



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

Scuola di Dottorato di Ricerca in: SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI
Indirizzo: SCIENZE NEFROLOGICHE; Ciclo: XXI

NEFROCALCINOSI E PLACCHE DI RANDALL: UN PROCESSO DI BIOMINERALIZZAZIONE A LIVELLO RENALE?

STUDIO CELLULARE E MOLECOLARE DI UN PROCESSO DI CALCIFICAZIONE SPONTANEA DI CELLULE PAPILLARI *IN VITRO*

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Antonio Tiengo

Supervisore: Dott.ssa Franca Anglani

Tutor: Dott.ssa Monica Ceol

Dottorando: Federica Mezzabotta

INDICE

ABSTRACT (ITALIANO)

ABSTRCT (INGLESE)

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Nefrolitiasi.....	1
1.1.1 La nefrolitiasi calcica.....	2
1.2 Nefrocalcinosi e placche di Randall.....	4
1.3 Rene con midollare a spugna.....	9
1.4 Il transdifferenziamento epitelio-mesenchima.....	11
1.5 Il processo di calcificazione vascolare.....	13
1.5.1 Cellule bersaglio della differenziazione osteoblastica.....	15
1.5.2 I periciti.....	18
1.5.3 Geni e proteine coinvolte nella regolazione dell'osteogenesi.....	22
1.6 La papilla renale come nicchia di cellule staminali.....	27
2. SCOPO	29
3. MATERIALI E METODI	31
3.1 Biologia Cellulare.....	31
3.1.1 Colture cellulari primarie.....	31
3.1.2 Stimolazione osteogenica.....	34
3.2 Biologia Molecolare.....	34

3.2.1	Estrazione dell'RNA.....	34
3.2.2	Quantificazione dell'RNA.....	35
3.2.3	Verifica dell'integrità dell'RNA.....	36
3.2.4	RT (retrotrascrizione).....	37
3.2.5	PCR (reazione a catena della Polimerasi).....	37
3.2.6	RT PCR comparativa.....	39
3.2.7	Real Time PCR.....	40
3.3	Analisi statistica.....	41
3.4	Immunoistochimica.....	41
3.4.1	Tessuto di papilla renale.....	41
3.4.2	Cellule papillari in coltura.....	43
3.5	Scanning Electron Microscope (SEM) e Enviromental Scanning Electron Microscope (ESEM).....	45
3.6	Saggio della fosfatasi alcalina.....	46
3.7	Colorazione con il reagente di Von Kossa.....	47
3.8	Analisi cellulare mediante tecnologia FACS.....	48

4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....51

4.1	Tessuto bioptico di papilla renale.....	52
4.1.1	Presenza di depositi calcifici.....	52
4.2	Comportamento particolare delle cellule in coltura.....	54
4.2.1	Caratterizzazione fenotipica delle cellule.....	56
4.2.2	Queste cellule potrebbero essere cellule staminali della nicchia papillare?.....	59
4.2.3	E se fossero cellule renali adulte andate incontro a EMT?.....	63
4.2.4	E se fossero periciti?.....	64

4.2.5	I noduli calcificano come quelli formati spontaneamente da periciti in coltura.....	64
4.2.6	Studio dei marcatori osteogenici.....	70
4.2.7	Il fenomeno osservato potrebbe dipendere dalla costituzione genica del tessuto di partenza?.....	75
5.	CONCLUSIONI.....	79
6.	ABBREVIAZIONI.....	81
7.	BIBLIOGRAFIA.....	83

ABSTRACT (italiano)

La patogenesi della calcolosi renale ossalico-calcica è oggetto di discussione.

Le placche di Randall originano nella membrana basale dell'ansa di Henle e agiscono come siti di ancoraggio per la formazione di calcoli. La presenza di idrossiapatite (chimicamente simile alla componente minerale dell'osso) in queste strutture potrebbe deporre per un processo di biomineralizzazione attiva.

Studi sulle calcificazioni vascolari hanno dimostrato che cellule di origine mesenchimale (periciti, cellule vascolari calcificanti, cellule vascolari muscolari lisce) possono differenziare in cellule con fenotipo osteoblastico, con conseguente sintesi di proteine tipiche dell'osteoidi (osteopontina, osteocalcina, osteonectina) in un processo di biomineralizzazione simile all'osteogenesi.

Con queste premesse si ipotizza che cellule della papilla possano differenziare verso la linea osteogenica, determinando la sintesi di proteine tipiche dell'osso e mineralizzazione in apatite del tessuto renale. Questo fenomeno potrebbe aver luogo in patologie renali associate a nefrocalcinosi, come il rene con midollare a spugna (MSK).

Recentemente il nostro gruppo di ricerca ha trovato che in alcuni pazienti con nefrolitiasi e MSK bilaterale sono presenti mutazioni del gene GDNF (glial derived neurotrophic factor), che potrebbero essere correlate con la malattia.

Da biopsia chirurgica da polo indenne per carcinoma renale in una paziente con MSK e portatrice di una mutazione in eterozigosi di GDNF sono state allestite colture primarie di cellule papillari renali.

L'analisi della biopsia renale ha evidenziato nefrocalcinosi papillare e una piccola placca di fosfato di calcio.

Abbiamo osservato la crescita spontanea *in vitro* delle cellule fino al passaggio p4, notando nelle cellule la capacità di organizzarsi in noduli, a partire dal

passaggio p2, con una modalità simile a quella descritta per i periciti calcificanti. E' stata condotta un'analisi immunocitochimica (ICH) per tipizzare i vari tipi cellulari con marcatori per cellule endoteliali (von Willebrand), cellule muscolari lisce (α SMA), cellule epiteliali (citocheratina, E-caderina, ZO-1), cellule mesenchimali (vimentina e desmina) e periciti (3G5). L'analisi ha evidenziato eterogeneità cellulare al p1 e, a partire dal p2, la comparsa di un fenotipo mesenchimale.

La presenza di depositi di fosfato di calcio nelle cellule e/o nei noduli è stata rivelata mediante colorazione con il reagente di Von Kossa e analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM); il saggio della fosfatasi alcalina ha evidenziato alcune cellule positive nelle vicinanze dei noduli.

Lo studio ICH dei marcatori osteogenici ha rivelato una positività per osteocalcina e osteonectina e una negatività per osteopontina nelle cellule e nei noduli.

Questi risultati sono stati confermati attraverso studi di RT PCR nei quali i livelli di espressione di osteonectina e di Cbfa1 (fattore trascrizionale regolatore dell'espressione dei geni osteogenici) aumentavano a partire dal p1 fino al p4, in parallelo allo sviluppo dei noduli; al contrario i livelli di osteopontina diminuivano durante gli stessi passaggi.

Lo studio dei livelli di espressione di GDNF nelle cellule MSK ha mostrato una down-regolazione del gene, suggerendo un suo possibile coinvolgimento nel fenomeno osservato.

Sono state allestite come controllo colture primarie di cellule renali papillari provenienti da un soggetto di sesso ed età comparabili, senza MSK né nefrolitiasi. Le cellule al passaggio p3 sono state incubate con glicerolfosfato e dexametazone per la possibile induzione di un fenotipo osteogenico ma non hanno presentato crescita nodulare né spontanea né indotta.

I dati raccolti depongono un processo attivo e spontaneo di calcificazione nelle cellule MSK in coltura, suggerendo che nella papilla renale sono presenti cellule in grado di differenziare verso la linea osteoblastica.

Se questo processo sia dovuto al transdifferenziamento di cellule renali residenti o al differenziamento di progenitori renali verso il lineaggio osteogenico non è ancora noto e dovrà essere approfondito.

La presenza della mutazione di GDNF potrebbe svolgere un ruolo nella differenziazione osteogenica, conferendo alle cellule un'immaturità che potrebbe renderle maggiormente suscettibili ad un possibile fenomeno di transdifferenziamento.

I nostri risultati suggeriscono un nuovo meccanismo patogenetico per la nefrocalcosi in MSK e probabilmente anche in altre nefrolitiasi.

ABSTRACT (inglese)

The pathogenesis of calcium-oxalate (CaOx) renal stones is still debated. Randall's plaque may represent an ideal site on which overgrowths of CaOx or calcium phosphate could grow into stones. The presence of hydroxyapatite (a mineral, chemically similar to the mineral component of bones) in these structures suggests that a process of biomineralization is in progress.

Studies on vascular calcifications demonstrate that cells of mesenchymal origin (pericytes, calcifying vascular cells, vascular smooth muscle cells) may differentiate in osteoblast-like cells determining the synthesis of typical bone osteoid proteins (osteopontin, osteocalcin, osteonectin) in a biomineralization process similar to osteogenesis. Since these premises, we hypothesize that cells located in the papilla may differentiate toward the osteogenic lineage, determining the synthesis of typical bone osteoid proteins and hydroxyapatite mineralization of renal tissue. If this phenomenon indeed happens, it might well occur in renal diseases associated with nephrocalcinosis. Among these, the medullary sponge kidney (MSK) disease is frequently associated with calcium oxalate nephrolithiasis and nephrocalcinosis. Our research group found that GDNF (glial derived neurotrophic factor) mutations could be related to MSK in a subgroup of patients with nephrolithiasis and bilateral MSK.

Papillary primary cells have been obtained from a surgical biopsy of the site remote from cancer in a patient with familiar MSK and with a GDNF heterozygous mutation.

Analysis of the biopsy by Von Kossa staining and ESEM (Environmental Scanning Electron Microscope) analysis evidenced papillary nephrocalcinosis and a small calcium-phosphate plaque.

We observed the spontaneous tendency of cells, starting from p2, to overlap and aggregate to form nodules with a behaviour similar to that described for calcifying pericytes in culture. The cellular phenotyping performed by immunocytochemistry (ICH) with marker for von Willebrand factor, α SMA, cytokeratin, E-caderin, ZO-1, vimentin, desmin and 3G5 (pericyte marker) evidenced heterogeneity at first passages; however starting from p2, cells were mainly positive for mesenchymal markers.

Calcium phosphate deposits were detected by Von Kossa staining, SEM (Scanning Electron Microscope) analysis starting from p3; positive alkaline phosphatase cells were also detected.

By ICH analysis cells and nodules were osteocalcin and osteonectin positive and osteopontin negative. These results were confirmed by the RT PCR studies. Expression levels of Cbfa1 (a transcription factor regulating osteoblast specific genes) and osteonectin increased in cells starting from p1 to p4, paralleling the development of nodules. Instead, the expression levels of osteopontin decreased during the same passages.

Primary cultures of renal papillary cells from a patient matched for age and gender but without MSK or nephrolithiasis, were used as control. Cells were incubated with glycerophosphate and dexametazone to induce an osteogenic phenotype, but not spontaneous neither induced nodular growth was observed.

The study of GDNF expression revealed that this gene was down-regulated in MSK cells, suggesting its involvement in the observed phenomenon.

Our data indicate that a spontaneous process of calcification was active in MSK cells, suggesting that in the renal papilla may be present cells that can undergo osteogenic differentiation.

Whether this process was related to the transdifferentiation of resident renal cells or to the osteogenic differentiation of renal progenitors has to be clarified.

The presence of GDNF mutation may have a role in the osteogenic differentiation, conferring some degree of immaturity to papillary cells, thereby predisposing them to transdifferentiation.

Our results suggest a new pathogenetic mechanism for nephrocalcinosis in MSK and possibly in other nephrolithiasis.

INTRODUZIONE

1.1 Nefrolitiasi

La nefrolitiasi è una patologia molto frequente che tipicamente insorge tra i 30 e i 60 anni. Dieci persone adulte su 100 almeno una volta nella vita riferiscono un episodio di calcolosi renale, causata dalla deposizione di calcoli nelle vie urinarie.

Il calcolo urinario è un aggregato solido di varia forma e struttura che si deposita all'interno del rene o delle vie urinarie. Fino ad oggi si è ritenuto che la sua formazione sia dovuta alla rottura di un delicato equilibrio, mantenuto dalla funzione renale, in cui una serie di complessi fenomeni fisico/chimici determinano il passaggio di alcuni composti dell'urina da una fase di soluzione liquida ad una fase solida cristallina.

Lo sviluppo di calcoli di natura idiopatica ha nella maggior parte dei casi un'eziologia multifattoriale, che interessa fattori genetici così come ambientali (per esempio, la dieta) (Scheinman, 1999; Goldfarb et al, 2005) ma sono conosciute anche forme ereditarie di calcolosi, legate a cause genetiche, tra cui l'iperossaluria primitiva, la cistinuria, la litiasi da 2,8-diidrossiadenina e la malattia di Dent.

Condizione essenziale per la formazione dei calcoli è la sovrasaturazione di un soluto presente nell'urina (calcio, ossalato, fosforo, acido urico, cistina); questo meccanismo patogenetico è responsabile del passaggio di alcuni composti urinari dalla fase di soluzione alla fase solida cristallina (Worcester and Coe, 2008). Con sovrasaturazione si indica che a livello delle vie urinarie un determinato sale litogeno presenta una concentrazione superiore a quella di solubilità, al di sotto della quale i suoi ioni costituenti sono disciolti in soluzione e non possono quindi precipitare a formare cristalli.

Per prevenire la formazione di precipitati nei siti di massima saturazione dell'urina (ansa di Henle, papilla renale, regione midollare dei dotti collettori) esistono nel rene meccanismi intrinseci che normalmente proteggono l'organismo dalle formazione di cristalli, i quali aggregandosi fra loro danno origine al calcolo. I calcoli possono essere associati all'iper calciuria la quale può contribuire alla formazione degli stessi sia mediante l'aumento della saturazione del calcio-ossalato e del calcio-fosfato, sia riducendo i processi che antagonizzano la formazione di aggregati cristallini (Sayer et al, 2004).

Le complicanze più rilevanti della nefrolitiasi sono la dilatazione dei dotti escretori del rene per ostacolo al deflusso dell'urina dovuto ai calcoli (idronefrosi) e le infezioni delle vie urinarie.

1.1.1 La nefrolitiasi calcica

La forma calcica è la più comune nei paesi occidentali, rappresentando fino al 70-80% dei casi. Di questi i 2/3 circa si caratterizzano per la produzione di calcoli di ossalato di calcio, il 10% per quella di calcoli di fosfato di calcio (idrossiapatite e brucite - fosfato monoidrogeno calcico) ed il rimanente 20-30% per la produzione di calcoli misti di fosfato e ossalato. Con una frequenza del 10% si trovano calcoli di struvite (fosfato idrato di ammonio e magnesio) e piuttosto rari sono i calcoli formati da cristalli di acido urico (9%) e di cistina (1%) (Coe et al, 2005).

La nefrolitiasi non sempre provoca disturbi o sintomi, ad eccezione di un'ematuria; può tuttavia manifestarsi con dolorose coliche renali dovute al passaggio del calcolo dalla pelvi renale all'uretere.

Il primo passo per poter meglio impostare una terapia idonea è rappresentato dallo studio della composizione del calcolo espulso spontaneamente oppure rimosso

con procedure urologiche, studio effettuato mediante metodo chimico o, se possibile, spettrofotometrico. Qualora invece il calcolo sia ritenuto nelle vie urinarie, informazioni indirette, circa la sua composizione, possono essere ottenute grazie all'impiego della radiografia diretta dell'addome, eventualmente associata ad uno studio stratigrafico delle ombre renali: queste metodiche permetteranno di distinguere calcoli intensamente radiopachi, quelli cioè dotati di elevato contenuto calcico (calcio ossalato, calcio fosfato e calcoli misti), debolmente radiopachi (struvite, cistina) e radiotrasparenti (acido urico).

La modalità appropriata di approccio al calcolo dipende dalla dimensione, dalla localizzazione e dalla tipologia.

Calcoli di dimensioni inferiori a 5mm di solito sono in grado di passare spontaneamente lungo le vie escrettrici, mentre calcoli di dimensioni maggiori richiedono un intervento di tipo urologico per la loro rimozione (Coe et al, 2005; Worcester and Coe, 2008).

L'attenzione terapeutica è sempre stata rivolta per lo più alla cura dei calcoli già formati e non tanto alla loro prevenzione. Purtroppo non è sempre possibile affidarsi alla cura dei calcoli renali con la sola terapia medica, la maggior parte dei calcoli renali, infatti, per lo loro consistenza non sono aggredibili da alcuna sostanza assumibile, per bocca o somministrata per altra via. La maggior parte delle terapie urologiche sono invasive e prevedono manovre intra ed extracorporee.

Una tecnica frequentemente utilizzata, per calcoli di piccole dimensioni, è un trattamento extracorporeo ad onde d'urto che utilizza onde sonore per rompere il calcolo in piccoli frammenti che possono più facilmente passare nella vescica e venire così eliminati. Calcoli di cistina e di fosfato risultano, tuttavia, resistenti alla frammentazione (Coe et al, 2005; Worcester and Coe, 2008).

Queste metodiche non possono ridurre l'incidenza della nefrolitiasi, né tanto meno evitare l'insorgenza di nuove recidive. Al contrario, il trattamento con

Litotrissia Extracorporea (ESWL) può in alcuni casi rappresentare la causa scatenante di nuovi episodi colici, per la persistenza nelle vie urinarie di frammenti derivati dalla disintegrazione del calcolo originario (Fine et al, 1995); questi frammenti, soprattutto se posizionati al polo renale inferiore, non verrebbero espulsi e quindi si accrescerebbero progressivamente fino a raggiungere dimensioni sufficientemente grandi da poter indurre la comparsa della sintomatologia.

Appare chiaro, quindi, che la ESWL e le altre metodiche urologiche di rimozione dei calcoli non possono rappresentare l'approccio terapeutico ideale a questa patologia. E' pertanto sempre più importante la prevenzione medica, da attuare tramite l'impiego di terapie specifiche dirette a correggere i fattori eziopatogenetici alla base della produzione dei calcoli.

1.2 Nefrocalinosi e Placche di Randall

La nefrocalinosi è una forma di nefrolitiasi calcica conseguente alla formazione e deposizione di sali di calcio nel tessuto renale (Sayer et al, 2004).

Questo aumento può essere rilevato a diversi livelli: funzionale, microscopico/istologico e macroscopico.

La nefrocalinosi e la nefrolitiasi sono due patologie differenti ma intimamente correlate tra di loro. La nefrocalinosi non conduce necessariamente alla formazione di calcoli, così come i calcoli possono svilupparsi in apparente assenza di nefrocalinosi.

La maggior parte della nefrocalinosi documentata (98%), associata comunemente ad una condizione di ipercalcemia o ipercalciuria, è di tipo midollare con accumuli di materiale cristallino all'apice di ciascuna piramide

renale e può coinvolgere le cellule tubulari, l'interstizio o il lume tubulare (Sayer et al, 2004).

Una forma molto particolare di nefrocalcosi, recentemente rivisitata, è la placca di Randall.

Nella prima metà del '900 Alexander Randall descrisse pazienti calcolotici con depositi di apatite, nominati successivamente placche di Randall, che ritenne rappresentassero il sito di formazione di calcoli di calcio ossalato (Randall, 1937; Randall, 1940).

Inizialmente l'ipotesi di Randall non venne valorizzata e per lunghi anni non venne seriamente considerata come passaggio importante per una maggiore comprensione dei meccanismi patogenetici e di formazione dei calcoli renali. Fino al momento della "riscoperta" delle placche di Randall esistevano diverse teorie e ipotesi per spiegare il fenomeno della calcolosi (Gambaro et al, 2004):

1. l'ipotesi di un puro squilibrio fisico-chimico pre-urinario in qualche tratto del nefrone tale da spiegare la cristallizzazione;
2. la teoria della particella fissa, cioè l'adesione di cristalli di ossalato di calcio all'epitelio tubulare tale da giustificare come i cristalli possono crescere abbastanza da rimanere intrappolati nel lume tubulare, permettendo così l'evoluzione verso un vero calcolo;
3. il ruolo di anomalie delle cellule del tubulo renale nel determinare il bilancio fisico-chimico della pre-urina e/o l'adesione ad essa dei cristalli;
4. la scoperta di diversi inibitori dell'aggregazione e della crescita dei cristalli, tra i quali macromolecole come la nefrocalcina e l'osteopontina.

E' stato tuttavia grazie a studi condotti da Evan e colleghi che le teorie proposte da Randall sono tornate alla ribalta e le placche di Randall hanno cominciato a rivestire un ruolo importante nella comprensione della patogenesi della calcolosi renale.

Evan ha dimostrato che le placche di Randall originano nella membrana basale del tratto sottile dell'ansa di Henle e possono espandersi attraverso l'interstizio fino a sotto l'urotelio papillare (Evan et al, 2003; Evan et al, 2005) (**figura 1**) dove agiscono come sito di ancoraggio per la formazione dei calcoli e per la loro crescita nello spazio urinario. La membrana basale del tratto sottile dell'ansa di Henle offre infatti siti ionici per il legame del calcio, favorendo la formazione e la crescita dei cristalli (Sayer et al, 2004).

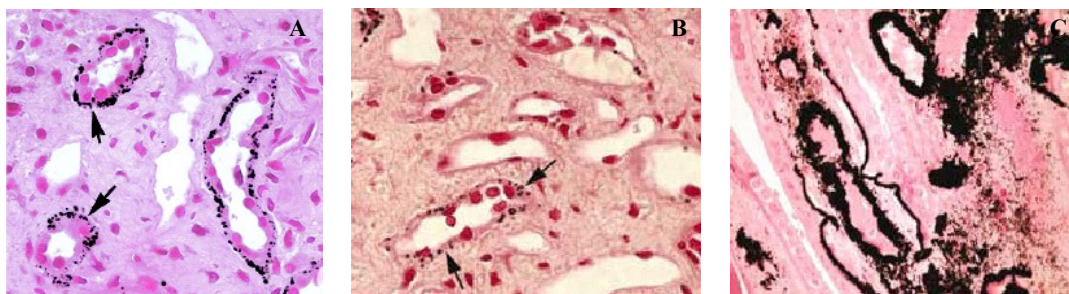


Figura 1. Deposizioni di calcio sulla membrana basale dell'ansa di Henle. Immagine tratta da Evan et al (2003) *J Clin Invest* **111**: 607-616 (A). Sito iniziale di deposito di calcio (B) che può estendersi nell'interstizio (C). Immagine tratta da Evan et al (2006) *Kidney Int* **69**: 1313-1318.

Il ruolo della placca di Randall nella patogenesi della calcolosi sembra tipico dei pazienti con calcolosi idiopatica. E' stato dimostrato che il 100% dei pazienti con calcolosi ossalico calcica ha placche di Randall. Le dimensioni sono direttamente correlate all'iper calciuria e al numero degli stones events e inversamente proporzionale al volume delle urine; questo mette in luce che le stesse forze che dirigono la formazione dei calcoli dirigono anche la formazione della placca (Evan et al, 2003). In pazienti invece con calcolosi secondaria, per esempio, a bypass ileo digiunale non è stata riscontrata la presenza di placche di Randall bensì la formazione di noduli nella parte terminale del dotto di Bellini, dove si depositano macroaggregati di calcio-ossalato (Evan et al, 2003) (**figura 2**).

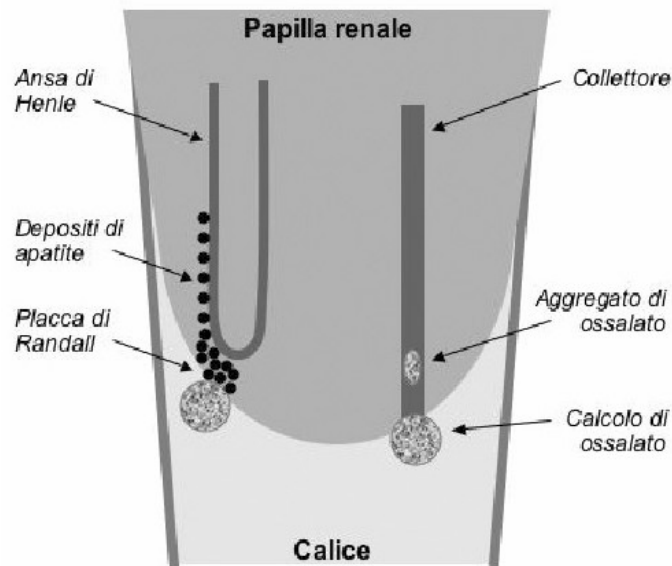


Figura 2. Origine della placca di Randall in un soggetto con calcolosi ossalico calcica idiopatica (a sinistra) e di un calcolo in un soggetto portatore di bypass ileo digiunale (a destra). Immagine tratta da Vezzoli et al (2005) *Giornale di Tecniche Nefrologiche e Dialitiche*, anno XVII 4: 39-41.

Gli studi svolti da Evan hanno approfondito la composizione e la struttura delle placche di Randall che vanno da depositi di calcio fosfato a livello della membrana basale del tratto sottile dell'ansa di Henle a vere e proprie placche di apatite che si estendono fino all'interstizio papillare. I depositi di materiale cristallino sono dell'ordine di 50 nm e crescono come sfere costituite da più anelli di materiale elettrodensso, posti uno sopra l'altro (**figura 3**) (Matlaga et al, 2007).

