



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotechnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Curriculum Scienze Biomediche Molecolari

IRCCS Policlinico San Matteo – Pavia

Vescicole Extracellulari da cellule mesenchimali ad alto contenuto
di ATP: Strategia emergente di Drug Delivery in modelli in vitro
di Ischemia Renale

Relatore:

Professoressa Simona Viglio

Correlatore:

Dott.Ssa Maria Antonietta Grignano

Tesi di:

Giulia Brusoni

Matricola: 544119

Anno Accademico 2025/2026

Indice

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUZIONE..... | 4 |
| 1.1 | Trapianto di rene e organi marginali | 4 |
| 1.1.1 | Trapianto renale | 4 |
| 1.1.2 | Organi marginali | 5 |
| 1.1.3 | Danno renale causato da ischemia prolungata e da IRI | 7 |
| 1.1.4 | Adenosina Trifosfato (ATP) | 11 |
| 1.2 | Strategie di drug Delivery | 16 |
| 1.2.1 | Somministrazione esogena di ATP | 16 |
| 1.2.2 | Somministrazione dei liposomi..... | 18 |
| 1.2.3 | Tecniche di caricamento dell'ATP: elettroporazione | 22 |
| 1.3 | Vescicole Extracellulari derivanti da cellule stromali mesenchimali per la terapia rigenerativa renale..... | 29 |
| 1.3.1 | Cellule stromali mesenchimali come fonte per la terapia rigenerativa..... | 29 |
| 1.3.2 | Vescicole extracellulari..... | 30 |
| 1.3.3 | EV bioingegnerizzate: la nuova era della terapia acellulare..... | 36 |
| 2 | SCOPO DEL LAVORO | 38 |
| 3 | MATERIALI E METODI..... | 39 |
| 3.1 | Isolamento di MSC-EV | 39 |
| 3.2 | Validazione dei test di caricamento di ATP nelle EV | 40 |
| 3.3 | Quantificazione dell'ATP nelle vescicole extracellulari..... | 43 |
| 3.4 | Valutazione morfologica e dimensionale delle EV-ATP | 45 |
| 3.5 | Coltura di cellule tubulari renali..... | 45 |
| 3.6 | Modello di ipossia | 46 |
| 3.7 | Disegno sperimentale | 47 |
| 3.8 | Saggio di vitalità cellulare..... | 48 |
| 3.9 | Dosaggio Lattato Deidrogenasi (LDH)..... | 49 |
| 3.10 | Emogas analisi | 50 |

| | | |
|------|---|----|
| 3.11 | Analisi metabolomiche | 50 |
| 3.12 | Analisi statistica..... | 51 |
| 4 | RISULTATI..... | 53 |
| 4.1 | Caratterizzazione di EV naïve | 53 |
| 4.2 | Efficacia di caricamento tra MF, EP e T | 53 |
| 4.3 | Analisi dimensione e morfologica tra MF ed EP | 54 |
| 4.4 | Studio di rilascio dell'ATP..... | 55 |
| 4.5 | Cinetica di rilascio dell'LDH | 56 |
| 4.6 | Vitalità cellulare | 57 |
| 4.7 | Dosaggi LDH | 58 |
| 4.8 | Dosaggio elettroliti e pH | 60 |
| 4.9 | Analisi dei metaboliti | 61 |
| 5 | DISCUSSIONE..... | 63 |
| 6 | CONCLUSIONE | 66 |
| | Bibliografia | 67 |

1 INTRODUZIONE

1.1 Trapianto di rene e organi marginali

1.1.1 *Trapianto renale*

Il trapianto di rene è il trattamento di elezione per i pazienti con insufficienza renale cronica terminale. (Force and Andreu 2005).

In Italia, dopo un declino registrato nel 2020 a causa della pandemia da COVID 19, l'attività di trapianto di organi ha mostrato una ripresa costante e significativa, raggiungendo quasi le 5000 procedure nel 2025. (Figura 1)

L'andamento positivo, che ha incluso trapianti da donatori deceduti e viventi, è indicativo del rafforzamento del sistema nazionale dei trapianti. A livello territoriale, tuttavia, emergono significative disparità, con regioni come la Lombardia e il Veneto che mostrano un'attività di gran lunga superiore rispetto ad altre, suggerendo una potenziale eterogeneità nella capacità operativa tra i sistemi sanitari regionali.

Nonostante questo aumento complessivo, la domanda di organi continua a superare l'offerta disponibile. Questo persistente divario fa sì che un numero considerevole di pazienti rimanga in lista d'attesa.

Inoltre, il numero di organi ritenuti idonei al trapianto viene ridotto a seguito di essenziali valutazioni di qualità e compatibilità (Magistri 2025).

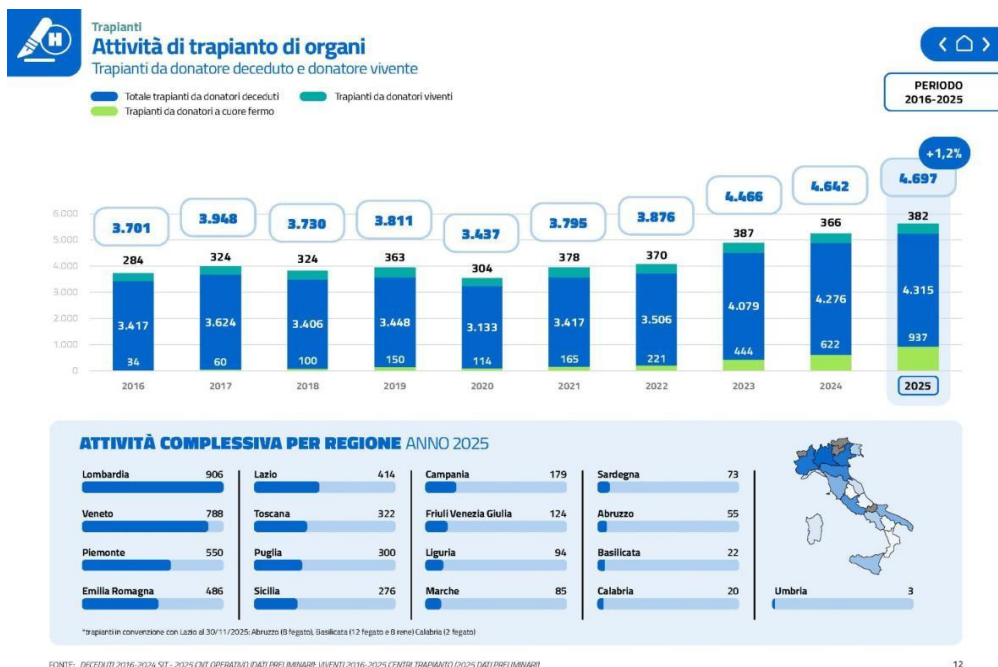


Figura 1: Andamento dell'attività di trapianto di organi in Italia dal 2016 al 2025, con una ripartizione per regione per l'anno 2025. I dati evidenziano una crescita nazionale continua dal 2021, con un incremento del +1,2% nel 2025 rispetto al 2024. (Adattamento di AVIS, sulla base di dati preliminari 2025 del Centro Nazionale Trapianti - CNT <https://www.avis.it/donazioni-e-trapianti-neri-ancora-in-crescita-il-2025-miglior-anno-di-sempre/>)

1.1.2 Organi marginali

Le strategie per aumentare il numero dei donatori sono numerose e si basano sia su una corretta informazione e sensibilizzazione in merito al consenso alla donazione di organi sia sull'incremento delle redazioni testamentarie in vita.

Inoltre, una delle sfide degli ultimi decenni riguarda l'individuazione di strategie innovative volte a migliorare e preservare la qualità degli organi attualmente scartati, con l'obiettivo di ampliare il bacino dei donatori disponibili.

Tra le prime e più rilevanti strategie adottate per incrementare l'attività di trapianto vi è stato il ricorso a organi provenienti da "donatori marginali", ossia soggetti che non rientrano nella categoria dei donatori a criteri standard (Standard Criteria Donor, SCD), comunemente identificati anche come donatori dopo morte cerebrale (Donation after Brain Death, DBD) (Demiselle et al., 2016).

Per donatori marginali si intendono, in particolare: i) i donatori a cuore fermo (Donation after Circulatory Death, DCD), ovvero dopo morte circolatoria; e ii) i donatori con criteri espansi (Expanded Criteria Donor, ECD), categoria che comprende soggetti di età superiore ai 60 anni oppure di età compresa tra 50 e 59 anni associata ad almeno due delle seguenti caratteristiche:

- ipertensione

- creatinina sierica superiore a 1,5 mg/dL
- decesso per cause cerebrovascolari/ictus (Filiopoulos e Boletis, 2016; Kootstra and van Heurn 2007).

Inoltre nel 1996, il gruppo per il trapianto di rene doppio (DKG) ha definito precisi criteri istologici standardizzati per l'assegnazione dei reni sulla base della biopsia eseguita prima del trapianto. Ciò ha portato a una riduzione dei tempi di lista d'attesa per i riceventi di questi reni, a diretto vantaggio di tutti i candidati (Remuzzi et al., 2006).

Le sfide cliniche dei donatori marginali: un rischio amplificato di lesioni

L'uso di organi ECD/DCD è diventato una pratica clinica indispensabile per ampliare il pool di organi disponibili. Tuttavia, questa strategia, sottopone l'innesto a un rischio intrinsecamente più elevato di esiti avversi rispetto a un trapianto da donatore standard, poiché questi organi sono caratterizzati da una maggiore vulnerabilità al danno da ischemia-riperfusione (IRI). Le principali complicazioni post trapianto associate all'uso di organi ECD e DCD includono la mancata funzionalità primaria (PNF), la disfunzione ritardata dell'innesto (DGF) e il rigetto dell'organo.

- la PNF si riferisce al fallimento completo e irreversibile dell'organo trapiantato nel funzionare immediatamente dopo il trapianto, che spesso richiede un re- trapianto immediato o porta al decesso del paziente.
- la DGF è una disfunzione temporanea dell'organo trapiantato, che in genere richiede dialisi o cure di supporto nel periodo postoperatorio precoce ed è associata a una maggiore morbilità e al rischio di danni cronici all'innesto.
- il rigetto d'organo, acuto o cronico, si verifica quando il sistema immunitario del ricevente attacca il trapianto, portando al deterioramento della funzione dell'organo e, se non trattato, alla perdita del trapianto (Taylor e Baicu, 2010; Zhu et al., 2018; Busatti et al., 2019).

Gli organi provenienti da donatori con ECD sono particolarmente suscettibili al danno ischemico a causa della ridotta riserva fisiologica, della senescenza cellulare e del danno istologico preesistente, come aterosclerosi e nefroangiosclerosi. Questa condizione compromette la loro stabilità metabolica durante l'ischemia e limita la loro capacità di recuperare alla riperfusione, contribuendo a una maggiore incidenza di DGF e a una minore sopravvivenza a lungo termine del trapianto (Tingle et al., 2024).

