Meccanismi di riparazione del danno renale

P. Menè, R. Polci, F. Festuccia

Cattedra di Nefrologia, Università degli Studi di Roma "La Sapienza", Roma
A nome del Gruppo di Studio di Biologia Cellulare e Molecolare della Società Italiana di Nefrologia

Mechanisms of repair after renal injury

Recovery from kidney injury through repair mechanisms often linked to inflammation is conditioned by nature and severity of the insult. In the assessment of kidney repair, functional recovery should be kept distinct from structural repair: compensatory hypertrophy/function of intact nephrons often masks the inability of the kidney to heal or replace damaged structures. The mechanisms of repair reflect three degrees of injury, differently handled by the kidney. First, repair of DNA damage is accomplished through proofreading DNA polymerases, along with other controls for sequence misalignment / nucleotide replacement. If DNA cannot be repaired, cells carrying mutation(s) are disposed of through apoptosis, which is also critical to clearing damaged kidney cells and infiltrating leukocytes in acute and chronic ischemic, immunological, or chemical damage. A second mechanism of repair is linked to proliferation of surviving cells. At least 5 types of reparative proliferation are known to occur, some of which implicate stem cell immigration from distant reservoirs, followed by in situ differentiation. A third mode of repair could be referred to as structural repair, indeed limited in the human kidney by the absence of postnatal nephrogenesis. Recovery from acute tubular necrosis involves remodelling of the proximal tubule, with a strict requirement for integrity of the basement membrane. Contrary to the current dogma that only acute injury can be repaired, whereas chronic damage leads to irreversible loss of nephrons, evidence is emerging that some degree of renal remodelling occurs even in chronic renal disease, despite the occurrence of stabilized structural changes. (G Ital Nefrol 2003; 20: 229-37)

KEY WORDS: Renal injury, Renal repair, DNA damage, Cell proliferation, Stem cells, Dedifferentiation, Transdifferentiation

PAROLE CHIAVE: Danno renale, Riparazione renale, Danno al DNA, Proliferazione cellulare, Cellule staminali, Dedifferenziazione, Transdifferenziazione

Introduzione

La capacità del rene di riparare un danno funzionale o strutturale è stata a lungo dibattuta da clinici e nefrologi. Il recupero spontaneo è ovviamente condizionato dalla cessazione dell'insulto renale o dal controllo del danno da parte dei meccanismi di difesa dell'ospite. Quest'ultimo è il tipico caso delle infezioni, sia localizzate al rene che sistemiche, che risolvono quando il sistema immunitario riesce ad eliminare o circoscrivere l'agente patogeno responsabile. Il recupero ottenuto mediante un trattamento farmacologico è invece il risultato favorevole di un intervento mirato a contenere il meccanismo di lesione, sostenendo contemporaneamente la funzione renale. La risoluzione del quadro clinico è basata almeno in parte sulla riparazione delle strutture renali coinvolte.

Sfortunatamente, la limitata capacità del rene adulto di rigenerare porzioni del nefrone riduce spesso la possibilità di recupero ad un semplice incremento compensatorio della funzione nei nefroni intatti. Il recupero funzionale deve perciò essere distinto dal recupero strutturale. Peraltro, dal momento che la funzione renale globale è la somma del contributo di un vasto numero di nefroni individuali, il primo problema che si incontra nel quantificare la riparazione del danno renale è l'effettiva entità della riparazione rispetto ad un semplice aumento dell'attività dei nefroni superstiti. La risposta è difficile, poiché la funzione renale è un fenomeno dinamico e le tecniche per valutare la percentuale di nefroni funzionanti e la riserva funzionale sono scarse. Tuttavia i meccanismi compensa-

© Società Italiana di Nefrologia

tori, come l'ipertrofia dei nefroni residui, spesso si sviluppano in un lungo periodo di tempo. Per questo motivo è frequente osservare un lento e graduale miglioramento della funzione renale nell'arco di mesi o anni, o perfino la sospensione della terapia sostitutiva regolare (emodialisi, dialisi peritoneale), in pazienti che avevano riportato un danno renale acuto di notevole entità.

Uno dei "dogmi" della nefrologia clinica è che il danno acuto possa essere riparato, mentre un danno cronico progredisce invariabilmente fino all'insufficienza renale terminale. Esempi di lesioni reversibili acute includono le glomerulonefriti (GNF) post-infettive intra- ed extracapillari (per esempio la GNF post-streptococcica), episodi di ematuria macroscopica nel corso della nefropatia ad IgA, la pielonefrite, l'ostruzione ureterale, il rigetto acuto e soprattutto la necrosi tubulare acuta (NTA). Nel campo delle patologie croniche il tipico decorso progressivo dell'insufficienza renale cronica riflette questa veduta (1, 2). Molti studi clinici pubblicati negli ultimi 15 anni in tema di progressione non-immunologica della malattia renale hanno notevolmente rafforzato questa tesi (3, 4). Tuttavia un certo numero di osservazioni, casi clinici e persino studi clinico-patologici di piccole dimensioni tendono a mettere in discussione questo concetto in varie patologie cronico-degenerative. Un tipico esempio è la nefropatia diabetica, in cui è stato recentemente descritto un miglioramento strutturale collegato al controllo metabolico aggressivo della patologia causale (5).

Questo articolo riassume le attuali conoscenze sui principali meccanismi di riparazione del danno renale, tentando un approccio critico ad alcuni dei più interessanti obiettivi immediati e futuri della nefrologia sperimentale.

Danno renale

1.1 - Alterazioni del DNA

La natura e l'intensità dell'insulto al rene determinano la gravità del successivo danno. Un danno subletale permette una minima riduzione di perdita cellulare, spesso con modeste alterazioni individuabili solo a livello genomico. Errori nella sequenza del DNA si verificano frequentemente durante la replicazione, un punto chiave nella mitosi delle cellule somatiche (6). Benché le cellule renali abbiano un ricambio alquanto lento nella vita adulta, si tratta di una circostanza potenzialmente pericolosa che giustifica la notevole efficienza e molteplicità dei meccanismi di riparazione del DNA. Radiazioni ionizzanti, raggi UV, sostanze chimiche, agenti antimitotici, infezioni virali favoriscono errori replicativi e/o un danno diretto alla sequenza e stabilità del DNA.