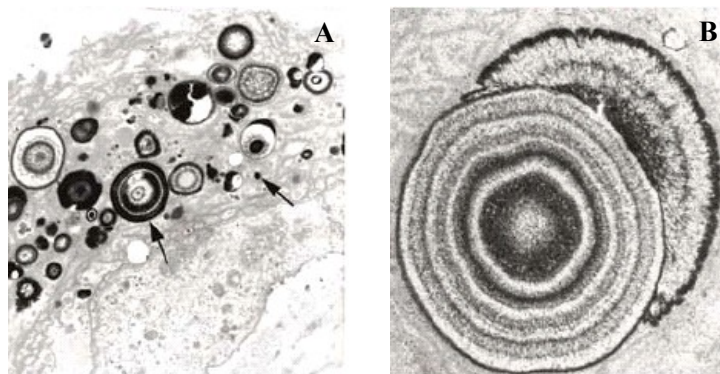


Figura 3. Materiale cristallino nella membrana basale dell'ansa di HenleImmagine tratta da Evan et al (2006) *Kidney Int* **69**: 1313-1318.

Studi hanno identificato la presenza dell'Osteopontina dentro i singoli cristalli nell'interfaccia materiale cristallino-layer organico (Evan et al, 2005; Matlaga et al, 2007). Questa molecola ha un'alta affinità per la superficie dei cristalli di calcio e si pensa sia coinvolta nella biologia delle placche (**figura 4**). Se da una parte è un potente inibitore della crescita e formazione di cristalli, dall'altra sembra avere un ruolo nell'adesione del cristallo alla cellula tubulare epiteliale (Kleinman et al, 2004). Recenti studi in reni di topo propongono, inoltre, un suo ruolo nella conversione dei cristalli di calcio ossalato in calcoli (Okada et al, 2008).

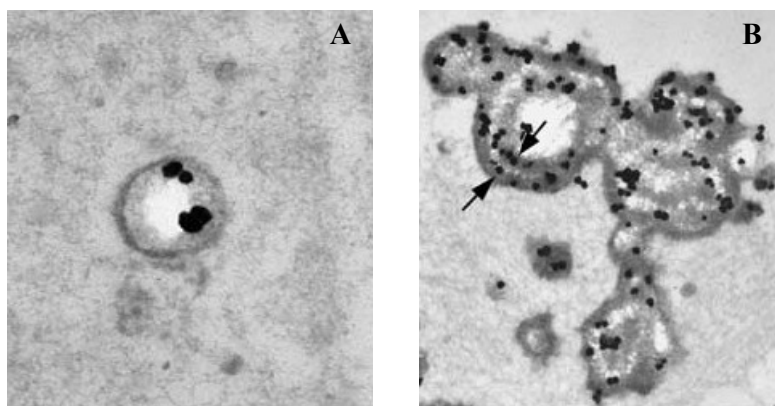


Figura 4. Localizzazione dell'osteopontina nei singoli cristalli trovati nella membrana basale dell'ansa di Henle (A) e nelle placche interstiziali (B), visualizzata mediante microscopia elettronica. Immagine tratta da Evan et al (2005) *Kidney Int* **68(1)**: 145-154.

La componente cristallina della placca, costituita da calcio fosfato sotto forma di apatite, è simile a quella che si trova nell'osso (Coe et al, 2005; Evan et al, 2006). Questa evidenza depone per un processo di biomineralizzazione attiva alla base dell'origine della placca di Randall che potrebbe coinvolgere fattori osteogenici analoghi a quelli coinvolti durante il processo di formazione dell'osso.

Non si è ancora riusciti a sistemare in un unico mosaico patogenetico i diversi tasselli di conoscenza. Non è noto il destino del cristallo fissato intraluminalmente, non è nota la relazione, ammesso che ce ne sia una, che ha il cristallo di ossalato di calcio che abbia aderito all'epitelio tubulare, intraluminalmente, con la placca di Randall (l'ipotesi che esso venga incorporato nella placca sembra improbabile in considerazione della composizione in apatite della placca stessa).

Inoltre non si è ancora in grado di combinare lo squilibrio chimico-fisico intraluminalmente e la teoria della particella fissa con l'evidenza indiretta che i calcoli di ossalato di calcio si formano e crescono nella pelvi renale partendo dalla placca di Randall.

Spunti di comprensione dei meccanismi patogenetici della nefrocalcinosi potrebbero derivare dallo studio di malattie con chiara base genetica, correlate alla nefrocalcinosi, come la malattia di Dent o il rene con midollare a spugna.

1.3 Rene con midollare a spugna

Il rene con midollare a spugna (MSK) è una nefropatia che si associa ad un elevato rischio di sviluppare nefrocalcinosi (più frequentemente nefrocalcinosi midollare) e calcoli renali ed è caratterizzata dalla presenza di anomalie funzionali del nefrone tubulare e dilatazioni cistiche dei dotti collettori precaliceali, nonché da un moderato rischio di infezioni urinarie ed insufficienza renale (Pesce et al, 1995; Gambaro et al, 2001).

Generalmente sono coinvolte le papille renali bilateralmente ma possono essere interessate solo le papille di un rene o alcune di esse; tra le manifestazioni più classiche di MSK vi sono la calcolosi recidivante e la nefrocalcinosi associate ad

ipercalciuria, acidosi tubulare distale e ipocitratemia (Oshter et al, 1994; Pabico et al, 1998).

Spesso la malattia è asintomatica e decorre in maniera silenziosa. La diagnosi è radiografica e l'urografia è l'indagine di riferimento.

MSK si verifica generalmente in forma sporadica, sebbene siano stati descritti casi familiari (Copping 1967; Kuiper 1971) nei quali la malattia sembra essere ereditata in forma autosomica dominante (Kuiper 1971, Klemme et al, 1998).

Pur non essendo stata ancora chiarita la sua patogenesi, la frequente associazione con diverse condizioni malformative renali ed extra-renali ed il coinvolgimento in casi familiari suggeriscono che si tratti di una patologia disembrionica, ossia un disordine dello sviluppo, e che fattori genetici possano essere alla base dello sviluppo della malattia.

La concomitanza di alterazioni dei dotti precaliceali e collettori (cisti e nefrocalcosi) e di difetti funzionali multipli del tubulo nefronico (ipercalciuria, ipocitratemia, acidificazione) nel rene MSK ci ha suggerito l'ipotesi che MSK possa essere la conseguenza di una disregolazione che avviene a livello dell'interfaccia "abbozzo ureterale-mesenchima metanefrico" (essenziale per i messaggi differenziativi per una corretta nefrogenesi), ossia di un danneggiamento dei processi molecolari coinvolti nella crescita e nella ramificazione dell'abbozzo ureterale e del cross-talk con il mesenchima metanefrico, probabilmente dovuto a mutazioni o polimorfismi funzionalmente rilevanti dei geni implicati.

Possibili candidati sono GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) e RET. GDNF codifica per un fattore neurotrofico e richiede per il suo pathway un recettore tirosina-chinasi (RET). Il segnale GDNF/RET nell'embriogenesi renale è importante in quanto promuove la formazione del nefrone e la ramificazione dei dotti collettori (Costantini and Shakya, 2006).

Nel nostro laboratorio è stata svolta un'analisi mutazionale di GDNF in una popolazione MSK (pazienti affetti da MSK diagnosticato sulla base di criteri

urografici, segnalati per ricorrente nefrolitiasi calcica che presentavano le papille di entrambi i reni con alterazioni calcinosiche e cistiche) che ha portato all'identificazione di due differenti varianti nucleotidiche nella regione non codificante 5'UTR (untranslated region). Queste variazioni sono state viste segregare con MSK nei casi familiari e, sulla base dei nostri studi di frequenza e caso-controllo, si è avanzata l'ipotesi che queste variazioni siano mutazioni correlate con lo sviluppo di MSK.

Rimane ovviamente da spiegare il possibile significato patogenetico delle alterazioni geniche trovate associate alle alterazioni renali presenti in MSK e, soprattutto in relazione al tema trattato in questa tesi, se vi possa essere un nesso tra alterazioni di GDNF e la nefrocalcosi. Un'ipotesi stimolante, che è stata in parte percorsa in questa tesi di Dottorato è che alterazioni di GDNF possano portare la cellula tubulare dell'ansa di Henle a non raggiungere la sua completa maturità funzionale, conferendole una sorta di suscettibilità al transdifferenziamento, di cui quello verso il lineaggio osteogenico, in quel particolare tratto del nefrone, potrebbe essere il più probabile.

1.4 Il transdifferenziamento epitelio-mesenchima

Il transdifferenziamento è l'abilità di una cellula differenziata di acquisire stabilmente caratteristiche fenotipiche diverse da quelle del tessuto di origine (Thowfeequ et al, 2007) attraverso lo spegnimento di geni linea specifici e l'attivazione del programma genetico di un altro tipo di cellula differenziata (Slack and Tosh, 2001; Thowfeequ et al, 2007). Il transdifferenziamento di una cellula epiteliale in una mesenchimale (EMT) è una manifestazione essenziale della plasticità degli epiteli durante processi fisiologici quali la morfogenesi e la

riparazione tissutale, ma caratterizza anche processi patologici quali la fibrosi e la carcinogenesi (Zavadi and Böttinger, 2005).

Nel rene il processo di EMT è caratterizzato (Zavadi and Böttinger, 2005; Kokkinos et al, 2007) dalla perdita del fenotipo epiteliale (perdita dell'integrità e della polarità da parte delle cellule epiteliali tubulari); dall'espressione di marker mesenchimali, quali: il cambiamento dei filamenti citoplasmatici intermedi dal tipo epiteliale di citocheratina a quello mesenchimale di vimentina; la produzione di proteine della matrice mesenchimale quali Fibronectina e Collagene di tipo I, ed infine, alle volte, l'acquisizione di proteine del citoscheletro della isoforma α -actina muscolare liscia (α SMA) che caratterizzano le cellule muscolari lisce e le cellule miofibroblastiche, cellule effettrici del riparo tissutale e della fibrosi (Forino et al, 2006).

La dedifferenziazione di cellule tubulari mature è uno dei meccanismi coinvolti nella rigenerazione renale, soprattutto a livello del tubulo prossimale, la regione del nefrone più sensibile al danno ischemico. Queste cellule, dopo l'insulto, sono in grado di riattivare il programma mesenchimale attivo durante la nefrogenesi, di proliferare ripopolando così la regione danneggiata del tubulo con cellule funzionalmente attive (Anglani et al, 2008).

Sebbene quasi tutti gli studi in vitro sulla EMT impieghino come modello cellule tubulari prossimali, la possibilità che cellule dell'ansa di Henle, sulla cui membrana basale originano le placche di Randall, possano transdifferenziare sotto stimoli impropri non dovrebbe sorprendere poiché sia le cellule tubulari prossimali che quelle di Henle hanno la stessa origine embrionale e mesenchimale.

E' stato inoltre ampiamente dimostrato nel rene che i miofibroblasti dell'interstizio renale, cellule effettrici del processo di fibrogenesi, possono derivare da cellule tubulari che sono andate incontro a EMT (Manotham et al, 2004).

Sulla base di queste conoscenze è possibile che cellule renali adulte di origine mesenchimale, nonostante la loro differenziazione in cellule di tipo epiteliale, possano andare incontro ad un fenomeno di EMT, indotte da concentrazioni parafisiologiche di ossalato osservate in condizioni di calcolosi ossalico-calcica.

E' stato infatti dimostrato da Miyazawa *et al* come i cristalli di calcio ossalato inducano nelle cellule tubulari di ratto normali una up-regolazione della vimentina, considerata il principale marker di dedifferenziazione delle cellule tubulari epiteliali che rispondono ad un insulto (Miyazawa et al, 2004).

Interessanti spunti per studiare la patogenesi della nefrocalcinosi e della placca si Randall provengono da due diversi tipi di conoscenza: la conoscenza in parte dei meccanismi patogenetici che entrano in gioco nella formazione delle calcificazioni vascolari e le conoscenze acquisite dalla biologia delle cellule staminali adulte renali.

1.5 Il processo di calcificazione vascolare

Il processo di calcificazione vascolare è definito come una deposizione di calcio e fosfato all'interno della tonaca vascolare media.

La deposizione di calcio fosfato non è, tuttavia, un fenomeno esclusivamente a carico della tonaca media arteriosa ma può manifestarsi potenzialmente in tutti i tessuti molli, anche nel contesto del parenchima renale (nefrocalcinosi) peggiorandone la vascolarizzazione e accelerando la progressione dell'insufficienza renale.

Per molto tempo si è pensato che le calcificazioni vascolari fossero un processo esclusivamente passivo, dovuto alla semplice precipitazione di calcio e fosfato.

Tuttavia recenti scoperte hanno messo in evidenza che proteine della matrice ossea sono coinvolte nelle lesioni calcifiche, suggerendo che queste siano legate ad un processo attivo simile all'osteogenesi, causato da una serie di meccanismi correlati tra loro, che culminano con la deposizione di matrice extracellulare da parte di cellule simili agli osteoblasti (Steitz et al, 2001; Jono et al, 2006; Johnson et al, 2006).

La calcificazione vascolare è un processo multistep (Jono et al, 2006) (**figura 5**):

1. cellule vascolari di origine mesenchimale (cellule muscolari lisce, miofibroblasti, cellule vascolari calcificanti, periciti microvascolari) possono subire una differenziazione osteogenica trasformandosi in cellule simili agli osteoblasti in seguito a stimoli cronici quali invecchiamento, diabete, uremia, aterosclerosi, etc.;
2. queste cellule perdono i caratteristici marcatori delle cellule muscolari lisce e sviluppano caratteristiche tipiche degli osteoblasti, cominciando ad esprimere proteine associate all'osso (osteocalcina, osteopontina, fosfatasi alcalina, etc.);
3. questa differenziazione in senso osteoblastico conduce alla mineralizzazione della matrice extracellulare.

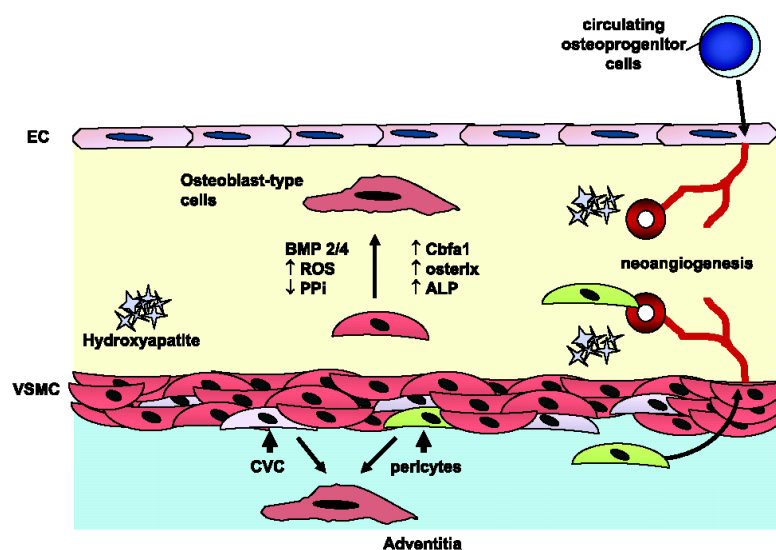


Figura 5. Meccanismo di calcificazione vascolare. Immagine tratta da Jhonson et al (2006) *Circ Res* **99**: 1044-1059.

1.5.1 Cellule bersaglio della differenziazione osteoblastica

Esistono diversi tipi cellulari che possono differenziare in cellule simili agli osteoblasti all'interno di un vaso (**figura 5**):

- **cellule vascolari muscolari lisce (VSMCs).** Sotto diversi stimoli (stress ossidativo, cambiamenti nei livelli di pirofosfato, un aumento dell'espressione delle proteine morfogenetiche dell'osso o BMPs) queste cellule possono differenziare in senso osteogenico.

Le BMPs appartengono alla famiglia TGF-beta (transforming growth factor-beta) e sono dei mediatori della calcificazione vascolare. In particolare BMP-2 è importante perché è in grado di guidare progenitori mesenchimali multipotenti verso la differenziazione osteogenica (Shea et al, 2003) mediante l'upregolazione di fattori di trascrizione osteogenici come Cbfa1 e osterix.

Cbfa1 (core-binding factor alpha1) è un regolatore della differenziazione osteoblastica e la sua espressione in VSMCs rappresenta uno degli step iniziali del processo di calcificazione vascolare (Steiz et al, 2001); controlla l'espressione di diverse proteine della differenziazione osteoblastica (osteocalcina, osteopontina, Collagene di tipo I, etc.) e la sua attivazione richiede la trascrizione del fattore osterix (Johnson et al, 2006). Lo stress ossidativo può indirizzare le VSMCs verso il fenotipo osteoblastico stimolando l'espressione di BMP-2 e di conseguenza di Cbfa1.

- **cellule vascolari calcificanti (CVCs).** Rappresentano una sottopopolazione delle VSMCs, circa il 20-30% della popolazione totale delle VSMCs (Yang et al, 2004). Sono in grado di differenziare in cellule simili agli osteoblasti e di formare spontaneamente noduli calcifici quando mantenute a lungo in coltura. Questi noduli presentano proprietà simili all'osso come un'aumentata attività della fosfatasi alcalina e un aumento dell'espressione di osteocalcina, osteonectina e osteopontina (Watson et al, 1994);
- **periciti.** Queste cellule, strettamente associate all'endotelio della microvascolatura, sono considerate dei progenitori mesenchimali (Tilton, 1991) con capacità di differenziare in osteoblasti e condrociti (Doherty and Canfield, 1999). Producono anch'esse, come le CVCs, noduli contenenti collagene di tipo I, osteopontina, matrix gla-protein e osteocalcina (Abedin et al, 2004).

Nel processo di calcificazione vascolare i periciti possono essere attivati *in situ* e acquisire fenotipo osteogenico o in alternativa la neoangiogenesi vascolare ne può facilitare la migrazione all'interno del vaso dove differenziano in senso osteoblastico o rivestono il ruolo di trasportatori passivi di cellule osteoprogenitrici circolanti (Johnson et al, 2006).

Queste cellule hanno un particolare interesse per lo studio svolto in questo Dottorato ed è per questo motivo che verranno trattate in maniera più approfondita in un successivo paragrafo.

Elevati livelli di fosfato inorganico, così come di calcio extracellulare, risultano incrementare il processo di calcificazione (Shanahan, 2005), stimolando le cellule ad andare incontro a cambiamenti fenotipici che predispongono alla calcificazione stessa (Jono et al, 2006).

Nelle VSMCs elevate concentrazioni di fosfato stimolano l'uptake del fosfato stesso mediante un processo attivo mediato da Pit-1, un co-trasportatore di fosfato

sodio dipendente (**figura 6**). Il fosfato in seguito tende a precipitare e Pit-1 sembra indurre in maniera diretta l'espressione di Cbfa1 (Giachelli, 2003). Elevate concentrazioni di calcio promuovono la calcificazione mediante l'upregolazione dell'espressione di Pit-1 (Shanahan, 2005). Studi condotti *in vitro* hanno dimostrato che fosforo e calcio stimolano la differenziazione osteogenica in modo sinergico ed indipendente (Farzaneh-Far and Shanahan, 2005).

Studi relativi allo sviluppo osseo e alla calcificazione di arterie umane hanno messo in evidenza la presenza di piccole vescicole di matrice (**figura 6**) che sembrano agire come sito iniziale per la cristallizzazione in apatite (Farzaneh-Far and Shanahan, 2005). Sotto diversi stimoli, tra cui elevati livelli di calcio e fosfato, è stata osservata, in vitro, la capacità delle VSMCs di rilasciare simili vescicole di matrice o corpi apoptotici. L'apoptosi è stata, infatti, vista essere un evento che precede la calcificazione delle VSMCs (Proudfoot et al, 2000). Queste vescicole assumono attivamente calcio e fosfato dall'ambiente circostante (Proudfoot et al, 2000; Farzaneh-Far and Shanahan, 2005).

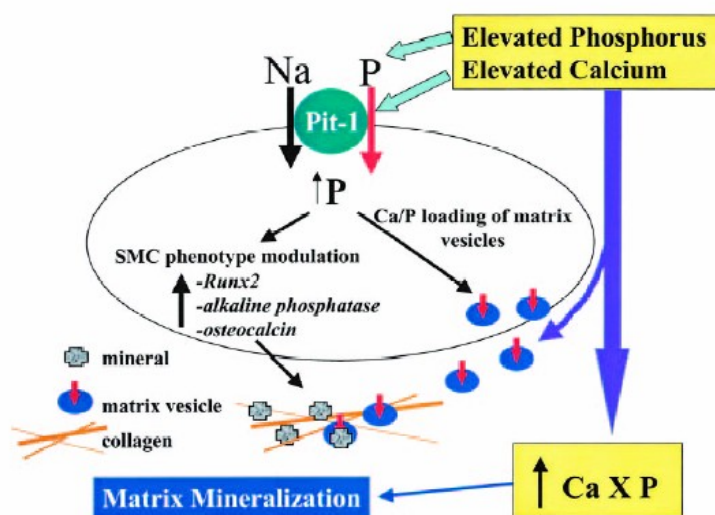


Figura 6. Effetto di alte concentrazioni di calcio e fosfato in cellule vascolari muscolari lisce. Immagine tratta da Giachelli (2004) *J Am Soc Nephrol* **15(12)**: 2959-2964.

La calcificazione vascolare è il risultato di meccanismi attivi cellulo-mediati che coinvolgono l'induzione dell'osteogenesi e la perdita degli inibitori della mineralizzazione (Steitz et al, 2001).

1.5.2 I periciti

I periciti sono cellule perivascolari, associati alla membrana basale di venule, arteriole e capillari (Schor et al, 1990). Circondano parzialmente le cellule endoteliali della microvascolatura condividendone la membrana basale (**figura 7**).

L'interazione tra i periciti e la matrice extracellulare, mediante la secrezione di fattori di crescita, è importante per la maturazione, il rimodellamento e il mantenimento del sistema vascolare (Allt and Lawrenson, 2001).

Hanno funzione di cellule progenitrici capaci di differenziarsi in una varietà di tipi cellulari mesenchimali, tra cui osteoblasti, condrociti, adipociti (Canfield et al, 2000).

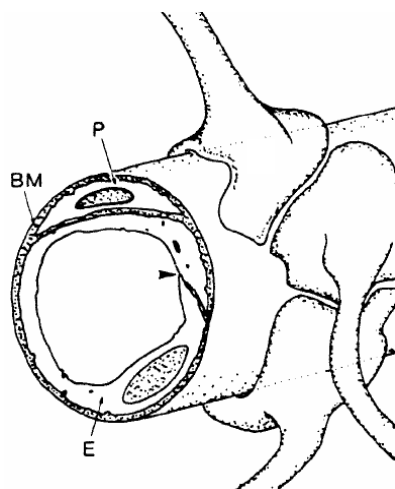


Figura 7. I periciti (P) sono strettamente associati alle cellule endoteliali capillari (E) con le quali condividono la lamina basale (BM). Immagine tratta da Allt and Lawrenson (2001) *Cells Tissue Organs* **169**: 1-11.

L'identificazione dei periciti presenta delle difficoltà dovute alla loro eterogeneità e alla loro abilità di differenziare in diversi tipi cellulari. Esprimono alcuni markers in comune con le cellule muscolari vascolari lisce come α -SMA (α -smooth muscle actin) e desmina (Bondjers et al, 2003), esprimono un ganglioside specifico di membrana, riconosciuto dall'anticorpo monoclonale 3G5 (Watson et al, 1994) e il regolatore del segnale della proteina G RGS5 (Armulik et al, 2005) e sono negativi per il fattore di von Willebrand (Allt and Lawrence, 2001).

Periciti isolati dalla microvascolatura della retina di bovino adulto presentano una particolare modalità di crescita in vitro (Schor et al, 1990; Canfield et al, 2000). Appaiono come cellule irregolari, stellate, spesso con lunghi processi filamentosi che uniscono cellule adiacenti tra loro. Una volta raggiunta la confluenza spontaneamente formano aree multistrato dove ritraendosi danno origine a noduli costituiti da centinaia di cellule metabolicamente attive, fissate in un'abbondante matrice extracellulare (Canfield et al, 2000). In seguito alla retrazione, il nodulo rimane ancorato al substrato e la deposizione della matrice avviene a carico dei periciti stessi sia all'interno che all'esterno del nodulo (Schor et al, 1990). La coltura è inoltre caratterizzata dalla presenza di frammenti cellulari, visibili anche sulla superficie del nodulo.

La caratteristica più sorprendente è la mineralizzazione della matrice prodotta nelle aree dove si formano i noduli, nelle zone monostrato la mineralizzazione infatti non viene osservata (Canfield et al, 2000).

La mineralizzazione avviene spontaneamente in un mezzo di crescita standard (DMEM arricchito con il 20% FCS, 2 mM glutammina, 1 mM sodio piruvato, 100 U/ml penicillina, streptomina, aminoacidi non essenziali e 50 μ g/ml acido ascorbico) a livelli fisiologici di fosfato e può essere accelerata dalla presenza del β -glicerolfosfato (Canfield et al, 2000).

La presenza di depositi minerali è stata confermata dalla colorazione con il reagente di Von Kossa e Alizarin Red (**figura 8**) e mediante analisi con raggi X e microscopia elettronica (Schor et al, 1990; Brighton et al, 1992).

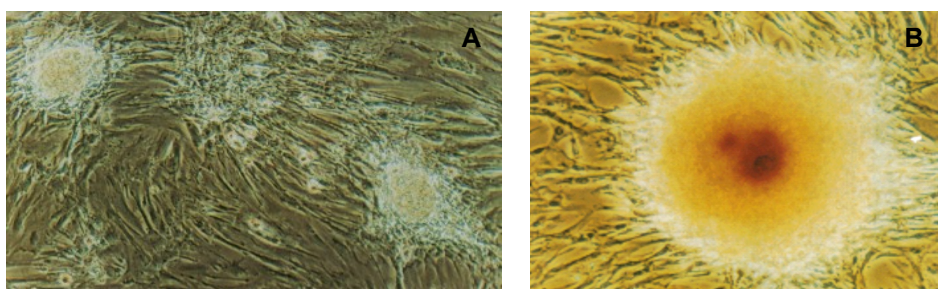


Figura 8. Periciti isolati da aorta di bovino che si organizzano in noduli (A). Nodulo positivo ad Alizarin red, che evidenzia depositi di calcio (B). Immagine tratta da Bostrom et al (1993) *J Clin Invest* **91(4)**: 1800-1809.