Gli organi DCD, d'altra parte, sono esposti a un periodo inevitabile e dannoso di ischemia calda tra l'arresto circolatorio e il prelievo dell'organo. Durante questo periodo, il metabolismo cellulare continua in assenza di ossigeno, ciò porta ad alterazioni nel volume e nella struttura dei mitocondri, portando ad un esaurimento critico di ATP e a un danno cellulare precoce anche prima dell'inizio della conservazione a freddo. Questo danno è ulteriormente aggravato dal successivo periodo di ischemia fredda, rendendo gli organi DCD particolarmente inclini a una grave IRI, con tassi significativamente aumentati di DGF e un rischio maggiore di PNF (Radajewska, Krzywonos-Zawadzka e Bil-Lula, 2022) (Tingle et al., 2024).

Oltre a questi effetti acuti, l'IRI è anche riconosciuta come un fattore chiave della disfunzione a lungo termine del trapianto. Il danno iniziale subito dagli organi marginali innesca frequentemente processi di riparazione mal adattativi, con conseguenti cambiamenti istologici cronici come la fibrosi interstiziale e l'atrofia tubulare (IFTA), che sono i segni distintivi strutturali del danno cronico all'allograpianto e sono associati a una progressiva perdita di funzione del trapianto nel tempo (Niculae et al., 2023; Zhang, Widdop e Ricardo, 2024).

Queste complicazioni non solo peggiorano gli esiti dei pazienti, ma rappresentano anche un onere considerevole per i sistemi sanitari, rendendo la minimizzazione dell'IRI un obiettivo critico nella moderna medicina dei trapianti (Fernández et al., 2020).

Queste complicazioni hanno un impatto significativo sugli esiti dei pazienti e sulle risorse sanitarie, rendendo lo sviluppo di strategie protettive per mitigare l'IRI e migliorare la vitalità del trapianto una priorità chiave nella medicina dei trapianti.

1.1.3 Danno renale causato da ischemia prolungata e da IRI

Danno da ischemia

Il principale fattore scatenante del danno ischemico risiede nel profilo metabolico unico delle cellule epiteliali tubulari renali. Queste cellule, in particolare nel tubulo contorto prossimale, sono tra le più metabolicamente attive del corpo, riassorbendo circa il 70% del filtrato glomerulare. Questa funzione è un processo estremamente dispendioso in termini di energia che si basa quasi esclusivamente sulla fosforilazione ossidativa mitocondriale per la produzione di ATP.

L'interruzione del flusso sanguigno durante un evento ischemico priva queste cellule di ossigeno, l'accettore finale di elettroni della catena di trasporto degli elettroni, causando un collasso quasi istantaneo delle riserve intracellulari di ATP.

Questa paralisi metabolica innesca una cascata di eventi che portano inesorabilmente alla morte cellulare per necrosi e apoptosi (Ma et al., 2014).

Durante il periodo prolungato di ischemia, questa crisi energetica impone un passaggio dal metabolismo aerobico. Ciò porta alla conversione del piruvato in lattato, che diventa l'unica fonte di ATP e sovraccarica la cellula di lattato e protoni. Il conseguente aumento dell'acido lattico sposta l'ambiente intracellulare verso l'acidosi (Salvadori, Rosso e Bertoni, 2015).

Per gestire questo stress metabolico, le cellule aumentano l'espressione delle proteine correlate alla glicolisi anaerobica.

L'esaurimento di ATP non è solo la conseguenza del danno, ma la sua causa diretta e fondamentale.

Questo deficit energetico ha conseguenze immediate e catastrofiche sull'omeostasi cellulare. In primo luogo, la funzione delle pompe ioniche di membrana critiche, come la Na^+/K^+ ATPasi, viene meno.

Questa inibizione porta a un accumulo intracellulare di sodio, che a sua volta causa un massiccio afflusso di acqua e il conseguente rigonfiamento cellulare. Come risultato dell'acidosi, l'aumento dei protoni intracellulari destabilizza anche le membrane lisosomiali, portando alla fuoriuscita di enzimi lisosomiali. Inoltre, l'escrezione di calcio diminuisce, con conseguente aumento del calcio intracellulare.

Questo sovraccarico attiva le proteasi Ca^{2+} dipendenti, come le calpaine, che avranno un effetto dannoso durante la fase di riperfusione (Nieuwenhuijs-Moeke et al., 2020).

Il sovraccarico di Ca^{2+} nei mitocondri è anche responsabile della generazione di piccole quantità di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

La profonda crisi energetica arresta anche tutti i processi anabolici, inclusa la sintesi proteica e i meccanismi di mantenimento essenziali come la riparazione del DNA (Ma et al., 2014).

Con un'ischemia prolungata, l'ATP viene rapidamente degradato in ADP e AMP e quest'ultimo viene ulteriormente metabolizzato in adenosina, inosina e ipoxantina.

La libera diffusione di questi nucleotidi di adenina all'esterno della cellula blocca il potenziale per una rapida ri-sintesi intracellulare di ATP una volta ripristinato il flusso sanguigno (Deverajan, 2006).

Il ruolo diretto della crisi energetica come fattore scatenante per i percorsi di morte cellulare è stato elegantemente dimostrato. Studi hanno dimostrato che una crisi energetica da sola, indotta chimicamente in cellule tubulari in coltura, è sufficiente ad attivare una complessa risposta al danno del DNA (DDR).

L'esperimento decisivo ha dimostrato che mantenendo i livelli di ATP attraverso una fonte di energia alternativa come il glucosio, l'intera cascata di danni è stata abrogata, confermando che la crisi energetica stessa è il fattore scatenante primario (Ma et al., 2014).

In particolare, la via apoptotica intrinseca, che è centrale nel danno da ischemia-riperfusione renale, è strettamente regolata dalla famiglia di proteine BCL-2. Le proteine pro-apoptotiche, come BAX e BAK, promuovono il rilascio del citocromo C dai mitocondri, mentre le proteine anti-apoptotiche, come BCL-2 e BCL-XL, ne impediscono il rilascio. Lo squilibrio tra questi fattori, spesso innescato da stress cellulari, tra cui la deplezione di ATP, il sovraccarico di calcio e l'accumulo di ROS, porta alla permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna e alla successiva attivazione delle caspasi (Liu et al., 2022; Kim et al., 2024).

A livello strutturale, la deplezione di ATP porta a rapide alterazioni nella morfologia delle cellule tubulari.

Come illustrato nella Figura 2, il danno subletale si manifesta inizialmente con una perdita di orletti a spazzola e polarità cellulare, nonché come interruzione del citoscheletro.

Se la lesione si aggrava, progredisce alla fase di estensione, in cui i componenti della membrana a orletto a spazzola vengono rilasciati nel lume, contribuendo alla formazione di cilindri e all'ostruzione luminale, seguita da infiammazione, desquamazione e morte cellulare. (Devarajan, 2006).

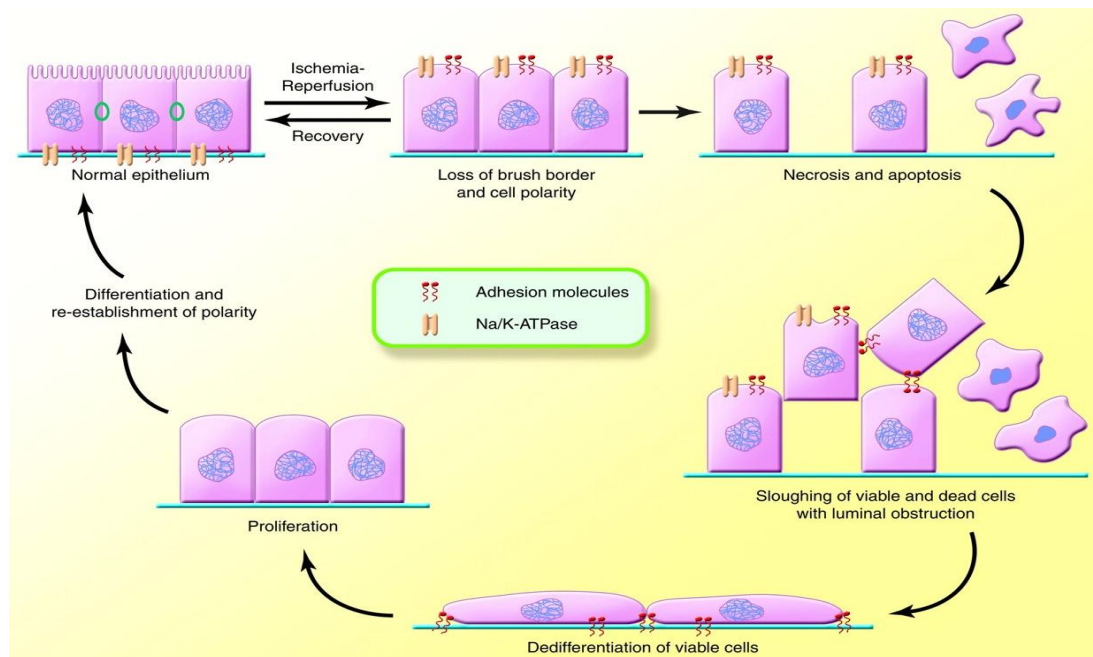


Figura 2: Alterazioni nella struttura delle cellule tubulari dopo ischemia

(Devarajan, Prasad. Update on Mechanisms of Ischemic Acute Kidney Injury)

Danno da riperfusione

La fisiopatologia dell'IRI, consiste in due fasi: una fase ischemica primaria in cui il flusso sanguigno all'organo viene interrotto dopo il clampaggio dell'arteria e il prelievo del rene, e la fase di riperfusione, in cui il flusso sanguigno viene ripristinato all'organo.

Sebbene essenziale per invertire il danno ischemico, il ripristino del flusso sanguigno paradossalmente aggrava il danno tissutale nel rene trapiantato, il danno da IRI è per questo definito contraddittorio (Cowled e Fitridge, 2011).

Questo fenomeno, noto come danno da riperfusione, è un processo complesso guidato da eventi dipendenti dalla riossigenazione, tra cui stress ossidativo, infiammazione e morte cellulare programmata (Kezic, Stajic e Thaiss, 2017).

Lo stato energetico ridotto di un rene ischemico lo rende particolarmente vulnerabile a questi insulti secondari, che possono portare a danni irreversibili al trapianto.

Il meccanismo centrale del danno da riperfusione è la massiccia generazione di ROS.

