

## CELLULE PROGENITRICI TUBULARI: NUOVI PROTAGONISTI PER LA RIGENERAZIONE TUBULARE RENALE

**Maria Lucia Angelotti, Elisa Ronconi, Anna Peired, Benedetta Mazzinghi, Elena Lazzeri, Laura Lasagni, Paola Romagnani**

Centro di Eccellenza per il Trasferimento, la Ricerca e l'Alta Formazione DENOthe, Università degli Studi di Firenze, Firenze

Il rene è sempre stato considerato nell'uomo un organo incapace di andare incontro ad un processo rigenerativo, in quanto la formazione di nuovi nefroni si arresta nella 36<sup>a</sup> settimana di gestazione. A differenza del fegato, infatti, il rene non è in grado di riformarsi a seguito di resezione. Tuttavia, dopo un danno tubulare acuto, sia di natura ischemica che tossica, il rene va incontro ad una risposta rigenerativa che nella maggior parte dei casi porta al completo recupero della funzionalità renale e dell'integrità dell'epitelio tubulare. Questo fenomeno non si riscontra in altri organi, come il cuore o il cervello, dove un danno acuto spesso risulta in una perdita permanente di cellule e nello sviluppo di fibrosi. L'origine delle cellule responsabili della risposta rigenerativa tubulare a seguito di un danno acuto è poco conosciuta e finora nei mammiferi è stata tradizionalmente attribuita alle cellule tubulari terminalmente differenziate sopravvissute al danno che, a seguito di un processo di de-differenziazione, riacquisiscono la capacità di proliferare e migrano per rimpiazzare le cellule morte più vicine (1, 2). Vogetseder e colleghi (3, 4) hanno suggerito che la rapida risposta proliferativa dell'epitelio tubulare conseguente ad un danno derivi dalla persistenza delle cellule epiteliali tubulari nella fase G1 del ciclo cellulare da cui, se opportunamente stimolate, possono avviare i processi replicativi ed, in ultima analisi, la riparazione.

Negli ultimi anni, l'identificazione di cellule staminali multipotenti in molti organi solidi, tra cui il cervello, ha rivalutato la possibilità che anche la rigenerazione renale possa attribuirsi ad una popolazione staminale endogena. I primi tentativi di identificare cellule staminali nel rene adulto si sono basati sull'analisi delle proprietà funzionali che caratterizzano le cellule staminali di altri tessuti, come la proliferazione cellulare lenta e continua (che conferisce la caratteristica di "label-retaining cells") (5), la capacità di

estrudere il colorante fluorescente Hoechst ("side population cells") (6), le capacità di crescita e replicazione in condizioni di coltura selettive e l'espressione di marcatori individuati in altri tipi di cellule staminali o nel rene, durante il suo sviluppo embrionale (7). Studi recentemente effettuati sull'uomo hanno condotto all'identificazione di una popolazione di cellule staminali/progenitori selettivamente localizzata al polo urinario della capsula di Bowman (8), caratterizzata dall'espressione dei marcatori CD24 e CD133, e dall'espressione di fattori di trascrizione caratteristici delle cellule staminali multipotenti, quali Oct-4 e Bmi-1. 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 contiguità sia con le strutture tubulari che con i podociti glomerulari (8), suggeriscono che tali cellule rappresentino progenitori comuni che, a partire dalla loro sede strategica, possono raggiungere sia strutture tubulari che glomerulari, sostituendo cellule danneggiate in entrambe queste sedi. In particolare, studi condotti nell'uomo e nel topo (9, 10) hanno dimostrato che queste cellule si distribuiscono lungo la capsula di Bowman secondo una gerarchia fenotipica e funzionale e generano nuovi podociti migrando progressivamente dal polo urinario al polo vascolare, dove avviene la completa differenziazione a podocita. Esse, inoltre, sono capaci *in vivo* di integrarsi in topi affetti da glomerulosclerosi, riducendo la proteinuria e migliorando il danno cronico renale (9). Le stesse cellule CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>, inoltre, isolate dalla capsula di Bowman e iniettate in topi SCID affetti da insufficienza renale acuta, mostrano la capacità di rigenerare le strutture tubulari di differenti porzioni del nefrone e di ridurre il danno renale sia dal punto di vista morfologico che funzionale (8). A supporto di questi dati, nel rene embrionale umano, la coespressione di CD24 e CD133 identifica