I noduli prodotti dai periciti rimangono metabolicamente attivi in coltura per lungo tempo (fino a 54 giorni) e cominciano a calcificare da 7 ai 15 giorni dopo la formazione del modulo (Schor et al, 1990).

La matrice extracellulare dei noduli presenta delle vescicole (dell'ordine di 100-300 nm) sulle quali vanno a depositarsi i cristalli di idrossiapatite che portano alla mineralizzazione della matrice stessa all'interno del nodulo (Canfield et al, 2000).

L'analisi mediante raggi X ha confermato la presenza di calcio e fosforo nei noduli mineralizzati, in un rapporto molto simile a quello caratteristico dell'osso (Schor et al, 1990).

Studi svolti mediante northern e southern blot, ibridizzazione in situ, immunofluorescenza e immunoistochimica hanno dimostrato che la deposizione di matrice mineralizzata da parte dei periciti microvascolari è associata all'espressione (Canfield et al, 2000) :

1. di marker tipici delle cellule della linea osteoblastica (Cbfa1, fosfatasi alcalina, BMPs, osteocalcina, osteonectina, osteopontina);
2. di marker delle cellule stromali del midollo osseo (STRO-1);
3. di proteine della matrice extracellulare (collagene di tipo I, laminina, tenascina, ect.).

Cbfa1 risulta presente in tutti gli stadi di differenziazione dei periciti (Doherty and Canfield, 1999) così come osteopontina, osteonectina e BMPs. L'osteonectina, coinvolta negli stadi precoci della differenziazione, è preferenzialmente espressa dai periciti confluenti mentre l'osteopontina nei noduli mineralizzati (Canfield et al, 2000). L'osteocalcina invece, considerato un marker degli stadi avanzati della differenziazione, è espresso in maniera specifica dalla popolazione di cellule alla periferia dei noduli mineralizzati (Canfield et al, 2000). La fosfatasi alcalina aumenta negli osteoblasti differenziati (Aubin et al, 1995); risulta bassamente espressa nei periciti confluenti e up-regolata nelle aree multistrato e nei noduli (Brighton et al, 1992).

La perdita dell'espressione dell'antigene STRO-1, associato a cellule mesenchimali staminali, è associata all'acquisizione di un fenotipo differenziato (Simmons and Torok-Storb, 1991). STRO-1 nelle culture di periciti è differenzialmente espresso, la sua espressione è ridotta nelle cellule all'interno del nodulo, suggerendo che queste cellule siano più differenziate rispetto alle altre cellule presenti in coltura (Doherty et al, 1998).

La laminina presenta un'aumentata espressione nei siti di formazione del nodulo (Schor et al, 1991) così come il collagene di tipo I, che è il tipo di collagene predominante nell'osso (Canfield et al, 1990).

Questo processo di calcificazione non è stato osservato in altre cellule vascolari come le cellule endoteliali e le VSMCs (Schor et al, 1990).

I periciti potrebbero svolgere un ruolo nelle calcificazione ectopiche in altri distretti come la cute, il rene, il muscolo scheletrico e le valvole cardiache. In

condizioni patologiche potrebbero differenziare, anche in queste sedi, in condrociti o osteoblasti e produrre matrice mineralizzata (Armulik et al, 2005).

I periciti nel rene sono concentrati soprattutto a livello dei vasa recta che scendono nella midollare renale (Pallone et al, 2003; Pitera et al, 2004). La funzione fisiologica dei periciti renali sembra essere legata al controllo del flusso sanguigno all'interno dei vasi (Park et al, 1997).

1.5.3 Geni e proteine coinvolte nella regolazione dell'osteogenesi

L'osteogenesi è un processo complesso che vede diversi geni e proteine agire e interagire tra loro mediante meccanismi noti e non noti.

A differenza della mineralizzazione fisiologica, in cui cristalli di fosfato di calcio precipitano in forma di idrossiapatite nella matrice extracellulare dell'osso, della cartilagine e dei denti, la calcificazione ectopica è un processo di mineralizzazione dei tessuti molli, causata da condizioni patologiche che comportano la perdita di funzione del tessuto. Sebbene ci siano delle similarità tra i due processi i meccanismi molecolari che regolano il processo della calcificazione ectopica sono ancora poco noti (Azari et al, 2008).

Diverse proteine sono coinvolte nell'inibizione e/o formazione delle calcificazioni vascolari e il delicato equilibrio esistente tra queste proteine sembra essere cruciale per l'attivazione di questo processo, così come avviene per l'osteogenesi. Osteocalcina, osteonectina, BMP-2 e fosfatasi alcalina inducono direttamente la formazione di calcificazioni extrascheletriche. Al contrario proteine, come MGP (matrix Gla protein), fetuina, osteoprotegerina e osteopontina agiscono come agenti protettivi, in grado di ridurre e forse prevenire le calcificazioni vascolari (Shanahan, 2005; Farzaneh-Far and Shanahan, 2005; Johnson et al, 2006;).

Tra gli inibitori del processo di calcificazione i più noti sono:

- la **Matrix Gla Protein** è una proteina della matrice extracellulare ad affinità elevata per gli ioni calcio e fosfato e per i cristalli di idrossiapatite (Jono et al, 2006), necessaria sia nella formazione di tessuto osseo normale sia nell'inibizione della calcificazione vascolare. E' in grado di legare e di modulare l'attività di BMP-2;
- la **Fetaina** è un inibitore della calcificazione, inibisce la formazione e la deposizione *de novo* di calcio-fosfato senza alcun effetto sui cristalli di idrossiapatite già formati (Johnson et al, 2006);
- l'**Osteoprotegerina** fa parte della famiglia di recettori TNF (Tumor Necrosis Factor) e una sua deficienza porta a calcificazione vascolare, anche se rimane da chiarire il meccanismo con cui agisce;
- l'**Osteopontina** è un modulatore della mineralizzazione dell'osso e un potente inibitore delle calcificazioni ectopiche. E' una sialoproteina (glicoproteina contenente residui glicidici di acido sialico) che è stata rilevata nell'osso, nel rene, nel sangue, nei denti, etc. e pertanto non è considerata specifica dell'osso, sebbene svolga un'importante funzione in questa sede. In condizioni normali viene espressa da osteoclasti e osteoblasti, cellule deputate al rimodellamento osseo, mentre durante il processo di mineralizzazione dell'osso agisce come inibitore della formazione di idrossiapatite (Mazzali et al, 2002) mediante il legame con la superficie del cristallo. La sua capacità di inibire le calcificazioni dipende da modificazioni post-traduzionali, cioè da estese fosforilazioni.

Accanto agli inibitori del processo di calcificazione esistono una serie di molecole che agendo, sia a livello locale che sistemico, possono promuovere questo processo.

Tra i fattori trascrizionali Cbfa1 e osterix sono quelli che giocano un ruolo chiave nell'attivazione del fenotipo osteoblastico (**figura 9**).

OSTEOGENESI

Figura 9. In blu alcune delle proteine coinvolte nel processo di osteogenesi, in viola alcuni fattori di trascrizione, in rosa proteine che fungono da inibitori della cristallizzazione.

Cbfa1, anche conosciuto come Runx2 (runt-related transcription factor 2), è considerato un regolatore della differenziazione osteoblastica. Richiede l'attivazione di osterix e controlla l'espressione di diverse proteine della differenziazione osteoblastica (fosfatasi alcalina, collagene di tipo I, osteocalcina, osteopontina, etc.). Sebbene sia ormai riconosciuta la sua importanza per l'induzione del fenotipo osteoblastico questo gene non è osteoblasto specifico. La sua espressione è stata osservata durante lo sviluppo precoce di numerosi tipi di cellule (come per esempio i condrociti) (Lian and Stein, 2003). E' stato visto che questo fattore lega OSE2, una regione del promotore dell'osteocalcina (Ducy and

Karsenty, 1995). OSE2 si trova nella regione promotore di diversi geni espressi dagli osteoblasti (Ducy et al, 1997).

Osterix è uno dei pochi geni caratterizzati specifico degli osteoblasti. Agisce sulla regolazione di diversi geni dell'osteogenesi (osteocalcina, osteonectina, osteopontina, BMPs, collagene di tipo I) (Ducy et al, 1996). Ha una funzione *downstream* nei confronti di Cbfa1 (Johnson et al, 2006; Huang et al, 2004). Studi relativi alla rimozione di osterix, svolti in modelli murini, hanno evidenziato una completa mancanza di ossificazione e di deposizione di matrice (Nakashima et al, 2002), cellule provenienti dai topi osterix-deficienti continuavano però ad esprimere Cbfa1. Al contrario, cellule isolate da topi Cbfa1-deficienti non esprimevano osterix, suggerendo che Cbfa1 lega, attiva e modula il promotore di osterix (Nishio et al, 2006). I trascritti di osterix agiscono poi su Cbfa1, mettendo così in stretta relazione questi due fattori nel processo di calcificazione.

Diverse sono le proteine espresse nei processi di calcificazione vascolare.

La **fosfatasi alcalina** è un gruppo eterogeneo di metallo enzimi dimerici, capace di idrolizzare gruppi fosfato legati a substrati organici. Gioca un ruolo nei processi di mineralizzazione mettendo a disposizione ioni fosfato per la formazione dei cristalli minerali. E' considerato un marker fenotipico degli osteoblasti e un indicatore di deposizione di matrice extracellulare (Jhonson et al, 2006). E' un modulatore della calcificazione vascolare, processo durante il quale la sua espressione viene aumentata.

L'**osteocalcina** è la più importante proteina non collagena della matrice ossea, vitamina K dipendente. E' composta da 49 amminoacidi e contiene 3 residui di acido γ -carbossiglutaminico (GLA). Lega il calcio e l'idrossiapatite in corrispondenza dei residui 17, 21 e 24. Essa deriva dal un precursore che, in seguito a rimozione di frammenti peptidici e a carbossilazione K-dipendente, origina la forma nativa secreta in circolo. Durante l'osteogenesi viene sintetizzata dagli osteoblasti e una volta rilasciata la maggior parte viene assimilata dalla

matrice ossea e una parte più esigua secreta nella circolazione sanguigna. La sua up-regolazione nella sintesi di matrice e nella mineralizzazione le conferiscono un ruolo chiave nel differenziamento osteoblastico di progenitori (Ryoo et al, 1997).

Questo gene è regolato da numerosi fattori intracellulari e presenta siti specifici per diversi ormoni. Le principali regioni del promotore dell'osteocalcina identificate sono OSE1 e 2. OSE2 è il promotore al quale si lega la proteina Cbfa1 up-regolandone l'espressione. OSE1 Sembra essere richiesto per un corretto svolgimento dell'attività di OSE2 (Schinke and Karsenty, 1999).

Partecipa inoltre al processo di rimodellamento osseo in quanto capace di legare lo ione calcio rendendolo indisponibile per la combinazione con lo ione fosfato. L'osteocalcina abbonda nel tessuto osseo maturo ed è scarsa nel tessuto osseo in via di formazione (Ducy, 2000).

L'**osteonectina** è una glicoproteina dotata di alta affinità per il calcio, sia come ione libero che associato in complessi di tipo cristallino. Viene secreta durante il processo di formazione dell'osso e promuove la formazione di cristalli minerali, agendo come elemento di enucleazione dei cristalli minerali, in quanto capace di concentrare il calcio nelle sue adiacenze creando così le condizioni per avviare la precipitazione del fosfato di calcio.

Modula l'interazione fra cellule e diverse proteine della matrice extracellulare, compresi i collagene interstiziali; è espressa in molti tessuti nel corso dello sviluppo (osteogenesi, adipogenesi, angiogenesi) e nell'adulto è presente nei tessuti che vanno incontro a rimodellamento.

Le **proteine morfogenetiche dell'osso** (BMP) sono citochine multifunzionali con diverse funzioni biologiche nel rimodellamento osseo e nell'osteogenesi. Sono presenti nella matrice ossea e sono in grado di legare l'idrossiapatite durante la formazione dei cristalli. In particolare, BMP-2, prodotto in condizioni di ipossia, stress ossidativi ed infiammazione, induce differenziazione osteogenica in

VSMCs e cellule progenitrici mesenchimali attivando Cbfa1 e osterix (Johnson et al, 2006).

Il **collagene di tipo I** è un'importante componente della matrice extracellulare ossea, interconnesso con integrine di superficie e con altre proteine della matrice extracellulare. Non è considerato specifico del distretto osseo in quanto è stato trovato in numerosi altri distretti. E' coinvolto nei processi di adesione cellulare, proliferazione e differenziazione del fenotipo osteoblastica.

1.6 La papilla renale come nicchia di cellule staminali

Interessanti spunti per la conoscenza dei meccanismi che sono alla base della formazione della placca di Randall non provengono solo dallo studio delle calcificazioni vascolari bensì anche dalle ultime conoscenze acquisite nel campo della biologia delle cellule staminali adulte.

La papilla renale, sito d'origine delle placche di Randall, è stata riconosciuta essere una nicchia per le cellule staminali renali.

Ogni cellula staminale occupa una propria nicchia biologica definita da un complesso network di segnali biochimici, che probabilmente forniscono alla cellula staminale informazioni necessarie sul momento opportuno per replicarsi (Al-Awqati and Oliver, 2006) e proteggono opportunamente la cellula da eventuali danni provenienti dall'ambiente circostante. Recenti studi hanno dimostrato come l'ipossia sia un importante elemento protettivo per la autorigenerazione delle cellule staminali ed il mantenimento del loro stato indifferenziato (Danet et al, 2003; Gustafsson et al, 2005).

La papilla, la parte più interna della midollare profonda, può costituire una nicchia staminale in quanto è la parte primordiale del rene e ha bassa tensione d'ossigeno. Uno studio svolto da Oliver e colleghi (Oliver et al, 2004) in un modello murino ha dimostrato come effettivamente la papilla rappresenti una nicchia di cellule staminali nel rene. Le cellule staminali sono caratterizzate da uno stato altamente

indifferenziato che permette loro di poter dare origine a diversi tipi cellulari. Presentano un lento ciclo di replicazione ed è noto come cellule staminali ematopoietiche, embrionali e neurali crescano formando sfere (Layer et al, 2002). Nel lavoro di Oliver la ricerca di cellule con un basso *turnover* si è basata su un saggio che prevede l'assunzione di BrdU da parte delle cellule del rene. BrdU è un nucleoside sintetico che viene incorporato dal DNA in via di sintesi in cellule in fase di replicazione (fase S del ciclo cellulare). Inizialmente tutte le cellule risultano colorate, in seguito il BrdU viene rimosso e le cellule osservate per lunghi periodi. Quando una cellula si divide rapidamente in assenza del colorante il contenuto di quest'ultimo appare sempre più diluito nelle generazioni successive. In questo modo solo le cellule con un lento ciclo di replicazione che trattengono il colorante vengono pertanto rilevate (Al-Awqati and Oliver, 2002). Oliver trovò poche cellule positive presenti nella corteccia e nella medulla, mentre l'intera popolazione papillare era positiva a BrdU (Oliver et al, 2004). Queste cellule, una volta in coltura e in assenza di fattori di crescita o siero, formavano delle sfere e molte di esse esprimevano nestina, un marker di staminalità neuronale. Alcune cellule acquisivano addirittura caratteristiche morfologiche dei neuroni, suggerendone la pluripotenza (Oliver et al, 2004). Tutti i dati raccolti dallo studio di Oliver sostengono l'ipotesi che la papilla sia una nicchia staminale del rene.

2. SCOPO

E' stato dimostrato che cellule non renali ma di origine mesenchimale (cellule vascolari) sono in grado di acquisire un fenotipo osteogenico. E' noto che periciti vascolari possono andare incontro spontaneamente ad una differenziazione osteoblastica, caratterizzata dalla perdita del loro tipico fenotipo e dalla espressione di proteine tipiche dell'osso con conseguente mineralizzazione della matrice extracellulare in cristalli di apatite.

Se un simile fenomeno avvenga nel rene non è mai stato indagato ma è riconosciuta la plasticità delle cellule tubulari renali, la presenza di periciti nella midollare renale riccamente vascolarizzata e la papilla come nicchia per cellule staminali adulte .

A partire da queste premesse l'ipotesi che si voleva verificare con questo progetto è che cellule della papilla, sotto opportuni stimoli, possano differenziare verso la linea osteogenica, determinando la sintesi di proteine tipiche dell'osso (osteopontina, osteonectina, osteocalcina) con conseguente mineralizzazione in apatite del tessuto renale e della membrana basale dell'ansa di Henle nel caso di formazione della placca di Randall. Se questo fenomeno avvenisse nel rene in pazienti calcolotici, potrebbe aver luogo in patologie renali associate a

nefrocalinosi, come il rene con midollare a spugna, frequentemente associato a nefrolitiasi ossalico-calcica.

L'obiettivo era quello di indurre, mediante stimolazione osteogenica, la differenziazione delle cellule che risiedono nella papilla verso un fenotipo osteoblastico.

L'asportazione di un carcinoma renale in un paziente affetto da MSK con nefrocalinosi e mutazione di GDNF è stata un'opportunità unica di ricerca che ha permesso di lavorare non solo con un tessuto renale caratterizzato da una specifica patologia legata a nefrocalinosi (MSK) ma anche in una condizione probabilmente geneticamente predisponente a fenomeni di differenziazione, dovuta alla presenza della mutazione di un gene chiave della nefrogenesi (GDNF).

3. MATERIALI E METODI

3.1 Biologia Cellulare

3.1.1 Colture cellulari primarie

Per questo studio sono state allestite colture primarie di cellule papillari umane provenienti da frammenti biotipici.

Cellule MSK: i campioni di papilla sono stati ottenuti durante nefrectomia effettuata, a causa di carcinoma renale, in una paziente di 80 anni con MSK familiare e portatrice in eterozigosi della seguente variante intronica gene GDNF (**figura 10**). MSK è stato diagnosticato sulla base di stretti criteri orografici.

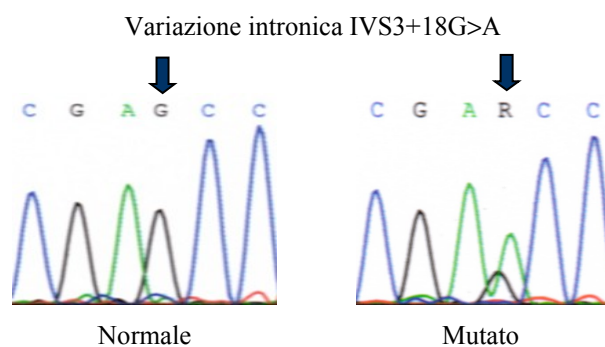


Figura 10. Variante intronica del gene GDNF presente nella paziente con MSK.

Cellule di controllo: come controllo sono state allestite colture primarie di cellule papillari provenienti da una paziente di 76 anni senza MSK né nefrolitiasi, mai andata incontro a problemi di tipo renale (come ha confermato l'analisi istopatologica della parte sana del rene).

I campioni della papilla MSK e della papilla di controllo sono stati processati nel medesimo modo.

I pezzetti di tessuto sono stati prelevati da siti lontani dal tumore nella zona della papilla renale: una parte è stata fissata in formalina 10% in buffer fosfato 0.2 M per preparati istologici atti ad escludere la presenza di alterazioni tissutali e una parte è stata frammentata in piccole porzioni di tessuto ed utilizzata per allestire colture primarie di cellula papillari.

In condizioni di sterilità sono state prelevate porzioni di tessuto dalla regione papillare e posti in un mezzo RPMI 1640 w/ stable L-Glutamine (Celbio) arricchito con penstrep 2% e glutamina 1%. Le porzioni di tessuto sono state ridotte in piccoli pezzi mediante l'uso di bisturi sterili e sono in seguito state trattate in buffer HBSS (Hank's Balanced Salts Solution; Euroclone) con collagenasi di tipo IA 740 units/mg 2mg/ml (Sigma) in agitazione per 1h a 37°C. La collagenasi è stata in seguito inattivata utilizzando del mezzo RPMI 1640 w/ stable L-Glutamine al 10% FBS (Celbio). I campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 1200 rpm e, una volta eliminato il sovrnatante, il pellet è stato risospeso in RPMI 1640 w/ stable L-Glutamine con 10% FBS e 2% penstrep. Le cellule in sospensione sono quindi state seminate in fiasche non rivestite aventi una superficie di 25 cm² e mantenute in incubatore a 37 °C, in un'atmosfera contenente il 5% di CO² e 90% di umidità.

Le cellule sono state coltivate utilizzando il mezzo RPMI 1640 w/ stable L-Glutamine contenente il 10% di siero fetale bovino (FBS) inattivato con il calore (57

°C per 30 minuti). Il mezzo è stato completato mediante di antibiotici penicillina streptomicina in soluzione 1% (Euroclone).

Il mezzo veniva cambiato 2-3 volte a settimana .

Le cellule MSK sono state mantenute in coltura fino al passaggio (p) 5; le cellule di controllo sono state espanse fino al p4.

Si definisce per “passaggio” il distacco, mediante enzimi proteolitici (per esempio la tripsina), delle cellule che crescono adese ad un supporto di coltura (nel nostro caso la plastica delle fiasche): p0 è il passaggio che caratterizza l’uscita delle cellule dall’espianto di tessuto; p1 è il primo distacco delle cellule dal supporto con successiva crescita in un altro supporto (nuova fiasca). Ogni volta che le cellule subiscono il distacco dal supporto, il numero di passaggi aumenta progressivamente.

Le cellule sono state tripsinizzate quando raggiungevano la sub-confluenza, utilizzando una soluzione di tripsina 0.05% ed EDTA 0.02% (Euroclone). L’azione della tripsina è stata neutralizzata mediante l’aggiunta di mezzo (10% FBS). Il numero delle cellule è stato determinato, al microscopio, mediante conta delle cellule per mezzo di un ematocritometro. La vitalità cellulare è stata valutata per esclusione del colorante, entro i primi tre minuti dall’aggiunta del 10% di Trypan blue.

Dalla sospensione cellulare ottenuta:

- una parte delle cellule è stata utilizzata per il mantenimento della coltura cellulare (circa 5×10^5 cellule/fiasca) e quindi espanse in fiasche da 75 cm²;
- una parte è stata seminata in chamberlsides da otto camerette forniti dalla Lab-Tek (Nalge Nunc International) (circa $2,5 \times 10^4$ cellule/pozzetto). Dopo 3 giorni i vetrini venivano sciacquati per un due volte con PBS senza Ca²⁺ e Mg²⁺, fissati in acetone per 5 secondi e stoccati a -20 °C fino all’utilizzo per le diverse analisi;

- un'aliquota delle cellule tripsinizzate (circa 1×10^6 cellule) è stata risospesa in mezzo di congelamento costituito da 70% FBS, 20 % RPMI 1640 w/ stable L-Glutamine e 10% dimetilsolfossido, e stoccata in azoto liquido.
- infine una parte è stata utilizzata per l'estrazione dell'RNA (circa 5×10^5 cellule) mediante l'utilizzo del kit commerciale RNeasy Micro Handbook (Qiagen).

Questa procedura è stata eseguita ad ogni tripsinizzazione.

3.1.2 Stimolazione osteogenica

Le cellule di controllo sono state indotte a differenziarsi verso il lineage osteogenico mediante stimolazione con dexametazone 10^{-8} (Sigma-Aldrich), β -glicerolfosfato 10 mM (Sigma-Aldrich) e acido ascorbico 50 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma-Aldrich), aggiunti direttamente al mezzo di coltura standard (10% FBS).

Il dexametazone è dimostrato stimolare la differenziazione osteogenica., l'acido ascorbico è richiesto per assemblare il collagene mentre il β -glicerolfosfato viene aggiunto come sorgente esogena di fosfato che mineralizza il collagene (Karp et al, 2005).

Una volta raggiunta la confluenza, le cellule sono state pre-trattate con dexametazone per 3 giorni, al termine dei quali il mezzo è stato rimosso e ripristinato con mezzo fresco contenente β -glicerolfosfato e acido ascorbico, secondo il protocollo utilizzato da Kumar in un esperimento di induzione osteogenica su cellule dei dotti collettori (Kumar et al, 2006).

Ogni 2-3 giorni una parte del mezzo veniva rimossa e ripristinata con mezzo fresco di calcificazione fino a 28 giorni.

3.2 Biologia Molecolare

3.2.1 Estrazione dell'RNA

L'estrazione dell'RNA dalla cellule è stata effettuata mediante il protocollo del kit commerciale RNeasy Micro Handbook (Qiagen).

Questo metodo di estrazione prevede l'uso di membrane di silice in formato *spin-column* alle quali gli acidi nucleici, in presenza di sali caotropici, si legano in modo specifico.

L'RNA totale è stato estratto sia dal prelievo biotico della papilla MSK che da quello della papilla di controllo.

Lo stesso procedimento è stato seguito anche per estrarre l'RNA dalle cellule MSK e da quelle di controllo, ad ogni passaggio della coltura primaria.

L'RNeasy Micro Handbook prevede un numero di cellule non superiore a 5×10^5 .