In seguito a riossigenazione, l'enzima xantina ossidasi, accumulato durante l'ischemia ma inattivo in un ambiente anossico, si attiva. Catalizza la conversione dell'ipoxantina in xantina, generando quantità sostanziali di superossido, perossido di idrogeno e radicali idrossilici.

Queste specie altamente reattive inducono carbonilazione proteica e perossidazione lipidica, che compromettono l'integrità strutturale e funzionale delle membrane mitocondriali, lisosomiali e plasmatiche (Paller, Hoidal e Ferris, 1984).

Oltre alla citotossicità diretta, i ROS avviano una potente cascata infiammatoria. Stimolano la fosfolipasi-A2 (PLA2) e inducono l'espressione di molecole di adesione endoteliale, in particolare, la molecola di adesione intracellulare-1 (CAM-1) che facilita la chemiotassi, il rolling e l'adesione stabile dei neutrofili. Contemporaneamente, la PLA2 attivata può promuovere la produzione mediata dalla caspasi-1 di citochine pro infiammatorie, tra cui il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α) e varie interleuchine (ad esempio IL-1 e IL-8).

Questo ambiente citochinico recluta ulteriormente i neutrofili all'endotelio peritubulare. L'infiltrato infiammatorio risultante, unito all'ostruzione tubulare, ostacola significativamente il ripristino del flusso sanguigno renale e della filtrazione glomerulare (Collard e Gelman, 2001; Versteilen et al., 2004).

Inoltre, la riperfusione porta a un aumento dei livelli di calcio intracellulare e mitocondriale, in parte dovuto alla normalizzazione del pH. Questo calcio elevato attiva le calpaine, proteasi che degradano i componenti del citoscheletro e contribuiscono alla morte cellulare (Salvadori, Rosso e Bertoni, 2015).

In sinergia con i ROS, questo sovraccarico di calcio induce l'apertura del poro di transizione della permeabilità mitocondriale (mPTP). L'apertura dell'mPTP porta al rilascio di fattori pro-apoptotici come il citocromo C e di modelli molecolari associati al danno (DAMP) come il DNA mitocondriale (mtDNA).

Queste molecole innescano percorsi intrinseci di morte cellulare (apoptosi e necrosi) e attivano i sistemi immunitari innato e adattativo, amplificando ulteriormente il danno tissutale (Nieuwenhuijs-Moeke et al., 2020).

Questo spiega come il sistema immunitario svolga un ruolo cruciale nella patogenesi dell'IRI e, in particolare, nelle cellule renali che producono attivamente mediatori infiammatori (Sung et al., 2002).

Collettivamente, questi percorsi interconnessi e sinergici aggravano l'insulto ischemico iniziale, trasformando un danno potenzialmente reversibile in una lesione e disfunzione del trapianto consolidate (Aranda-Rivera et al., 2021) ed è per questo associato ad un aumento della mortalità, a un prolungamento dell'ospedalizzazione e può causare disfunzione renale e danno renale acuto (AKI) (Ponticelli, 2014).

1.1.4 Adenosina Trifosfato (ATP)

Come detto in precedenza la riduzione di ATP è la principale causa del danno da ischemia prolungata.

L'ATP è universalmente riconosciuto come la principale fonte di energia chimica all'interno delle cellule ed è essenziale per sostenere i processi biologici e, quindi, per la vita stessa.

Chimicamente, l'ATP è un nucleotide composto da tre componenti principali:

- un'adenina, una base purinica azotata
- uno zucchero ribosio (pentoso a cinque atomi di carbonio)
- tre gruppi fosfati legati allo zucchero che formano una catena lineare

Come mostrato nella Figura 3, la capacità energetica della molecola risiede nei due legami fosfoanidridici ad alta energia che collegano i gruppi fosfato. L'idrolisi di questi legami porta alla formazione di ADP e Pi (fosfato inorganico), questa è una reazione altamente esoergonica che rilascia

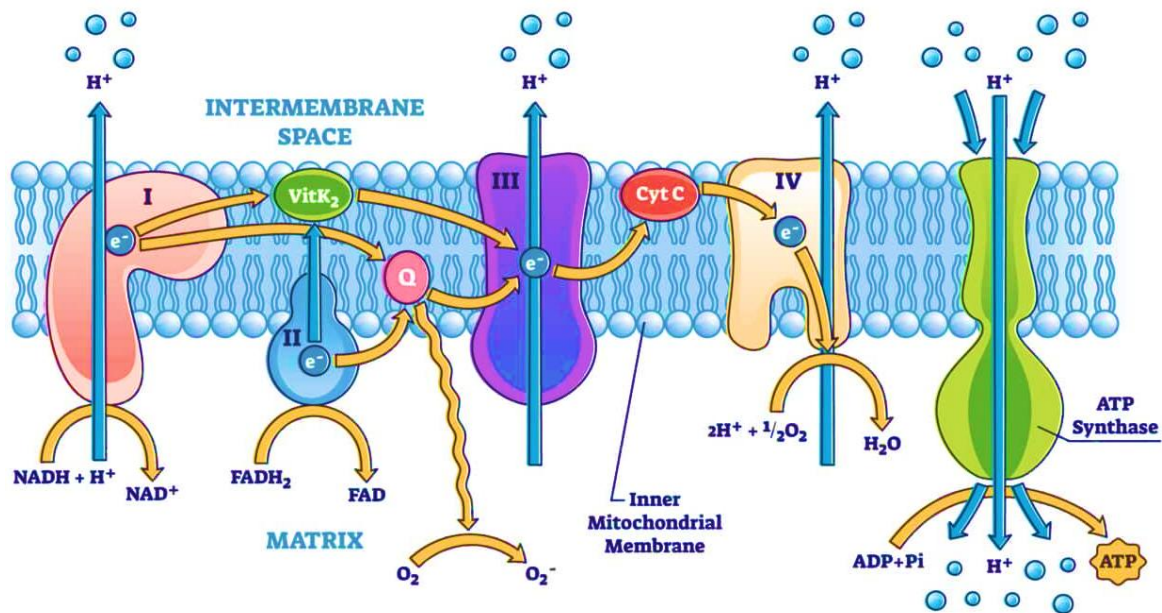


Figura 4: Catena di trasporto degli elettroni

Conservazione degli organi e macchina di riperfusione

Per ottenere un esito positivo del trapianto è fondamentale mantenere la vitalità dell'organo durante la conservazione prima dell'innesto. Nella routine clinica pre-trapianto, l'organo può essere conservato mediante perfusione meccanica ipotermica (HMP).

Perfusione meccanica ipotermica

L'HMP rappresenta un progresso significativo e comprovato nella conservazione degli organi, affermandosi come un'alternativa superiore alla tradizionale conservazione statica a freddo (CS).

Il principio base comune a quello della CS è utilizzare l'abbassamento della temperatura per sopprimere l'attività degli enzimi metabolici e catabolici per ridurre il consumo di substrati energetici e ossigeno, rallentando il metabolismo cellulare.

Il sistema HMP però al contrario della CS non offre solo un raffreddamento passivo ma fornisce anche un supporto fisiologico attivo dell'organo. Con questo metodo, infatti, il rene è collegato a una macchina specializzata che fa circolare continuamente una soluzione di conservazione fredda (tipicamente $4-8^\circ\text{C}$) acellulare attraverso il suo sistema vascolare.

Questo flusso continuo a bassa pressione, che può essere pulsatile o non pulsatile, garantisce un raffreddamento più rapido e omogeneo dell'intero organo, lava via efficacemente le cellule del sangue

residue e i sottoprodotti metabolici tossici accumulati durante l'ischemia e previene l'edema interstiziale che può compromettere la funzionalità del trapianto.

L'apparato HMP stesso è costituito da un circuito sterile monouso collegato a una console che gestisce il processo di perfusione. I componenti chiave includono una pompa che genera il flusso, un serbatoio contenente la soluzione di perfusione, una cassetta o camera per organi in cui è alloggiato il rene e sensori integrati per il monitoraggio. Una rappresentazione schematica di tale sistema è fornita nella Figura 5.

Il liquido di perfusione utilizzato è fondamentale per il successo della tecnica. La più comune è la soluzione dell'università del Wisconsin (soluzione Belzer), una formulazione avanzata contenente agenti oncotici come l'idrossietilamido per mantenere la pressione osmotica, tamponi per contrastare l'acidosi e antiossidanti come il glutatione per neutralizzare i radicali liberi, il tutto progettato per proteggere l'integrità cellulare e preservare le riserve energetiche durante il periodo di conservazione (Bzeizi et al., 1997; Quader et al., 2020).

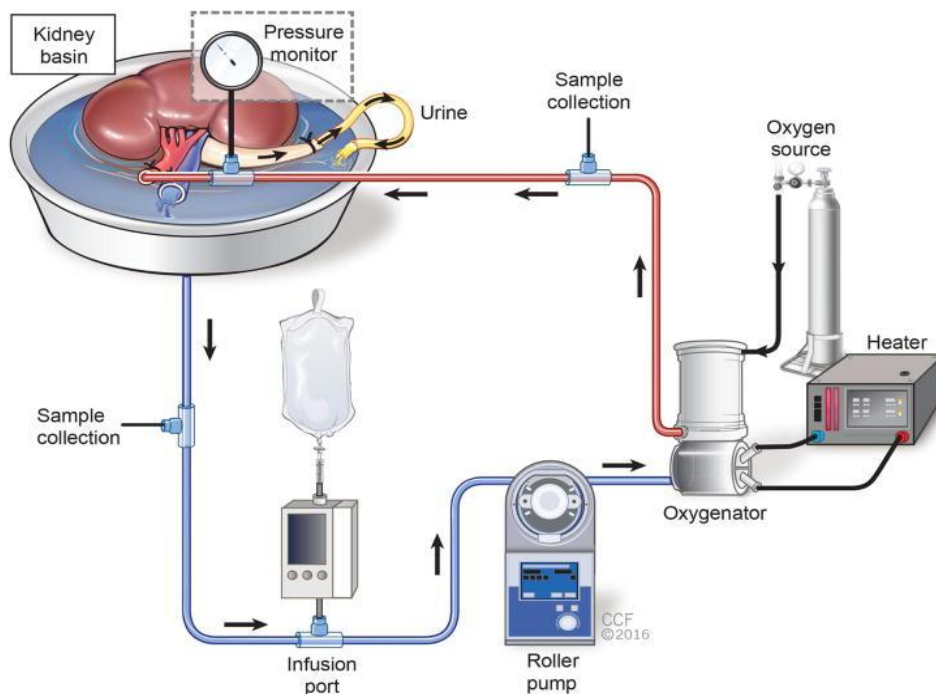


Figura 5: Rappresentazione schematica della macchina di perfusione

(Blum MF *et al.*, 2017 Comparison of normothermic and hypothermic perfusion in porcine kidneys donated after cardiac death.)