Le conseguenze delle alterazioni del DNA sono di due ordini. Primo, a differenza degli errori nell'RNA, che sono autolimitanti e facilmente corretti a livello del "controllo di qualità" post-transcrizionale del gene prodotto, ogni alterazione nella struttura genomica è stabile e viene trasferita alle cellule discendenti (6). Si ritiene ad esempio, che la notevole quantità di DNA non codificante nel genoma degli eucarioti derivi almeno in parte dall'accumulo di errori di duplicazione o di sequenze danneggiate durante l'evoluzione di una determinata specie (6). I "retrotrasposoni" sono larghe sequenze inattive, trasmesse con il genoma durante la replicazione, probabilmente originate da retrotrascrizione di materiale estraneo (forse virale) sfuggito alla "sorveglianza" del DNA (7). Sequenze geniche difettose (mutazioni) sono alla base di varie patologie renali ereditarie che conducono spesso all'insufficienza renale. In base al gene implicato, alcune patologie hanno prevalente espressione a livello renale, come nel caso delle due forme di diabete insipido nefrogenico legato al recettore dell'AVP e all'acquaporina 2, rispettivamente. Altri – la maggior parte – coinvolgendo un aspetto comune a diversi organi, come per esempio la biosintesi delle catene del collagene, hanno manifestazioni dominanti a livello renale, con associate anomalie extrarenali. Questo è il caso della sindrome di Alport, in cui le membrane basali della cute, dell'orecchio interno e della camera anteriore dell'occhio sono alterate in maniera analoga alla membrana basale glomerulare (8). Patologie cistiche, come il rene policistico o la sclerosi tuberosa, tipicamente coinvolgono altri organi come il fegato, il cervello e la cute (9, 10).

Una seconda conseguenza degli errori del DNA è lo sviluppo di tumori, che sono frequenti nel rene adulto e prendono origine soprattutto da cellule della linea epiteliale. In quale misura l'alta concentrazione di agenti chimici, farmaci, tossici, mutageni o stress osmotici determinati dal meccanismo di concentrazione in controcorrente siano responsabili dell'incidenza di queste neoplasie è un quesito ancora irrisolto. Un tipico esempio è l'osservazione di una più alta prevalenza di carcinoma renale a cellule chiare in pazienti trattati con diuretici tiazidici per ipertensione (11). Errori nella programmazione genetica dell'apoptosi – vedi di seguito – potrebbero anche facilitare l'instaurarsi e il diffondersi di cloni cellulari neoplastici, sia permettendo la proliferazione locale, sia riducendo la sorveglianza immunologica su cellule mutate.

1.2 - Apoptosi

Alcune alterazioni del DNA sfuggono ai comuni meccanismi riparativi (vedi oltre). Interviene quindi apoptosi (morte cellulare programmata) attraverso una precisa sequenza che include rottura internucleosomale della doppia elica di DNA da parte di endonucleasi, frammentazione del DNA e degli istoni con formazione di corpi apoptotici, fagocitosi e digestione dei frammenti da parte di macrofagi o cellule limitrofe (12, 13).

Benché l'apoptosi sia un fenomeno comune nella

embriogenesi del rene e in corso di svariate patologie renali, negli ultimi dieci anni il numero di studi su questo argomento è aumentato sensibilmente, facendone una delle principali aree attuali di ricerca nefrologica. Le principali patologie renali sono state studiate con tecniche di ibridazione *in situ* (TUNEL), frammentazione del DNA o approcci genomici nella convinzione che aumento o difetto dell'apoptosi possano essere responsabili di alcuni processi fisiopatologici (12, 13). Ad esempio, alcune nefriti acute proliferative, come le forme post-infettive o lupiche, sono caratterizzate da numerose cellule apoptotiche, sia di origine locale che di derivazione ematogena (14, 15). Si ritiene che la loro eliminazione sia un evento cruciale nella risoluzione del processo, e che difetti dell'apoptosi siano responsabili dell'autoimmunità nel Lupus eritematoso sistemico (15). Meno ovvia è l'implicazione dell'apoptosi nelle patologie croniche glomerulosclerotiche o tubulo-interstiziali, dal momento che cicatrici e fibrosi implicano in molti casi una quota di deplezione cellulare a fianco della deposizione di matrice extracellulare (16, 17). Lo studio dell'apoptosi è difficile, poiché la rimozione cellulare avviene attraverso una sequenza di eventi molto rapida, che richiede da alcuni minuti a poche ore. La probabilità di identificare cellule apoptotiche in una sezione di tessuto di origine animale o umana è per questo motivo piuttosto limitata.

1.3 - Necrosi

La NTA è una tipica situazione in cui il danno cellulare supera il potenziale di rimozione per apoptosi. L'insulto ischemico o chimico porta un notevole numero di cellule a distaccarsi accumulandosi all'interno del lume tubulare, che viene ostruito dai detriti (18, 19). La quantità di materiale da rimuovere sovraccarica i fagociti, con amplificazione del danno per esposizione delle cellule circostanti ad enzimi lisosomiali e metaboliti cellulari tossici proinfiammatori. Infine, la necrosi si propaga alle strutture limitrofe attraverso meccanismi di amplificazione che spesso conducono all'insufficienza renale acuta (18, 19).

Nonostante la severità del quadro, la NTA è spesso autolimitante, purché la causa venga rimossa. Questo significa che anche in presenza di gravi alterazioni strutturali le strutture tubulari epiteliali possono comunque essere rigenerate ricostruendo l'integrità del nefrone. Questo efficace esempio di riparazione renale non ha viceversa un corrispettivo nella capacità di rigenerazione dei capillari glomerulari.

Critica per la risoluzione della NTA è l'integrità della membrana basale tubulare, che serve come guida per la ricostruzione di un epitelio polarizzato, in presenza di un adeguato afflusso ematico nel compartimento tubulointerstiziale. La rarefazione capillare è ritenuta da alcuni Ricercatori indicativa di una successiva evoluzione cronica sclerosante delle lesioni (vedi oltre, 18, 19).

