabilità di sviluppo di CKD [12-14, 19, 149]. Ciò nonostante, la GFR è recuperata per un breve periodo di tempo dopo l'episodio di ATN, e con essa l'architettura tubulare.

Pertanto, per chiarire meccanismi che regolano e danno luogo al recupero della morfo-funzionalità tubulare in seguito ad AKI di natura ischemica, ho indotto un danno di media intensità in un modello transgenico, denominato Pax8-Rain, in cui tutte le cellule tubulari sono stocasticamente marcate da differenti fluorofori, caratteristica che mi ha permesso di quantificare il numero effettivo di mitosi che si sono verificate a livello tubulare in risposta al danno [87, 110]. Ho quindi ripetuto il danno da Ischemia/Riperfusione monolaterale in questi animali, che hanno sviluppato un'AKI ischemica di lieve entità, e che successivamente sono stati mantenuti in condizioni fisiologiche per un mese. L'analisi dei reni ischemici di questo modello transgenico mi ha permesso di dimostrare che, ad un mese di distanza dall'IRI, le cellule epiteliali tubulari rigenerate rappresentano la progenie clonale del 3,36% delle cellule tubulari Pax8<sup>+</sup> presenti a T<sub>0</sub>, e che il 40,48% delle cellule tubulari perse non è in grado di essere sostituito, suggerendo pertanto che la capacità rigenerativa del tubulo è limitata. Questi dati sono in pieno accordo con quanto dimostrato relativamente all'andamento della GFR in seguito ad induzione di danno tubulare acuto in topi C57BL/6 *wild type*: la GFR, dopo un rapido decremento, va incontro ad una temporanea ripresa con picco a 14 giorni. Tuttavia, nonostante abbia luogo, la ripresa della funzionalità renale è mantenuta solo transitoriamente e, ad un mese di distanza, la GFR risulta stabilmente

ridotta del 30,17%, indicando che la rigenerazione è stata minima, e che non tutte le cellule dell'epitelio tubulare andate perse sono anche state sostituite.

Questi risultati sono in opposizione all'attuale e comune nozione che la capacità di rigenerazione del tubulo sia elevata e che qualunque cellula dell'epitelio tubulare possa dividersi in risposta alla condizione di AKI [97, 121, 123]. Al contrario, i dati ottenuti dal modello Pax2-Rain hanno permesso di osservare che solo una specifica sottopopolazione di cellule epiteliali tubulari hanno effettivamente completato la mitosi, sono andate incontro ad espansione clonale ed hanno sostituito le cellule perse a causa dell'insulto. Lo studio del modello Pax2-Rain mi ha successivamente consentito di dimostrare che tale *pool* cellulare è caratterizzato dall'espressione del fattore trascrizionale Pax2, marcatore già noto in quanto capace di individuare specificamente i progenitori nefronici durante la fase di sviluppo del rene [137]. Recentemente, impiegando lo stesso modello murino, abbiamo dimostrato che le cellule Pax2<sup>+</sup> localizzate nell'epitelio parietale della capsula di Bowman del rene adulto di topo sono dei progenitori che costituiscono una riserva in grado di rimpiazzare eventuali podociti persi [150]. Dal momento in cui era possibile notare che il costrutto Pax2.rtTA marcava anche alcune cellule epiteliali tubulari raramente sparse, ho ipotizzato che lo stesso modello animale impiegato per lo studio della rigenerazione podocitaria potesse essere applicato anche alla comprensione dei meccanismi coinvolti nella rigenerazione tubulare. In questo elaborato ho, per la prima volta, fornito la prova che la popolazione di cellule Pax2<sup>+</sup> localizzata nel tubulo renale adulto rappresenta un *pool* di progenitori adibiti al mantenimento dell'epitelio tubulare. Le cellule Pax2<sup>+</sup> rappresentano, difatti, una ben definita sottopopolazione di cellule dell'epitelio tubulare: sono un *pool fixed* e pre-esistente, e non uno stato funzionale che può potenzialmente essere acquisito da qualunque cellula tubulare.