Una recente e ampia meta-analisi Cochrane ha concluso con elevata certezza che l'HMP continua, riduce significativamente l'incidenza di DGF. Ancora più importante, con un enorme impatto clinico,

la stessa analisi ha dimostrato che l'HMP migliora sostanzialmente la sopravvivenza dell'innesto sia a un anno che a lungo termine.

Un punto cruciale evidenziato da questa ricerca è la necessità di una perfusione continua: i massimi benefici si realizzano solo quando l'HMP viene applicata per l'intero tempo di ischemia fredda. Al contrario, brevi periodi di perfusione ipotermica "end-ischemic", eseguiti solo nelle ore immediatamente precedenti il trapianto, non sono riusciti a dimostrare gli stessi benefici significativi (Tingle et al., 2024).

Oltre ai suoi comprovati benefici di conservazione, l'HMP offre un'opportunità unica e preziosa per la valutazione in tempo reale della vitalità dell'organo.

La console di perfusione monitora e registra continuamente parametri critici come la resistenza vascolare, le portate e la temperatura del perfusato. Ad esempio, una resistenza vascolare elevata o in progressivo aumento può indicare danni endoteliali o ostruzione microvascolare, fungendo da forte predittore di una scarsa funzionalità post-trapianto.

Inoltre il perfusato può essere campionato per quantificare i biomarcatori di danno alle cellule renali, come l'enzima lattato deidrogenasi (LDH) e la glutatione-S-transferasi.

Questa ricchezza di dati oggettivi fornisce un "profilo di qualità" completo dell'organo, consentendo ai medici di prendere decisioni più informate, soprattutto quando valutano reni marginali che altrimenti potrebbero essere scartati (Mores et al., 2010).

Infine, il circuito HMP funge da piattaforma dinamica per il ricondizionamento e la terapia degli organi ex vivo. Questo trasforma la conservazione da uno stato di mantenimento passivo in una finestra di trattamento attiva. Gli agenti terapeutici possono essere aggiunti direttamente al perfusato per mitigare specifici tipi di danno. Esempi includono vasodilatatori come l'ossido nitrico per migliorare la perfusione microcircolatoria o antiossidanti per combattere preventivamente lo stress ossidativo della riperfusione (Bzeizi et al., 1997; Maathuis, Leuvenink e Ploeg, 2007). Questo campo continua ad evolversi con innovazioni come la perfusione ipotermica ossigenata, in cui l'ossigeno viene fornito attivamente durante la perfusione a freddo.

Questo specifico miglioramento ha mostrato ulteriori vantaggi, in particolare per gli organi ad alto rischio provenienti da donatori DCD, migliorando ulteriormente la funzione renale e riducendo i tassi di rigetto acuto (Tingle et al., 2024).

1.2 Strategie di drug Delivery

1.2.1 Somministrazione esogena di ATP

Se la carenza di ATP è il problema centrale, la soluzione apparentemente più diretta, sarebbe la somministrazione di ATP esogeno libero, ma ciò si scontra con una serie di barriere insormontabili che la rendono inefficace e potenzialmente dannosa.

Queste possono essere classificate in:

1. Barriera fisica: la membrana cellulare impermeabile;
2. Barriera enzimatica: rapida degradazione extracellulare dell'ATP;
3. Barriera biologica: segnalazione dannosa tramite il recettore P2X7, che inibisce la sintesi mitocondriale di ATP

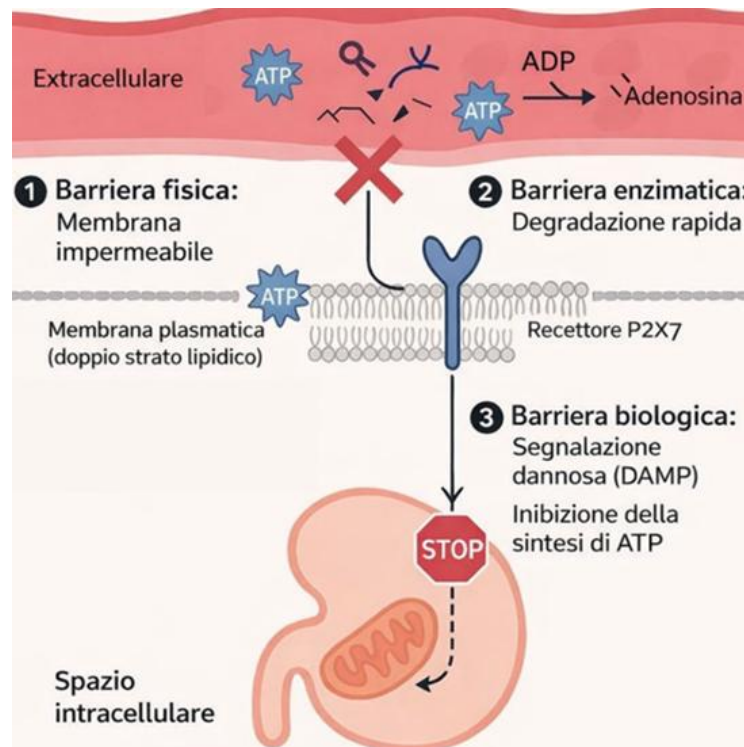


Figura 6: Le tre principali barriere che incontra l'ATP libero

Barriera fisica: la membrana plasmatica

Il primo ostacolo è di natura fisico-chimica.

In condizioni fisiologiche, esiste un enorme gradiente di concentrazione di ATP tra il citosol e lo spazio extracellulare.

La concentrazione intracellulare di ATP è nell'ordine delle millimoli (1-10 mM), mentre i livelli extracellulari sono mantenuti a concentrazioni estremamente basse, spesso nanomolari (Sameiyan et al., 2021).

Questo gradiente è rafforzato dalla quasi totale impermeabilità della membrana plasmatica all'ATP, che non può diffondere passivamente attraverso il doppio strato lipidico apolare per raggiungere il citosol, dove sarebbe necessaria la sua azione terapeutica.

Degradazione extracellulare dell'ATP libero

Anche se l'ATP potesse in qualche modo aggirare la membrana, verrebbe distrutto prima di raggiungerla.

Lo spazio extracellulare è pattugliato da un sistema enzimatico robusto e ridondante, le ectonucleotidasi, il cui scopo è inattivare rapidamente l'ATP extracellulare e prevenire un'eccessiva segnalazione purinergica. Questo sistema è dominato dall'asse ATP- adenosina, un equilibrio tra due segnali opposti: l'ATP, che è proinfiammatorio, e il suo prodotto di degradazione adenosina, che è antinfiammatorio (Wu et al., 2022).

La conversione è catalizzata da due enzimi chiave: CD39, l'enzima limitante la velocità che degrada ATP e ADP in AMP, e CD73, che converte l'AMP in adenosina (Zhong et al., 2021; Wu et al., 2022).

Questi sono integrati da altri enzimi, come le ecto-nucleotide pirofosfato/fosfodiesterasi (eNPPs), che competono per lo stesso substrato (Villa-Belosta, 2023).

L'efficienza di questo sistema è tale che l'emivita dell'ATP libero nel flusso sanguigno è questione di secondi, un lasso di tempo assolutamente insufficiente per qualsiasi effetto terapeutico.

Segnalazione dannosa

Infine, recenti scoperte hanno rilevato un ostacolo ancora più profondo. L'ATP extracellulare, agendo come DAMP, si lega ai recettori di superficie come il recettore P2X7. Paradossalmente, questo legame innesca una cascata di segnalazione intracellulare che porta all'inibizione della fosforilazione ossidativa mitocondriale (Saller et al., 2025).

In pratica, la somministrazione di ATP libero dall'esterno non solo non riuscirebbe a risolvere la crisi energetica, ma potrebbe addirittura aggravarla inducendo la cellula ad interrompere la propria produzione residua di ATP e indirizzandola verso un percorso di morte cellulare pro-infiammatorio.

Queste barriere dimostrano collettivamente perché reintegrare l'energia cellulare con ATP libero non è una strategia terapeutica praticabile.

1.2.2 Somministrazione dei liposomi

I liposomi come strategia di somministrazione di farmaci, sono stati descritti per la prima volta da Alec D. Bangham negli anni '60.

I liposomi sono vescicole sferiche artificiali costituite da uno o più doppi strati lipidici che racchiudono un nucleo acquoso. Questa architettura, che imita da vicino le membrane cellulari naturali, conferisce elevata biocompatibilità, biodegradabilità e non immunogenicità, rendendo i liposomi particolarmente adatti all'uso terapeutico (Guimaraes, Cavaco-Pauloo e Nogueira, 2021).

La loro modularità chimica è il loro principale punto di forza, consentendo un controllo preciso sulla composizione per adattarla ad applicazioni specifiche. Questa versatilità ha reso i liposomi una delle piattaforme più efficaci e clinicamente validate per la somministrazione di farmaci, come dimostrato dalle numerose formulazioni già approvate per l'uso clinico (Large et al., 2021; Nsairat et al., 2022).

Il loro successo si basa su tre vantaggi chiave:

1. **Biocompatibilità:** grazie alla loro natura biomimetica, i liposomi interagiscono facilmente con le membrane cellulari dei mammiferi, facilitando un efficiente assorbimento cellulare e riducendo al minimo le risposte biologiche avverse.
2. **Protezione e rilascio del carico terapeutico:** una volta incapsulato, sia idrofilo nel nucleo acquoso che idrofobo all'interno del doppio strato fosfolipidico, il farmaco è protetto dalla degradazione enzimatica, dall'inattivazione chimica e dal riconoscimento immunitario, con conseguente prolungamento del tempo di circolazione e miglioramento dell'efficacia terapeutica.
3. **Indice terapeutico migliorato:** i liposomi migliorano la biodistribuzione e riducono l'esposizione sistemica ai tessuti non bersaglio, riducendo così gli effetti collaterali rispetto al farmaco libero e migliorando sia l'efficacia che la sicurezza del paziente.

La composizione dei liposomi può essere finemente regolata utilizzando vari fosfolipidi, sia naturali (ad esempio lecitina di soia) che, più comunemente, sintetici. La scelta del fosfolipide è fondamentale per determinare le proprietà chiave del nanovettore. La lunghezza e il grado di saturazione delle catene aciliche influenzano la temperatura di transizione di fase (T_m), che a sua volta regola la rigidità e la permeabilità della membrana. I lipidi saturi come DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) e DSPC

(distearoilfosfatidilcolina) formano membrane più rigide e meno permeabili, ideali per il rilascio controllato di farmaci, mentre i lipidi insaturi come DOPC (dioleoilfosfatidilcolina) producono membrane più fluide. Il gruppo di testa polare del fosfolipide determina la carica superficiale, un fattore critico nella stabilità colloidale e nell'interazione cellulare. Ciò consente la formulazione di liposomi neutri (PC), anionici (PS, PG) o cationici (ad esempio, DOTAP), questi ultimi ampiamente utilizzati per la complessazione elettrostatica degli acidi nucleici. (Nsairat et al., 2022).