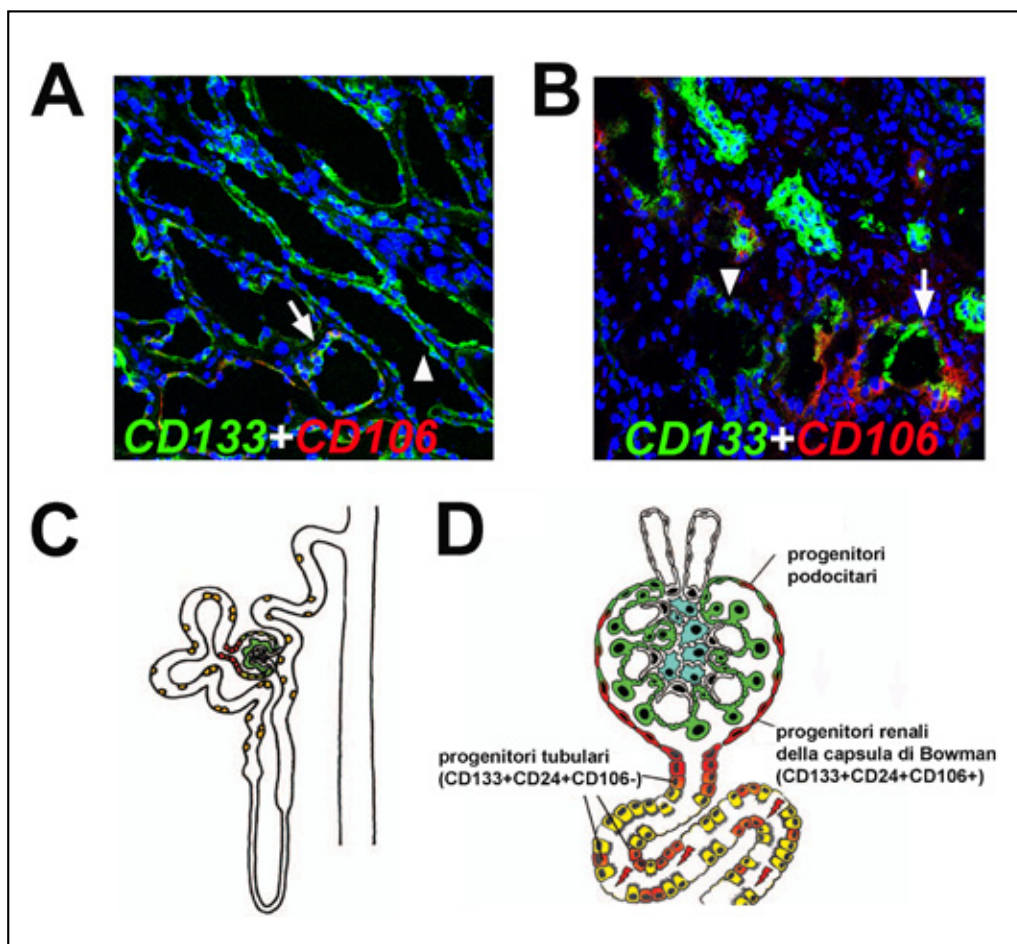
**Fig. 1** - Le cellule  $CD133^+CD24^+CD106^+$  e le cellule  $CD133^+CD24^+CD106^-$  proliferano a seguito di un insulto in biopsie di pazienti affetti da un danno tubulare acuto o cronico.