TABELLA I - MECCANISMI DI RIPARAZIONE DEL DNA

- "Proofreading" mediante DNA-polimerasi
- Riparazione di basi non appaiate (mismatch)
- Riparazione per escissione
- Ricombinazione omologa
- Giunzione termino-terminale DNA-duplicato
- Ricombinazione inducibile

Meccanismi di riparazione in cellule renali

1.1 - Riparazione del DNA

Il primo e più avanzato meccanismo di controllo della sequenza del DNA, "proofreading" o "correzione di bozze", è legato all'attività dell'enzima DNA-polimerasi ed è altamente efficiente nel localizzare e fissare gli errori nelle sequenze genomiche (Tab. I). Le DNA-polimerasi sono enzimi ubiquitari che catalizzano la successiva aggiunta di un desossiribonucleotide all'estremità 3'-OH di una catena polinucleotidica (la catena primaria) appaiata ad una seconda, la catena copiata. Possono assemblare fino a cinquanta nucleotidi al secondo, controllando simultaneamente l'accoppiamento delle basi complementari. L'incorporazione di una base errata all'estremità 3'-OH causa una fusione delle estremità della doppia elica. Come risultato la polimerasi si ferma e l'estremità 3' terminale della catena di crescita viene trasferita ad una 3', 5' esonucleasi circa 3 nm più avanti, dove la base non appaiata e probabilmente anche altre basi vengono rimosse. Successivamente, il 3' terminale torna indietro all'interno del sito della polimerasi e l'allungamento ricomincia (20).

La procedura di riparazione di basi non appaiate, che interviene immediatamente dopo la sintesi del DNA, usa la catena parentale come copia per correggere un nucleotide non appaiato incorporato all'interno della catena di nuova sintesi. La riparazione per escissione comporta rimozione di una regione danneggiata attraverso sistemi di endonucleasi specializzate e successiva sintesi di DNA per ricostituire il segmento soppresso. Oltre a varie procedure di ricombinazione (Tab. I), la riparazione delle rotture della doppia elica di DNA negli organismi multicellulari si realizza principalmente attraverso un processo di giunzione termino-terminale del DNA duplicato (6).

1.2 - Riparazione cellulare

La proliferazione cellulare è il primo e più importante meccanismo di ripopolazione di una struttura renale che ha subito lesioni. Come già ricordato, il rene è un organo alquanto statico, con modesto turnover cellulare ad eccezione delle cellule epiteliali (21, 22). Studi con traccianti radioattivi hanno dimostrato che in animali normali e

TABELLA II - MECCANISMI DI RIPARAZIONE CELLULARE RENALE

- Mitosi di cellule limitrofe
- Reclutamento, attivazione e proliferazione di cellule staminali residenti
- Dedifferenziamento di cellule renali intrinseche (es.: cellule epiteliali in fibroblasti)
- Transdifferenziamento (es.: fibroblasti in cellule epiteliali)
- Migrazione di cellule staminali extrarenali

nell'uomo si verifica una trascurabile sintesi di DNA in cellule glomerulari o vascolari, mentre un incremento di portata maggiore si osserva in corso di infiammazione (22). La mitosi di cellule contigue al sito di lesione è il primo e più semplice meccanismo di riparazione cellulare (Tab. II). Il modello di nefrite anti-Thy 1.1 nel ratto è un tipico esempio di questo fenomeno (23). In tale situazione una singola somministrazione di anticorpo è seguita entro poche ore da estesa apoptosi mesangiale (23, 24). Microaneurismi capillari compaiono entro 3-5 giorni, insieme a infiltrazione di cellule mononucleate o macrofagi, mentre la successiva proliferazione di cellule mesangiali fa di questa forma sperimentale un modello adeguato delle nefriti mesangiali proliferative umane (per esempio la nefrite a depositi mesangiali di IgA). La proliferazione è rivelata dalla comparsa di figure mitotiche contemporaneamente ad aumento della cellularità e all'espressione di markers come il *proliferative cell nuclear antigen* (PCNA), il Ki-67 etc. (23, 24). Le cellule mesangiali aumentano progressivamente per alcune settimane, fino a quando si stabilisce un nuovo bilancio della popolazione cellulare, con scomparsa delle cellule infiltranti e ripristino della normale architettura glomerulare in circa 21-28 gg., qualora non vengano somministrate ulteriori dosi di antisiero anti-Thy 1.1. In altri modelli animali di nefriti proliferative e in patologia umana, le semilune cellulari che occupano la capsula di Bowman e altre strutture glomerulari sono estesamente positive per markers immunoistochimici di mitosi (25).

Come illustrato in Tabella II, la proliferazione cellulare attraverso mitosi è solo una delle diverse modalità di riparazione che consentono la sostituzione delle cellule danneggiate o perdute con ricostruzione di una struttura ordinata. Strettamente collegata alla proliferazione è la crescita e differenziazione di cellule staminali residenti, un campo relativamente nuovo di notevole rilevanza in patologie come la NTA. È generalmente riconosciuto che cellule staminali non differenziate risiedano nel monostrato di cellule epiteliali della parete tubulare, particolarmente a livello del tubulo prossimale (26). In circostanze particolari queste cellule possono attivarsi e iniziare un programma di differenziamento che diriga verso un fenotipo epiteliale specializzato. Le relative caratteristiche includono la polarizzazione, ovvero l'esposizione di un "orletto a spazzola" con trasportatori specifici e integrine sul versante apicale/luminale, e la migrazione di altre molecole verso il versante basolaterale, come nel caso della Na+/K+ ATPasi (18, 19).