Una componente pressoché onnipresente nelle formulazioni liposomiali è il colesterolo, che si intercala tra le catene aciliche e agisce come tampone di fluidità: al di sopra della T_m , riduce la fluidità della membrana; al di sotto aumenta il disordine delle catene, prevenendo la cristallizzazione e mantenendo la flessibilità. L'effetto netto è una maggiore stabilità strutturale e una ridotta permeabilità alle piccole molecole incapsulate (Large et al., 2021).

Oltre alla composizione, i liposomi sono classificati anche in base alle dimensioni e alla lamellarità. Possono essere classificati come vescicole unilamellari, piccole o grandi, o come vescicole multilamellari, a seconda che siano formate da un singolo o da più doppi strati lipidici concentrici.

Sfide e strategie di ottimizzazione: l'evoluzione delle piattaforme liposomiali

Nonostante i loro significativi vantaggi, la prima generazione di liposomi "convenzionali" ha dovuto affrontare una sfida critica che ne ha limitato l'efficacia terapeutica: il rapido riconoscimento e la rimozione dal flusso sanguigno. Dopo la somministrazione endovenosa, questi liposomi vengono rapidamente opsonizzati, rivestiti da proteine plasmatiche chiamate opsine, che li contrassegnano per l'assorbimento da parte del sistema fagocitario mononucleare, principalmente da parte dei macrofagi nel fegato e nella milza (Nsairat et al., 2022).

Questa rapida eliminazione ha ridotto drasticamente la loro emivita circolatoria, impedendo loro di raggiungere i tessuti bersaglio previsti in concentrazioni sufficienti.

Per affrontare questo problema, sono stati sviluppati i liposomi stealth (di seconda generazione), rivestiti con PEG (PEGilazione), che li rende meno rilevabili dal sistema immunitario e ne prolunga significativamente il tempo di circolazione nel flusso sanguigno.

Successivamente, l'attenzione si è spostata sui liposomi a targeting attivo, funzionalizzati con ligandi specifici (ad esempio, anticorpi) per promuovere l'accumulo selettivo nei tessuti bersaglio.

Infine, la ricerca si sta orientando verso lo sviluppo di liposomi intelligenti, capaci di rilasciare il farmaco solo in risposta a stimoli specifici, interni (come pH acido o enzimi) o esterni (come calore o ultrasuoni), migliorando così sia la precisione che la sicurezza del trattamento.

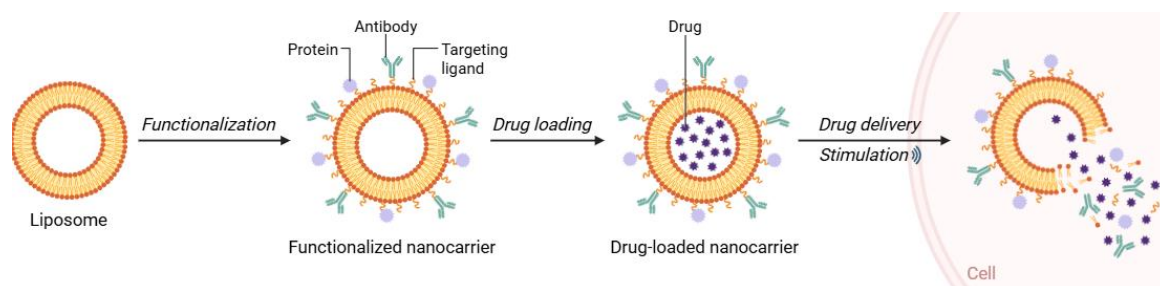


Figura 7: Schema di funzionamento di un liposoma (Biorender)

Limiti nella somministrazione dei liposomi

I liposomi emergono come un vettore logico e convincente per l'ATP terapeutico. La loro comprovata capacità di incapsulare molecole idrofile all'interno di un guscio lipidico protettivo li rende, in teoria, una soluzione ideale alla triade di barriere fisiche, enzimatiche e biologiche, che invece impediscono l'uso dell'ATP libero. Proteggendo l'ATP dalle ectonucleasi extracellulari e lo mascherano dai recettori di superficie come il P2X7, un liposoma caricato con ATP (ATP-LP) dovrebbe, teoricamente, essere in grado di trasportare in sicurezza il suo carico energetico attraverso il flusso sanguigno e consegnarlo ai tessuti ischemici, compreso il rene. Tuttavia, questo potenziale teorico si scontra con la formidabile e unica realtà dell'anatomia e della biologia cellulare renale.

Il potenziale teorico dell'ATP-LP è supportato da decenni di ricerca preclinica su vari modelli di IRI (Korb et al., 2008).

Nel miocardio, l'ATP-LP agisce come fonte energetica esogena, migliorando significativamente il recupero funzionale e accumulandosi preferenzialmente nelle aree ischemiche (Verma et al., 2005; Harter et al., 2009). Analogamente, nel sistema nervoso centrale e nella retina, ha dimostrato effetti neuroprotettivi, aumentando la tolleranza all'ischemia, preservando la sopravvivenza neuronale e riducendo la risposta infiammatoria (Laham et al., 1998; Dvorianchikova et al., 2010). Anche in altri organi ad elevata attività metabolica, come il fegato, l'ATP-LP ha mostrato efficacia nel limitare il danno ischemico e nel migliorare la vitalità tissutale, anche in condizioni di conservazione per trapianto (Korb et al., 2008). Complessivamente, questi studi dimostrano il potenziale dell'ATP-LP come approccio terapeutico versatile per la protezione dei tessuti ischemici (Puisieux et al., 1994).

L'ischemia renale e il dilemma della somministrazione dei liposomi

La funzione primaria del rene, filtrare il sangue e riassorbire selettivamente le sostanze, è proprio ciò che lo rende un organo eccezionalmente difficile per il targeting delle nanoparticelle. La somministrazione mirata al rene richiede una comprensione approfondita dei suoi compartimenti distinti e, per i liposomi, quasi ogni percorso verso il vulnerabile epitelio tubulare è irto di ostacoli (Liu et al., 2019).

Il primo e più determinante di questi è la barriera di filtrazione glomerulare.

Questa intricata struttura multistrato è progettata per essere altamente selettiva in base alle dimensioni, con un cutoff di filtrazione funzionale che trattiene efficacemente le particelle più grandi di 10 nm all'interno della circolazione.

I liposomi, con diametri tipici che vanno da 50 nm a diverse centinaia di nanometri, sono troppo grandi per passare attraverso questo filtro.

Di conseguenza, e loro fisicamente impedito di entrare nel lume tubulare attraverso il filtrato.

Questo chiude il percorso più diretto verso il lato apicale delle cellule epiteliali tubulari, costringendo qualsiasi strategia di somministrazione a basarsi esclusivamente sull'accesso del lato basolaterale, rivolto verso il sangue (Liu et al., 2019). Questo percorso basolaterale alternativo, tuttavia, non è un percorso semplice.

Richiede che i liposomi prima fuoriescano dai capillari peritubulari e poi navighino nello spazio interstiziale denso e attraversino la membrana basale tubulare per entrare in contatto fisico con le cellule bersaglio.

Fondamentalmente, l'assorbimento efficace da parte delle cellule tubulari non è un processo passivo; si basa su specifici meccanismi di trasporto biologico, come l'endocitosi mediata da recettori (Liu et al., 2019).

I liposomi convenzionali, in quanto semplici costrutti sintetici, sono "biologicamente inerti" a questo riguardo.

Mancano delle proteine di superficie e dei ligandi specifici che consentirebbero loro di essere riconosciuti e internalizzati attivamente dai recettori specializzati sulle cellule tubulari. Il loro assorbimento, pertanto, dovrebbe essere minimo, non specifico e del tutto insufficiente per ottenere un effetto terapeutico intracellulare.

Nella Figura 8 è rappresentato uno schema dei due principali ostacoli anatomici che impediscono ai liposomi di raggiungere efficacemente il loro bersaglio terapeutico, le cellule tubulari renali.

La barriera di filtrazione glomerulare agisce come un filtro selettivo in base alle dimensioni, escludendo efficacemente i liposomi (tipicamente >50 nm), che sono troppo grandi per passare nel lume tubulare.

Di conseguenza, i liposomi sono limitati alla via basolaterale dai capillari peritubulari. Anche questa via alternativa è altamente inefficiente, ostacolata dalla necessità di extravasazione e dalla mancanza di meccanismi di assorbimento specifici sulle cellule tubulari, un concetto rappresentato dal percorso incerto.

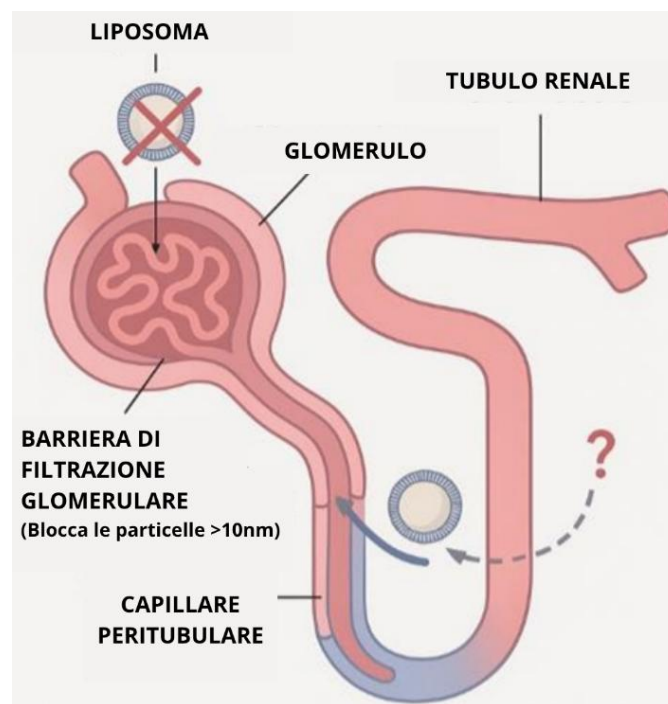


Figura 8: Barriere anatomiche dei tubuli renali per il rilascio dei liposomi

1.2.3 Tecniche di caricamento dell'ATP: elettroporazione

La trasformazione di un nanovettore in un efficace veicolo terapeutico dipende in modo critico dalla capacità di caricarlo con una molecola esogena.