(A, B) Immagine rappresentativa di una doppia immunofluorescenza per  $CD133$  (verde) e  $CD106$  (rosso) in biopsie di pazienti affetti da necrosi tubulare acuta (A) e sindrome nefrosica (B). Sia le cellule  $CD133^+CD24^+CD106^+$  che le cellule  $CD133^+CD24^+CD106^-$  proliferano e diventano una rilevante componente dell'epitelio renale sopravvissuto.

(C) Schema che illustra la distribuzione lungo il nefrone dei progenitori tubulari (arancio) nei reni umani adulti. Le cellule progenitrici tubulari  $CD133^+CD24^+CD106^-$  si localizzano in specifici segmenti del nefrone: il tubulo prossimale e il tubulo convoluto distale. Non s'individuano invece cellule  $CD133^+CD24^+$  a livello dell'ansa di Henle e del dotto collettore.

(D) Schema che illustra l'ipotetica risposta al danno dei progenitori tubulari. A seguito di un danno renale acuto, le cellule tubulari differenziate (giallo) esposte all'insulto muoiono, mentre i progenitori tubulari (arancio) sparsi lungo il nefrone, sopravvivono in virtù della loro resistenza alla morte, proliferano e differenziano per rimpiazzare le cellule morte.

Modificata da Angelotti et al. *Stem Cells*. 2012; 30(8):1714-25 e pubblicata con il permesso del Publisher Alphamed Press.



un subset di cellule nel mesenchima metanefrico con caratteristiche di *self-renewal* e potenziale multidifferenziativo, che rappresenta un progenitore comune delle cellule tubulari e podocitarie durante lo sviluppo renale (11).

Tuttavia, dal momento che il rene è un organo anatomicamente complesso, costituito da più di 30 tipi cellulari distinti localizzati in compartimenti distinti, si potrebbe ipotizzare che per ogni differente regione del nefrone possa esistere una popolazione staminale con capacità rigenerativa ristretta, o che, comunque, data l'estensione del nefrone debbano esistere più compartimenti staminali. In accordo con questa ipotesi, recentemente, Lindgren e colleghi (12) hanno suggerito l'esistenza, nel rene dell'adulto, di singoli progenitori tubulari raramente distribuiti nel contesto delle cellule cilindriche differenziate dell'epitelio tubulare prossimale. Queste cellule presentavano un'elevata attività dell'aldeide deidrogenasi (ALDH), caratteristica degli elementi staminali/progenitori negli organismi complessi ed erano caratterizzate

dall'espressione dei marcatori di superficie  $CD24$  e  $CD133$ , identificative anche dei progenitori renali presenti nella capsula di Bowman (8, 9, 11), e dall'espressione di citokeratina 7, citokeratina 19, gene antiapoptotico  $BCL2$ ,  $MYOF$ , una molecola promotrice della rigenerazione, e vimentina (12). In aggiunta, in biopsie di pazienti affetti da necrosi tubulare acuta in restituzione, le cellule  $CD133^+vimentina^+$  proliferano, lasciando presupporre che esse rappresentino una popolazione di cellule progenitrici (12).

In accordo con queste osservazioni, Sallustio e colleghi (13) hanno confermato l'esistenza nei reni umani adulti di rare cellule  $CD133^+CD24^+$  sparse lungo l'epitelio tubulare, sia nei segmenti tubulari prossimali che distali, e hanno osservato che tali cellule hanno un profilo di espressione genica non statisticamente diverso da quello delle cellule  $CD133^+CD24^+$  del glomerulo.