Un campo molto attivo di ricerca comprende la regolazione del differenziamento delle cellule staminali. Se da un lato non vi è dubbio che qualsiasi tipo di proliferazione cellulare è regolato da molteplici fattori di crescita, e le cellule staminali non fanno eccezione in questo senso, si osserva oggi che fattori di crescita specifici indirizzano verso fenotipi specifici. In altre parole, uno o più fattori di crescita controllano non solo la proliferazione di un clone cellulare, ma anche l'espressione di determinanti di membrana, componenti del citoscheletro, trasportatori etc. Microambienti tissutali diversi indirizzerebbero il fenotipo delle cellule proliferanti *in situ* attraverso la produzione di una "miscela" di fattori di crescita. Oltre alle caratteristiche intrinseche delle cellule, questo concetto si applica anche alla organizzazione strutturale in strati, cordoni, tubuli, vasi di cellule epiteliali ed endoteliali. L' identificazione iniziale di mitogeni "generici" come il *platelet-derived growth factor* (PDGF), l'*epidermal growth factor* (EGF), il *fibroblast growth factor* (FGF) negli anni '80 è stata recentemente seguita dalla caratterizzazione di "nuovi" polipeptidi come l'*hepatocyte growth factor / scatter factor* (HGF-SF) o il *vascular endothelial growth factor* (VEGF). L'interesse che circonda queste molecole è giustificato dalle loro complesse attività biologiche che includono proprietà mitogeniche, "motogeniche" (promozione di migrazione), angiogeniche o morfogeniche. Per esempio, HGF-SF si lega ad uno specifico recettore c-met accoppiato ad una tirosina kinasi che promuove la proliferazione delle cellule-bersaglio a formare una struttura tubulare, molto simile all'organizzazione tridimensionale del nefrone distale (27). Vari studi recenti si sono quindi indirizzati verso il ruolo dell'HGF nella rigenerazione tubulare dopo lesioni ischemiche od ostruttive. Yang e Liu hanno condotto una accurata analisi degli effetti dell'HGF-SF sul recupero dopo ostruzione ureterale unilaterale nel ratto, dimostrando che la somministrazione di HGF esogeno promuove una rigenerazione ordinata dell'epitelio tubulare (28, 29). Questo si verifica non solo attraverso proliferazione delle cellule staminali, ma anche per la capacità di HGF di prevenire la trasformazione delle cellule epiteliali tubulari in direzione fibroblastica/matrigenica (28-30). In effetti, quando la rimozione della legatura ureterale era condotta in assenza di HGF, le cellule epiteliali si modificavano esprimendo un fenotipo meno differenziato, aumentando la sintesi di fibronectina, vimentina ed altre componenti della matrice extracellulare (28-30). Le cellule esprimevano un marker fibroblastico - o mio-fibroblastico - come l'isoforma muscolare liscia α-dell'actina. Questo fenomeno è apparso un chiaro indicatore di fibrosi, che poteva essere prevenuta dalla somministrazione di HGF prima e dopo la rimozione dell'ostru-

zione, risultandone una rapida ed efficiente riparazione strutturale e funzionale. L'espressione della E-caderina confermava la morfologia epiteliale delle cellule trattate con HGF (28, 29). Pertanto, questi ed altri studi documentavano la transizione delle cellule verso differenti fenotipi, con il termine dedifferenziamento ad indicare la perdita di caratteristiche specializzate, mentre transdifferenziamento esprime uno scambio bidirezionale, da fibroblasto a cellula epiteliale e viceversa (Tab. II) (27, 30, 31, 32).

Lo stesso concetto è stato sviluppato in una serie di lavori di Johnson et al, che hanno impiegato VEGF esogeno per contrastare la fibrosi interstiziale in ratti sottoposti a iniezioni di anticorpi monoclonali anti-endoteliali in un modello sperimentale di sindrome emolitico-uremica (33, 34). Questo interessante sistema determina una diffusa rarefazione capillare che riproduce le lesioni vascolari croniche frequentemente osservate nel rene umano. Il fattore di crescita angiogenico antagonizzava efficacemente la rarefazione capillare e la successiva fibrosi tubulointerstiziale, con effetti favorevoli sulla funzione renale e sulla sopravvivenza d'organo. Ulteriori effetti benefici del VEGF sono stati recentemente riportati in uno studio sul recupero funzionale dopo nefrite da antisiero anti-Thy-1.1 nel ratto (35).

Negli ultimi 10 anni notevole interesse si è appuntato su un'altra classe di fattori di crescita con prevalente attività fibrogenica, la "superfamiglia" del *transforming growth factor beta* (TGF-ß). Polipeptidi come il *connective tissue growth factor* (CTGF) e il TGF-ß1 stesso hanno ruoli ben caratterizzati nella fibrosi e nelle alterazioni cicatriziali conseguenti ad una varietà di patologie renali, dalle nefriti sperimentali alla nefropatia diabetica, alla nefrectomia subtotale (36, 37). L'espressione genica di CTGF è aumentata nel rigetto cronico di trapianto, possibilmente in associazione con infezioni da Citomegalovirus (38).

L'inibizione di questi fattori di crescita mediante approcci diversi, comprendenti anticorpi monoclonali bloccanti, ligandi endogeni (decorina) o terapia genica, è stata generalmente efficace nel prevenire la fibrosi e nel rallentare la progressione del danno renale (37). Un polipeptide di recente caratterizzazione, *bone morphogenetic protein* 7 (BMP-7), denominato anche proteina osteogenica-1, ha rivelato interessanti proprietà antifibrotiche antagonizzanti il TGF-ß1 (39). Anche se il BMP-7 appartiene alla superfamiglia del TGF-ß1, si ritiene che contrasti i fattori fibrogenetici correlati attraverso legame con recettori accoppiati a serina-treonina-kinasi che attivano il fattore di trascrizione intracellulare Smad6 (40). Questo non significa che l'antagonismo dei fattori fibrogenetici comporti comunque la riparazione cellulare del danno renale. Piuttosto, il blocco della transizione delle cellule sopravvissute verso un tipo cellulare fibroblastico con eccessiva deposizione di matrice consente ad altri fattori di crescita, come l'HGF, di guidare un processo di ordinata riparazione della perdita di cellule (26, 40). Questo è tipicamente il caso del danno tubulare, in cui l'antagonismo del TGF-ß1 consente un efficiente recupero dalla necrosi epiteliale (27, 28, 29, 41).