Il buffer di lisi contenente guanidina-isotiocianato ed etanolo viene aggiunto alla sospensione di cellule dopo tripsinizzazione, per creare le condizioni che promuovono il legame selettivo dell'RNA con la membrana. Il campione viene quindi trasferito nella colonnina e mediante l'uso di buffer e centrifugazioni l'RNA si lega alla membrana. Durante questi passaggi anche il DNA può legarsi erroneamente alla membrana per cui per rimuoverne eventuali tracce si procede con la sua digestione tramite l'uso dell'enzima DNase RNase free nella *spin-column*. DNasi ed eventuali contaminanti (sali, proteine) vengono rimossi mediante una serie di lavaggi in buffer e l'RNA eluito in H₂O RNasi-free (30 µl).

L'RNA estratto viene conservato a -80 °C fino al momento dell'utilizzo.

3.2.2 Quantificazione dell'RNA

I campioni di RNA totale così ottenuti sono stati quantificati utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop ND-1000.

Il NanoDrop è uno Spettrofotometro UV-Visibile capace di lavorare con microvolumi di campione, fino a 1 μ l. Sfrutta una tecnologia, basata sulla tensione superficiale che piccoli volumi di liquidi esercitano quando si trovano collocati tra due superfici vicine. In tal modo una goccia di campione posizionata sull'apposita piastra di lettura crea una colonna di liquido a diretto contatto con due fibre ottiche, e può essere analizzata in modo semplice e veloce.

Per ogni campione di RNA eluito in H₂O RNasi-free 1 μ l è stato utilizzato per la lettura al Nanodrop,.

La purezza dell'RNA è assicurata da un rapporto spettrofotometrico $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$, dove A_{260} è l'assorbanza in nanometri relativa agli acidi nucleici, mentre A_{280} (l'assorbanza negli UV) è indice della contaminazione proteica.

I campioni estratti avevano una purezza dell'ordine di 1,7-1,9.

3.2.3 Verifica dell'integrità dell'RNA

L'integrità è stata valutata mediante elettroforesi capillare su chip in Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology), osservando visivamente le due distinte bande ribosomiali 28S e 18S e considerando il rapporto 28S/18S (che dovrebbe essere approssimamente 2). La quantità di RNA totale caricata per ogni campione nel chip è stato di 1 μ l.

La popolazione di RNA cellulari è molto eterogenea: l'RNA codificante rappresenta circa il 4% e comprende le molecole di RNA messaggero citoplasmatico e i precursori nucleari (hnRNA: heterogeneous nuclear RNA), mentre circa il 96% è costituito da RNA non codificante. Quest'ultimo è rappresentato per l'80% da RNA ribosomiali (28S, 18S, 5S) con i relativi

precursori e per il resto da RNA transfer (tRNA) e altri piccoli RNA a localizzazione nucleare, nucleolare o citoplasmatica (rispettivamente snRNA, snoRNA, scRNA). Le preparazioni di RNA totale sono quindi composte prevalentemente di RNA ribosomiali, ecco perché per vederne l'integrità ci basiamo sull'analisi degli RNA ribosomiali 28S e 18S.

3.2.4 RT (retrotrascrizione)

In seguito al controllo e alla quantificazione dell'RNA si procede con una reazione di RT/PCR. La reazione di retrotrascrizione prevede la sintesi di DNA copia (cDNA) a partire da stampi di RNA.

120 ng di RNA totale estratto da tessuto e 100 ng di RNA totale estratto da cellule sono stati retrotrascritti in un volume finale di 20 μ l. La miscela di reazione è costituita da 4 μ l $MgCl_2$ 25 mM (Sigma), 2 μ l dNTPs 10 μ M (Roche), 1 μ l esameri random 50 μ M (Applied Biosystem), 1 μ l inibitore delle RNAsi 20 U/ μ l (Applied Biosystem) e 1 μ l trascrittasi inversa MuLV 50 U/ μ l (Applied Biosystem), 2 μ l Buffer 10X (Sigma) costituito da KCl 50 mM e Tris-HCl 10 mM (pH 8.3) e acqua milliQ per arrivare al volume finale. La trascrittasi inversa MuLV è una DNA polimerasi che utilizza RNA a singolo filamento come stampo, in presenza di un primer, per sintetizzare un filamento complementare di DNA (cDNA).

Il protocollo di RT prevede, previa incubazione della miscela di reazione a temperatura ambiente per 10 minuti per favorire l'estensione dei primers esameri da parte della trascrittasi inversa, un ciclo unico di tre step, eseguito nel termociclatore iCycler (BioRad): incubazione a 42 °C per 30 minuti, denaturazione a 99 °C per 5 minuti ed infine raffreddamento a 5 °C per 5 minuti.

Il cDNA così ottenuto viene denaturato a 95 °C per 5 minuti prima di venire utilizzato nelle reazioni di PCR e Real Time PCR.

3.2.5 PCR (reazione a catena della Polimerasi)

Un'aliquota di 1 µl della reazione di retrotrascrizione viene utilizzata per amplificare i geni di interesse. La reazione viene condotta in un volume finale di 25 µl contenente: 0,4 µl dNTPs 10 µM; 2,4 µl buffer di reazione 10X costituito da KCl 50 mM e Tris-HCl 10 mM (pH 8.3); MgCl₂ 25 mM (Sigma) a molarità variabile a seconda dei primers utilizzati (come riportato in **tabella 1**); 0,5 µl primer forward 20 µM; 0,5 µl primer reverse 20 µM; 0,4 µl JumpStart Taq DNA Polimerasi 2,5 U/µl (Sigma) e acqua milliQ per arrivare al volume finale.

Nella **tabella 1** sono riportate le coppie di primers dei geni analizzati con le relative informazioni sulla sequenza, la temperatura di *annealing*, il numero di cicli di amplificazione.

Tabella 1. Elenco dei primers.

Real Time PCR				
<i>Primer</i>	<i>Sequenza</i>	<i>T_A</i>	<i>[MgCl₂]</i>	<i>Ditta</i>
G3PDH <i>F_w</i> G3PDH <i>R_w</i>	GAAGGTGAAGGTCGGAGT TGGCAACAATATCCACTTTACCA	60 °C	3 mM	MVG
Osteonectina <i>F_w</i> Osteonectina <i>R_w</i>	CCTGGATCTTCTTTCTCCTTTGC ATCAGGCAGGGCTTCTTGCT	60 °C	2 mM	Eurogentec
Osteopontina <i>F_w</i> Osteopontina <i>R_w</i>	CGAGACCTGACATCCAGTACC GATGGCCTTGTATGCACCATTC	62 °C	3 mM	Eurogentec
RT PCR comparativa				

<i>Primer</i>	<i>Sequenza</i>	<i>T_A e cicli</i>	<i>[MgCl₂]</i>	<i>Ditta</i>
G3PDH <i>F_w</i> G3PDH <i>R_w</i>	TCCACCACCCTGTTGCTGTA ACCACAGTCCATGCCATCAC	60 °C 30 cicli	1,5 mM	MVG
Cbfa1 <i>F_w</i> Cbfa1 <i>R_w</i>	CCTCTGACTTCTGCCTCTGG TATGGAGTGCTGCTGGTCTG	60 °C 40 cicli	1 mM	Eurogentec
Oct4 <i>F_w</i> Oct4 <i>R_w</i>	GACAACAATGAAAATCTTCAGGAGA TTCTGGCGCCGGTTACAGAACCA	60 °C 34 cicli	1,5 mM	Eurogentec
GDNG <i>F_w</i> GDNF <i>R_w</i>	GGCTATGAAACCAAGGAGGAAGTCTG TCCACCACCCTGTTGCTGTA	60 °C 30 cicli	1,5 mM	MVG

Il profilo di reazione è lo stesso per ciascuna coppia di primer e consiste in: 94 °C per 45 secondi (denaturazione), temperatura di *annealing* per 45 secondi (ibridizione), 72 °C per 1 minuto (estensione).

La reazione è stata eseguita nel termociclatore iCycler (BioRad).

L'avvenuta reazione è stata controllata per ogni campione mediante elettroforesi capillare in Agilent 2100 Bioanalyzer.

3.2.6 RT PCR comparativa

Per lo studio di espressione di Cbfa1, GDNF e Oct4 è stata utilizzata la PCR comparativa per cinetica, usando come controllo interno la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (G3PDH), che è un *housekeeping gene*, ossia un gene non soggetto a modulazioni dell'espressione. Il numero di cicli per ciascun gene è stato selezionato all'interno della fase esponenziale di amplificazione. Solo in questa fase, infatti, esiste un rapporto proporzionale tra il prodotto di amplificazione e la quantità di cDNA (e quindi di mRNA) di partenza, a differenza della fase di plateau della reazione di PCR, raggiunta oltre un certo numero di cicli, che è indipendente dalla quantità iniziale di template.

Gli amplificati sono stati controllati e quantificati in Agilent 2100 Bioanalyzer.

La quantità dei geni target è stata espressa come valore relativo, calcolato come rapporto tra le concentrazioni (ng/μl) del gene di interesse e del gene housekeeping.

3.2.7 Real Time PCR

La Real Time PCR, denominata anche PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale, è un metodo di amplificazione e quantificazione simultanee del DNA.

Per effettuare questi tipo di analisi è prima necessario preparare curve standard di calibrazione, mediante l'amplificazione e la successiva purificazione dei geni di interesse.

Il campione viene amplificato secondo la reazione di PCR descritta precedentemente e purificato mediante l'utilizzo di MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen). L'amplificato purificato, diluito 1:23, viene letto allo spettrofotometro. La lettura dell'assorbanza a 260 nm viene utilizzata per calcolare la concentrazione del campione che viene espressa in numero di copie/μl mediante la seguente formula:

$$\frac{6,023E23 \times 5E-5 \times OD260 \times 1E3 \times 23,3}{\text{bp amplificato} \times 6,50 \times 10^2}$$

La curva standard viene preparata mediante diluizioni seriali 1:10 a partire dalla concentrazione $10E8$ copie/ μ l del campione.

L'analisi di Real Time PCR quantitativa è stata eseguita in ICycler (BioRad).

La miscela di reazione è costituita da 0,5 μ l curva standard; 0,375 μ l primer forward 20 μ M; 0,5 μ l primer reverse 20 μ M; 0,1 μ l SYBR Green (Sigma); 0,5 μ l dNTPs 10 μ M; 2,5 μ l buffer di reazione 10X costituito da KCl 50 mM e Tris-HCl 10 mM (pH 8.3); $MgCl_2$ 25 mM (Sigma) a molarità variabile a seconda dei primers utilizzati (come riportato in **tabella 1**) e acqua milliQ per arrivare al volume finale.

I campioni vengono così aliquotati in piastre da 96 pozzetti (PCR plates 96 wells BioRad). Per ciascuna piastra vengono utilizzati dei controlli negativi per escludere la presenza di eventuali contaminanti nei componenti di reazione.

I templati vengono amplificati secondo il seguente profilo di reazione: 95 °C per 5 minuti (denaturazione iniziale), n cicli di amplificazione che prevedono 94 °C per 30 secondi (denaturazione) e temperatura di annealing per 30 secondi (ibridazione).

Il numero di cicli viene scelto in base all'espressione basale del gene di interesse.

Per ogni campione viene eseguita una curva di melting che fornisce un'indicazione della purezza del prodotto di reazione e rivela l'eventuale presenza di dimeri dei primers.

L'espressione del gene di interesse viene normalmente normalizzata utilizzando il gene housekeeping G3PDH.

3.3 Analisi statistica

I dati grezzi per i livelli di espressione dei geni ottenuti da ogni esperimento in RT PCR (per ogni campione tre repliche) sono stati sottoposti al Test T di Student, considerando statisticamente significativo $p \leq 0,05$.

3.4 Immunoistochimica

3.4.1 Tessuto di papilla renale

Per le analisi istologiche i campioni prelevati dal tessuto sono stati inclusi in paraffina e preparati dei vetrini con sezioni di campione dell'ordine di 5 μm .

La paraffina è insolubile in acqua. L'inclusione è pertanto preceduta dalla disidratazione mediante serie crescente degli alcoli fino all'alcol assoluto e successivamente dall'immersione del tessuto nel solvente del materiale di inclusione utilizzato (xilolo) così da permetterne l'impregnazione. L'inclusione in paraffina viene effettuata in stufa a 50-60 °C. A tale temperatura lo xilolo evapora e al suo posto entra la paraffina liquida, che viene successivamente fatta solidificare per raffreddamento a temperatura ambiente.

Per la colorazione occorre rimuovere dalle sezioni il materiale di inclusione con xilolo e reidratare le fette mediante passaggio del vetrino nella serie discendenti degli alcoli (alcol 100, 95, 75, 50) e infine in acqua distillata. A questo punto è possibile colorare con il colorante desiderato.

Le sezioni incluse in paraffina sono state utilizzate per esami istopatologici mediante colorazione con ematossilina eosina e colorazione PAS.

La colorazione con ematossilina eosina colora in blu violaceo, grazie all'ematossilina, le componenti cellulari cariche negativamente come gli acidi nucleici (nuclei) e in rosso rosato, tramite l'eosina, i componenti carichi

positivamente come molte proteine cellulari, le proteine mitocondriali e le fibre collagene.

La reazione PAS (acido periodico - reattivo di Schiff) è una reazione istochimica che evidenzia, colorando in rosso magenta, componenti tissutali contraddistinti da gruppi glicolici o aminoidrossilici adiacenti. I componenti maggiormente evidenziati da questa tecnica sono quelli glucidici del glicocalice e della membrana basale, mucopolisaccaridi neutri, mucoproteine, glicoproteine, glicolipidi e fosfolipidi.

3.4.2 Cellule papillari in coltura

Le cellule per l'analisi immunocitochimica sono state seminate in chamberslides da 8 camerette. Dopo 3 giorni di coltura in condizioni standard le cellule sono state sciacquate con PBS senza Ca^{2+} e Mg^{2+} , fissate con acetone e stoccate a -20°C .

Nella **tabella 2** sono riportate le specifiche degli anticorpi utilizzati.

Tabella 1. Elenco degli anticorpi.

Anticorpi monoclonali		
<i>Nome</i>	<i>Diluizione</i>	<i>Ditta</i>
Vimentina	1:20	Dako
Citocheratina	prediluito	Nova Castra Laboratories
αSMA	1:100	Chemicon
Desmina	1:50	Medac
E-caderina	1:100	Takara

Laminina	1:50	Medac
Collagene di tipo I	1:100	Chemicon
Osteocalcina	10 ug/ml	QED Bioscience Inc
3G5	1:1	Per gentile concessione del Dott.re Rattazzi (Dip.Medicina Clinica e Sperimentale)
Anticorpi policlonali		
<i>Nome</i>	<i>Diluizione</i>	<i>Ditta</i>
Fattore di von Willebrand	1:100	Dako
Pax-2	1:25	Zymed
CD133	1:5	MACS
ZO1	1:20	SantaCruz
Osteonectina	1:1000	Chemicon
Osteopontina	1:5000	Chemicon

L'analisi immunocitochimica è stata condotta utilizzando il metodo di immunoperossidasi indiretta; il segnale è stato rivelato utilizzando come substrato della perossidasi la diaminobenzidina (DAB).

Prima dell'inizio della colorazione le cellule sono state scongelate per circa un minuto e immerse subito in PBS per 15 minuti a temperatura ambiente (T_A).

I vetrini sono stati quindi trattati con H_2O_2 2% (500 μ l/pozzetto) per 15 minuti a T_A in una cameretta umida per rimuovere le perossidasi endogene e successivamente sciacquati con PBS per 5 minuti. Il blocco dei siti aspecifici è stato eseguito mediante incubazione per 30 minuti a T_A in cameretta umida con BSA per gli anticorpi primari monoclonali o siero normale di capra o coniglio per gli anticorpi primari policlonali.

Le cellule sono state quindi incubate *overnight* a 4°C in presenza degli anticorpi primari alle diluizioni riportate in **tabella 2**.

Dopo ambientazione a T_A per 30 minuti e lavaggi con PBS per 5 minuti, le cellule esposte agli anticorpi primari monoclonali sono state incubate per 30 minuti a T_A

con immunoglobuline di coniglio anti-topo (Dako) e per 30 minuti a T_A con il complesso perossidasi anti-perossidasi di topo (PAP; Dako); invece per la rivelazione degli anticorpi policlonali primari è stato utilizzato il sistema Envision, incubando per 30 minuti a T_A , secondo il protocollo fornito dalla ditta (Dako).

Dopo risciacqui in PBS le cellule sono state incubate con la DAB in soluzione (Dako) per 5 minuti, colorate con ematossilina e montate in Eukitt per l'osservazione al microscopio ottico. L'osservazione veniva effettuata in tre campi e il numero delle cellule positive rilevato contando un numero complessivo di 100 cellule per campo, dove possibile.

3.5 Scanning Electron Microscope (SEM) ed Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM)

Il microscopio elettronico è un tipo di microscopio che non sfrutta la luce come sorgente di radiazioni ma un fascio di elettroni.

Nel microscopio elettronico a scansione (SEM - Scanning Electron Microscope) il preparato, adeguatamente preparato, viene attraversato da un fascio molto sottile di elettroni, detti primari, che viene focalizzato su una piccola area e deflesso lungo traiettorie che formano un tracciato che esplora tutta l'area. Dal campione vengono emesse numerose particelle fra le quali gli elettroni secondari i quali vengono raccolti da uno speciale rivelatore e convertiti in impulsi elettrici. Il segnale degli elettroni secondari viene inviato ad un monitor fornendo un ingrandimento finale dell'oggetto. Ogni punto del campione analizzato corrisponde a un pixel dello schermo televisivo, cosicché, man mano che il fascio elettronico scorre sul campione, sullo schermo si costruisce un'immagine completa.

Il potere di risoluzione di un normale microscopio elettronico SEM si aggira intorno ai 5 nm. L'immagine SEM ha un'elevata profondità di campo. Il campione è sotto alto vuoto (10⁻⁵ Torr) poiché l'aria impedirebbe la produzione del fascio (data la bassa energia degli elettroni), e deve essere conduttivo (oppure metallizzato), altrimenti produce cariche elettrostatiche che disturbano la rivelazione dei secondari.

I campioni vengono trattati inizialmente con una soluzione di gluteraldeide 3% in un tampone fosfato e in seguito disidratati mediante una serie crescenti di alcoli. I campioni in alcol assoluto sono poi posti all'interno dello strumento fino al raggiungimento del *critical point* che permette il passaggio da liquido a gas. L'alcol assoluto viene sostituito con CO₂ liquido del *critical point*, il campione seccato, colorato mediante l'utilizzo di metalli (solitamente l'oro) e osservato.

Il microscopio ESEM (Environmental Scanning Electron Microscope) si presenta come una naturale evoluzione della microscopia elettronica a scansione dal punto di vista elettronico ed informatico che consente di superare il vincolo di operare in condizioni di vuoto elevato imposto dai microscopi elettronici convenzionali.

Il diverso funzionamento si basa sull'esistenza di una colonna che può lavorare, oltre che in modalità convenzionale (vuoto elevato in tutta la colonna), anche in modalità controllata di vuoto differenziale, elevato nella zona della colonna vera e propria, minore in prossimità del diaframma finale e decisamente più basso nella camera vera e propria ove viene posto il campione, pur mantenendo la risoluzione del SEM convenzionale.

L'analisi del tessuto biotico (preparati in paraffina) è stata effettuata mediante microscopia ESEM.

I campioni sono stati analizzati presso il centro CUGAS dell'Università di Padova.

3.6 Saggio della fosfatasi alcalina

Le fosfatasi sono una classe di enzimi idrolasi che catalizzano la rimozione di gruppi fosfato. La fosfatasi alcalina catalizza l'idrolisi, in ambiente alcalino, del p-nitrofenilfosfato in p-nitrofenolo e fosfato.

La sua attività enzimatica è stata rilevata nelle cellule seminate nelle chamberslides (e fissate mediante acetone) mediante il kit commerciale fornito dalla Sigma-Aldrich.

3.7 Colorazione con il reagente di Von Kossa

Questa metodica è stata utilizzata per rilevare la deposizione di minerale nel tessuto biotico e nelle cellule in coltura. Il reagente di Von Kossa è una soluzione al 5% di nitrato d'argento che colora le zone mineralizzate in nero.

La colorazione nera è dovuta alla deposizione dell'argento in forma metallica che si va a sostituire al calcio ridotto dalla luce forte. Ciò che ci si aspetta da questa colorazione sono i depositi di calcio in nero o marrone scuro e i nuclei delle cellule in rosso.

Inizialmente le sezioni vengono deparaffinate e portate all'acqua. Si eseguono diversi lavaggi in acqua distillata. Le sezioni vengono in seguito incubate in una soluzione di nitrato d'argento 5% (Sigma-Aldrich) ed esposte per circa un'ora alla luce solare all'interno di una vaschetta trasparente. Seguono diversi lavaggi in acqua distillata. Per rimuovere l'argento che non si è legato si incubano i preparati in sodio tiosolfato 5% (Sigma-Aldrich) per 5 minuti. Si sciacqua abbondantemente prima con acqua di fonte e successivamente con quella

distillata. La controcolorazione viene effettuata mediante colorazione con soluzione di rosso neutro (Sigma-Aldrich) per 1 minuto. Si lavano i preparati in acqua distillata e li si disidrata. Infine i preparati vengono montati in Eukitt e guardati mediante microscopio ottico.

3.8 Analisi cellulare mediante tecnologia FACS

La citometria di flusso rappresenta una sofisticata tecnica di separazione cellulare che prevede la marcatura di cellule specifiche con anticorpi accoppiati ad una sostanza fluorescente. Le cellule marcate vengono quindi separate da quelle non marcate in un separatore cellulare attivato dalla fluorescenza (fluorescence activated cell sorter, FACS). In questo strumento, singole cellule che viaggiano una dopo l'altra in un flusso sottile vengono passate attraverso un raggio laser che serve per misurarne la fluorescenza. Goccioline contenenti una sola cellula ricevono automaticamente nel momento in cui si formano una carica positiva o negativa, a seconda che contengano o no una cellula fluorescente, e vengono deviate poi da un potente campo elettrico nel contenitore appropriato secondo la loro carica. Il citofluorimetro a flusso può separare una cellula che presenti uno specifico marcatore di superficie da migliaia di altre che non lo possiedono. Queste macchine possono selezionare 1 cellula su 1000 e dividere circa 5000 cellule al secondo.

Le cellule MSK al p3 di due fiasche confluenti sono state tripsinizzate e analizzate per i seguenti marcatori: CD34, CD117, HLA-DR e citocheratine intracitoplasmatiche.

CD34 è una glicoproteina integrale di membrana, la cui struttura suggerisce un ruolo nell'adesione cellulare, probabilmente nell'adesione dei progenitori e delle cellule staminali alle cellule stromali. L'espressione del CD34 è indice di fenotipo

immaturo; il compartimento CD34+, infatti che costituisce solo una piccola frazione del tessuto ematopoietico, comprende cellule a vari stadi di differenziazione, compreso un piccolo gruppo di cellule staminali quiescenti con capacità di autorinnovarsi. Le cellule che esprimono CD34 si trovano nel cordone ombelicale e nel midollo osseo come cellule ematopoietiche, cellule progenitrici endoteliali, cellule endoteliali dei vasi sanguigni, etc.

CD117, conosciuto anche come c-kit, è una glicoproteina integrale di membrana codificata dal proto-oncogene ckit. La molecola CD117 appartiene alla famiglia dei recettori di classe III per le tirosinchinasi. E' espressa sulle cellule staminali ematopoietiche ed è coinvolta nel controllo della proliferazione cellulare. Nell'ambito del sistema ematopoietico, il CD117 è espresso da circa la metà dei precursori CD34+, compresi quelli impegnati nelle linee cellulari eritroide, granulo-monocitica e megacariocitica. Questo antigene è espresso anche da una piccola porzione di cellule progenitrici della linea linfoide, da un piccolo sottogruppo di cellule NK (natural killer cells) quiescenti e da circa il 30% di timociti immaturi.

Il sistema HLA (Human Leucocyte Antigen) è il nome attribuito al maggiore complesso di istocompatibilità (MHC) nell'uomo; esso è composto di tre gruppi di molecole indicate come MHC di classe I, di classe II e di classe III. La regione genomica del MHC di classe II, o regione HLA-D, contiene i geni codificanti per gli antigeni HLA-DR, -DQ e -DP. L'antigene HLA-DR è stato trovato sui linfociti B, su monociti/macrofagi, cellule dendritiche e cellule di Langerhans. Essa è espressa anche su alcuni progenitori emopoietici a vari stadi di differenziazione.

Le citocheratine sono una complessa famiglia di proteine. Negli epiteliumi umani ne esistono più di 20 distinte, che vengono espresse preferenzialmente in modo sito-specifico. Tuttavia l'espressione delle citocheratine non è esclusiva delle cellule

epiteliali e dei loro tumori ma altri tipi cellulari possono coesprimerle, in aggiunta ai filamenti intermedi loro caratteristici.

Lo studio mediante FACS è stato effettuato in collaborazione con il Dott.re Fadini (Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Lo studio svolto durante questo Dottorato si proponeva di verificare la possibilità che cellule della papilla fossero in grado di modificare il loro fenotipo in uno osteoblastico, mediante induzione osteogenica. La dimostrazione che cellule renali della papilla sono in grado di assumere un fenotipo osteoblastico avrebbe suggerito un loro possibile ruolo nello sviluppo della nefrocalcinosi.