Al fine di mettere a punto una caratterizzazione fenotipica e funzionale delle cellule tubulari  $CD133^+CD24^+$  e di verificarne la reale natura di

cellule progenitrici, di recente Angelotti e colleghi (14) hanno individuato un marcatore, VCAM1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*), anche noto come CD106, che consente di distinguere tali cellule da quelle CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> della capsula di Bowman. Le cellule localizzate, infatti, a livello della capsula di Bowman sono CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>+</sup>, mentre le cellule CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> distribuite a livello tubulare sono negative per il marcatore CD106. Le cellule tubulari CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>-</sup>, in accordo con gli studi precedenti, condividono con le cellule progenitrici della capsula di Bowman l'espressione di marcatori unici, quali la citocheratina 7, la citocheratina 19 e la vimentina e si localizzano in specifici segmenti del nefrone: il tubulo prossimale e il tubulo convoluto distale. Non s'individuano, invece, cellule CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> a livello dell'ansa di Henle e del dotto collettore (Fig. 1C). Identici risultati sono stati osservati in frammenti di rene sano ottenuti da pazienti nefrectomizzati e in reni sani ottenuti da donatori cadavere. L'identificazione del CD106 ha consentito, inoltre, di recuperare in maniera separata le 2 popolazioni cellulari e di analizzarne la funzionalità sia *in vitro* che *in vivo*. I progenitori della capsula di Bowman CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>+</sup> (14) mostravano un alto potenziale proliferativo e la capacità di differenziare ed acquisire sia il fenotipo delle cellule podocitarie che quello delle cellule tubulari, mentre le cellule tubulari CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>-</sup> mostravano una capacità proliferativa molto più bassa e un fenotipo già commissionato in senso tubulare. Entrambe le popolazioni però manifestavano una capacità di resistenza agli agenti tossici superiore rispetto alle cellule tubulari renali già differenziate. Inoltre, sia le cellule glomerulari CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>+</sup> che le cellule tubulari CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>-</sup>, se inoculate in topi affetti da danno tubulare acuto, si integravano a livello tubulare e mostravano la capacità di ridurre il danno renale sia da un punto di vista morfologico che funzionale (14). Questo suggerisce che entrambe le popolazioni cellulari possano potenzialmente partecipare alla rigenerazione cellulare nei reni umani adulti. A conferma di questo dato, nei tessuti umani di pazienti con un danno renale acuto o cronico entrambe le popolazioni cellulari proliferano (Fig. 1A e B). Inoltre, i progenitori tubulari CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>-</sup>, che in condizioni normali costituiscono il 2%-6% delle cellule tubulari prossimali (14), aumentano nelle biopsie dei pazienti dove le cellule tubulari terminalmente differenziate vengono danneggiate e muoiono, e diventano la componente predominante dell'epitelio tubulare (Fig. 1C-D).

I risultati, quindi, di questo lavoro (14) suggeriscono che sia le cellule CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>+</sup> che le cellule CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>-</sup> partecipino alla rigenerazione tubulare anche se in maniera diversa. È noto, infatti,

che durante l'accrescimento renale, l'invecchiamento o durante disturbi renali cronici, in associazione a fibrosi interstiziale e atrofia tubulare, a livello della giunzione tubulo-glomerulare aumenta il numero di cellule che manifestano un fenotipo intermedio fra le cellule parietali e le cellule dell'epitelio tubulare prossimale (15-17). Invece, durante un AKI, la riparazione delle cellule epiteliali dipende soprattutto dalla migrazione e proliferazione delle cellule epiteliali tubulari adiacenti (18-20).

L'esistenza dei progenitori tubulari è stata confermata anche nei roditori (21-23), nei quali è stata identificata una popolazione di cellule "label-retaining" distribuita lungo il segmento S3 del tubulo prossimale. Nei reni sani tali cellule esistono come cellule isolate o in piccoli gruppi lungo tutto il tratto S3. A seguito però di un danno da ischemia-riperfusion (21) o di un'insufficienza renale acuta indotta da agenti tossici (23), queste cellule proliferano, esprimono la vimentina e si comportano come cellule progenitrici responsabili della rigenerazione tubulare.