Le tecniche convenzionali (ad esempio, sonicazione, estrusione, cicli di congelamento-scongelo) si basano su approcci di “forza” che destabilizzano temporaneamente la membrana per consentire l'ingresso del carico. Tuttavia questi metodi presentano limitazioni significative. L'applicazione di un elevato stress fisico può causare danni strutturali, come la frammentazione delle

vescicole e la denaturazione di proteine di superficie. Ciò è particolarmente dannoso per le Vescicole Extracellulari (EV), in quanto può annullare i loro vantaggi biologici intrinseci, incluso il targeting naturale (Nowak et al., 2023).

Inoltre, la natura scarsamente controllata di questi processi porta ad un'elevata eterogeneità del prodotto, rendendo difficile stabilire una chiara relazione dose-risposta (Danilushkina et al., 2023).

Cicli di congelamento/scongelamento

Il metodo di caricamento-scongelamento (freeze-thaw, F/T) rappresenta una strategia ampiamente utilizzata nella preparazione e nel caricamento di farmaci nei liposomi, sfruttata sia per migliorare l'efficienza di incapsulamento sia per modulare le proprietà fisico-chimiche del sistema.

Il principio fisico alla base di questo approccio consiste nell'induzione di cicli termici che determinano la formazione di ghiaccio durante il congelamento e la successiva riorganizzazione delle membrane lipidiche durante lo scongelamento. La cristallizzazione dell'acqua provoca un aumento della concentrazione dei soluti nella fase non congelata (cryo-concentrazione) e genera stress meccanici che possono temporaneamente perturbare o rompere il doppio strato fosfolipidico; durante la fase di scongelamento, la riorganizzazione delle membrane favorisce la fusione o il rimodellamento dei liposomi e il conseguente intrappolamento del farmaco nel compartimento acquoso interno, con un incremento dell'efficienza di carico rispetto ai metodi passivi tradizionali. Inoltre, i cicli F/T possono aumentare l'uniformità e la capacità di carico, rendendo il processo utile anche come pretrattamento o fase di ottimizzazione formulativa.

Dal punto di vista dei vantaggi, il metodo è semplice, non richiede l'uso di solventi organici o condizioni particolarmente aggressive e può portare a elevate percentuali di incapsulamento, oltre a favorire la formazione di sistemi più omogenei e stabili. Tuttavia, presenta anche diverse limitazioni: lo stress termico e meccanico associato ai cicli può indurre fusione, aggregazione o aumento delle dimensioni dei liposomi, con possibile perdita di integrità della membrana e rilascio del farmaco, riducendo la riproducibilità del processo. Per questo motivo, la stabilità del sistema dipende fortemente dall'ottimizzazione delle condizioni operative (numero di cicli, velocità di congelamento/scongelamento e presenza di crioprotettori), spesso studiata nell'ambito dell'approccio Quality by Design (QbD) per controllare gli attributi critici di qualità del prodotto finale.

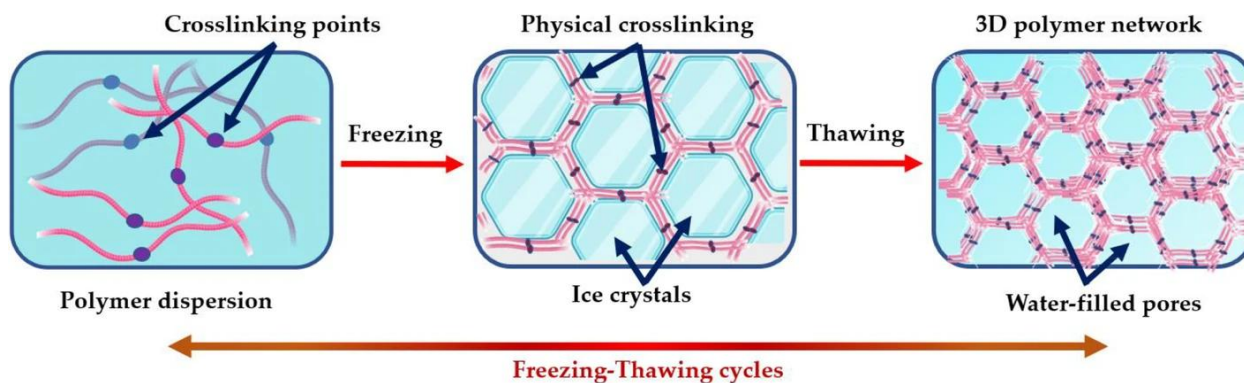


Figura 9: Rappresentazione schematica del processo di congelamento-scongelo

(Bernal-Chávez SA *et al.*, 2023)

Microfluidica

La microfluidica si è affermata come una piattaforma tecnologica rivoluzionaria, questo approccio si basa sulla manipolazione precisa dei fluidi all'interno di microcanali, dove il flusso laminare e la miscelazione caotica controllata consentono un'interazione tra vescicole e carico che è al contempo rapida, efficiente e delicata.

Un sistema microfluidico è tipicamente costituito da tre elementi fondamentali: pompe esterne ad alta precisione (ad esempio, pompe a siringa) per un controllo accurato del flusso, tubi di collegamento e l'unità di elaborazione centrale, il chip microfluidico.

Il chip, spesso delle dimensioni di un vetrino da microscopio, è comunemente realizzato con polimeri come il polidimetilsilossano, un materiale preferito per la sua trasparenza ottica, biocompatibilità e facilità di fabbricazione attraverso un processo noto come soft litografia (Bezelya, Küçüktürkmen e Bozkır, 2023).

All'interno dei microcanali del chip, il comportamento del fluido differisce radicalmente da quello osservato a livello macroscopico. A causa delle piccole dimensioni, il flusso è dominato da forze viscose piuttosto che da forze inerziali, una condizione descritta da un basso numero di Reynolds ($Re < 100$). Questo stabilisce un regime di flusso laminare, in cui i flussi di fluido adiacenti scorrono in strati paralleli (lamine) senza miscelazione turbolenta.

In un canale semplice, l'unica modalità di trasporto di massa tra queste lamine è la diffusione molecolare, un processo intrinsecamente lento (Chiesa *et al.*, 2018).

L'innovazione cruciale della microfluidica risiede nello sfruttare a proprio vantaggio questa fisica. Poiché il tempo necessario per la diffusione è proporzionale al quadrato della distanza da percorrere,

progettando geometrie di canali che riducono questa distanza a pochi micrometri, è possibile ottenere una miscelazione completa in millisecondi. Per ottenere questa miscelazione rapida e controllata, vengono impiegati micromiscelatori passivi con geometrie di canali specificamente progettate.

Le architetture più efficaci e ampiamente utilizzate per la sintesi di nanovettori, come nel metodo di diluizione con etanolo, includono:

- Focalizzazione idrodinamica: un flusso centrale, ad esempio contenente lipidi in etanolo, viene compresso lateralmente da due flussi di guaina esterni (contenenti il carico in un tampone acquoso). Questa configurazione restringe drasticamente il flusso centrale, minimizzando le distanze di diffusione e inducendo un autoassemblaggio rapido e omogeneo di nanoparticelle (Fig. 11) (Maeki et al., 2022). Le geometrie fondamentali per questo scopo, tra cui giunzioni a T, giunzioni a Y e canali di focalizzazione del flusso, sono mostrate schematicamente nella Figura 10.

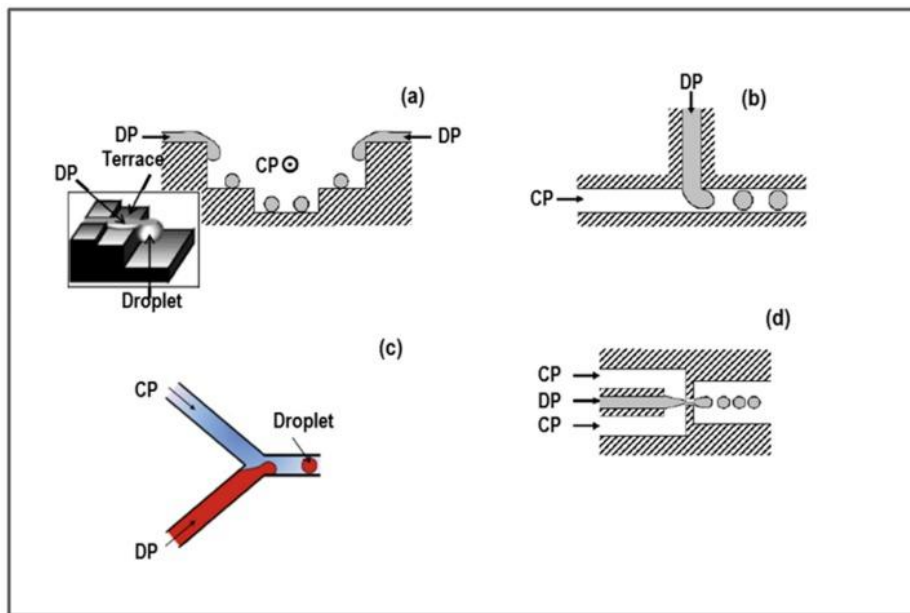


Figure 10: Rappresentazione schematica delle geometrie fondamentali dei microcanali utilizzati come micromiscelatori passivi. (a) Dispositivo a terrazza; (b) Dispositivo a giunzione a T; (c) Dispositivo a giunzione a Y; e (d) Dispositivo a microcanale focalizzante il flusso. CP e DP indicano rispettivamente le fasi continua e dispersa (Chiesa et al., 2018).

- Miscelatori ad advezione caotica: questi canali presentano microstrutture tridimensionali, come il design "a spina di pesce" (miscelatore a spina di pesce sfalsata), che inducono microvortici controllati. Questi vortici piegano e allungano ripetutamente i flussi laminari, garantendo una miscelazione completa ed efficiente all'interno di un canale di lunghezza molto breve (Figura 11) (Chiesa et al., 2018; Maeki et al., 2022).

- Processo delicato: l'assenza di elevate sollecitazioni meccaniche preserva in modo ottimale l'integrità strutturale e biologica delle nanoparticelle, aspetto cruciale per il mantenimento della funzionalità dei veicoli elettrici.
- Controllo e riproducibilità superiori: la gestione precisa dei parametri di flusso garantisce la produzione di particelle altamente uniformi con una riproducibilità tra lotti senza pari, affrontando così una sfida fondamentale nella produzione di veicoli elettrici (Bader, Brigger e Leroux, 2024).

Elettroporazione

L'elettroporazione/elettropermeabilizzazione (EP) si traduce nell'applicazione di un campo elettrico localizzato in grado di aumentare la permeabilità delle molecole nelle membrane cellulari. A causa del fenomeno innescato fisicamente, la membrana cellulare può indurre la depolarizzazione temporanea dei canali voltaggio-dipendenti, che successivamente aumentano la permeabilità cellulare mediante la formazione di pori idrofili (≈ 23 nm di raggio) (Krassowska et al., 2007).

L'EP delle cellule in vitro può essere utilizzata per l'introduzione di DNA, enzimi, anticorpi e altri reagenti biochimici come l'ATP.