Un altro argomento di importanza cruciale nella riparazione cellulare è il reclutamento di cellule staminali circolanti nel rene danneggiato, un meccanismo che solo recentemente ha ricevuto attenzione (Tab. II). Un ingegnoso approccio basato sulla marcatura vitale con un costrutto incorporante il fluoroforo EGFP *(enhanced green fluorescent protein)* di cellule di midollo osseo trapiantate nel ratto, ha consentito a due laboratori indipendenti di seguire *in vivo* i movimenti di cellule staminali trapiantate (42, 43, 44). Questi studi dimostrano in maniera alquanto convincente che cellule midollari fluorescenti migrano e colonizzano il rene, insidiandosi in varie strutture, con una certa prevalenza del mesangio. Esse possono essere quindi isolate e mantenute in coltura, dando luogo a linee stabili di cellule mesangiali esprimenti la EGFP. In effetti, la presenza di cellule "mesangiali" con determinanti di superficie caratteristici di linee di derivazione midollare (antigene comune leucocitario, antigene Ia) è un fenomeno noto fin dai primi anni '80 (21). L'opinione corrente è stata per diverso tempo che cellule mononucleate / monocitoidi migrino in vari organi per differenziare quindi *in situ* in macrofagi, cellule dendritiche presentanti gli antigeni, ecc.

È interessante osservare come nel lavoro di Ito et al la ripopolazione di lesioni mesangiolitiche in ratti sottoposti a trapianto di midollo e quindi ad iniezione di antisiero anti-Thy-1.1 sia almeno in parte legata all'immigrazione di cellule EGFP+. Tali cellule sono stabilmente presenti anche a distanza di mesi, quando non sono più osservabili cellule infiammatorie infiltranti (42, 43). La conclusione di questi studi è stata che un significativo contributo al rimodellamento glomerulare proviene da cellule staminali di origine midollare, che sono quindi indotte a differenziare localmente dal microambiente circostante. Anche se molto attraenti, queste osservazioni non provano che il meccanismo sia operativo nell'uomo e, ancora più specificamente, che cellule altamente differenziate, come i podociti o le cellule endoteliali glomerulari possano essere ricostruite da cellule staminali immigrate.

Un interessante tentativo di definire questo problema nella patologia umana viene dai lavori indipendenti di Grimm et al, e Poulsom et al, che hanno accuratamente esaminato biopsie da reni trapiantati per la espressione del cromosoma Y. Questo tipo di studi è reso complesso dalle piccole dimensioni del marcatore, che occupa una minima sezione del nucleo e richiede l'esame di numerose sezioni sottili seriate. La presenza di cellule positive in riceventi maschi quando l'organo trapiantato proveniva da donne donatrici indicava la colonizzazione del rene da parte di cellule del ricevente (45, 46). In particolare la colonizzazione del cromosoma Y con il marcatore endoteliale glomerulare *Ulex europaeus* appariva indicativa di neoangiogenesi nel rene trapiantato. Anche il marker epiteliale

TABELLA III - ALCUNE CONDIZIONI CLINICHE CON EVIDENZA ISTOLOGICA DI RIPARAZIONE CELLULARE E/O STRUTTURALE RENALE

Glomeruli
Glomerulonefrite proliferativa acuta intra- ed extra-capillare (post-infettiva)
Glomerulonefriti proliferative extracapillari (Lupus nefriti, IgA nefrite/ Schönlein-Henoch)
Glomerulopatia membranosa, stadio IV
Glomerulopatia diabetica (?)
Tubulo-interstizio
Necrosi tubulare acuta
Lesioni vascolari / ischemiche; ipertensione "maligna"
Nefriti interstiziali immunoallergiche
Rigetto acuto di trapianto
Nefropatia a catene leggere (?) Amiloidosi (?)

Elenco di nefropatie in cui il recupero funzionale renale è associato ad evidenza istologica di rimodellamento strutturale. Il simbolo (?) indica condizioni in cui vi sono discordanze nella letteratura o dati non definitivi.

tubulare CAM 5.2 era presente in cellule positive per il cromosoma Y. L'ovvia importanza di queste osservazioni va oltre il tema delle cellule staminali circolanti, per dimostrare che il rene trapiantato diviene nel tempo una "chimera" esprimente due linee cellulari parallele, dotate rispettivamente del genoma del donatore e del ricevente. In aggiunta al turnover cellulare garantito dall'organismo ricevente, è facile immaginare che una maggiore quota di ripopolamento dell'organo da parte dello stesso ricevente garantisca minori probabilità di rigetto. D'altra parte però la sostituzione delle cellule dell'organo da parte di elementi con il genoma del ricevente si potrebbe accompagnare alla riproduzione del difetto genetico che aveva portato alla perdita della funzione renale in patologie ereditarie come la sindrome di Alport o la malattia di Fabry.

In sintesi, appare ragionevole allo stato attuale delle conoscenze ritenere che il rene possa ospitare colonie di cellule immigrate dal midollo osseo, che possono acquisire un fenotipo renale in caso di necessità di riparazione di lesioni e forse anche nel normale turnover cellulare. Cellule scarsamente differenziate come i fibroblasti - e la loro controparte glomerulare, la cellula mesangiale - sono i candidati più verosimili. Rimane da stabilire se una "cellula staminale renale" esista nel midollo osseo o in altri organi di riserva, ovvero se una cellula staminale "generica" divenga commissionata ad un fenotipo renale una volta migrata nell'organo (26, 47, 48).

1.3 - Riparazione strutturale

Il termine riparazione strutturale si riferisce alla capacità di un organo di rimodellare la sua normale architettura dopo un danno strutturale di entità maggiore o dopo ablazione di parenchima. Chiaramente questo non avviene per il rene, che non rigenera dopo ablazione di tessuto a differenza del fegato, della cute o dell'osso (49). Tuttavia, un certo grado di riparazione strutturale può essere osservato in varie situazioni cliniche (1, 2, Tab. III). Per esempio, alterazioni multicellulari parzialmente distruttive sono tipicamente riscontrate in malattie infiammatorie, come la glomerulonefrite acuta post-infettiva, la nefrite proliferativa lupica, episodi macroematurici nella nefrite ad IgA o nella malattia di Schönlein-Henoch (Tab. III). Biopsie ripetute a distanza di alcune settimane e/o dopo terapia con steroidi dimostrano frequentemente ricostituzione della normale citoarchitettura del glomerulo contestualmente alla normalizzazione della funzione renale. Anche le lesioni della membrana basale glomerulare in corso di glomerulopatia membranosa possono andare incontro a una complessiva riorganizzazione nel quadro dello stadio istologico IV. La NTA è stata già discussa precedentemente come seguita da una caratteristica e solitamente efficace fase riparativa. Il danno da ipertensione in forma di arterite "maligna" con ialinosi e slaminamento della parete vascolare può regredire fino ad un reperto istologico pressoché normale in seguito ad un controllo efficace dei valori pressori (Tab. III).