L'eccezionale opportunità fornita dall'asportazione di carcinoma renale in una paziente con MSK e mutazione di GDNF ha dato la possibilità di verificare l'ipotesi che cellule della papilla possono differenziare verso la linea osteogenica in una situazione patologica caratterizzata dall'elevato rischio di sviluppare nefrocalcinosi e calcoli renali. La presenza di nefrocalcinosi nel tessuto papillare potrebbe essere la manifestazione di una predisposizione delle cellule renali

residenti a transdifferenziare (nel caso di cellule mature) o a differenziare (nel caso di cellule progenitrici) verso la linea osteogenica in specifiche circostanze.

Sono state allestite colture primarie di cellule papillari renali provenienti da campioni di tessuto ottenuti da biopsia chirurgica durante nefrectomia effettuata in una paziente affetta da MSK e portatrice di una mutazione in eterozigosi di GDNF (cellule MSK) e in una paziente di controllo, di età e sesso comparabili alla paziente con MSK ma senza MSK né nefrolitiasi (cellule di controllo).

In maniera sorprendente, le cellule provenienti dalla papilla MSK hanno manifestato spontaneamente un comportamento particolare con crescita nodulare, che ricordava molto quello dei periciti formanti noduli mineralizzati in coltura. La possibilità di essere di fronte ad un possibile fenomeno di biomineralizzazione attiva spontanea ha richiesto che questo venisse studiato a fondo.

Oggetto di studio di questo Dottorato è stata infatti l'analisi approfondita di questo processo.

4.1 Tessuto bioptico di papilla renale

Le sezioni incluse in paraffina sono state utilizzate per gli esami istopatologici mediante colorazione con ematossilina eosina e colorazione PAS per verificare che i frammenti bioptici prelevati, dai quali sono state ottenute le colture primarie di cellule papillari, appartenessero effettivamente alla regione della papilla e per escludere la presenza di cellule neoplastiche.

Queste analisi hanno confermato che il tessuto bioptico prelevato era papilla ed hanno escluso la presenza di cellule tumorali, sia nel tessuto ottenuto dalla paziente MSK che in quello ottenuto dalla paziente di controllo.

4.1.1 Presenza di depositi calcifici

E' noto come MSK sia una patologia frequentemente associata a nefrocalcinosi. Per questo motivo si è deciso di confermare istologicamente la presenza di calcificazioni nel tessuto prelevato dal paziente affetto da MSK.

La colorazione con il reagente di Von Kossa ha identificato la presenza di depositi granulari di calcio (**figura 11**), aggregati in *clusters*, nell'interstizio in prossimità (ma non alla base) dell'ansa di Henle. Non è stata riscontrata la presenza di cristalli intratubulari. Tranne la presenza dei depositi di calcio, il tubulo interstizio è apparso normale.

L'analisi del tessuto mediante microscopia ESEM (**figura 12**) ha confermato la presenza di concrezioni granulari di calcio a livello interstiziale, che risultavano inoltre contenere un'abbondante quantità di fosfato. Le calcificazioni erano di diverse dimensioni (700 nm-3 μ m) e l'analisi ha inoltre permesso di rilevare una piccola placca di fosfato di calcio dell'ordine di 10-13 μ m (**figura 13**).

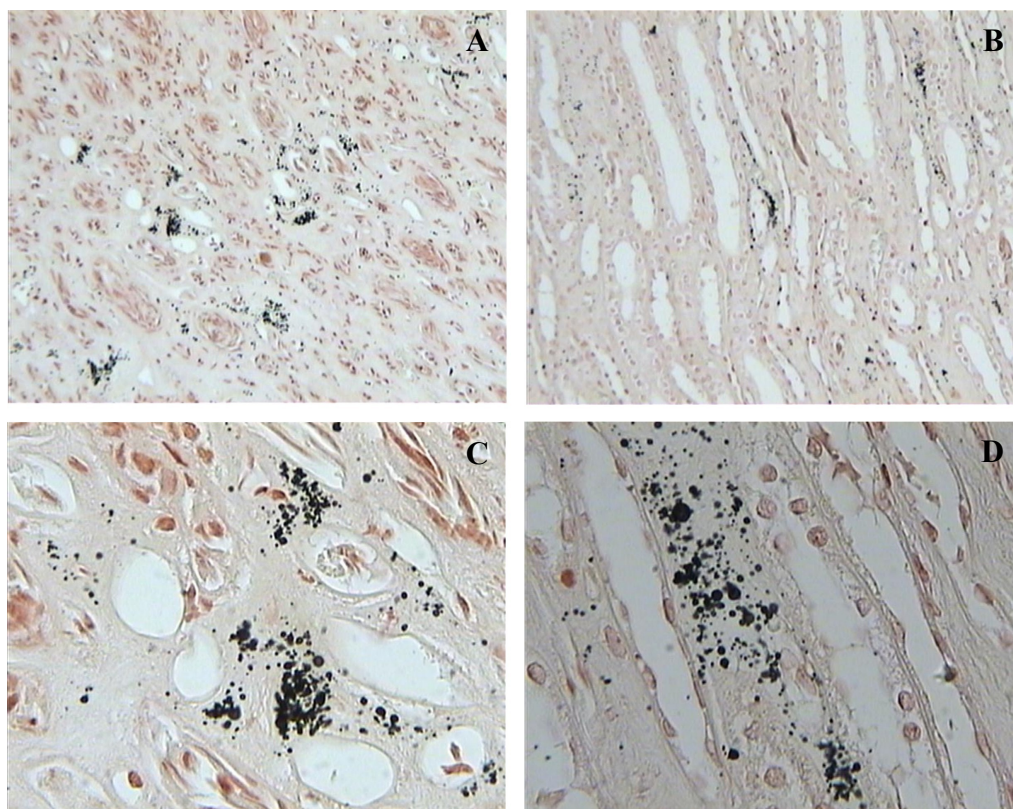


Figura 11. Colorazione con il reagente di Von Kossa del tessuto ottenuto da papilla MSK: deposizione di calcio come granulazioni nere. Ingrandimento 40X (A, B), 100X (C, D).

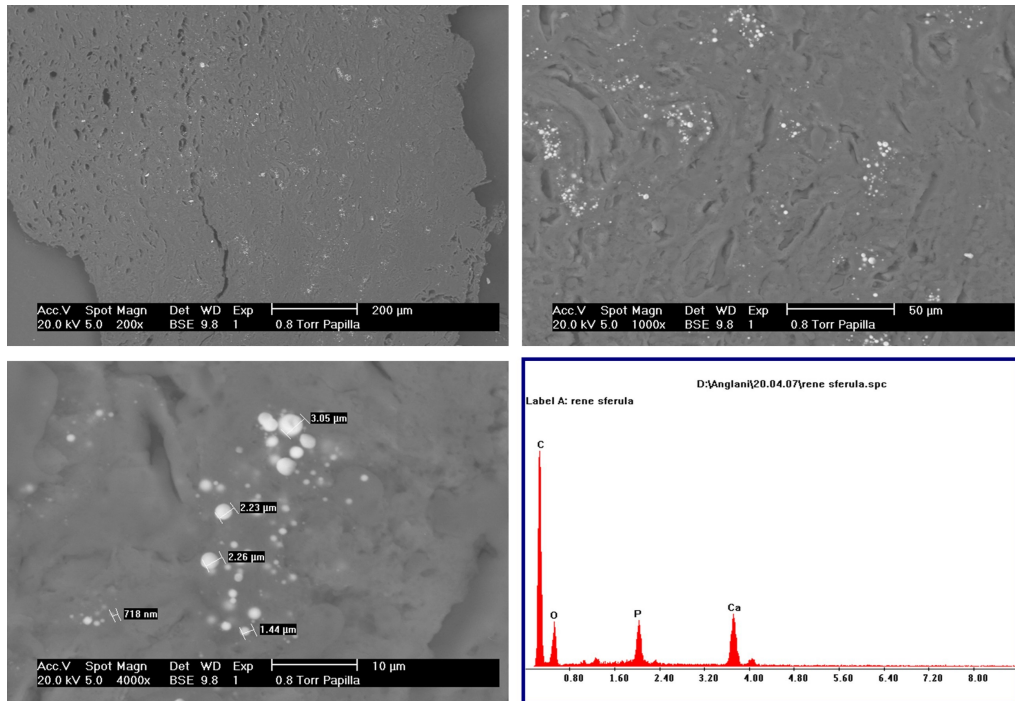


Figura 12. Depositi granulari e spettro della loro composizione in fosfato di calcio nel tessuto papillare MSK valutati mediante ESEM.

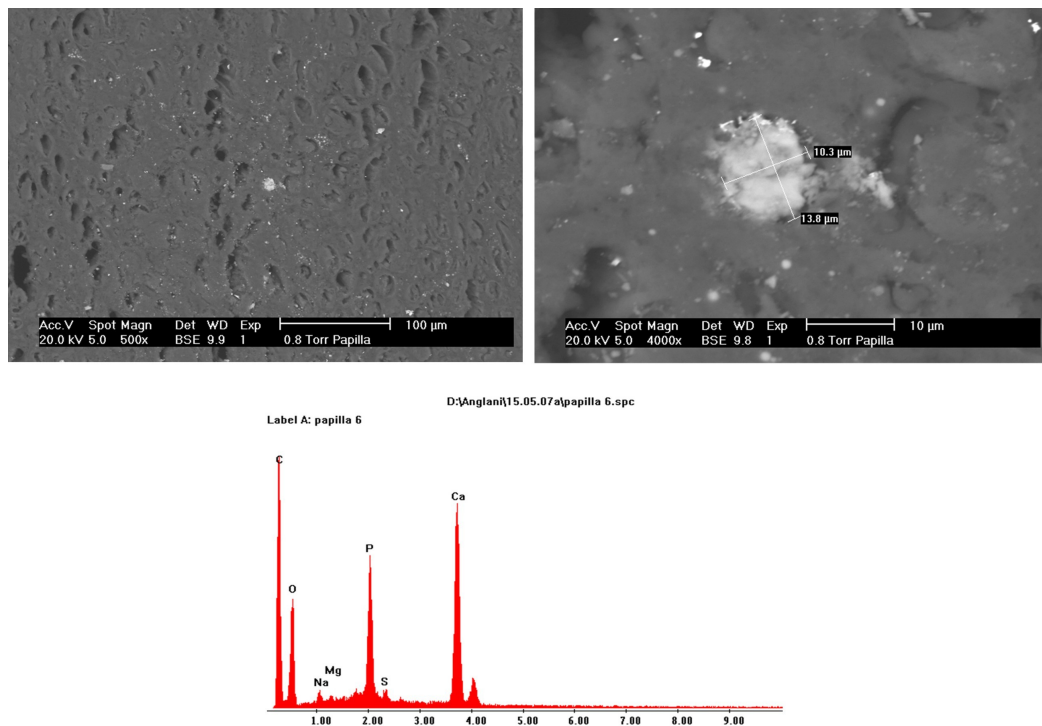


Figura 13. Presenza di una piccola placca di fosfato di calcio nel tessuto papillare MSK valutata mediante ESEM.

4.2 Comportamento particolare delle cellule in coltura

Le cellule MSK dal p0 al p1 presentavano una spiccata eterogeneità cellulare (**figura 14**): erano presenti cellule allungate fibroblasto-simili, cellule con enormi citoplasmi, cellule di tipo epiteliale.

A partire dal passaggio p2 le cellule erano caratterizzate da un'omogeneità di crescita e di morfologia (**figura 15**), quest'ultima simile a quella delle cellule mesenchimali in coltura, e presentavano spontaneamente la tendenza ad organizzarsi in multistrato formando noduli sferici di diverse dimensioni e di diversa trasparenza (da una translucidità dei primi passaggi ad un'opacità quasi nera degli ultimi) (**figura 16**).

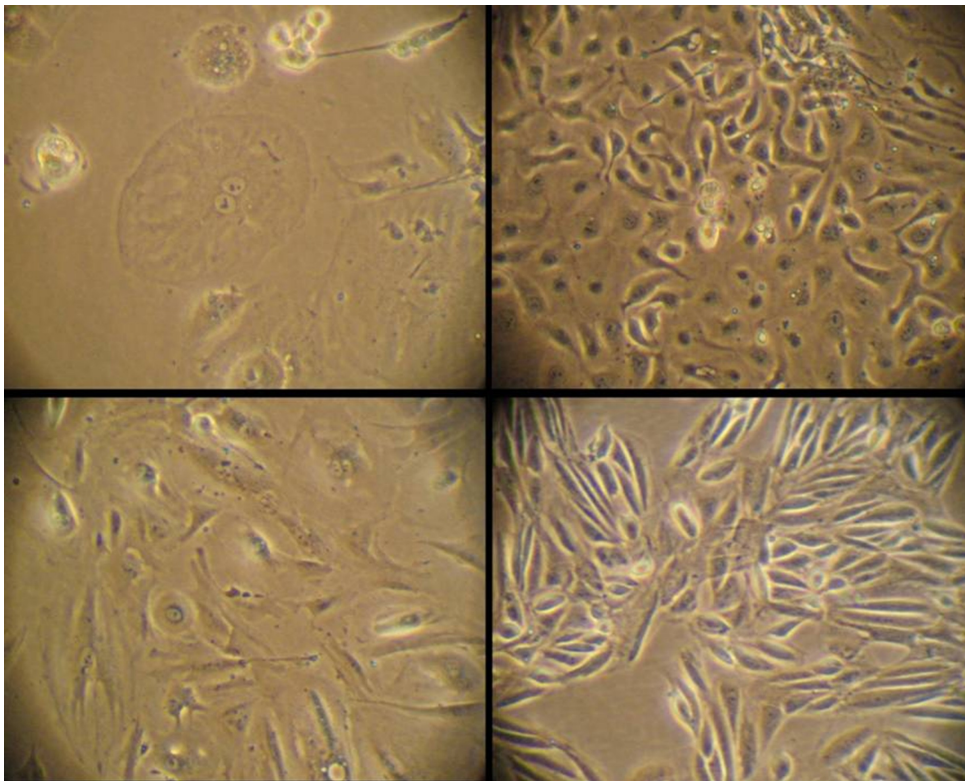


Figura 14. Morfologia eterogenea delle cellule MSK in coltura al passaggio p0 (400X).

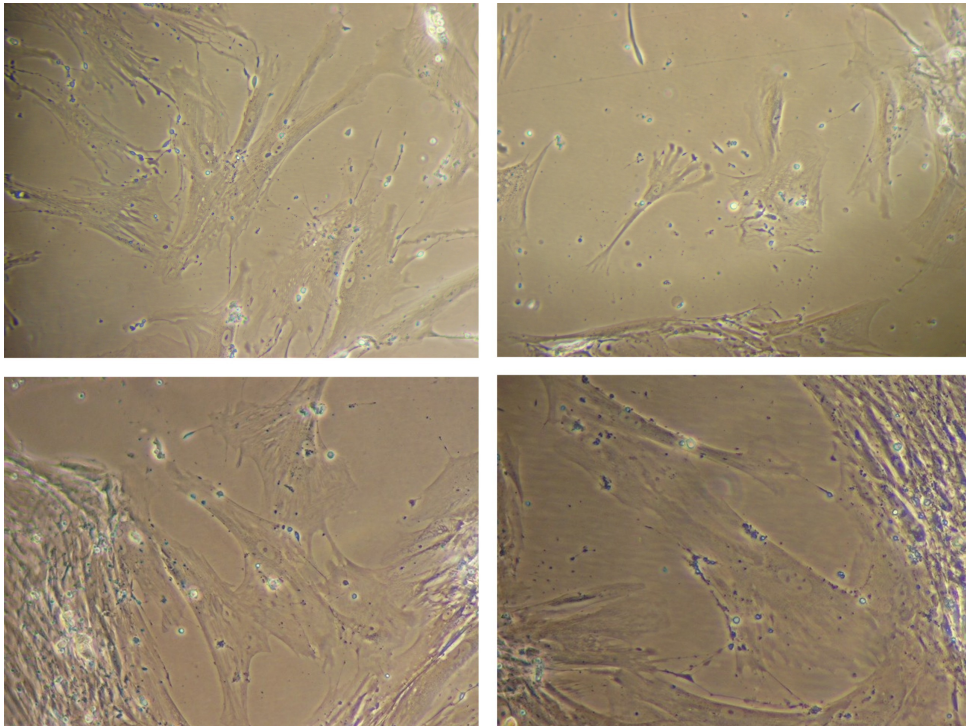


Figura 15. Morfologia simil-mesenchimale delle cellule MSK in coltura a partire dal p2 (200-400X).

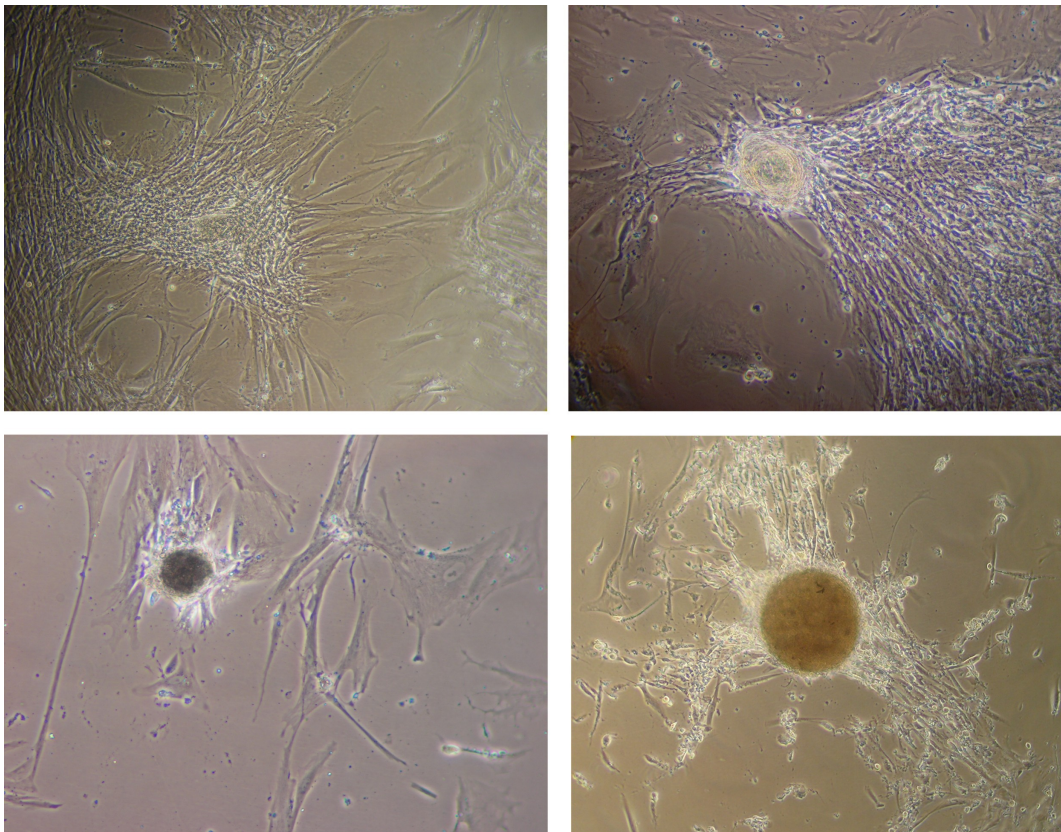


Figura 16. Esempi di crescita nodulare di cellule MSK in coltura (200X).

4.2.1 Caratterizzazione fenotipica delle cellule

Nella papilla si trovano diversi tipi di cellule: cellule tubulari, cellule endoteliali, cellule staminali, periciti.

Per meglio comprendere la natura delle cellule papillari MSK in grado di formare spontaneamente noduli in coltura e' stata condotta un'analisi immunocitochimica (**figure 17, 18, 19**) con marcatori per l'identificazione di cellule endoteliali (von Willebrand), cellule muscolari lisce (α SMA), cellule epiteliali (citocheratina, E-caderina, ZO-1), cellule mesenchimali (vimentina e desmina) e periciti (3G5).

La tipizzazione immunocitochimica al p1 ha confermato l'eterogeneità morfologica evidenziando: positività vicina al 100% per vimentina e citocheratina; positività al 40% per il fattore di von Willebrand e una bassa positività per ZO1, confinata soprattutto nelle zone di contatto tra cellula e cellula; la positività per il marcatore 3G5 era presente in poche cellule; negatività per desmina, E-caderina e α SMA. Questi dati hanno suggerito al p1 la presenza di cellule epiteliali, cellule endoteliali, alcune cellule simili ai periciti e cellule con un fenotipo intermedio (coesprimenti contemporaneamente diversi marcatori).

Questa eterogeneità cellulare era attesa non solo per la natura del tessuto papillare in cui risiedono diversi tipi cellulari ma anche perché, nelle fasi di messa in coltura e durante la coltura stessa, non è stato operato nessun trattamento (filtri, mezzi di crescita selettivi, etc.) per selezionare particolari tipi cellulari (fibroblasti, cellule epiteliali, etc.).

Al p3 le cellule risultavano 100% intensamente positive per vimentina e positive per ZO1 sia nei noduli che nelle cellule. Compariva una positività per α SMA, confinata ai noduli e alle cellule adiacenti, mentre la positività per citocheratina

scompariva, ad eccezione di qualche rara cellula. Desmina si riconfermava totalmente negativa.

La tipizzazione e l'aspetto morfologico delle cellule deponevano per un fenotipo certamente di tipo mesenchimale.

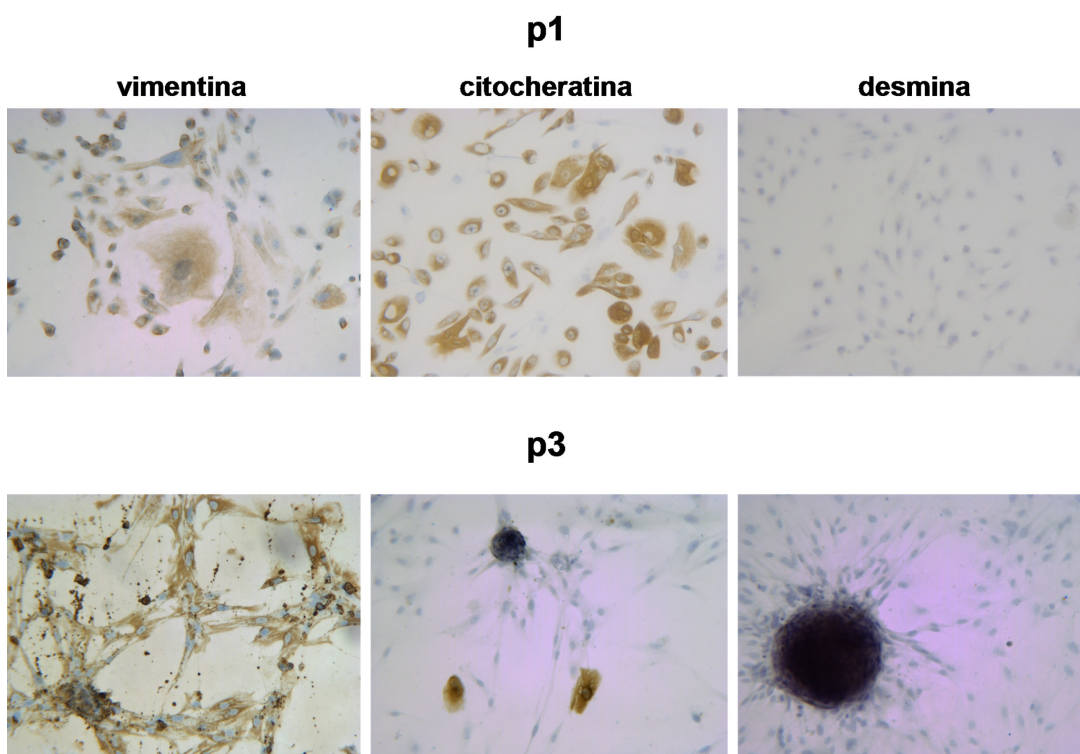


Figura 17. Tipizzazione mediante immunocitochimica delle cellule MSK in coltura per vimentina, citocheratina e desmina. (100X, 200X)

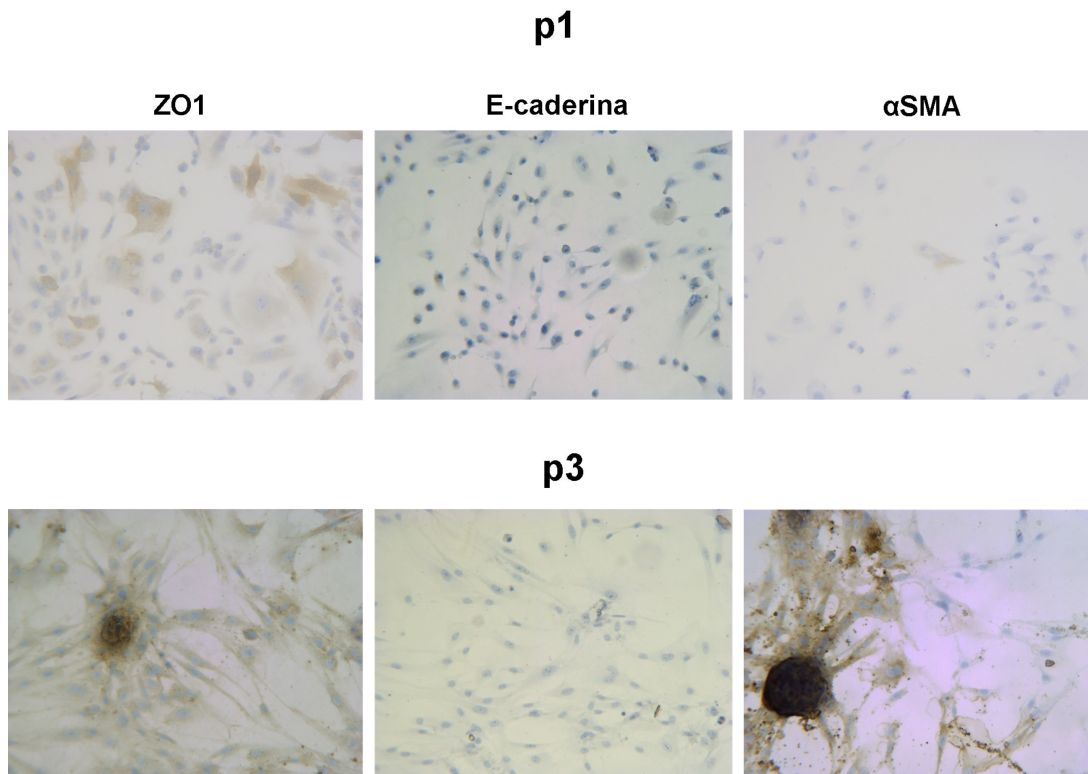


Figura 18. Tipizzazione mediante immunocitochimica delle cellule MSK in coltura per ZO1, E-caderina e α SMA (100X-200X).