Infatti, mantenendo un gruppo di animali in *wash out* per 30 giorni successivamente alla finestra di induzione con Doxiciclina, e comparando il numero di cloni Pax2<sup>+</sup> ricavati da questi topi con quelli ottenuti da reni di animali mantenuti in induzione continuata, mi è stato possibile provare che il trattamento ininterrotto con Doxiciclina non determina alcuna significativa variazione nel numero di cellule e cloni Pax2<sup>+</sup> tra i due gruppi. Questo suggerisce che l'espressione Pax2 non sia legata all'acquisizione stocastica dell'espressione di tale marcatore da parte di qualsiasi cellula tubulare, ma che piuttosto sia il risultato di un programma trascrizionale specifico che caratterizza questo sottogruppo di progenitori tubulari. In particolare, ho potuto verificare la presenza di cellule Pax2<sup>+</sup> in ogni segmento del compartimento tubulare del nefrone (segmento S3 del tubulo prossimale, *thick ascending limb* dall'Ansa di Henle, tubulo contorto distale), confermando che questa popolazione di progenitori possiede una distribuzione analoga a quella già riportata per le cellule staminali tubulari di altri animali, come la *Drosophila* [156]. È da notarsi inoltre che un *cluster* di cellule Pax2<sup>+</sup> si localizza anche in prossimità del *connecting segment*, caratteristica che è stata riportata nello *Zebrafish* [130, 157]: ciò suggerisce che i progenitori tubulari rappresentino una sottopopolazione di cellule renali con caratteristiche staminali che si sono conservate durante l'evoluzione delle specie [106]. Nondimeno, va sottolineato che la maggior parte delle cellule Pax2<sup>+</sup> sono localizzate nel segmento S3 del tubulo prossimale (già dimostrato in ratto [81]) e nel *thick ascending limb*, ossia i segmenti tubulari maggiormente colpiti da danno ischemico e tossico [21], suggerendo una loro disposizione strategica in chiave del ruolo critico che rivestono nella risposta al danno. Il modello Pax2-Rain è stato poi successivamente impiegato per studiare la risposta clonale di questa popolazione di progenitori in un contesto di danno ischemico, la causa più frequente di AKI in uomo [6]. Successivamente all'induzione di IRI come

eseguita nei precedenti modelli, i reni degli animali analizzati a 30 giorni dall'*onset* del danno mi hanno permesso di dimostrare che le cellule Pax2<sup>+</sup> sono caratterizzate da una elevata resistenza alla morte, 5 volte maggiore rispetto alla media della popolazione tubulare, motivo per cui questa sottopopolazione di progenitori tubulari è maggiormente in grado di sopravvivere ad un insulto ischemico. Le cellule Pax2<sup>+</sup> hanno inoltre esibito una elevata capacità clonogenica, in quanto il 22,03% delle cellule di questo *pool* sono in grado di rispondere ad un insulto tubulare, generando cloni in grado di contribuire a ricostituire l'architettura tubulare sia in senso circonferenziale che longitudinale rispetto all'asse del tubulo. In particolare, alcuni cloni monocromatici hanno addirittura contribuito alla totale ricostituzione circonferenziale di un intero tubulo nella zona dell'*outer stripe* dell'*outer medulla*.

Quanto dimostrato relativamente alla popolazione Pax2<sup>+</sup> si pone in linea con quanto già riportato da Rinkevich *et al.*, i quali hanno evidenziato la presenza dell'espansione clonale da parte delle cellule epiteliali tubulari in seguito ad IRI, suggerendo la possibile esistenza di una popolazione di progenitori tubulari [110].

Questi dati mettono in discussione le attuali conoscenze relative alla fisiopatologia dell'AKI, classicamente vista come una patologia con che si risolve spontaneamente, in risposta al danno, grazie alla massiva divisione di tutte le cellule epiteliali tubulari. Al contrario, quanto emerge da questo elaborato è che, in modelli murini, anche un lieve danno tubulare può portare ad una perdita permanente di massa funzionale renale; pertanto è essenziale che venga prontamente diagnosticato così da evitare il successivo sviluppo di CKD.

Questi ritrovamenti in topo sono perfettamente in linea con quanto già dimostrato nell'uomo, ove la presenza di una popolazione *scattered* nel tubulo

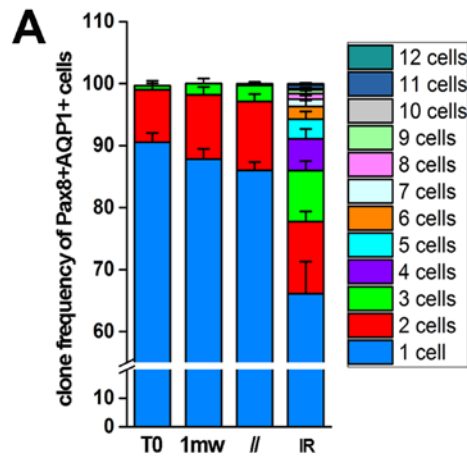
CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>-</sup> è già stata riportata da più studi, che dimostravano la partecipazione di queste cellule agli eventi rigenerativi [43, 71, 80, 103].