Anche più significativo è il lavoro ormai classico di Fioretto et al., che hanno descritto la regressione del quadro strutturale della glomerulopatia diabetica nodulare dopo trapianto di pancreas (5). Sebbene limitato ad una popolazione molto ristretta di pazienti in cui la malattia causale è stata eradicata mediante il trapianto - e non solo curata sul piano metabolico - e possibilmente complicato dagli effetti della concomitante terapia immunosoppressiva, questo studio convoglia due importanti concetti: primo, le lesioni strutturali diabetiche possono regredire, non solo rimanere "congelate" da un efficace controllo della malattia; secondo, le lesioni sclerosanti possono forse essere rivascolarizzate, rigenerando in qualche modo le funzioni di filtrazione e riassorbimento. Naturalmente lo studio necessita di conferme attraverso altri studi sperimentali ed osservazionali nel diabete e possibilmente in altre patologie sclerosanti in cui sia possibile risolvere definitivamente la patologia causale, come l'amiloidosi, l'ipertensione accelerata o "maligna", le nefropatie da trapianto ecc.

Più in generale, si deve tentare di distinguere una vera riparazione strutturale, che equivale ad un processo di neo-nefrogenesi nell'adulto, da una pseudo-riparazione. Nel secondo caso, le strutture renali residue fungono da guida per la ripopolazione del nefrone attraverso proliferazione cellulare o immigrazione di precursori come discusso nel precedente paragrafo. Ancora una volta la NTA è il paradigma di questa "ricostruzione guidata", che si sviluppa sullo stampo della membrana basale tubulare solo se essa mantiene la sua integrità. La distruzione di questa

struttura comporta una prognosi negativa in ordine al recupero funzionale (18, 19).

Non vi è evidenza di nefrogenesi nella vita adulta e anche immediatamente dopo la nascita nel rene umano. Questo è confermato sul piano molecolare da un recente lavoro di Stuart et al., che hanno applicato la tecnica del *DNA* array ad alta densità nello studio dell'embriogenesi del rene, osservando un rigido profilo temporale della espressione genica renale (50). Uno screening dell'intero genoma renale murino, comprendente circa 8700 geni, ha prodotto un profilo comprendente 5 famiglie maggiori di trascritti nell'arco della gestazione, con una iniziale espressione di geni implicati nella sintesi di DNA, RNA e nella sintesi proteica. Questo è facilmente comprensibile nelle prime settimane della organogenesi renale. I geni del gruppo 2 hanno invece un picco a metà gestazione, con dominanza di elementi morfogenetici e implicati nella sintesi di matrice. Il gruppo 3 si prolunga nel periodo neonatale con prevalenza di retrotrasposoni, mentre i gruppi 4 e 5 comprendono nell'immediato periodo prenatale trasportatori ionici e geni collegati alla difesa immunitaria, alla detossificazione ed allo stress ossidativo (50). Questa sequenza così rigida anche in una specie murina che mantiene una quota di nefrogenesi post-natale indica come nell'uomo i margini di rigenerazione dell'intero nefrone siano estremamente ristretti, con una tendenza alla plasticità (cioè ipertrofia) in luogo di una reale rigenerazione.

Conclusioni

Qualsiasi approccio allo studio dei fenomeni riparativi nel rene deve tenere conto delle numerose evidenze di un ricambio cellulare, finalizzato alla sostituzione di cellule con difetti genomici o al ripristino di strutture danneggiate. D'altra parte è noto da molto tempo come il rene umano non sia capace di nefrogenesi in età post-natale, così che qualsiasi lesione coinvolgente interi nefroni si traduce in una perdita di massa renale funzionante. La persistenza della patologia causale è un altro problema rilevante nel contesto della riparazione renale. In effetti il danno renale cronico riconosce numerose possibili cause, come malfunzioni del sistema immunitario, alterata pressione arteriosa sia a livello sistemico che nel microcircolo renale, deposizione di paraproteine nefrotossiche, infezioni ricorrenti, sovraccarico dei nefroni residui. Se queste condizioni non possono essere corrette, le già limitate capacità di recupero sono facilmente superate da nuove ulteriori lesioni.

Il differenziamento terminale di molte linee cellulari renali indubbiamente contribuisce all'incapacità rigenerativa dei nefroni. Un confronto con il sistema nervoso può aiutare a comprendere meglio questo punto. Anche cellule altamente specializzate e differenziate come i neuroni mostrano un certo grado di plasticità e rigenerazione assonale. Tuttavia, il principale ostacolo alla ricostruzione del tessuto nervoso è rappresentato dalla complessità della rete multicellulare di neuroni, che non possono ripristinare efficacemente la linearità dei fasci assonali e le reciproche interrelazioni, comprese le strutture gliali accessorie. Allo stesso modo, i nefroni sono delle reti multicellulari complesse, con elevato grado di specializzazione nei diversi segmenti. Il diverso fenotipo delle cellule epiteliali che circondano i capillari glomerulari, la capsula di Bowman e il complesso tubulare è un esempio di tale diversificazione funzionale. La ricostruzione *ex novo* della struttura del nefrone costituisce un problema complesso per qualsiasi approccio futuro di ingegneria e terapia genetica. Per esempio, mentre la ricostruzione di una porzione infartuata del ventricolo sinistro è teoricamente realizzabile attraverso l'iniezione intracoronarica di cellule staminali miogeniche, un simile approccio è difficilmente proponibile per il rene. Ancora, mentre il trapianto di midollo osseo è ormai una pratica corrente nel trattamento di varie emopatie, l'approccio più realistico alla terapia genica nel rene è rappresentato dall'espressione transitoria - attualmente solo nell'animale - di geni alterati in alcune malattie metaboliche ereditarie (51, 52).