L'esistenza e la localizzazione dei precursori tubulari CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> come cellule sparse fra le cellule tubulari più differenziate ha sollevato la questione su come queste cellule si siano generate. È interessante notare che, durante lo sviluppo del rene la co-espressione di CD133 e CD24 identifica i progenitori renali embrionali in strutture primordiali derivate dal mesenchima condensato, come le vescicole primarie, i "corpi a forma di virgola" (*comma-shaped bodies*) e i "corpi a forma di esse" (*S-shaped bodies*) (11). Tuttavia, durante lo sviluppo del nefrone, la maggior parte dei progenitori CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> rimane localizzata a livello del polo urinario della capsula di Bowman mentre qualche cellula potrebbe rimanere all'interno del nefrone in maturazione, per poi costituire la popolazione dei progenitori CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> sparsi nella porzione tubulare. Questo potrebbe anche spiegare perché le cellule CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>-</sup> sono localizzate selettivamente a livello del tubulo prossimale e distale, che sono generati direttamente dall'allungamento di un *S-shaped body*, ma non a livello dei tubuli collettori, i quali non derivano dal mesenchima metanefrico (11). A conferma di questo dato, quando cloni di cellule CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>+</sup> venivano messi in coltura in REGM+HGF (medium di coltura tubulare) un'importante percentuale di cellule (10%-30%) perdeva il marcatore CD106 (14), suggerendo quindi che le cellule CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>-</sup> possano derivare dalle cellule CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD106<sup>+</sup> e possano rappresentare uno step più commissionato verso la differenziazione tubulare (14).

L'identificazione di un compartimento staminale endogeno a livello tubulare, potrebbe però risultare concettualmente incompatibile con la classica teoria

che attribuisce la rigenerazione renale alla de-differenziazione e proliferazione delle cellule tubulari sopravvissute al danno. In accordo, tuttavia, con quanto osservato a livello di altri organi umani e in altre specie animali (24, 25), la rigenerazione di un tessuto è deputata a diversi meccanismi che, in serie o in parallelo, possono essere attivati a seconda del tipo e della gravità dell'insulto. Inoltre, recenti studi (26) hanno evidenziato la presenza di cellule progenitrici tubulari a livello prossimale anche nei tessuti renali ottenuti dai maiali e dallo chimpanzee, ma non nei tessuti renali murini, suggerendo che la presenza di una popolazione progenitrice tubulare pre-esistente possa essere specie-specifica. Questo concilierebbe i risultati ottenuti nell'uomo (12, 14) con i risultati apparentemente contrastanti ottenuti in precedenti lavori condotti nei topi in cui si attribuisce la rigenerazione tubulare alla de-differenziazione delle cellule tubulari stesse, escludendo così la presenza di una popolazione di cellule staminali adulte (20). Tuttavia, se il mancato rilevamento di cellule progenitrici a livello tubulare nei roditori sia da attribuirsi al fatto che la loro presenza sia specie-specifica o all'espressione di marcatori differenti resta ancora da stabilire. A tal proposito, infatti, Langworthy e colleghi (27), mediante studi di "tagging" genetico, hanno dimostrato l'esistenza di una popolazione di cellule sparse a livello del tubulo prossimale, identificate dal fattore di trascrizione NFATc1 (*Nuclear Factor of Activated*

*T-cells cytoplasmic 1*) che, analogamente a quanto descritto a riguardo dei progenitori tubulari umani, sono altamente resistenti all'apoptosi e, a seguito di un trauma indotto da HgCl<sub>2</sub>, proliferano e ripopolano il tubulo prossimale (27).

L'identificazione dei fattori che regolano la crescita cellulare e le proprietà differenziative dei progenitori tubulari, apre importanti prospettive in termini di medicina rigenerativa e pone le basi per la messa a punto di potenziali agenti terapeutici finalizzati alla promozione delle capacità rigenerative del rene che potrebbero essere utilizzati per prevenire e trattare il danno tubulare.

#### DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

#### Indirizzo degli Autori:

Prof.ssa Paola Romagnani  
 Centro di Eccellenza per il Trasferimento, la Ricerca e l'Alta Formazione DENOthe,  
 Università degli Studi di Firenze  
 Viale Pieraccini 6  
 50139 Firenze  
 e-mail: p.romagnani@dfc.unifi.it

#### BIBLIOGRAFIA

- Lin F, Moran A, Igarashi P. Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney. *J Clin Invest* 2005; 115: 1756-64.
- Bonventre JV. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: S55-61.
- Vogetseder A, Palan T, Bacic D, et al. Proximal tubular epithelial cells are generated by division of differentiated cells in the healthy kidney. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C807-13.
- Vogetseder A, Picard N, Gaspert A, et al. Proliferation capacity of the renal proximal tubule involves the bulk of differentiated epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294: C22-8.
- Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, et al. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest* 2004; 114: 795-804.
- Goodell MA, Brose K, Paradis G, et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996; 183: 1797-806.
- Dekel B, Zangi L, Shezen E, et al. Isolation and characterization of nontubular sca-1+lin- multipotent stem/progenitor cells from adult mouse kidney. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 3300-14.
- Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, et al. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2443-56.
- Ronconi E, Sagrinati C, Angelotti ML, et al. Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 322-32.
- Appel D, Kershaw DB, Smeets B, et al. Recruitment of podocytes from glomerular parietal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 333-43.
- Lazzeri E, Crescioli C, Ronconi E, et al. Regenerative potential of embryonic renal multipotent progenitors in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 3128-38.
- Lindgren D, Boström AK, Nilsson K, et al. Isolation and characterization of progenitor-like cells from human renal proximal tubules. *Am J Pathol* 2011; 178: 828-37.
- Sallustio F, De Benedictis L, Castellano G, et al. TLR2 plays a role in the activation of human resident renal stem/progenitor cells. *FASEB J* 2010; 24: 514-25.
- Angelotti ML, Ronconi E, Ballerini L, et al. Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage

- and their regenerative potential in renal tubular injury. *Stem Cells* 2012; 30: 1714-25.
15. Finckh ES, Joske RA. The occurrence of columnar epithelium in Bowman's capsule. *J Pathol Bacteriol* 1954; 68: 646-8.
  16. Nachman RL. Metaplasia of parietal capsular epithelium of renal glomerulus. Report of an autopsied case of carcinoma of the liver. *Arch Pathol* 1962; 73: 48-52.
  17. Andrews PM. The presence of proximal tubule like cells in the kidney parietal epithelium in response to unilateral nephrectomy. *Anat Rec* 1981; 200: 61-5.
  18. Nony PA, Schnellmann RG. Mechanisms of renal cell repair and regeneration after acute renal failure. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304: 905-12.
  19. Little MH. Tracing the life of the kidney tubule- re-establishing dogma and redirecting the options. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 191-2.
  20. Humphreys BD, Czerniak S, Dirocco DP, et al. Repair of injured proximal tubule does not involve specialized progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 9226-31.
  21. Maeshima A, Yamashita S, Nojima Y. Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration process of the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 3138-46.
  22. Fujigaki Y, Goto T, Sakakima M, et al. Kinetics and characterization of initially regenerating proximal tubules in S3 segment in response to various degrees of acute tubular injury. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 41-50.
  23. Sakakima M, Fujigaki Y, Yamamoto T, et al. A distinct population of tubular cells in the distal S3 segment contributes to S3 segment regeneration in rats following acute renal failure induced by uranyl acetate. *Nephron Exp Nephrol* 2008; 109: e57-70.
  24. Pleniceanu O, Harari-Steinberg O, Dekel B. Concise review: kidney stem/progenitor cells: differentiate, sort out, or reprogram? *Stem Cells* 2010; 28: 1649-60.
  25. Tanaka M, Itoh T, Tanimizu N, et al. Liver stem/progenitor cells: 561 their characteristics and regulatory mechanisms. *Journal of Biochemistry* 2011; 149: 231-9.
  26. Axelson H, Johansson ME. Renal stem cells and their implications for kidney cancer. *Semin Cancer Biol* 2012; in press.
  27. Davenport RJ. NFATc1 identifies a population of proximal tubule cell progenitors. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 311-21.