In conclusione, grazie ai risultati ottenuti da questo studio è possibile affermare che nel topo, contrariamente a quanto ritenuto fino ad ora, un *subset* di cellule selettivamente individuate dall'espressione di Pax2 si attiva prontamente in risposta al danno, dando luogo ad una amplificazione clonale che permette di rigenerare l'architettura tubulare persa. Al contrario, l'impiego del modello Pax8<sup>+</sup> permette definitivamente di escludere che tutte le cellule dell'epitelio tubulare si dividano massivamente, o vadano incontro a dedifferenziazione al fine di sostituire le cellule adiacenti perse in seguito ad IRI.

Questo studio apre anche alla ricerca di nuove strategie terapeutiche che siano mirate a promuovere la divisione dei progenitori tubulari endogeni, promuovendo pertanto la sostituzione delle cellule perse ed il recupero dell'integrità morfo-funzionale del tessuto tubulare. Sarebbe in questo modo possibile garantire un miglior *outcome* ai soggetti colpiti da AKI riducendo, di conseguenza, il rischio che sviluppino successivamente CKD ed, infine, ESRD.



## 5 MATERIALE SUPPLEMENTARE

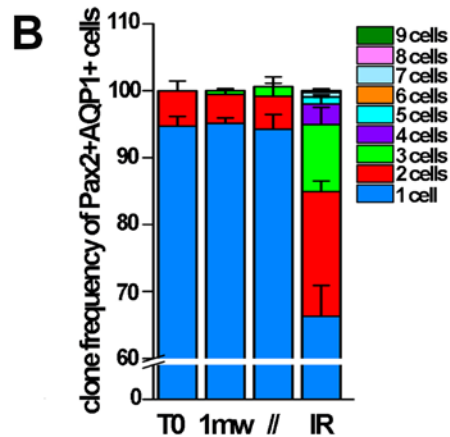


N° di Cloni Pax8

	1	SEM	2	SEM	3	SEM	4	SEM	5	SEM	6	SEM
T0	90,53133	1,47296	8,48167	1,45176	0,66667	0,34873	0	0	0	0	0	0
T30	87,79333	1,69196	10,40667	1,27007	1,79	0,82809	0	0	0	0	0	0
//	86	1,38127	11,11625	1,20016	2,6075	0,56448	0,255	0,18325	0	0	0	0
IR	66,09	5,19899	11,67625	1,60084	8,20625	1,54167	5,13625	1,58101	3,175	1,21094	2,04375	0,94961

	7	SEM	8	SEM	9	SEM	10	SEM	11	SEM	12	SEM
T0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
//	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IR	1,1725	0,59185	0,86375	0,5232	0,6425	0,3636	0,1925	0,12692	0,59	0,31243	0,1725	0,1725



N° di Cloni Pax2

	1	SEM	2	SEM	3	SEM	4	SEM	5	SEM
T0	94,6975	1,46828	5,2725	1,48603	0	0	0	0	0	0
T30	95,12	0,8234	4,3275	0,67249	0,54	0,34127	0	0	0	0
//	93,3	2,30869	5,71833	2,09475	1,45	1,45	0	0	0	0
IR	63,165	3,99209	19,7	1,40306	11,46167	2,53778	3,55833	1,01405	0,99333	0,40834

	6	SEM	7	SEM	8	SEM	9	SEM
T0	0	0	0	0	0	0	0	0
T30	0	0	0	0	0	0	0	0
//	0	0	0	0	0	0	0	0
IR	0,035	0,035	0,785	0,60736	0	0	0,29667	0,29667

**Figura Supplementare 1. Analisi di frequenza clonale nei modelli Pax8-Rain e Pax2-Rain a T<sub>30</sub> dopo induzione di danno da Ischemia/Riperfusione.** **A-** Ingrandimento dell'immagine 10G e relativa media e SEM del numero di cloni contati per gruppo sperimentale nel modello Pax8-Rain. I cloni sono raggruppati in base all'ampiezza clonale, ossia il numero di cellule adiacenti dello stesso colore. **B-** Ingrandimento dell'immagine 13H e relativa media e SEM del numero di cloni contati per gruppo sperimentale nel modello Pax2-Rain. I cloni sono raggruppati in base all'ampiezza clonale, ossia il numero di cellule adiacenti dello stesso colore