Nonostante queste limitazioni, l'applicazione già molto ampia delle tecniche di trapianto di rene rappresenta il più semplice e praticabile approccio al problema della ricostruzione di questo organo. Contemporaneamente è prevedibile il prossimo ingresso nella sperimentazione clinica di molecole in grado di promuovere la riparazione cellulare o rallentare la fibrogenesi, come fattori di crescita nell'insufficienza renale acuta o anticorpi monoclonali nelle nefropatie croniche evolutive. Questo passaggio da una semplice terapia conservativa alla promozione di fenomeni riparativi, pur non essendo immediatamente praticabile, è oggi tutt'altro che remoto. La sfida che la Nefrologia sperimentale si troverà ad affrontare nei prossimi anni è rappresentata dalla trasformazione di un notevole bagaglio di acquisizioni sperimentali in strategie terapeutiche rivolte a rendere possibile l'antico sogno di "ricostruire un rene".

Riassunto

Il ripristino di strutture cellulari renali danneggiate è legato ad entità e caratteristiche della lesione iniziale, attraverso meccanismi di riparazione talvolta secondari a processi infiammatori. Nell'esame degli eventi riparativi deve essere distinto un recupero funzionale da vera riparazione strutturale, dato che un incremento compensatorio della funzione dei nefroni residui maschera frequentemente l'incapacità del rene a riparare o rigenerare le strutture danneggiate. I meccanismi riparativi riflettono tre livelli di danno, differentemente gestiti dal rene. Un primo grado di lesione tissutale a livello del DNA viene rettificato da

DNA-polimerasi, associate ad altri meccanismi per la riparazione del disallineamento e/o sostituzione di nucleotidi. Se il DNA non può essere riparato, le cellule alterate vengono eliminate per apoptosi, meccanismo fondamentale anche nella eliminazione delle cellule intrinseche e dei leucociti infiltranti dopo ischemia, ostruzione, danno immunologico, tossico o chimico. Un secondo livello di riparazione è legato a proliferazione delle cellule superstiti. Sono conosciuti almeno cinque tipi di proliferazione riparativa, alcuni dei quali implicano il differenziamento di cellule staminali e forse la loro migrazione da "riserve" distanti. L'ultima fase del processo riparativo implica un ripristino strutturale, molto limitato nel rene umano per l'assenza di nefrogenesi durante la vita adulta. Alcune forme di recupero dopo necrosi tubulare acuta coinvolgono un esteso rimodellamento del tubulo prossimale, in cui è cruciale l'integrità della membrana basale per una efficace riparazione.

Contrariamente all'opinione consolidata che solo una lesione acuta possa essere riparata, poiché il danno cronico porta ad una progressiva perdita di nefroni, dati recenti suggeriscono che un certo grado di rimodellamento renale intervenga anche in corso di nefropatie croniche.

Ringraziamenti

Questo articolo è stato preparato a nome e con l'importante contributo del Gruppo di Studio di Biologia Cellulare e Molecolare della Società Italiana di Nefrologia (Presidente: Dr.ssa Franca Anglani, Università di Padova; Segretario: Prof. Giuseppe Grandaliano, Università di Bari; Comitato Direttivo: Prof. Ciro Esposito, Università di Pavia; Prof. Paolo Menè, Università di Roma; Dr.ssa Elisa Menegatti, Università di Torino).

Finanziato in parte dal MIUR, quota 60%.

Indirizzo degli Autori:
Prof. Paolo Menè
Cattedra di Nefrologia
Dipartimento di Scienze Cliniche
Policlinico Umberto I
Viale del Policlinico, 155
00161 Roma
e-mail: Paolo.Mene@uniroma1.it

Bibliografia

1. Meyer TW, Baboolal K, Brenner BM. Nephron Adaptation to renal injury. In: Brenner and Rector's The Kidney. BM Brenner (ed.); 6th ed, Philadelphia, WB Saunders 2000; 2011-48.
2. Olson JL. Progression of renal disease. In: Heptinstall's Pathology of the Kidney. JC Jennette, JL Olson, MM Schwartz, FG Silva (eds.); 5th ed, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 1998; 137-69.
3. Hebert LA, Wilmer WA, Falkenhain ME, Ladson-Wofford SE, Nahman NS Jr, Rovin BH. Renoprotection: one or many therapies? Kidney Int 2001; 59: 1211-26.
4. Remuzzi G, Ruggenenti P, Perico N. Chronic renal diseases: renoprotective benefits of renin-angiotensin system inhibition. Ann Intern Med 2002; 136: 604-15.
5. Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DER, Goetz FC, Mauer M. Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. N Engl J Med 1998; 339: 69-75.
6. Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. Carcinogenesis 2002; 23: 687-96.
7. Eickbush TH. Repair by retrotransposition. Nat Genet 2002; 31: 126-7.
8. Gubler M-C, Heidet L, Antignac C. Alport's syndrome, thin-basement membrane nephropathy, nail-patella syndrome, and type III collagen glomerulopathy. In: Heptinstall's Pathology of the Kidney. JC Jennette, JL Olson, MM Schwartz, FG Silva (eds.); 5th ed, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 1998; 1207-30.
9. Torres VE, King BF, McKusick MA, Bjornsson J, Zincke H. Update on tuberous sclerosis complex. Contrib Nephrol 2001; 136: 33-49.
10. Qian Q, Harris PC, Torres VE. Treatment prospects for autosomal-dominant polycystic kidney disease. Kidney Int 2001; 59: 2005-22.
11. Godley PA, Taylor M. Renal cell carcinoma. Curr Opin Oncol 2001; 13: 199-203.
12. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. Nature 2000; 407: 784-8.
13. Orlov SN, Tremblay J, Deblois D, Hamet P. Genetics of programmed cell death and proliferation. Semin Nephrol 2002; 22: 161-71.
14. Soto H, Mosquera J, Rodriguez-Iturbe B, Henriquez La Roche C, Pinto A. Apoptosis in proliferative glomerulonephritis: decreased apoptosis expression in lupus nephritis. Nephrol Dial Transplant 1997; 12: 273-80.
15. Tax WJM, Kramers C, van Bruggen MCJ, Berden JHM. Apoptosis, nucleosomes, and nephritis in lupus erythematosus. Kidney Int 1995; 48: 666-73.
16. Yang B, Johnson TS, Thomas GL. Expression of apoptosis-related genes and proteins in experimental chronic renal scarring. J Am Soc Nephrol 2001; 12: 275-88.
17. Ecder T, Melnikov VY, Stanley M, et al. Caspases, Bcl-2 proteins and apoptosis in autosomal-dominant polycystic kidney disease. Kidney Int 2002; 61:1220-30.
18. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. N Engl J Med 1996; 334: 1448-60.
19. Lameire N, Vanholder R. Pathophysiologic features and prevention of human and experimental acute tubular necrosis. J Am Soc Nephrol 2001; 12 (suppl 17): S20-32.
20. Shevelev IV, Hubscher U. The 3' 5' exonucleases. Nat Rev Mol Cell Biol 2002; 3: 364-76.
21. Menè P, Simonson MS, Dunn MJ. Physiology of the mesangial cell. Physiol Rev 1989; 69: 1347-424.
22. Rupprecht HD, Sterzel RB. Glomerular mesangial cells. In: Immunologic Renal Diseases, eds. Neilson EG, Couser WG. Philadelphia, Lippincott-Raven 1997; 595-626.
23. Mosley K, Collar J, Cattell V. Mesangial cell necrosis in Thy 1 glomerulonephritis--an ultrastructural study. Virchows Arch 2000; 436: 567-73.
24. Baker AJ, Mooney A, Hughes J, Lombardi D, Johnson R, Savill