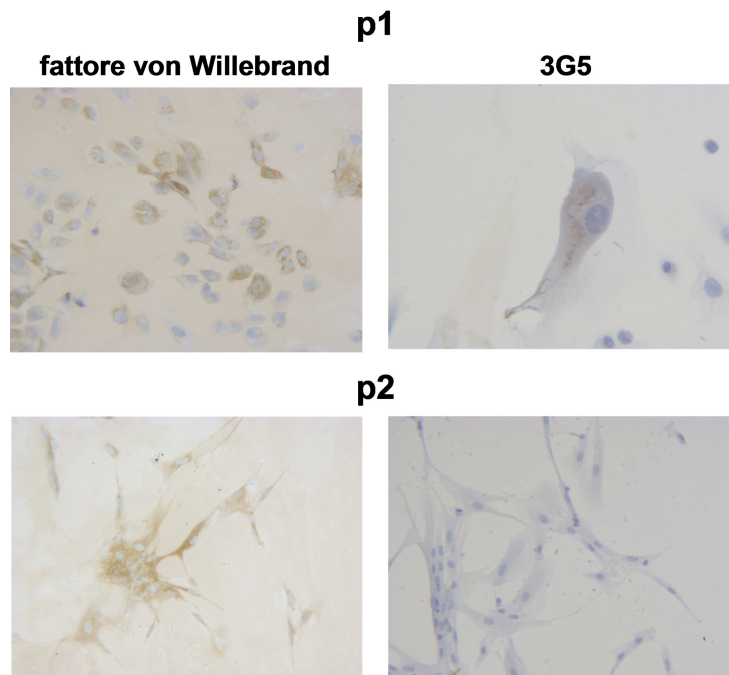


Figura 19. Tipizzazione mediante immunocitochimica delle cellule MSK in coltura per il fattore di von Willebrand e 3G5 (200X-400X).

4.2.2 Queste cellule potrebbero essere cellule staminali della nicchia papillare?

Le cellule staminali renali sono sensibili agli insulti e alle alte concentrazioni di calcio, fosfato e ossalato e potrebbero, come conseguenza, differenziare in senso osteogenico portando alla formazione della placca di Randall.

La presenza al p2 di cellule con fenotipo chiaramente mesenchimale formanti noduli ha suggerito la possibilità che queste cellule potessero essere le cellule staminali formanti neurosfere descritte da Oliver. Si trattava quindi di verificare se si fossero selezionate cellule staminali nelle colture MSK.

E' noto, infatti, che la papilla è una nicchia di cellule staminali adulte. Queste cellule sono multipotenti *in vitro*, capaci di dare origine a più tipi cellulari, e possono crescere formando degli aggregati cellulari sferici o neurosfere (Oliver et al, 2004).

Sono state svolte, pertanto, analisi immunocitochimiche, analisi FACS e RT PCR comparativa per valutare la presenza di marcatori tipici di staminalità nelle cellule ai passaggi p2 e p3.

L'analisi immunocitochimica ha visto lo studio di Pax-2 e di CD133.

E' noto infatti, da studi condotti dal gruppo di ricerca della Bussolati, che le cellule staminali renali sono positive per Pax-2 e CD133 (Bussolati et al, 2005).

CD133 è apparso negativo mentre le cellule risultavano in parte positive a Pax-2 con un segnale tuttavia di tipo citoplasmatico (**figura 20**). Come documentato dalla letteratura, la localizzazione di Pax-2, osservata mediante analisi immunoistochimica, è invece sempre di tipo nucleare (Dressler and Douglass, 1992; Bussolati et al, 2005).

Pax-2 è espresso nel mesenchima indotto e nei primi derivati epiteliali, mentre è rapidamente down-regolato nelle cellule più differenziate derivanti dal

mesenchima e nel rene maturo. Agisce come fattore di trascrizione e la sua espressione è essenziale per lo sviluppo dell'epitelio renale. Risulta, infatti, determinante per la conversione dei progenitori mesenchimali del metanefro in cellule differenziate dell'epitelio tubulare del nefrone (Dressler and Douglass, 1992; Rothenpieler and Dressler, 1993) nel processo di MET dei primi stadi dello sviluppo renale. Recentemente è stato dimostrato come Pax-2 giochi un ruolo nell'induzione e nel mantenimento del *pathway* RET/GDNF, regolando l'espressione di GDNF e attivando ed aumentando l'espressione del recettore RET (Clarke et al, 2006).

Il fatto che le cellule MSK di questo studio presentassero un segnale di tipo citoplasmatico potrebbe suggerire che Pax-2, sintetizzato a livello citoplasmatico, non sia stato in grado di traslocare nel nucleo dove svolge la sua funzione.

Le cellule MSK portavano una mutazione del gene GDNF; la presenza di Pax-2 nel citoplasma potrebbe essere giustificata come una conseguenza di una disregolazione di GDNF causata dalla mutazione che potrebbe aver causato indirettamente la non induzione della differenziazione delle cellule mesenchimali del metanefro, rimaste quindi ad uno stadio immaturo.

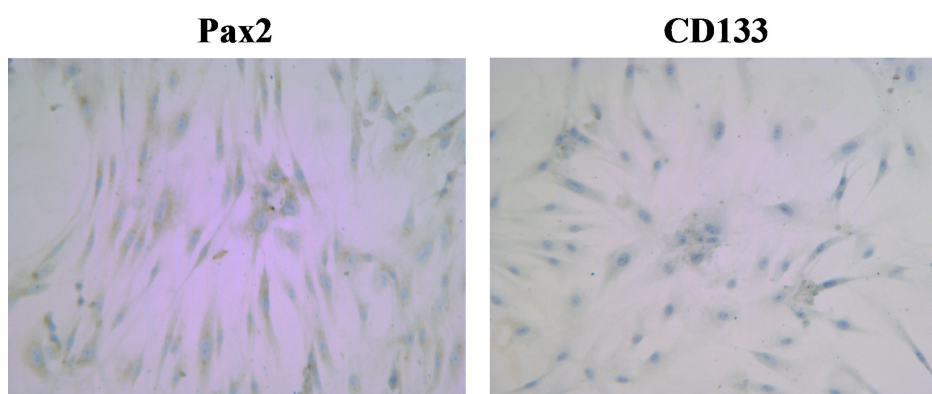


Figura 20. Immunocitochimica su cellule MSK in coltura: marcatori di staminalità (100X).

Mediante la tecnologia FACS sono stati studiati i seguenti marcatori cellulari: CD34, CD117, HLA-DR e citocheratine intracitoplasmatiche che sono risultati negativi (**figura 21**).

Oliver ha trovato che le cellule staminali della nicchia papillare erano negative per CD34 e per CD117 e positive per α SMA e ZO1 (Oliver et al, 2004). Le nostre cellule risultavano quindi avere lo stesso *pattern* per cui se da una parte mediante l'analisi FACS si è potuto escludere che si trattasse di cellule staminali provenienti dal circolo ematopoietico, non è tuttavia da escludere che possano essere state cellule staminali specifiche del rene.

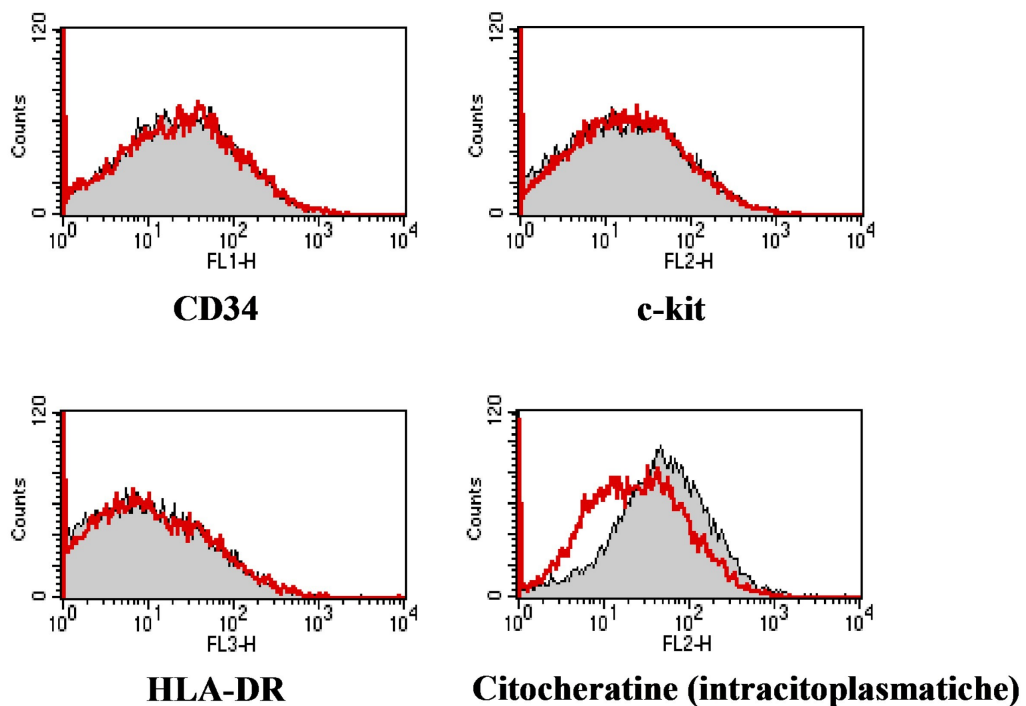


Figura 21. FACS su cellule MSK p3.

L'ultimo marcatore di immaturità studiato, mediante RT PCR comparativa, è stato Oct-4. Oct-4 (octamero-4) è un fattore di trascrizione espresso in cellule embrionali totipotenti e cellule germinali, il cui compito è quello di regolare l'espressione genica e mantenere l'identità delle cellule staminali. Se viene disattivato, la cellula comincia immediatamente a differenziarsi. Reprime un gruppo di geni importanti per la generazione di cellule specializzate e necessari all'embrione per svilupparsi. Quando l'embrione comincia a svilupparsi Oct4 viene disattivato, questi geni cominciano a lavorare e le staminali cessano di essere pluripotenti.

Questo marcatore non era espresso nelle cellule MSK (**figura 22**). Essendo un marker di indifferenziazione cellulare, l'espressione nulla rilevata nelle cellule MSK potrebbe essere collegata al fatto che le cellule in questione avevano parzialmente già subito un commissionamento.

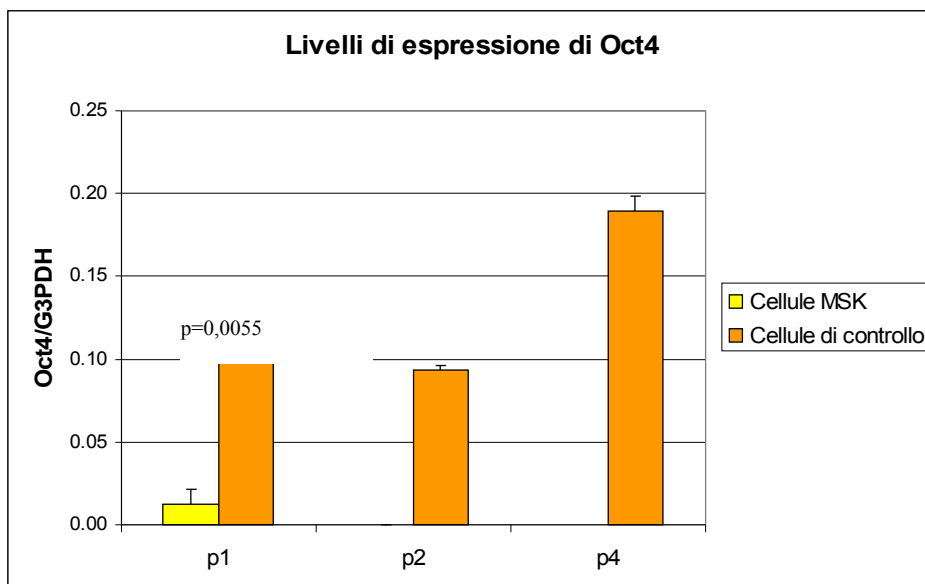


Figura 22. Livelli di espressione del marcatore di immaturità Oct4, valutato in RT PCR comparativa.

Stimoli ancora non compresi potrebbero avere indotto lo spegnimento di alcuni fattori di trascrizione tipici delle cellule immature, tra cui Oct-4, e aver attivato un programma genico di differenziazione.

Il quadro di riconoscimento di queste cellule appare complesso: da una parte hanno mantenuto caratteristiche di immaturità, dall'altra sembrano essersi già indirizzate verso la differenziazione. E' probabile che il *pattern* che ne è risultato fosse intermedio tra queste due condizioni.

4.2.3 E se fossero cellule renali adulte andate incontro a EMT?

Dai dati raccolti possiamo, pertanto, escludere che queste cellule siano derivate dal circolo ematopoietico ma non possiamo escludere che siano state cellule staminali renali, così come che siano state cellule mature del rene andate incontro a EMT.

Questo processo è caratterizzato dalla perdita dei marcatori tipici delle cellule epiteliali (perdita di E-caderina, ZO1, etc.), dall'acquisizione di caratteristiche mesenchimali (espressione di vimentina e STRO-1, assenza di espressione di CD133, CD34, CD45, ect.) e dall'espressione di α SMA (Kokkinos et al, 2007). Nelle cellule MSK effettivamente scompariva la citocheratina, CD133 e CD34 risultavano negativi, la vimentina era molto espressa e compariva una positività per α SMA. Anche fenotipicamente le cellule, a partire dal p2, avevano assunto un aspetto allungato tipico delle cellule mesenchimali.

Le cellule staminali mesenchimali sono precursori multipotenti capaci di differenziare in tessuto osseo, cartilagineo e adiposo.

4.2.4 E se fossero periciti?

La caratterizzazione dei periciti in coltura risulta complicata: sono cellule con l'abilità a differenziarsi in diversi tipi cellulari ed esprimono diversi marker tra cui α SMA, desmina, 3G5, ZO-1 ma non il fattore di von Willebrand.

La papilla è una regione estremamente vascolarizzata e ricca di periciti. Non si può pertanto escludere che nella popolazione cellulare MSK messa in coltura vi fossero cellule pericita-simili, data la presenza di cellule positive per 3G5 e ZO1.

4.2.5 I noduli calcificano come quelli formati spontaneamente da periciti in coltura

La modalità di crescita delle cellule MSK formanti noduli ha presentato effettivamente diverse analogie con la modalità di crescita e di formazione dei noduli dei periciti.

I periciti sono cellule irregolari con processo filamentosi che uniscono cellule adiacenti tra loro. Una volta raggiunta la confluenza sono in grado di crescere in multistrato e, ritraendosi, formare noduli costituiti da centinaia di cellule fissate in un'abbondante matrice extracellulare mineralizzata.

Anche le cellule MSK delle nostre colture presentavano un comportamento di crescita nodulare molto simile a quello che manifestano i periciti in coltura. Presentavano la capacità, nelle aree confluenti, di organizzarsi spontaneamente in noduli che apparivano ancorati ad un substrato sottostante.

Nella **figura 23** si può apprezzare molto chiaramente le similitudini tra la crescita dei periciti in coltura e delle cellule MSK. La forma e la consistenza dei noduli appaiono straordinariamente simili, così come la morfologia delle cellule che ritraendosi danno origine al nodulo in entrambe le colture.

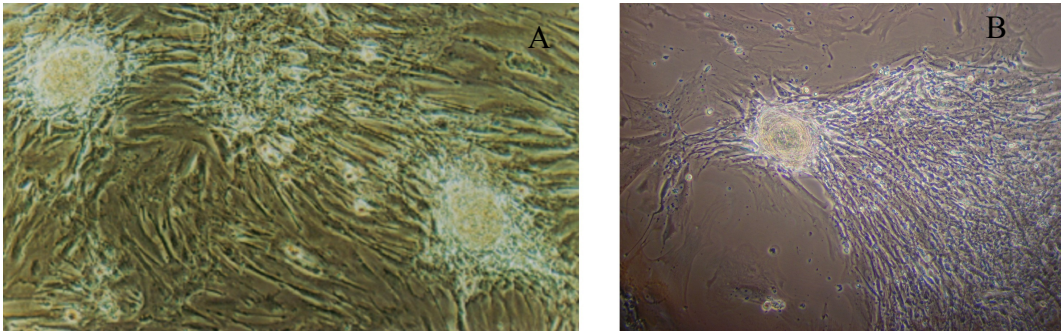


Figura 23. Similitudine di crescita e di morfologia dei periciti in coltura (A), immagine tratta da Bostrom et al (1993) *J Clin Invest* **91(4)**: 1800-1809) e delle cellule MSK (B).

Il passo successivo è stato, pertanto, quello di verificare se i noduli potessero essere mineralizzati come quelli che i periciti formano spontaneamente *in vitro*.

La presenza di depositi minerali nelle cellule e/o nei noduli è stata rilevata mediante colorazione Von Kossa, saggio della fosfatasi alcalina, analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM) e analisi immunocitochimica per componenti della matrice extracellulare (laminina e collagene I) e analisi immunocitochimica e mediante RT PCR per marcatori precoci del processo osteogenico (Cbfa1, osteocalcina, osteonectina, osteopontina).

Depositi di calcio fosfato in alcune cellule e in zone dove le cellule tendono a convergere, probabilmente per formare un nodulo, sono stati identificati mediante la colorazione con il reagente di Von Kossa (**figura 24**).

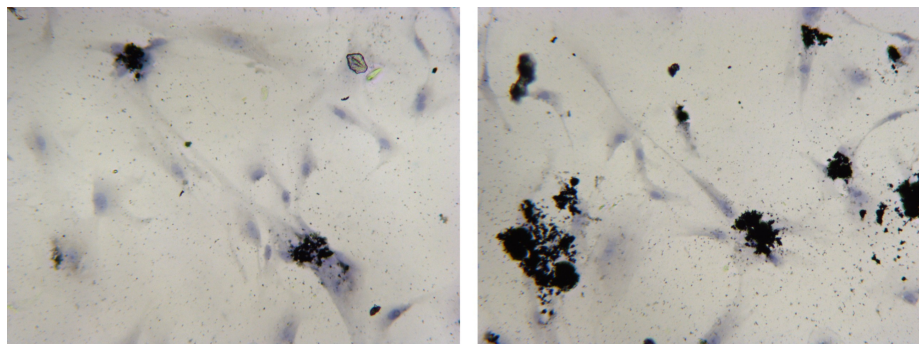


Figura 24. Colorazione con il reagente di Von Kossa su cellule MSK in coltura al passaggio p4 (200X).

Cellule fosfatasi alcalina positive sono state trovate nelle vicinanze di alcuni noduli al p4 (**figura 25**). Nei periciti calcificanti la fosfatasi alcalina risulta espressa solo nelle aree multistrato e nei noduli.

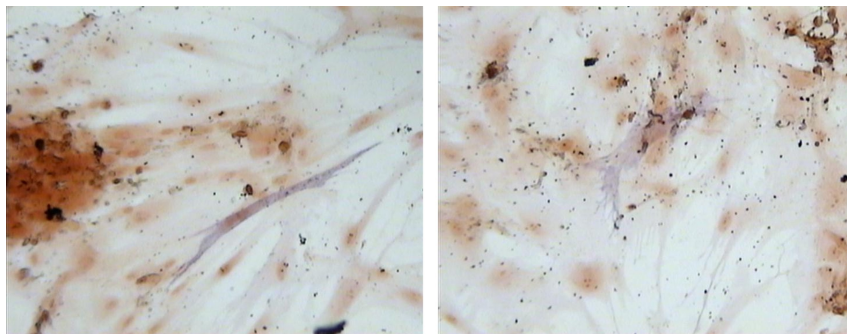


Figura 25. Saggio della fosfatasi alcalina su cellule MSK in coltura al p4 (400X).

L'analisi al SEM di alcuni noduli, analizzati al p5, ha confermato la loro composizione in fosfato di calcio, come si può apprezzare nella **figura 26** dove è riportata l'analisi di un nodulo con la mappa di distribuzione di calcio (in verde) e fosfato (in rosso). L'analisi della composizione delle concrezioni del nodulo ha

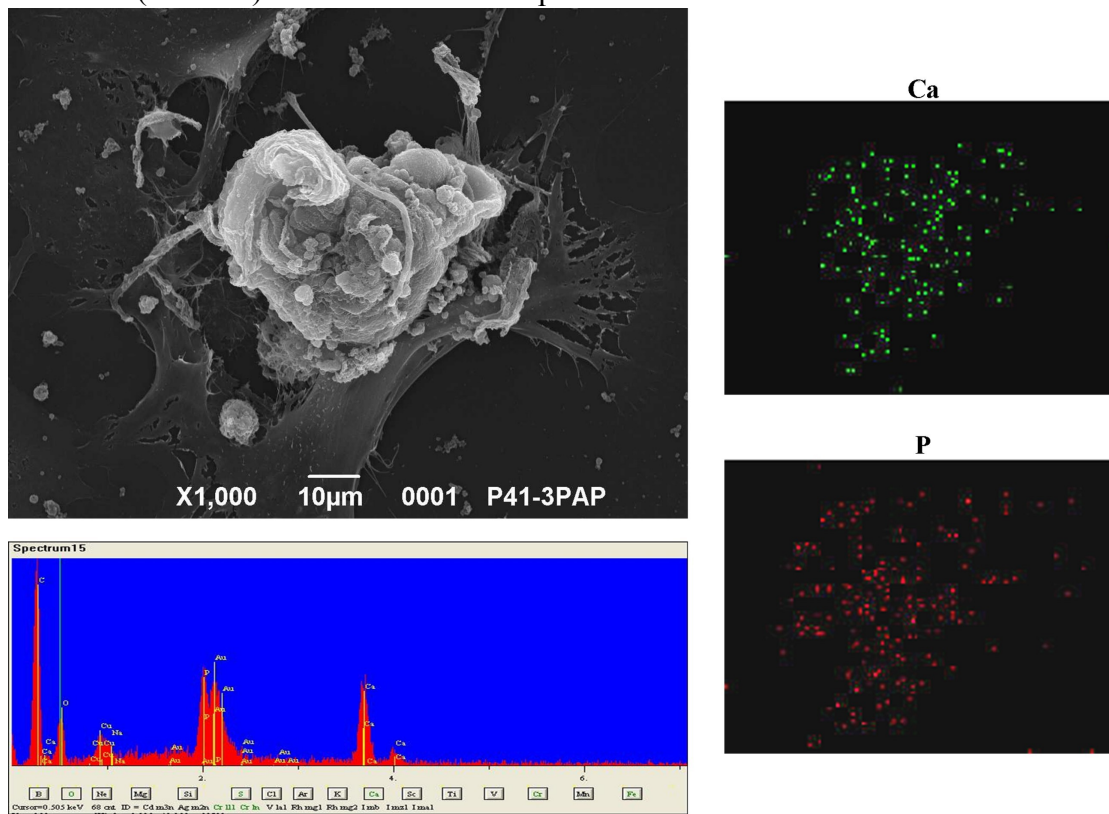


Figura 26. Analisi al SEM di un nodulo (colture MSK) e relativa mappa di distribuzione di calcio (in verde) e fosfato (in rosso) al p5

Le colture MSK al p5 erano caratterizzata dalla presenza di frammenti cellulari. L'analisi di questi frammenti in foci di formazione di noduli, mediante SEM, ha rilevato la loro costituzione in fosfato di calcio (**figura 27**).