## 6 BIBLIOGRAFIA

---

1. Van Biesen, W., R. Vanholder, and N. Lameire, *Defining acute renal failure: RIFLE and beyond*. Clin J Am Soc Nephrol, 2006. **1**(6): p. 1314-9.
2. Uchino, S., et al., *Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study*. JAMA, 2005. **294**(7): p. 813-8.
3. Andreoli, S.P., *Acute renal failure*. Curr Opin Pediatr, 2002. **14**(2): p. 183-8.
4. Mehta, R.L., et al., *Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury*. Crit Care, 2007. **11**(2): p. R31.
5. Mehta, R.L. and G.M. Chertow, *Acute renal failure definitions and classification: time for change?* J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(8): p. 2178-87.
6. Bellomo, R., et al., *Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group*. Crit Care, 2004. **8**(4): p. R204-12.
7. Srisawat, N., E.E. Hoste, and J.A. Kellum, *Modern classification of acute kidney injury*. Blood Purif, 2010. **29**(3): p. 300-7.
8. Faubel, S. and C.L. Edelstein, *Exciting times in research regarding the definition, diagnosis, complications, and outcomes of acute kidney injury*. Adv Chronic Kidney Dis, 2008. **15**(3): p. 211-2.
9. Bagshaw, S.M., et al., *A comparison of the RIFLE and AKIN criteria for acute kidney injury in critically ill patients*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(5): p. 1569-74.
10. Hoste, E.A., et al., *RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis*. Crit Care, 2006. **10**(3): p. R73.
11. Uchino, S., et al., *An assessment of the RIFLE criteria for acute renal failure in hospitalized patients*. Crit Care Med, 2006. **34**(7): p. 1913-7.
12. James, M.T., et al., *Acute kidney injury following coronary angiography is associated with a long-term decline in kidney function*. Kidney Int, 2010. **78**(8): p. 803-9.
13. Coca, S.G., S. Singanamala, and C.R. Parikh, *Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis*. Kidney Int, 2012. **81**(5): p. 442-8.
14. Lo, L.J., et al., *Dialysis-requiring acute renal failure increases the risk of progressive chronic kidney disease*. Kidney Int, 2009. **76**(8): p. 893-9.
15. Ryden, L., et al., *Acute kidney injury after coronary artery bypass grafting and long-term risk of end-stage renal disease*. Circulation, 2014. **130**(23): p. 2005-11.
16. James, M.T., et al., *Associations between acute kidney injury and cardiovascular and renal outcomes after coronary angiography*. Circulation, 2011. **123**(4): p. 409-16.
17. Brady, H., *Insufficienza renale acuta.*, in *Harrison, Principi di Medicina Interna* 2002. p. 1794-1804.
18. Gill, N., J.V. Nally, Jr., and R.A. Fatica, *Renal failure secondary to acute tubular necrosis: epidemiology, diagnosis, and management*. Chest, 2005. **128**(4): p. 2847-63.

19. Lombardi, D., F. Becherucci, and P. Romagnani, *How much can the tubule regenerate and who does it? An open question*. Nephrol Dial Transplant, 2015.
20. Conger, J., *Vascular alterations in the acute renal failure: roles in initiation and maintenance*, in *Acute renal failure, a companion to Brenner and Rector's the kidney*. 2001. p. 13-29.
21. Heyman, S.N., et al., *Proximal tubular injury attenuates outer medullary hypoxic damage: studies in perfused rat kidneys*. Exp Nephrol, 2002. **10**(4): p. 259-66.
22. Dagher, P.C., *Apoptosis in ischemic renal injury: roles of GTP depletion and p53*. Kidney Int, 2004. **66**(2): p. 506-9.
23. Kaushal, G.P., A.G. Basnakian, and S.V. Shah, *Apoptotic pathways in ischemic acute renal failure*. Kidney Int, 2004. **66**(2): p. 500-6.
24. Molitoris, B.A., *Actin cytoskeleton in ischemic acute renal failure*. Kidney Int, 2004. **66**(2): p. 871-83.
25. Gailit, J., et al., *Redistribution and dysfunction of integrins in cultured renal epithelial cells exposed to oxidative stress*. Am J Physiol, 1993. **264**(1 Pt 2): p. F149-57.
26. Schwartz, D., et al., *Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats*. J Clin Invest, 1997. **100**(2): p. 439-48.
27. Nath, K.A. and S.M. Norby, *Reactive oxygen species and acute renal failure*. Am J Med, 2000. **109**(8): p. 665-78.
28. Paller, M.S. and B.E. Hedlund, *Role of iron in postischemic renal injury in the rat*. Kidney Int, 1988. **34**(4): p. 474-80.
29. Ogawa, T. and Y. Mimura, *Antioxidant effect of zinc on acute renal failure induced by ischemia-reperfusion injury in rats*. Am J Nephrol, 1999. **19**(5): p. 609-14.
30. Chatterjee, P.K., et al., *Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat*. Kidney Int, 2000. **58**(2): p. 658-73.
31. Bayati, A., et al., *Prevention of ischaemic acute renal failure with superoxide dismutase and sucrose*. Acta Physiol Scand, 1987. **130**(3): p. 367-72.
32. Bonventre, J.V. and A. Zuk, *Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease?* Kidney Int, 2004. **66**(2): p. 480-5.
33. Holt, S.G. and K.P. Moore, *Pathogenesis and treatment of renal dysfunction in rhabdomyolysis*. Intensive Care Med, 2001. **27**(5): p. 803-11.
34. Prendergast, B.D. and C.F. George, *Drug-induced rhabdomyolysis--mechanisms and management*. Postgrad Med J, 1993. **69**(811): p. 333-6.
35. Lameire, N. and R. Vanholder, *New perspectives for prevention/treatment of acute renal failure*. Curr Opin Anaesthesiol, 2000. **13**(2): p. 105-12.
36. Sheridan, A.M. and J.V. Bonventre, *Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2000. **9**(4): p. 427-34.
37. Devarajan, P., *Cellular and molecular derangements in acute tubular necrosis*. Curr Opin Pediatr, 2005. **17**(2): p. 193-9.
38. Molitoris, B.A., R. Sandoval, and T.A. Sutton, *Endothelial injury and dysfunction in ischemic acute renal failure*. Crit Care Med, 2002. **30**(5 Suppl): p. S235-40.