In breve, quando viene applicato un impulso di campo elettrico (EFP), si induce una variazione transitoria della permeabilità e della conduttività elettrica nelle membrane cellulari (spessore delle membrane a doppio strato fosfolipidico di $h \approx 3$ a 7×10^{-9} m). L'EFP deve essere applicato per brevi periodi e in un campo elettrico elevato per ottenere una permeabilizzazione della membrana adeguata a consentire il passaggio di qualsiasi molecola attraverso i pori della membrana cellulare (Pisani et al., 2022).

Si verifica così un accumulo di cariche dovuto alla migrazione degli ioni e le membrane cellulari subiscono un riarrangiamento della loro morfologia dopo aver superato una soglia critica che causa la rapida creazione di percorsi acquosi attraverso le barriere contenenti lipidi nelle cellule e nei tessuti (si formano pori idrofili transitori). L'elettroporazione si verifica quando il potenziale transmembrana cellulare (V_m) raggiunge valori molto più alti dei normali valori di "potenziale di riposo" sviluppati per le cellule viventi (Weaver et al., 1995).

I parametri del campo elettrico che controllano l'elettroporazione della membrana sono l'intensità del campo elettrico, la durata dell'impulso (nanosecondi, microsecondi o millisecondi), il numero di impulsi applicati e la frequenza degli impulsi.

Altri parametri che possono influenzare l'elettroporazione della membrana sono la composizione del tampone di elettroporazione, la temperatura e le proprietà intrinseche delle cellule (dimensioni, tipo, forma, densità e adesione) (Teissie et al., 2005).

Un aspetto da considerare è che, con un raggio cellulare più piccolo, è necessario un campo elettrico esterno più intenso per ottenere una permeabilizzazione adeguata. I campi elettrici richiesti per la permeabilizzazione delle cellule dei mammiferi sono molto inferiori a quelli necessari per permeabilizzare, ad esempio, i batteri. È inoltre evidente che, ad esempio, i mitocondri o altri organelli intracellulari non saranno permeabilizzati dagli stessi campi elettrici utilizzati per permeabilizzare la membrana cellulare.

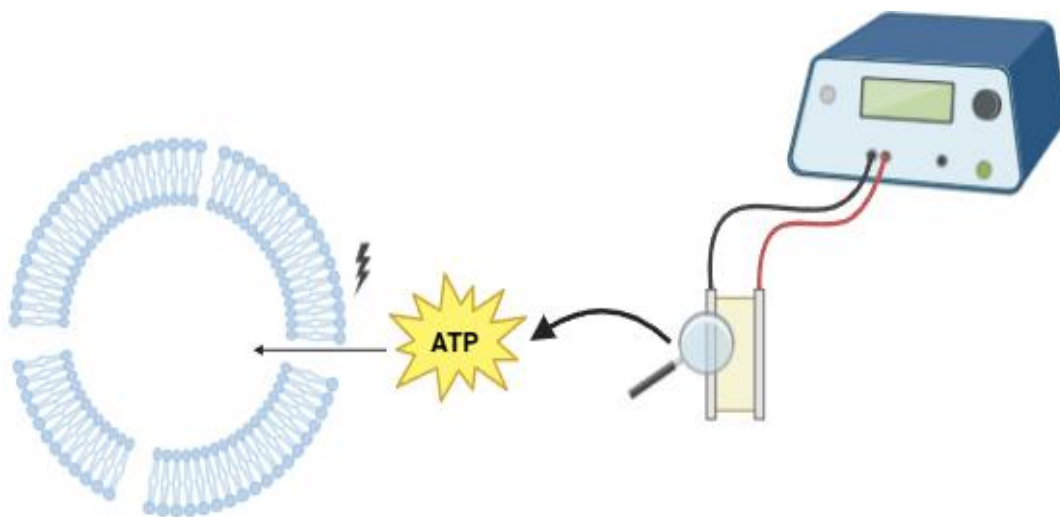


Figura 12: Ingresso di ATP sfruttando l'elettroporazione (Biorender)

I vantaggi dell'elettroporazione per la produzione di nanovettori sono molteplici:

- Elaborazione delicata dei campioni: l'assenza di elevato stress meccanico preserva in modo ottimale l'integrità strutturale e biologica delle nanoparticelle, fondamentale per mantenere la funzionalità dei veicoli elettrici.
- Controllo e riproducibilità superiori: la gestione precisa dei parametri di flusso garantisce la produzione di particelle altamente uniformi con una riproducibilità senza pari, affrontando così una sfida chiave nella produzione di veicoli elettrici (Bader, Brigger e Leroux, 2024).

1.3 Vescicole Extracellulari derivanti da cellule stromali mesenchimali per la terapia rigenerativa renale

1.3.1 Cellule stromali mesenchimali come fonte per la terapia rigenerativa

Nella ricerca di trattamenti innovativi per l'AKI, una condizione con opzioni terapeutiche limitate, la medicina rigenerativa basata sulle cellule è emersa come un campo molto promettente (Lee et al., 2021). Tra i vari candidati, le cellule stromali mesenchimali (MSC) hanno attirato un notevole interesse scientifico. Le MSC sono una popolazione eterogenea di cellule staminali adulte multipotenti che possono essere isolate dai vari tessuti, tra cui midollo osseo, tessuto adiposo e cordone ombelicale. La loro identità è definita da una serie di criteri minimi stabiliti dalla Società internazionale per la Terapia Cellulare (ISCT), che garantisce la standardizzazione nella ricerca a livello mondiale. Secondo l'ISTC, le MSC devono:

- aderire alla plastica in condizioni di coltura standard;
- differenziarsi in vitro in osteoblasti, adipociti e condrociti;
- esprimere uno specifico profilo di marcatori di superficie, risultando positive (>95%) per CD73, CD90 e CD105, pur non esprimendo (<2%) marcatori emopoietici e leucocitari come CD34, CD45, CD11b e HLA-DR (Dominici et al., 2006).

L'assenza di molecole HLA di classe II, in particolare, conferisce loro una bassa immunogenicità, rendendole un candidato adatto per terapie allogeniche (da donatore a ricevente).

Inizialmente, il potenziale terapeutico delle MSC è stato attribuito alla loro capacità di differenziazione.

L'ipotesi prevalente era che le MSC sarebbero migrate nei siti di lesione, si sarebbero innestate e avrebbero sostituito cellule danneggiate.

Tuttavia, numerosi studi in vivo hanno successivamente rivelato che il numero di MSC che si innestano e si differenziano con successo è troppo basso per giustificare i robusti effetti terapeutici osservati.

Questa evidenza ha innescato un fondamentale cambio di paradigma nel settore, spostando l'attenzione dalla sostituzione cellulare a un meccanismo d'azione prevalentemente paracrino.

È ormai ampiamente accettato che le MSC funzionino come “farmacie biologiche” dinamiche.

Rilevano i segnali di lesione del microambiente e rispondono secernendo un complesso cocktail di molecole bioattive, collettivamente noto come secretoma (Matsuzaka e Yashiro, 2022).

Questo secretoma include fattori di crescita (ad esempio VEGF e HGF), citochine immunomodulatorie (ad esempio IL-10 e TGF- β), fattori anti-apoptotici e antifibrotici e vescicole extracellulari (EV) che orchestrano la riparazione dei tessuti, promuovono l'angiogenesi e sopprimono l'infiammazione.

1.3.2 Vescicole extracellulari

Le EV sono una popolazione eterogenea di strutture membranose a doppio strato, raggruppate in tre categorie principali in base alle loro dimensioni, forma, biogenesi e composizione (Cocucci e Meldolesi, 2015):

- Esosomi: vescicole intraluminali (ILV) quando non ancora rilasciate nello spazio extracellulare
- Ectosomi: vescicole di distacco
- Corpi apoptotici: frammentazione della membrana plasmatica durante l'apoptosi. Gli esosomi hanno dimensioni che variano da 30 a 120 nm e sono attualmente le specie di EV più caratterizzate. Provengono dal sistema endosomiale intracellulare, i corpi multivescicolari (MVP), e vengono poi rilasciati per esocitosi nello spazio extracellulare attraverso la fusione con la membrana, con un meccanismo dipendente dall'attivazione del citoscheletro regolato dalla proteina p53, ma indipendentemente dall'afflusso di calcio cellulare.

Gli ectosomi, d'altra parte, hanno generalmente dimensioni maggiori che vanno da 100 nm a 1 μ m. Si assemblano direttamente attraverso la nucleazione della membrana plasmatica e l'aggregazione di proteine transmembrana in domini di membrana discreti che promuovono la gemmazione della membrana verso l'esterno; questo meccanismo è controllato dall'efflusso di calcio, dalla calpaina, dalla scramblasi, dalla floppasi e dalla riorganizzazione del citoscheletro (Koniusz et al., 2016).

L'involucro vescicolare, in generale, condivide gli stessi antigeni di superficie con l'elemento cellulare da cui ha avuto origine (antigeni verso i quali vari altri tipi di cellule hanno recettori specifici) e può racchiudere molecole di rilevanza biologica: proteine, lipidi e frammenti di ncRNA, miRNA, mRNA e DNA derivano tutti dalla cellula che li ha rilasciati. Il rilascio di EV avviene praticamente in tutte le cellule quando attivate da agonisti solubili o da stress fisico/chimico, come ionoforo di calcio, stress o ipossia (Zaborowski et al., 2015).

In generale, il contenuto delle EV riflette la cellula da cui hanno origine. Tuttavia, alcune molecole selezionate sembrano essere specificamente arricchite nelle EV rispetto alla cellula di origine. Il

contenuto lipidico, ad esempio, appare altamente arricchito in sfingomieline, colesterolo, fosfatidilserina e glicosfingolipidi. Si ritiene che questi ultimi conferiscano stabilità a queste vescicole negli ambienti extracellulari e siano essenziali per il loro ruolo nella comunicazione intracellulare (Llorente et al., 2013).

Inoltre, le EV presentano una predominanza selettiva di classi distinte di RNA come mRNA che codificano per fattori di trascrizione, nonché geni coinvolti nell'angiogenesi e nell'adipogenesi (Eirin et al., 2015).

L'internalizzazione delle EV si manifesta attraverso vari meccanismi come l'endocitosi, la fagocitosi, la pinocitosi e la fusione di membrana. In quanto "veicoli" di molecole bioattive, possono mediare il trasferimento del loro contenuto alle cellule vicine promuovendo la comunicazione cellula-cellula e modificando l'attività delle cellule bersaglio attraverso diversi meccanismi:

- Esprimendo ligandi di superficie che stimolano direttamente le cellule bersaglio (agiscono come un complesso di segnalazione);
- Trasferendo recettori tra le cellule;
- Consegnando proteine funzionali o particelle infettive alle cellule bersaglio;
- Trasferendo informazioni genetiche tramite mRNA o miRNA, o fattori di trascrizione da una cellula all'altra.