J. Mesangial cell apoptosis: the major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. J Clin Invest 1994; 94: 2105-6.
25. Yang B, Johnson TS, Thomas GL, Watson PF, Wagner B, Nahas AM. Apoptosis and caspase-3 in experimental anti-glomerular basement membrane nephritis. J Am Soc Nephrol 2001; 12: 485-95.
26. Al-Awqati Q, Oliver JA. Stem cells in the kidney. Kidney Int 2002; 6: 387-95.
27. Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. Kidney Int 2001; 59: 2023-38.
28. Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. Am J Pathol 2001; 159: 1465-75.
29. Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. J Am Soc Nephrol 2002; 13: 96-107.
30. Zeisberg M, Strutz F, Muller GA. Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis. J Nephrol 2000; 13 (suppl. 3): S111-20.
31. Okada H, Inoue T, Suzuki H, Strutz F, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transformation of renal tubular epithelial cells *in vitro* and *in vivo*. Nephrol Dial Transplant 2000; 15 (suppl. 6): 44-6.
32. Strutz F, Muller GA. Transdifferentiation comes of age. Nephrol Dial Transplant 2000; 15: 1729-31.
33. Kim Y-G, Suga S-I, Kang D-H, et al. Vascular endothelial growth factor accelerates renal recovery in experimental thrombotic microangiopathy. Kidney Int 2000; 58: 2390-9.
34. Suga S, Kim YG, Joly A, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF121) protects rats from renal infarction in thrombotic microangiopathy. Kidney Int 2001; 60: 1297-308.
35. Masuda Y, Shimizu A, Mori T, et al. Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis. Am J Pathol 2001; 159: 599-608.
36. Yokoi H, Mukoyama M, Sugawara A, et al. Role of connective tissue growth factor in fibronectin expression and tubulointerstitial fibrosis. Am J Physiol Renal Physiol 2002; 282: F933-42.
37. Gaedeke J, Peters H, Noble NA, Border WA. Angiotensin II, TGF-beta and renal fibrosis. Contrib Nephrol 2001; 135: 153-60.
38. Inkinen K, Soots A, Krogerus L, et al. Cytomegalovirus infection enhances connective tissue growth factor mRNA expression in a rat model of chronic renal allograft rejection. Transplant Proc 2001; 33: 379.
39. Morrissey J, Hruska K, Guo G, Wang S, Chen Q, Klahr S. Bone morphogenetic protein-7 improves renal fibrosis and accelerates the return of renal function. J Am Soc Nephrol 2002; 13: S14-21.
40. Gould SE, Day M, Jones SS, Dorai H. BMP-7 regulates chemokine, cytokine, and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells. Kidney Int 2002; 61: 51-60.
41. Dai C, Yang J, Liu Y. Single injection of naked plasmid encoding hepatocyte growth factor prevents cell death and ameliorates acute renal failure in mice. J Am Soc Nephrol 2002; 13: 411-22.
42. Ito T, Suzuki A, Imai E, Okabe M, Hori M. Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodelling. J Am Soc Nephrol 2001; 12: 2625-35.
43. Ito T, Suzuki A, Okabe M, Imai E, Hori M. Application of bone marrow-derived stem cells in experimental nephrology. Exp Nephrol 2001; 9: 444-50.
44. Imasawa T, Utsunomiya Y, Kawamura T, et al. The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells. J Am Soc Nephrol 2001; 12: 1401-9.
45. Grimm PC, Nickerson P, Jeffery J, et al. Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. N Engl J Med 2001; 345: 93-7.
46. Poulsom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, et al. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. J Pathol 2001; 195: 229-35.
47. Sainio K, Raatikainen-Ahokas A. Mesonephric kidney--a stem cell factory? Int J Dev Biol 1999; 43: 435-9.
48. Forbes SJ, Poulsom R, Wright NA. Hepatic and renal differentiation from blood-borne stem cells. Gene Ther 2002; 9: 625-30.
49. Schedl A, Hastie ND. Cross-talk in kidney development. Curr Opin Genet Dev 2000; 10: 543-9.
50. Stuart RO, Bush KT, Nigam SK. Changes in global gene expression patterns during development and maturation of the rat kidney. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 5649-54.
51. Imai E, Isaka Y. Targeting growth factors to the kidney: myth or reality? Curr Opin Nephrol Hypertens 2002; 11: 49-57
52. Tomasoni S, Remuzzi G, Benigni A. Gene therapy to the kidney. Contrib Nephrol 2001; 136: 140-56.

Giunto in Redazione il 12.10.2002
Accettato il 5.2.2003