39. Akimau, P., et al., *New experimental model of crush injury of the hindlimbs in rats*. J Trauma, 2005. **58**(1): p. 51-8.
40. Slater, M.S. and R.J. Mullins, *Rhabdomyolysis and myoglobinuric renal failure in trauma and surgical patients: a review*. J Am Coll Surg, 1998. **186**(6): p. 693-716.
41. Paller, M.S., *Hemoglobin- and myoglobin-induced acute renal failure in rats: role of iron in nephrotoxicity*. Am J Physiol, 1988. **255**(3 Pt 2): p. F539-44.
42. Wangsiripaisan, A., et al., *Role of polymeric Tamm-Horsfall protein in cast formation: oligosaccharide and tubular fluid ions*. Kidney Int, 2001. **59**(3): p. 932-40.
43. Lindgren, D., et al., *Isolation and characterization of progenitor-like cells from human renal proximal tubules*. Am J Pathol, 2011. **178**(2): p. 828-37.
44. Gurtner, G.C., et al., *Wound repair and regeneration*. Nature, 2008. **453**(7193): p. 314-21.
45. Dressler, G.R., *The cellular basis of kidney development*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 509-29.
46. Romagnani, P., *Toward the identification of a "renopoietic system"?* Stem Cells, 2009. **27**(9): p. 2247-53.
47. Little, M.H., *Regrow or repair: potential regenerative therapies for the kidney*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(9): p. 2390-401.
48. Morigi, M., et al., *The regenerative potential of stem cells in acute renal failure*. Cell Transplant, 2006. **15 Suppl 1**: p. S111-7.
49. Blanpain, C., V. Horsley, and E. Fuchs, *Epithelial stem cells: turning over new leaves*. Cell, 2007. **128**(3): p. 445-58.
50. Rios, A.C., et al., *In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland*. Nature, 2014. **506**(7488): p. 322-7.
51. Ousset, M., et al., *Multipotent and unipotent progenitors contribute to prostate postnatal development*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(11): p. 1131-8.
52. Barker, N., et al., *Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(1): p. 25-36.
53. Oliver, J.A., et al., *The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells*. J Clin Invest, 2004. **114**(6): p. 795-804.
54. Dekel, B., et al., *Isolation and characterization of nontubular sca-1+lin- multipotent stem/progenitor cells from adult mouse kidney*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(12): p. 3300-14.
55. Bussolati, B., et al., *Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney*. Am J Pathol, 2005. **166**(2): p. 545-55.
56. Gupta, S., et al., *Isolation and characterization of kidney-derived stem cells*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(11): p. 3028-40.
57. Sagrinati, C., et al., *Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(9): p. 2443-56.
58. Maeshima, A., S. Yamashita, and Y. Nojima, *Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(12): p. 3138-46.
59. Cantley, L.G., *Adult stem cells in the repair of the injured renal tubule*. Nat Clin Pract Nephrol, 2005. **1**(1): p. 22-32.
60. Goodell, M.A., et al., *Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo*. J Exp Med, 1996. **183**(4): p. 1797-806.