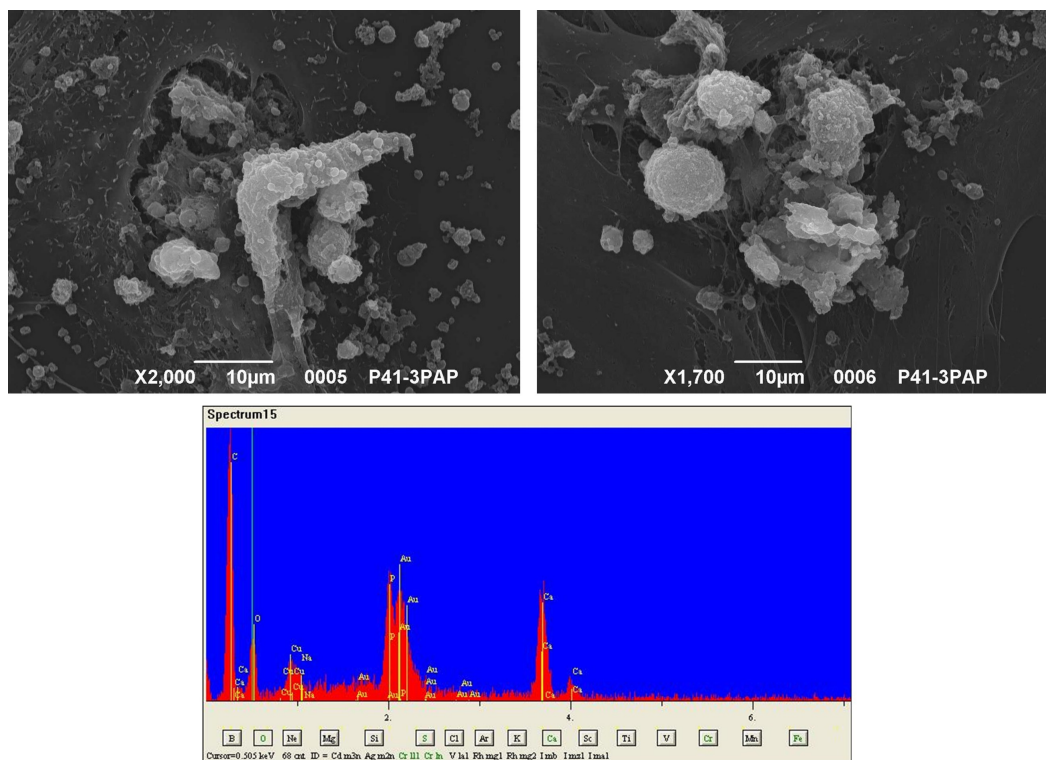


Figura 27. Presenza diffusa di granulazioni di calcio fosfato nelle colture MSK e sui noduli analizzate al SEM.

Alcuni noduli, che appaiono privi di frammenti cellulari sia sulla loro superficie che nell'ambiente a loro circostante, presentavano concentrazioni pressoché nulle di fosfato di calcio, suggerendo l'importanza della presenza di questi frammenti per l'iniziazione della mineralizzazione del nodulo (**figura 28**).

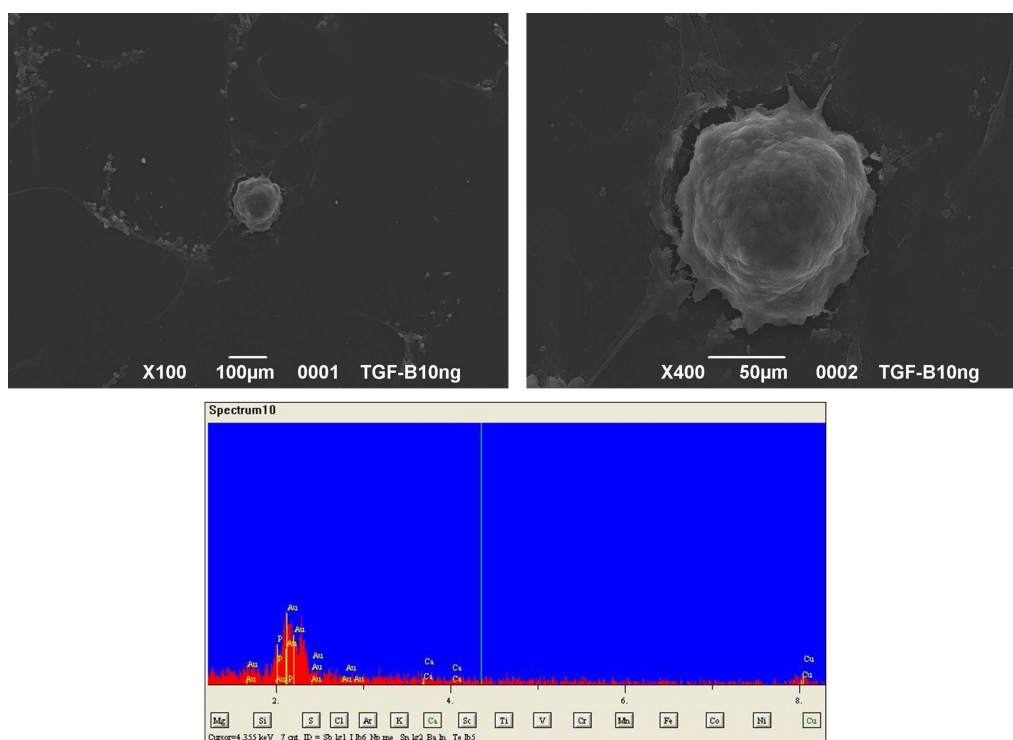


Figura 28. Analisi al SEM di un nodulo la cui costituzione non rileva la presenza di calcio fosfato.

Il tessuto osseo è costituito, oltre che da cellule, da una abbondante matrice di natura proteica, prodotta dalle cellule del tessuto e nella quale le cellule stesse sono intersperse, che presenta una porzione di natura organica ed una componente minerale calcificata. Si è deciso pertanto di andare studiare anche alcuni marcatori per la matrice extracellulare nelle cellule MSK. E' stato rinvenuto un segnale intenso intracellulare del 10% delle cellule per collagene I e meno intenso ma più diffuso, tendenzialmente nelle zone di iniziale crescita in multistrato delle cellule, per laminina al p2, passaggio in cui compaiono i noduli (**figura 29**). Nei periciti, invece, l'espressione di queste componenti della matrice risulta aumentare nei siti di formazione del nodulo.

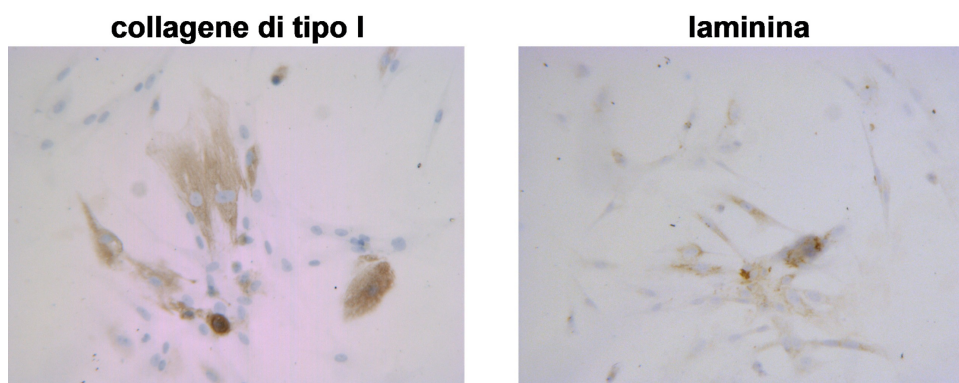
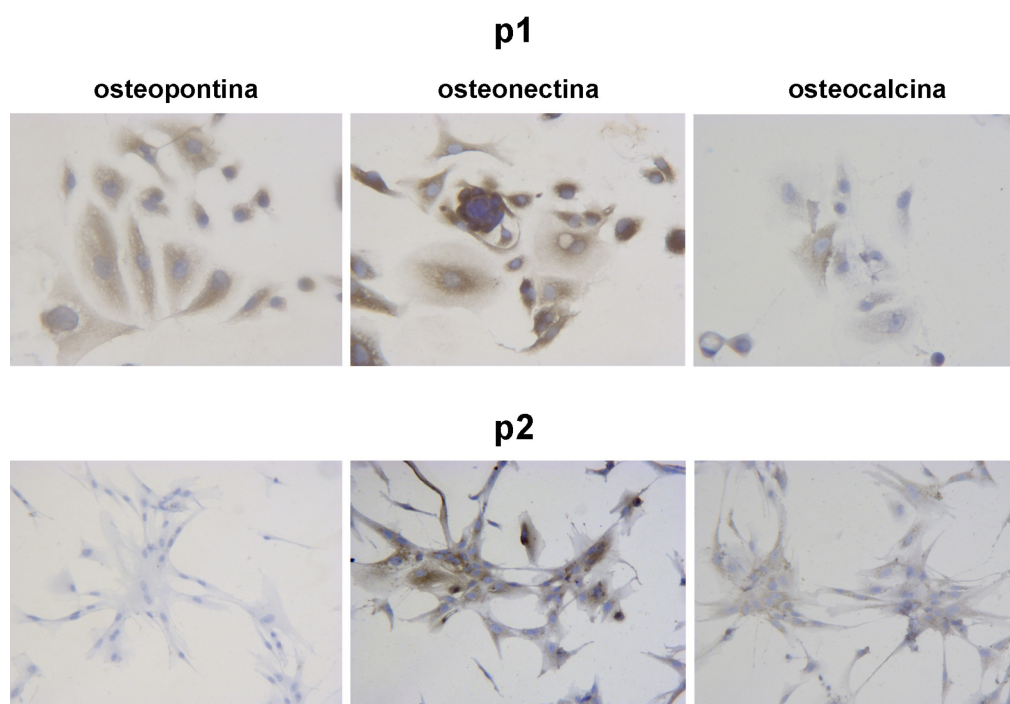


Figura 29. Analisi di componenti della matrice extracellulare nelle cellule MSK al p2 mediante immunocitochimica (200X).

4.2.6 Studio dei marcatori osteogenici

I dati raccolti suggerivano che un processo di biomineralizzazione fosse attivo nella coltura MSK in cui le cellule formavano noduli calcifici. Lo studio di marcatori coinvolti nell'osteogenesi si rivelò necessario per poter dimostrare che le cellule MSK si stavano effettivamente indirizzando verso un lineaggio osteoblastico. Sono stati studiati Cbfa1, un fattore di trascrizione che svolge un ruolo cruciale nella regolazione di geni specifici della linea osteoblastica; osteonectina, una glicoproteina che promuove la formazione di cristalli minerali; osteocalcina, la principale proteina della matrice ossea sintetizzata nell'osso dagli osteoblasti e osteopontina, un potente inibitore dei processi di cristallizzazione. L'analisi di questi marcatori osteogenici è stata svolta mediante immunocitochimica e mediante RT PCR.

Lo studio immunocitochimico (**figura 30**) ha evidenziato positività cellulare per osteopontina, osteonectina e osteocalcina al p1. Nel passaggio successivo le cellule risultavano intensamente positive per osteonectina, debolmente positive per osteocalcina e negative per osteopontina, scomparsa dal momento in cui le cellule hanno cominciato ad aggregarsi in noduli. Per quanto riguarda invece i foci di formazione dei noduli e i noduli veri e propri, questi sono risultati positivi per osteocalcina e osteonectina e non per osteopontina (**figura 31**).



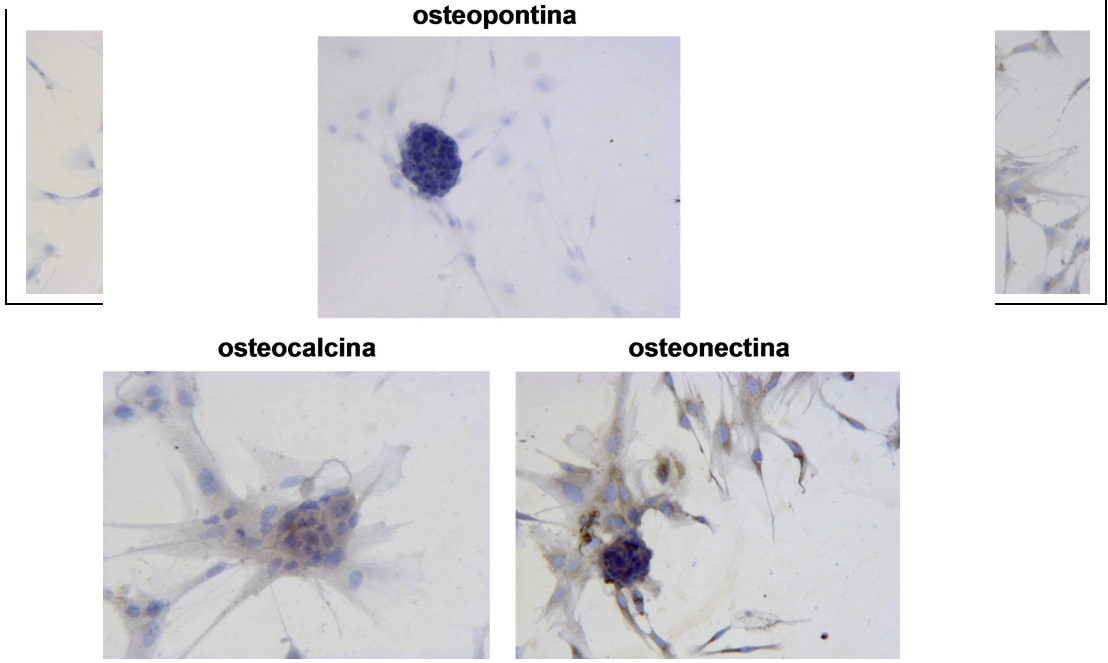
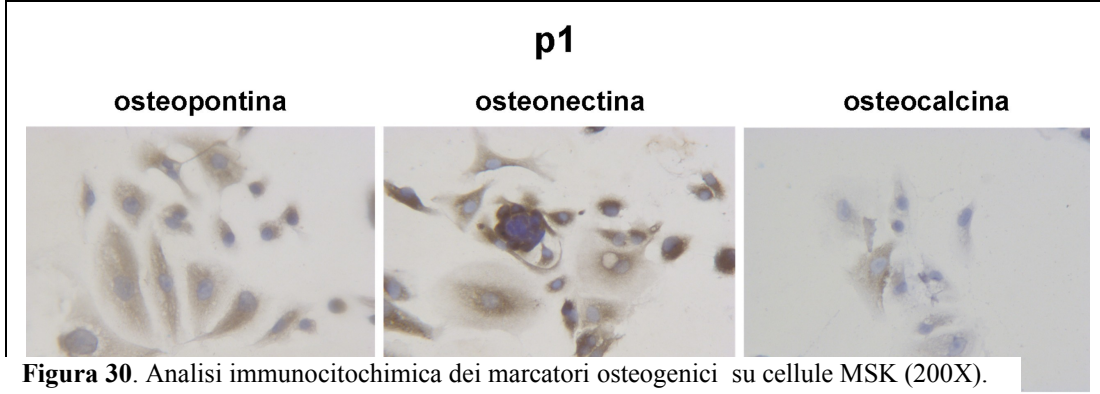
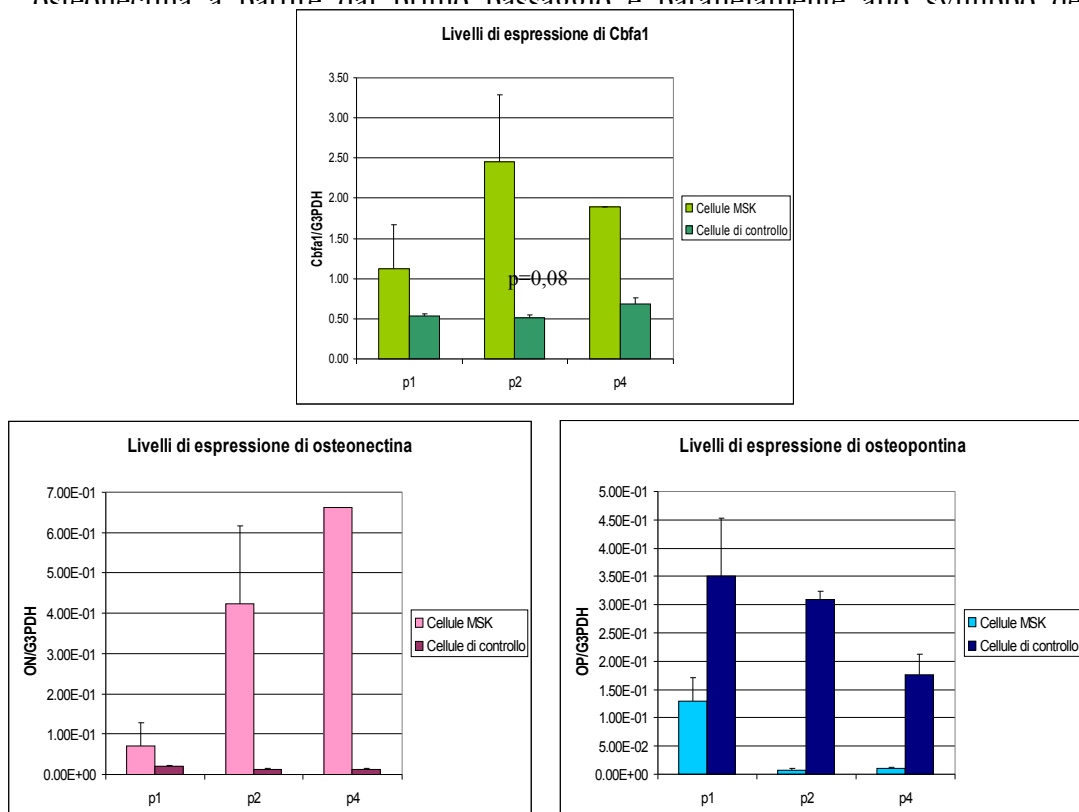


Figura 31. Analisi immunocitochimica dei noduli comparsi nella coltura MSK a partire dal passaggio p2 (200X).

La RT PCR svolta per l'analisi dei marcatori Cbfa1, osteonectina e osteopontina (**figura 32**) ha evidenziato un aumento dei livelli di espressione di Cbfa1 e di osteonectina a partire dal primo passaggio e parallelamente allo sviluppo dei



p=0,09

p=0,001

Figura 32. Studio dei livelli di espressione di marcatori osteogenici in cellule MSK e in cellule di controllo mediante RT PCR.

Il quadro che cominciava dunque a delinearsi vedeva da una parte l'attivazione di un programma osteogenico mediante l'aumento dell'espressione di Cbfa1, fattore di trascrizione che attiva i geni dell'osteogenesi, e di osteonectina, proteina che promuove la mineralizzazione; dall'altra parte l'inibizione di uno dei maggiori agenti protettori in grado di prevenire il processo di calcificazione (osteopontina). L'equilibrio, cruciale per l'attivazione dell'osteogenesi, tra agenti promuoventi e agenti protettori il processo di calcificazione risultava quindi tutto a favore degli agenti che inducono la cristallizzazione, a scapito di quelli che la proteggono.

La presenza di questi marcatori osteogenici suggerisce che le cellule abbiano acquisito un fenotipo osteoblastico e che un processo di calcificazione spontanea abbia avuto luogo nelle culture di cellule MSK.

Il fatto che osteocalcina, una proteina caratteristica degli osteoblasti maturi, fosse poco espressa nelle cellule MSK probabilmente può essere dovuto ad un non raggiungimento di un fenotipo osteoblastico maturo da parte delle cellule MSK.

Lo studio degli stessi stessi marcatori nelle cellule di controllo ha portato a risultati completamente diversi. I livelli di espressione dei marcatori non sono risultati variabili nel corso dei passaggi. Cbfa1 e osteonectina sono risultati essere molto meno espressi rispetto alle cellule MSK, mentre l'osteopontina è apparsa significativamente più espressa, con un andamento totalmente opposto rispetto a

quello delle cellule MSK (**figura 32**). In questo caso l'equilibrio tra agenti promuoventi e agenti protettori il processo di osteogenesi risultava decisamente a favore degli agenti inibenti la cristallizzazione.

Questo è spiegato dal fatto che nelle colture di controllo, dove non è mai stata rilevata crescita nodulare né cambiamenti morfologici cellulari durante i diversi passaggi, non è avvenuto nessun processo di calcificazione. A differenza dei cambiamenti morfologici che hanno caratterizzato le cellule MSK, nelle cellule di controllo appariva una stabilità nella morfologia (**figura 33**) confermata dalla tipizzazione. Si è infatti evidenziato in ogni passaggio positività per il fattore di von Willebrand, per ZO1, per citocheratina e intensa positività per vimentina; negatività invece per α SMA, desmina, collagene di tipo I e Pax-2 (**figura 34**).

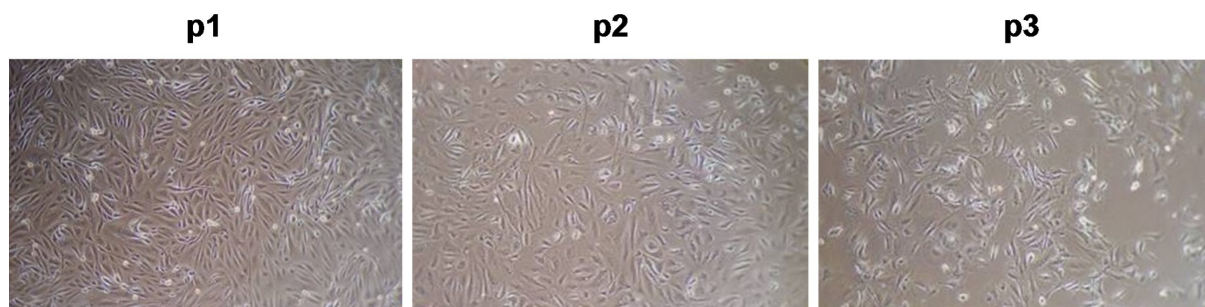


Figura 33. Morfologia e modalità di crescita delle cellule papillari di controllo in coltura (100X).

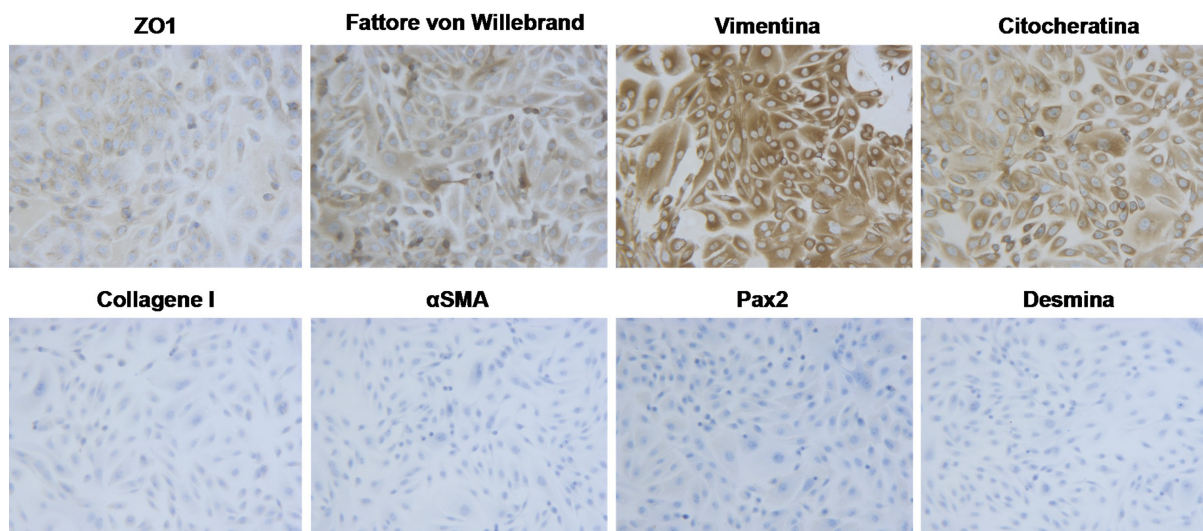


Figura 34. Tipizzazione delle cellule papillari di controllo mediante immunocitochimica (100X).

Dall'analisi dei marcatori osteogenici nelle cellule MSK, sia mediante immunocitochimica che RT PCR, si nota come fosse presente uno sbilanciamento dei fattori osteogenici a favore di quelli induttivi. Ci si è chiesti se questo potesse essere già presente nel tessuto di origine da cui la coltura è stata ottenuta e si è studiato mediante RT PCR l'espressione di osteonectina e osteopontina sia nel tessuto proveniente dalla paziente MSK che in quello di controllo. L'analisi ha evidenziato come i livelli di espressione di osteonectina fossero significativamente maggiori nel tessuto MSK rispetto a quello di controllo. I livelli di espressione di osteopontina risultavano invece simili tra i due tessuti e maggiori rispetto a quelli di osteonectina (**figura 35**).

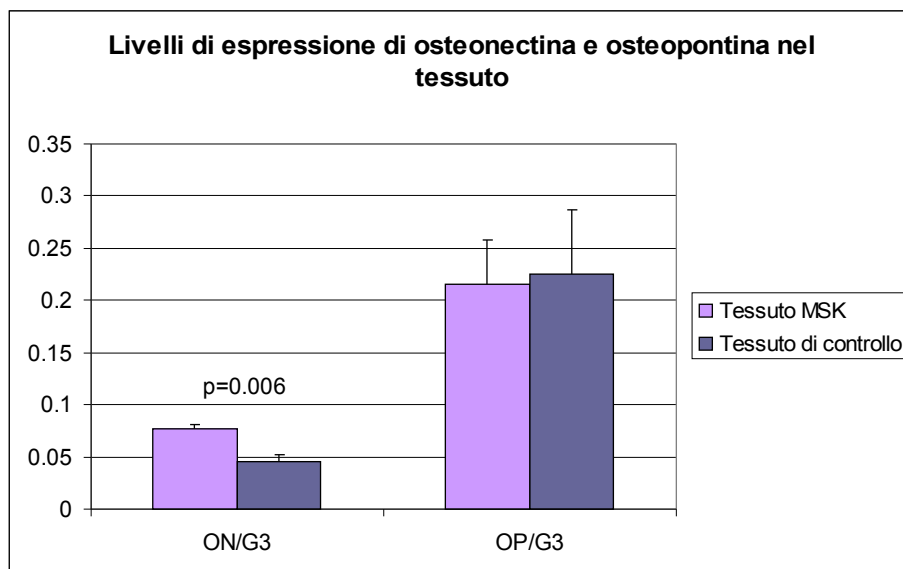


Figura 35. Studio dei livelli di espressione di proteine coinvolte nel processo di osteogenesi nel tessuto renale MSK e in quello di controllo, mediante Real Time PCR.