61. Challen, G.A., et al., *Kidney side population reveals multilineage potential and renal functional capacity but also cellular heterogeneity*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(7): p. 1896-912.
62. Vogetseder, A., et al., *Tubular cell proliferation in the healthy rat kidney*. Histochem Cell Biol, 2005. **124**(2): p. 97-104.
63. Kiel, M.J., et al., *Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain BrdU*. Nature, 2007. **449**(7159): p. 238-42.
64. Jiang, Y., et al., *Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100** **Suppl 1**: p. 11854-60.
65. Cho, K.J., et al., *Neurons derived from human mesenchymal stem cells show synaptic transmission and can be induced to produce the neurotransmitter substance P by interleukin-1 alpha*. Stem Cells, 2005. **23**(3): p. 383-91.
66. Kelly, G., et al., *The peripolar cell: a distinctive cell type in the mammalian glomerulus. Morphological evidence from a study of sheep*. J Anat, 1990. **168**: p. 217-27.
67. Thumwood, C.M., et al., *Scanning and transmission electron-microscopic study of peripolar cells in the newborn lamb kidney*. Cell Tissue Res, 1993. **274**(3): p. 597-604.
68. Bariety, J., et al., *Parietal podocytes in normal human glomeruli*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(10): p. 2770-80.
69. Ronconi, E., et al., *Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(2): p. 322-32.
70. Kim, D. and G.R. Dressler, *Nephrogenic factors promote differentiation of mouse embryonic stem cells into renal epithelia*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(12): p. 3527-34.
71. Angelotti, M.L., et al., *Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury*. Stem Cells, 2012. **30**(8): p. 1714-25.
72. Nachman, R.L., *Metaplasia of parietal capsular epithelium of renal glomerulus. Report of an autopsied case of carcinoma of the liver*. Arch Pathol, 1962. **73**: p. 48-52.
73. Valdes, A.J. and J.M. Zhang, *Intraglomerular tubular epithelial cells. A marker of glomerular hematuria*. Arch Pathol Lab Med, 1987. **111**(2): p. 189-91.
74. Andrews, P.M., *The presence of proximal tubulelike cells in the kidney parietal epithelium in response to unilateral nephrectomy*. Anat Rec, 1981. **200**(1): p. 61-5.
75. Ito, M., et al., *Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis*. Nat Med, 2005. **11**(12): p. 1351-4.
76. Levy, V., et al., *Distinct stem cell populations regenerate the follicle and interfollicular epidermis*. Dev Cell, 2005. **9**(6): p. 855-61.
77. Duffield, J.S., et al., *Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1743-55.
78. Lin, F., A. Moran, and P. Igarashi, *Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1756-64.

79. Vogetseder, A., et al., *Proximal tubular epithelial cells are generated by division of differentiated cells in the healthy kidney*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(2): p. C807-13.
80. Vogetseder, A., et al., *Proliferation capacity of the renal proximal tubule involves the bulk of differentiated epithelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **294**(1): p. C22-8.
81. Kitamura, S., et al., *Establishment and characterization of renal progenitor like cells from S3 segment of nephron in rat adult kidney*. FASEB J, 2005. **19**(13): p. 1789-97.
82. Maeshima, A., H. Sakurai, and S.K. Nigam, *Adult kidney tubular cell population showing phenotypic plasticity, tubulogenic capacity, and integration capability into developing kidney*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(1): p. 188-98.
83. Chaible, L.M., et al., *Genetically modified animals for use in research and biotechnology*. Genet Mol Res, 2010. **9**(3): p. 1469-82.
84. Lombardi, D. and L. Lasagni, *Transgenic Strategies to Study Podocyte Loss and Regeneration*. Stem Cells Int, 2015. **2015**: p. 678347.
85. Barker, N., et al., *Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5*. Nature, 2007. **449**(7165): p. 1003-7.
86. Rompolas, P., K.R. Mesa, and V. Greco, *Spatial organization within a niche as a determinant of stem-cell fate*. Nature, 2013. **502**(7472): p. 513-8.
87. Romagnani, P., Y. Rinkevich, and B. Dekel, *The use of lineage tracing to study kidney injury and regeneration*. Nat Rev Nephrol, 2015. **11**(7): p. 420-31.
88. Kretzschmar, K. and F.M. Watt, *Lineage tracing*. Cell, 2012. **148**(1-2): p. 33-45.
89. Humphreys, B.D. and D.P. DiRocco, *Lineage-tracing methods and the kidney*. Kidney Int, 2014. **86**(3): p. 481-8.
90. Hoess, R.H., A. Wierzbicki, and K. Abremski, *The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination*. Nucleic Acids Res, 1986. **14**(5): p. 2287-300.
91. Livet, J., et al., *Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system*. Nature, 2007. **450**(7166): p. 56-62.
92. Snippert, H.J., et al., *Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells*. Cell, 2010. **143**(1): p. 134-44.
93. Ritsma, L., et al., *Intestinal crypt homeostasis revealed at single-stem-cell level by in vivo live imaging*. Nature, 2014. **507**(7492): p. 362-5.
94. Basile, D.P., M.D. Anderson, and T.A. Sutton, *Pathophysiology of acute kidney injury*. Compr Physiol, 2012. **2**(2): p. 1303-53.
95. Humphreys, B.D., et al., *Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(3): p. 284-91.
96. Kobayashi, A., et al., *Six2 defines and regulates a multipotent self-renewing nephron progenitor population throughout mammalian kidney development*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(2): p. 169-81.
97. Humphreys, B.D., et al., *Repair of injured proximal tubule does not involve specialized progenitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(22): p. 9226-31.

98. Chutka, D.S., *Cardiovascular effects of the antidepressants: recognition and control*. Geriatrics, 1990. **45**(1): p. 55-9, 62, 67.
99. Lazzeri, E., et al., *Regenerative potential of embryonic renal multipotent progenitors in acute renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(12): p. 3128-38.
100. Sagrinati, C., et al., *Stem-cell approaches for kidney repair: choosing the right cells*. Trends Mol Med, 2008. **14**(7): p. 277-85.
101. Lasagni, L. and P. Romagnani, *Glomerular epithelial stem cells: the good, the bad, and the ugly*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(10): p. 1612-9.
102. Sallustio, F., et al., *TLR2 plays a role in the activation of human resident renal stem/progenitor cells*. FASEB J, 2010. **24**(2): p. 514-25.
103. Smeets, B., et al., *Proximal tubular cells contain a phenotypically distinct, scattered cell population involved in tubular regeneration*. J Pathol, 2013. **229**(5): p. 645-59.
104. Hansson, J., et al., *Evidence for a morphologically distinct and functionally robust cell type in the proximal tubules of human kidney*. Hum Pathol, 2014. **45**(2): p. 382-93.
105. Axelson, H. and M.E. Johansson, *Renal stem cells and their implications for kidney cancer*. Semin Cancer Biol, 2013. **23**(1): p. 56-61.
106. Romagnani, P., L. Lasagni, and G. Remuzzi, *Renal progenitors: an evolutionary conserved strategy for kidney regeneration*. Nat Rev Nephrol, 2013. **9**(3): p. 137-46.
107. Messier, B. and C.P. Leblond, *Cell proliferation and migration as revealed by radioautography after injection of thymidine-H3 into male rats and mice*. Am J Anat, 1960. **106**: p. 247-85.
108. Kramann, R., T. Kusaba, and B.D. Humphreys, *Who regenerates the kidney tubule?* Nephrol Dial Transplant, 2015. **30**(6): p. 903-10.
109. Langworthy, M., et al., *NFATc1 identifies a population of proximal tubule cell progenitors*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(2): p. 311-21.
110. Rinkevich, Y., et al., *In vivo clonal analysis reveals lineage-restricted progenitor characteristics in mammalian kidney development, maintenance, and regeneration*. Cell Rep, 2014. **7**(4): p. 1270-83.
111. Romagnani, P., *Of mice and men: the riddle of tubular regeneration*. J Pathol, 2013. **229**(5): p. 641-4.
112. Bonventre, J.V., *Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14** Suppl 1: p. S55-61.
113. Thomasova, D. and H.J. Anders, *Cell cycle control in the kidney*. Nephrol Dial Transplant, 2015. **30**(10): p. 1622-30.
114. Lasagni, L., et al., *Podocyte mitosis - a catastrophe*. Curr Mol Med, 2013. **13**(1): p. 13-23.
115. Miyaoka, Y., et al., *Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration*. Curr Biol, 2012. **22**(13): p. 1166-75.
116. Nonclercq, D., et al., *Tubular injury and regeneration in the rat kidney following acute exposure to gentamicin: a time-course study*. Ren Fail, 1992. **14**(4): p. 507-21.
117. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. J Cell Physiol, 2000. **182**(3): p. 311-22.
118. Wang, F. and J.M. Higgins, *Histone modifications and mitosis: countermarks, landmarks, and bookmarks*. Trends Cell Biol, 2013. **23**(4): p. 175-84.