4.2.7 Il fenomeno osservato potrebbe dipendere dalla costituzione genica del tessuto di partenza?

E' possibile escludere che il fenomeno osservato dipenda da un particolare comportamento delle cellule della papilla renale in condizioni di coltura in vitro in quanto le cellule di controllo non hanno manifestato alcun tipo di crescita nodulare, né spontanea né indotta (mediante stimolazione con attivatori del processo osteogenico, quali dexametazone 10^{-8} e β -glicerolfosfato 10 mM) né alcun segno di processo di biomineralizzazione in atto.

Una volta escluso che il fenomeno osservato fosse legato al tipo di tessuto (cioè papilla), ci si è interrogati sul significato funzionale della mutazione di GDNF, gene essenziale per una corretta nefrogenesi. Una sostituzione nucleotidica nella regione del promotore è probabile che possa influenzare i livelli di espressione del gene portando quindi ad una sua disregolazione.

I livelli di espressione di GDNF sono stati studiati mediante RT PCR comparativa e sono risultati maggiori nelle cellule di controllo rispetto a quelle MSK, in cui i livelli di espressione del gene sono apparsi quasi assenti. Nelle cellule di controllo poi l'espressione aumentava di circa quattro volte a partire dal primo passaggio fino all'ultimo. Nelle cellule MSK i deboli livelli di espressione si mantenevano

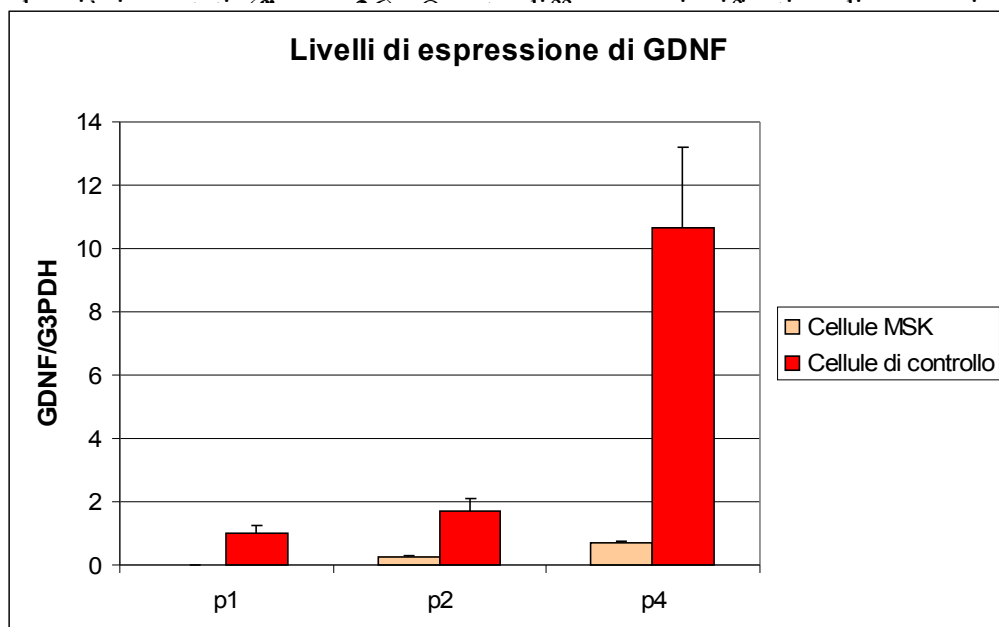


Figura 36. Analisi, mediante RT PCR, dei livelli di espressione di GDNF in cellule MSK e in cellule di controllo calcolati come rapporto sui livelli di espressione delle cellule di controllo al passaggio p1. Al p4 i livelli di espressione di GDNF nelle cellule MSK risultavano all'incirca dieci volte inferiori a quelli delle cellule di controllo.

Un'ipotesi che è possibile formulare su queste basi è che una mutazione di questo gene, coinvolto nelle prime fasi dello sviluppo renale, potrebbe conferire alle cellule caratteristiche di immaturità e renderle pertanto suscettibili ad una differenziazione in senso osteogenico, sotto appropriati stimoli.

5. CONCLUSIONI

L'asportazione di carcinoma renale in una paziente con MSK, nefrocalcinosi e mutazione di GDNF ha permesso di verificare l'ipotesi che cellule della papilla possono differenziare verso la linea osteoblastica determinando la sintesi di proteine tipiche dell'osteoidi e la formazione di concrezioni minerali.

Le cellule MSK hanno manifestato un comportamento, mai descritto prima, di crescita in multistrato e organizzazione in noduli mineralizzati.

La simultanea presenza di fosfato e di calcio nella componente cristallina dei noduli e l'espressione di proteine caratteristiche dell'osso supporta l'ipotesi che un fenomeno di biomineralizzazione abbia avuto luogo nella coltura MSK.

Se questo fenomeno sia stato causato dal transdifferenziamento di cellule renali residenti o dal differenziamento di progenitori renali verso il lineaggio osteogenico sotto stimoli appropriati, al momento non noti, rimane da indagare.

Questo processo non si è verificato (né spontaneamente né in seguito ad induzione) nelle cellule di controllo che non sono mutate per GDNF. La variante genica di GDNF potrebbe, pertanto, essere responsabile in qualche misura di questo comportamento agendo sull'immaturità delle cellule papillari e predisponendole così verso un fenomeno di transdifferenziamento.

Lo studio di questo fenomeno, mai segnalato prima, di differenziazione osteogenica di cellule renali potrebbe portare ad individuare un possibile meccanismo patogenetico per MSK ed un nuovo meccanismo di formazione della placca di Randall e della nefrocalcosi anche in altre nefrolitiasi. Di sicuro modifica l'idea della nefrocalcosi come puro squilibrio chimico-fisico e getta le basi per un meccanismo che, a fianco ad uno sbilanciamento ionico dell'ambiente, vede coinvolte attivamente cellule del tessuto renale, protagoniste di deposizione di materiale minerale.

ABBREVIAZIONI

BMP: proteine morfogenetiche dell'osso

Cbfa1: core binding factor alpha1

CVCs: cellule vascolari calcificanti

DAB: diaminobenzidina

DMSO: dimetilsolfossido

dNTP: deossinucleotidtrifosfato

EDTA: acido etilen-diammino-tetracetico

ESEM: environmental scanning electron microscope

FACS: fluorescence activated cell sorter

FBS: siero fetale bovino

GDNF: glial cell derived neurotrophic factor

HBSS: hank's balanced salts solution

MSK: rene con midollare a spugna

Oct4: octamer-4

p: passaggio di tripsinizzazione delle cellule

PBS: soluzione salina tamponata con fosfato

SEM: scanning electron microscope

VSMCs: cellule vascolari muscolari lisce

BIBLIOGRAFIA

- Abedin M, Tintut Y and Demer LL (2004) Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**: 1161-1170.
- Al-Awqati Q and Oliver JA (2002) Stem cells in the kidney. *Kidney Int* **61**: 387-395.
- Al-Awqati Q and Oliver JA (2006) The kidney papilla is a stem cells niche. *Stem Cell Rev* **2(3)**: 181-184.
- Allt G and Lawrenson JG (2001) Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs* **169**:1-11.

- Anglani F, Ceol M, Mezzabotta F, Torregrossa R, Tiralongo E, Toso E, Del Prete D and D'Angelo A (2008) The renal stem cell system in kidney repair and regeneration. *Front Biosci* **13**: 6395-6405.
- Armulik A, Abramsson A and Betsholtz C (2005) Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* **97**: 512-523.
- Aubin JE, Liu F, Malaval L and Gupta AK (1995) Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* **17**: 77S-83S.
- Azari F, Vali H, Guerin-Kern JL, Wu TD, Croisy A, Sears SK, Tabrizian M and McKee MD (2008) Intracellular precipitation of hydroxyapatite mineral and implications for pathologic calcification. *J Struct Biol* **162(3)**: 468-479.
- Bondjers C, Kalen M, Hellström M, Scheidl SJ, Abramsson A, Renner O, Londhal P, Cho H, Kehrl J and Betsholtz C (2003) Transcription profiling of platelet-derived growth factor-beta-deficient mouse embryos identifies RGS5 as a novel marker for pericytes and vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* **162(3)**: 721-729.
- Brighton CT, Lorich DG, Kupcha R, Reilly TM, Jones AR and Woodbury RA (1992) The pericyte as possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop Rel Res* **275**: 287-299.
- Bussolati B, Bruno S, Grange C, Buttiglieri S, Deregibus MC, Cantino D and Camussi G (2005) Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol* **166(2)**: 545-555.
- Canfield AE, Allen TD, Grant ME, Schor SL and Schor AM (1990) Modulation of extracellular matrix biosynthesis in bovine retinal pericytes in vitro: effects of the substratum and cell density. *J Cell Sci* **96**: 159-169.
- Canfield AE, Doherty MJ, Wood AC, Farrington C, Ashton B, Begum N, Harvey B, Poole A, Grant ME and Boot-Handford RP (2000) Role of pericytes in vascular calcification: a review. *Z Kardiol* **89**, suppl 2:20-27.

- Cifuentes Delatte L, Miñón Cifuentes J and Medina JA (1996) Randall and his plaque. *Urology* **48(3)**: 343-346.
- Clarke JC, Patel SR, Raymond RM Jr, Andrew S, Robinson BG, Dressler GR and Brophy PD (2006) Regulation of c-Ret in the developing kidney is responsive to Pax2 gene dosage. *Hum Mol Genet* **15(23)**: 3420-3428.
- Coe F, Evan A and Worcester E (2005) Kidney stone disease. *J Clin Invest* **115(10)**: 2598-2608.
- Copping GA (1967) Medullary sponge kidney: its occurrence in a father and daughter. *Can Med Assoc J* **96(19)**: 608-611.
- Costantini F and Shakya R (2006) GDNF/Ret signalling and the development of the kidney. *BioEssay* **28**: 117-127.
- Danet GH, Pan Y, Luongo JL, Bonnet DA and Simon MC (2003) Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J Clin Invest* **112(1)**: 126-135.
- Delatte LC, Cifuentes JM and Medina JA (1996) Randall and his plaque. *Urology* **48**: 343-346.
- Doherty MJ and Canfield AE (1999) Gene expression during vascular pericyte differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **9**: 1-17.
- Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, [Beresford JN](#), [Grant ME](#) and [Canfield AE](#) (1998) Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* **13**: 828-838.
- Dressler GR and Douglass EC (1992) Pax-2 is a DNA-binding protein expressed in embryonic kidney and Wilms tumor. *Proc Natl Acad Sci* **89(4)**: 1179-1183.
- Ducy P and Karsenty G (1995) Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcina gene. *Mol Cell Biol* **15**: 1858-1869.

- Ducky P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A and Karsenty G (1996) Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* **382(6590)**: 448-452.
- Ducky P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL and Karsenty G (1997) *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **89**: 747-754.
- Evan A, Lingeman J, Coe FL and Worcester E (2006) Randall's plaque: pathogenesis and role in calcium oxalate nephrolithiasis. *Kidney Int* **69**: 1313-1318.
- Evan AP, Coe FL and Lingeman JE (2005) Insights on the pathology of kidney stone formation. *Urol Res* **33**: 383-389.
- Evan AP, Coe FL, Lingeman JE, Worcester E (2005) Insights on the pathology of kidney stone formation. *Urol Res* **33**: 383-389.
- Evan AP, Coe FL, Rittling SR, Bledsoe SM, Shao Y, Lingeman JE and Worcester EM (2005) Apatite plaque particles in inner medulla of kidneys of calcium oxalate stone formers: osteopontin localization. *Kidney Int* **68(1)**: 145-154.
- Evan AP, Lingeman JE, Coe FL, Parks JH, Bledsoe SB, Shao Y, Sommer AJ, Paterson RF, Kuo RL and Grynepas M (2003) *J Clin Invest* **111**: 607-616.
- Evan AP, Lingeman JE, Coe FL, Parks JH, Bledsoe SB, Shao Y, Sommer AJ, Paterson RF, Kuo RL and Grynepas M (2003) Randall's plaque of patients with nephrolithiasis begins in basement membranes of thin loops of Henle. *J Clin Invest* **111(5)**: 607-616.
- Evan AP, Lingeman JE, Coe FL, Parks JH, Bledsoe SB, Shao Y, Sommer AJ, Paterson RF, Kuo RL, Grynepas M (2003) Randall's plaque of patients

with nephrolithiasis begins in basement membranes of thin loops of Henle. *J. Clin. Invest* **111**: 607-616.

- Farzaneh-Far a and Shanahan CM (2005) Biology of vascular calcification in renal disease. *Nephron Exp Nephrol* **101**: e134-e138.
- Fine JK, Pak CYC and Preminger G (1995) Effect of medical management and residual fragments on recurrent stone formation following shock wave lithotripsy. *J Urol* **153**: 27-33.
- Forino M, Torregrossa R, Ceol M, Murer L, Della Vella M, Del Prete D, D'Angelo A and Anglani F (2006) TGFbeta1 induces epithelial-mesenchymal transition, but not myofibroblast transdifferentiation of human kidney tubular epithelial cells in primary culture. *Int J Exp Pathol* **87(3)**: 197-208.
- Gambaro G, D'Angelo A, Fabris A, Tosetto E, Anglani F and Lupo A (2004) Crystals, Randall's plaques and renal stones: do bone and atherosclerosis teach us something?. *J Nephrol* **17(6)**: 774-777.
- Gambaro G, Favaro S and D'Angelo A (2001) Risk for renal failure in nephrolithiasis. *Am J Kidney Dis* **37(2)**: 233-243.
- Giachelli CM (2003) Vascular calcification: in vitro evidence for the role of inorganic phosphate. *J Am Soc Nephrol* **14**: S300-S304.
- Goldfarb DS, Fischer ME, Keich Y and Goldberg J (2005) A twin study of genetic and dietary influences on nephrolithiasis: a report from the Vietnam Era Twin (VET) Registry. *Kidney Int* **67(3)**: 1053-1061.
- Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, Ruas JL, Poellinger L, Lendahl U and Bondesson M (2005) Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell* **9(5)**: 617-28.
- Huang L, Teng XY, Cheng YY, Lee KM and Kumta SM (2004) Expression of preosteoblast markers and Cbfa-1 and Osterix gene

- transcripts in stromal tumor cell of giant cell tumor of bone. *Bone* **34**: 393-401.
- Johnson RC, Leopold JA and Loscalzo J (2006) Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res* **99**: 1044-1059.
 - Jono S, Shioi A, Ikari Y And Nishizawa Y (2006) Vascular calcification in chronic kidney disease. *J Bone Miner Metab* **24**:176-181.
 - Karp JM, Ferreira LS, Khademhosseini A, Kwon AH, Yeh J and Langer RS (2005) Cultivation of human embryonic stem cells without the embryonic body step enhances osteogenesis in vitro. *Stem cells* **24**: 835-843.
 - Kleinman JG, Wesson JA and Hughes J (2004) Osteopontin and calcium stone formation. *Nephron Physiol* **98**: 43-47.
 - Klemme L, Fish AJ, Rich S, Greenberg B, Senske B and Segall M (1998) Familial ureteral abnormalities syndrome: genomic mapping, clinical findings. *Pediatr Nephrol* **12(5)**: 349-356.
 - Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK, Newgreen DF, Thompson EW and Waltham M (2007) Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer-observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs* **185**: 191-203.
 - Kuiper JJ (1971) Medullary sponge kidney in three generations. *N Y State J Med* **71(22)**: 2665.1669.
 - Kumar V, Farrell G, Yu S, Harrington S, Fitzpatrick L, Rzewuska E, Miller VM and Lieske JC (2006) Cell biology of pathologic renal calcification: contribution of crystal transcytosis, cell-mediated calcification, and nanoparticles. *J Investig Med* **54(7)**: 412-424.

- Layer PG, Robitzki A, Rothermel A and Willbold E (2002) Of layers and spheres: the reaggregate approach in tissue engineering. *Trends Neurosci* **25(3)**: 131-134.
- Lian JB and Stein GS (2003) Runx2/Cbfa1: a multifunctional regulator of bone formation. *Curr Pharm Des* **9(32)**: 2677-2685.
- Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, Ohse T, Inagi R, Miyata T, Kurokawa K, Fujita T, Ingelfinger JR and Nangaku M (2004) Transdifferentiation of cultured tubular cells induced by hypoxia. *Kidney Int* **65(3)**: 871-80.
- Matlaga BR, Coe FL, Evan AP and Lingeman JE (2007) The role of Randall's plaques in the pathogenesis of calcium stones. *J Urol* **177(1)**: 31-38.
- Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R and Hughes J (2002) Osteopontin-a molecule for all seasons. *Q J Med* **95(1)**: 3-13.
- Miyazawa K, Domini C, Moriyama MT and Suzuki K (2004) Global analysis of expressed genes in renal epithelial cells to calcium oxalate crustals. *Urol Res* **32**: 146.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR and de Crombrughe B (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **108**: 17-29.
- Nishio Y, Dong Y, Paris M, O'Keefe RJ, Schwarz EM and Drissi H (2006) Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene* **372**: 62-70.
- Okada A, Nomura S, Saeki Y, Higashibata Y, Hamamoto S, Hirose M, Itoh Y, Yasui T, Tozawa K and Kohri K (2008) Morphological conversion

of calcium oxalate crystals into stones is regulated by osteopontin in mouse kidney. *J Bone Miner Res* **23(10)**: 1629-1637.

- Oliver JA (2004) Adult renal stem cells and renal repair. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **13**: 17-22.
- Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP and Al-Awqati Q (2004) The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest* **114(6)**: 795-804.
- Oshter PJ, Mathiasen H, Hansen AB and Nissen HM (1994) Urinary acidification and urinary excretion of calcium and citrate in women with bilateral medullary sponge kidney. *Urol Int* **52(3)**: 126-130.
- Pabico RC, McKenna BA and Freeman RB (1998) Renal tubular dysfunction in patients with cystic disease of the kidneys. *Urology* **51**: 156-160.
- Pallone TL, Zhang Z and Rhinehart K (2003) Renal medullary microcirculation. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**: F253-F266.
- Park F, Mattson DL, Roberts LA and Cowley AW Jr (1997) Evidence for the presence of smooth muscle α -actin within pericytes of the renal medulla. *Am J Physiol* **273**: R1742-R1748.
- Pesce C, Colombo B, Nicolini E, Spata F and Cappelari F (1995) Medullary sponge kidney with severe renal function impairment: a case report. *Pediatr Med Chir* **17(1)**: 65-67.
- Pitera JE, Woolf AS, Gale NW, Yancopoulos GD and Yuan HT (2004) Dysmorphogenesis of kidney cortical peritubular capillaries in angiotensin-2-deficient mice. *Am J Pathol* **165**: 1895-1906.
- Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM and Weissberg PL (2000) Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* **87(11)**: 1055-1062.

- Randall A (1937) The origin and growth of renal calculi. *Ann Surg* **105**: 1009-1027.
- Randall A (1940) Papillary pathology as precursor of primary renal calculus, *J Urol* **44**: 580-589.
- Rothenpieler UW and Dressler GR (1993) Pax-2 is required for mesenchyme-to-epithelium conversion during kidney development. *Development* **119(3)**: 711-720.
- Ryoo HM, Hoffmann HM, Beumer T, Frenkel B, Towler DA, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ and Lian JB (1997) Stage-specific expression of Dlx-5 during osteoblast differentiation: involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Mol Endocrinol* **11(11)**: 1681-1694.
- Sakhaee K (2008) Nephrolithiasis as a systemic disorder. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **17**: 304-309.
- Sayer JA, Carr G and Simmons NL (2004) Nephrocalcinosis: molecular insights into calcium precipitation within the kidney. *Clin Sci* **106**: 549-561.
- Scheinman SJ (1999) Nephrolithiasis. *Semin Nephrol* **19(4)**: 381-388.
- Schinke T and Karsenty G (1999) Characterization of Osfl, an osteoblast-specific transcription factor binding to a critical cis-acting element in the mouse Osteocalcin promoters. *J Biol Chem* **274(42)**: 30182-30189.
- Schor AM, Allen TD, Canfield AE, Sloan P and Schor SL (1990) Pericytes derived from the retinal microvasculature undergo calcification in vitro. *J Cell Sci* **97**: 449-461.
- Shanahan CM (2005) Vascular calcification. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **14**: 361-367.
- Shea CM, Edgar CM, Einhorn TA and Gerstenfeld LC (2003) BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem* **90**: 1112-1127.

- Simmons PJ and Torok-Storb B (1991) Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* **78**:55-62.
- Sims DE (2000) Diversity within pericytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **27(10)**:842-6.
- Slack JMW and Tosh D (2001) Transdifferentiation and metaplasia – switching cell types. *Curr Opin Genet* **11(5)**: 581-6.
- Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM (2001) Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res* **89**: 1147-1154.
- Thowfeequ S, Myatt EJ and Tosh D (2007) Transdifferentiation in developmental biology, disease, and in therapy. *Dev Dyn* **236**: 3208-3217.
- Tilton RG (1991) Capillary pericytes: perspectives and future trends. *J Electron Microscop Tech* **19**: 327-344.
- Vezzoli G, Terranegra A, Arcidiacono T, Paloschi V, Biasion R and Soldati L (2005) Studio genetico di una popolazione italiana affetta da calcoli renale di calico. *Giornale di Tecniche Nefrologiche e Dialitiche*, anno XVII **4**: 39-41.
- Watson KE, Boström K, Ravindranath R, Lam T, Norton B and Demer LL (1994) TGF- β 1 and 25-hydrocholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest* **93**: 2106-2113.
- Worcester EM and Coe FL (2008) Nephrolithiasis. *Prim Care Clin Office Pract* **25**: 369-391.
- Yang H, Curinga G and Giachelli CM (2004) Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney Int* **66**: 2293-2299.

- Zangrossi S, Marabese M, Brogginì M, Giordano R, D'Erasmus M, Montelatici E, Intini D, Neri A, Pesce M, Rebullà P and Lazzari L (2007) Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker. *Stem Cells* **25(7)**: 1675-1680.
- Zavadil J and Böttinger EP (2005) TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* **24**: 5764-5774.

**IL CONTENUTO DI QUESTA TESI E' STATO PRESENTATO A
CONGRESSI NAZIONALI ED INTERNAZIONALI**

Anglani F, Ceol M, **Mezzabotta F**, Torregrossa R, Tiralongo E, Gambaro G, Del Prete D, D'Angelo A. *Il processo di calcificazione spontanea in vitro in colture primarie di cellule renali*. XXIII Convegno della Sezione Triveneta, Stra (VE) 20-21 settembre 2007; pag. 42-43.

Presentato come comunicazione orale.

Mezzabotta F, Ceol M, Torregrossa R, Del Prete D, Tiralongo E, Fabris A, D'Angelo A, Gambaro G, Anglani F. *Spontaneous calcification process in a primary culture of renal cells*. Conference Developments in cell culture

technology to enhance cell growth in vitro, BioPark Hertfordshire, Welwyn Garden City, United Kingdom 2 maggio 2008.

Mezzabotta F, Ceol M, Torregrossa R, Del Prete D, Tiralongo E, Fabris A, D'Angelo A, Gambaro G, Anglani F. *Spontaneous calcification process in a primary culture of renal cells*. XLV Congress of the European Renal Association, European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA), Stockholm, Sweden 10-13 maggio 2008; pag. ii103.

Mezzabotta F, Ceol M, Torregrossa R, Del Prete D, Tiralongo E, Fabris A, Della Vella M, D'Angelo A, Gambaro G, Anglani F. *Spontaneous calcification process in a primary culture of renal cells*. Kidstem International Conference, Liverpool, United Kingdom 17-19 settembre 2008.

Mezzabotta F, Ceol M, Del Prete D, Tiralongo E, Lupo A, Fabris A, Torregrossa R, Basso F, D'Angelo A, Gambaro G, Anglani F. *Processo di calcificazione spontanea di cellule renali in coltura provenienti da un paziente affetto da MSK e portatore di una mutazione in eterozigosi del gene GDNF*. 49° Congresso Nazionale della Società Italiana di Nefrologia, Rimini 8-11 ottobre 2008; S-43: S66(94).

Presentato come comunicazione orale.

Mezzabotta F, Ceol M, Torregrossa R, Del Prete D, Tiralongo E, Fabris A, Della Vella M, D'Angelo A, Gambaro G, Anglani F. *Spontaneous calcification process in a primary culture of renal cells from a patient with MSK carrying a GDNF mutation*. ASN - 41st Annual Meeting and Scientific Exposition. Philadelphia, PA, USA 6-9 novembre 2008.

Presentato come comunicazione orale.

L'ATTIVITA' DI RICERCA E' STATA ARGOMENTO DI ALCUNI SEMINARI TENUTI ALL'INTERNO DELLA SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI – INDIRIZZO NEFROLOGIA

Mezzabotta F, “*Cellule staminali embrionali e adulte: biologia e potenzialità*”, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Padova 20 giugno 2006.

Mezzabotta F, “*Cellule progenitrici renali e placche di Randall: un suggerimento dalla biologia delle calcificazione vascolari*”, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Padova 20 giugno 2007.

Mezzabotta F, “*Nfrocalcinosi: un processo di calcificazione ectopica causata dal transdifferenziamento di cellule renali residenti?*”, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Padova 30 giugno 2008.