119. Nguan, C.Y., et al., *Promotion of cell proliferation by clusterin in the renal tissue repair phase after ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Renal Physiol, 2014. **306**(7): p. F724-33.
120. Ye, Y., et al., *Proliferative capacity of stem/progenitor-like cells in the kidney may associate with the outcome of patients with acute tubular necrosis*. Hum Pathol, 2011. **42**(8): p. 1132-41.
121. Berger, K., et al., *Origin of regenerating tubular cells after acute kidney injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(4): p. 1533-8.
122. Appel, D., et al., *Recruitment of podocytes from glomerular parietal epithelial cells*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(2): p. 333-43.
123. Kusaba, T., et al., *Differentiated kidney epithelial cells repair injured proximal tubule*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(4): p. 1527-32.
124. Mascré, G., et al., *Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 257-62.
125. Pina, C., et al., *Inferring rules of lineage commitment in haematopoiesis*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(3): p. 287-94.
126. Jensen, P., et al., *Redefining the serotonergic system by genetic lineage*. Nat Neurosci, 2008. **11**(4): p. 417-9.
127. Hsu, Y.C., L. Li, and E. Fuchs, *Transit-amplifying cells orchestrate stem cell activity and tissue regeneration*. Cell, 2014. **157**(4): p. 935-49.
128. Kikuchi, K. and K.D. Poss, *Cardiac regenerative capacity and mechanisms*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2012. **28**: p. 719-41.
129. Muller, J.Y., *[Anti PLA or anti HPA-1 platelet allo-immunization]*. Presse Med, 1991. **20**(41): p. 2099-103.
130. Diep, C.Q., et al., *Identification of adult nephron progenitors capable of kidney regeneration in zebrafish*. Nature, 2011. **470**(7332): p. 95-100.
131. Tanaka, M., et al., *Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms*. J Biochem, 2011. **149**(3): p. 231-9.
132. Tanaka, E.M. and P.W. Reddien, *The cellular basis for animal regeneration*. Dev Cell, 2011. **21**(1): p. 172-85.
133. Fujigaki, Y., *Different modes of renal proximal tubule regeneration in health and disease*. World J Nephrol, 2012. **1**(4): p. 92-9.
134. Shmelkov, S.V., et al., *AC133/CD133/Prominin-1*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(4): p. 715-9.
135. Grosse-Gehling, P., et al., *CD133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: limitations, problems and challenges*. J Pathol, 2013. **229**(3): p. 355-78.
136. Barker, N., et al., *Lgr5(+ve) stem/progenitor cells contribute to nephron formation during kidney development*. Cell Rep, 2012. **2**(3): p. 540-52.
137. Dressler, G.R., *Epigenetics, development, and the kidney*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(11): p. 2060-7.
138. Loverre, A., et al., *Increase of proliferating renal progenitor cells in acute tubular necrosis underlying delayed graft function*. Transplantation, 2008. **85**(8): p. 1112-9.
139. Torban, E., et al., *PAX2 suppresses apoptosis in renal collecting duct cells*. Am J Pathol, 2000. **157**(3): p. 833-42.
140. Gnarr, J.R. and G.R. Dressler, *Expression of Pax-2 in human renal cell carcinoma and growth inhibition by antisense oligonucleotides*. Cancer Res, 1995. **55**(18): p. 4092-8.

141. Imgrund, M., et al., *Re-expression of the developmental gene Pax-2 during experimental acute tubular necrosis in mice 1*. *Kidney Int*, 1999. **56**(4): p. 1423-31.
142. Burger, A., et al., *Generation of a novel rtTA transgenic mouse to induce time-controlled, tissue-specific alterations in Pax2-expressing cells*. *Genesis*, 2011. **49**(10): p. 797-802.
143. Traykova-Brauch, M., et al., *An efficient and versatile system for acute and chronic modulation of renal tubular function in transgenic mice*. *Nat Med*, 2008. **14**(9): p. 979-84.
144. Grahammer, F., et al., *mTORC1 maintains renal tubular homeostasis and is essential in response to ischemic stress*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(27): p. E2817-26.
145. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(9): p. e45.
146. Wei, Q. and Z. Dong, *Mouse model of ischemic acute kidney injury: technical notes and tricks*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012. **303**(11): p. F1487-94.
147. Schreiber, A., et al., *Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012. **303**(5): p. F783-8.
148. Bonventre, J.V. and L. Yang, *Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(11): p. 4210-21.
149. Okusa, M.D., et al., *The nexus of acute kidney injury, chronic kidney disease, and World Kidney Day 2009*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009. **4**(3): p. 520-2.
150. Lasagni, L., et al., *Podocyte Regeneration Driven by Renal Progenitors Determines Glomerular Disease Remission and Can Be Pharmacologically Enhanced*. *Stem Cell Reports*, 2015. **5**(2): p. 248-63.
151. Eckardt, K.U., et al., *Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden*. *Lancet*, 2013. **382**(9887): p. 158-69.
152. Bellomo, R., J.A. Kellum, and C. Ronco, *Acute kidney injury*. *Lancet*, 2012. **380**(9843): p. 756-66.
153. Perico, N. and G. Remuzzi, *Acute kidney injury: more awareness needed, globally*. *Lancet*, 2015. **386**(10002): p. 1425-7.
154. Thadhani, R., M. Pascual, and J.V. Bonventre, *Acute renal failure*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(22): p. 1448-60.
155. Zappitelli, M., *Epidemiology and diagnosis of acute kidney injury*. *Semin Nephrol*, 2008. **28**(5): p. 436-46.
156. Singh, S.R., W. Liu, and S.X. Hou, *The adult Drosophila malpighian tubules are maintained by multipotent stem cells*. *Cell Stem Cell*, 2007. **1**(2): p. 191-203.
157. Zeng, X. and S.X. Hou, *Kidney stem cells found in adult zebrafish*. *Cell Stem Cell*, 2011. **8**(3): p. 247-9.