Inoltre, le EV sono responsabili di varie funzioni di segnalazione per il mantenimento dell'omeostasi (Camussi et al., 2010; Raposo e Stoorvogel, 2013).

Hanno anche la capacità di raggiungere cellule bersaglio a lungo raggio come polmoni, fegato, milza e pancreas attraverso il sangue o altri fluidi biologici in modo dose- dipendente dopo 48 ore dall'iniezione sistemica. Inoltre, la biodistribuzione delle EV può essere influenzata dalle diverse fonti cellulari da cui derivano e dalla loro via di iniezione (Wiklander et al., 2015).

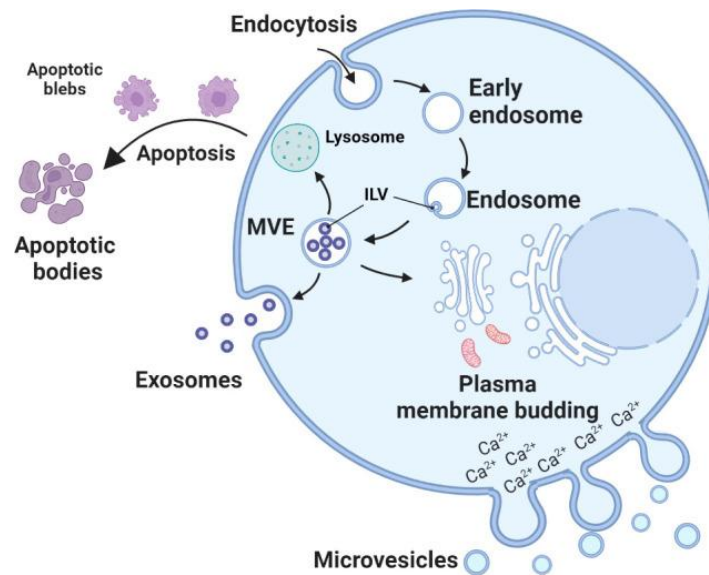


Figura 13: Biogenesi delle vescicole extracellulari (Wu et al., 2022)

Come si può notare dalla Figura 13, gli esosomi (30-150 nm) si formano attraverso una via endosomiale intracellulare. La membrana di un endosoma tardivo gemma verso l'interno, creando un MVB contenente vescicole intraluminali. L'MVB si sposta quindi verso la membrana plasmatica e si fonde con essa, rilasciando il suo contenuto sotto forma di esosomi.

Le microvescicole (100-1000 nm) si formano per gemmazione diretta verso l'esterno e distacco della membrana plasmatica, rilasciandole direttamente nell'ambiente extracellulare. Ciò evidenzia la differenza chiave tra l'origine endosomiale degli esosomi e l'origine derivata dalla membrana plasmatica delle microvescicole.

EV naïve e danno da Ischemia Renale

L'efficacia terapeutica delle EV derivate da MSC nel contesto dell'IRI renale è notevolmente multiforme, derivante dalla loro capacità di orchestrare un complesso programma di riparazione che affronta molteplici aspetti della patologia, come dimostrato sia in modelli in vitro che in vivo. Un meccanismo primario e fondamentale coinvolge la modulazione diretta del destino delle cellule bersaglio. Di fronte allo stress ischemico, è stato dimostrato che le EV forniscono segnali di sopravvivenza critici alle cellule tubulari renali, prevenendo efficacemente l'apoptosi e promuovendo l'attivazione di programmi proliferativi essenziali per la rigenerazione tissutale (Aghajani Nargesi, Lerman e Eirin, 2017).

Al centro di questa capacità citoprotettiva si trova il trasferimento orizzontale di un carico ricco e variegato di molecole di RNA, che consente alle EV di riprogrammare la risposta della cellula ricevente al danno.

Da un lato, esse rilasciano uno specifico carico di miRNA che agiscono come regolatori principali dell'espressione genica. Questi miRNA possono silenziare la trascrizione di geni chiave coinvolti nell'induzione dell'apoptosi, promuovendo una riorganizzazione dannosa del citoscheletro e gestendo la risposta cellulare all'ipossia, smantellando così il macchinario molecolare della morte cellulare e dello stress (Bruno et al., 2014). Dall'altro lato, le EV fungono da veicoli per RNA messaggeri funzionali, fornendo essenzialmente alle cellule danneggiate i progetti per il loro recupero.

Ad esempio, il trasferimento di mRNA codificante per potenti proteine pro-rigenerative come il fattore di crescita degli epatociti (HGF) e per recettori cruciali come il recettore del fattore di crescita insulina (IGF-1R) consente alle cellule tubulari riceventi di sintetizzare direttamente questi fattori, stimolando così i percorsi di riparazione endogeni, la rigenerazione e la proliferazione (Bruno et al., 2016).

L'azione terapeutica delle EV, tuttavia, non si limita al salvataggio diretto delle cellule tubulari; si estende ad una potente modulazione dell'intero microambiente patologico creato dall'IRI. Il danno ischemico innesca una cascata di effetti secondari dannosi, tra cui grave stress ossidativo e infiammazione, che le EV contrastano attivamente. Studi hanno dimostrato la loro capacità di mitigare il danno ossidativo inibendo l'espressione di enzimi pro-ossidanti chiave come la NADPH ossidasi (NOX2), nonché di modulare l'angiogenesi per ripristinare un corretto flusso sanguigno.

Inoltre, frenano la dannosa risposta infiammatoria post-ischemica, spostando l'equilibrio verso uno stato pro-risolutivo. Collettivamente, questo intervento orchestrato e multiforme sulle cellule e sul loro ambiente porta a una significativa riduzione del danno tubulare acuto, previene lo sviluppo di fibrosi successiva e culmina in un recupero tangibile e significativo della funzione renale complessiva (De Santiago, Bare e Benach, 2013; Zhang, Widdop e Ricardo, 2024).

Nella Figura 14 è rappresentato un riepilogo visivo di come le EV derivate dalle MSC, attraverso il loro carico di proteine e RNA, siano in grado di attivare diversi meccanismi di riparazione nelle cellule bersaglio per mitigare efficacemente il danno renale.

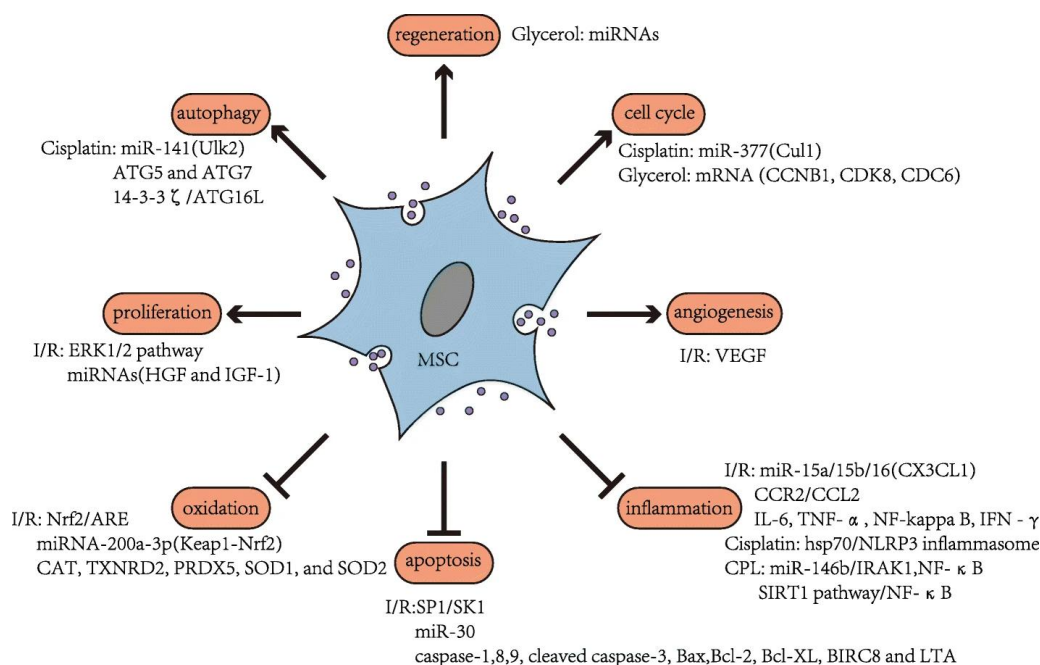


Figura 14: EV derivate da MSC, contenenti RNA e proteine che quando trasferite alle cellule bersaglio attivano meccanismi di riparazione per migliorare il danno renale (Huang Y, Yang L., 2021).

L'uso di EV come agenti terapeutici offre vantaggi sostanziali rispetto alla terapia con MSC, affrontando molte delle sfide che hanno ostacolato la traslazione clinica degli approcci basati sulle cellule. Uno dei vantaggi più convincenti è il loro profilo di sicurezza superiore. Essendo entità non viventi e acellulari, le EV non possono replicarsi o differenziarsi, eliminando così il rischio di proliferazione incontrollata, tumorigenesi o formazione di tessuto ectopico, gravi preoccupazioni associate alla somministrazione di cellule intere (Jafarina et al., 2020).

A differenza delle MSC, che possono innescare risposte immunitarie, le EV mostrano una bassa immunogenicità.

La loro architettura superficiale semplificata in genere è priva di molecole MHC di classe II, riducendo significativamente la probabilità di rigetto immunitario. Questa caratteristica supporta lo sviluppo di prodotti terapeutici standardizzati "pronti all'uso" che possono essere utilizzati su diversi pazienti senza previa corrispondenza immunologica (Ma, Siu e Leung, 2023).

Oltre ai vantaggi in termini di sicurezza e immunologici, le EV offrono vantaggi pratici nella produzione, conservazione e somministrazione. Sono più facili da isolare e manipolare rispetto alle MSC e dimostrano una maggiore stabilità durante la crioconservazione. Le loro dimensioni nanometriche non solo proteggono il carico sensibile come l'RNA dalla degradazione enzimatica, ma consentono anche loro di aggirare l'intrappolamento polmonare e attraversano barriere biologiche

altrimenti inaccessibili alle cellule intatte. Ciò consente alle MSC di biodistribuzione, e aumenta la probabilità di raggiungere i tessuti bersaglio. In particolare, le EV derivate da MSC mantengono molte delle proprietà terapeutiche delle loro cellule di origine, tra cui effetti immunomodulatori, anti infiammatori e pro-rigenerativi.

Studi recenti hanno dimostrato che queste vescicole mostrano intrinseche capacità di homing verso i siti di lesione. Ad esempio, nei modelli murini di ischemia renale, gli esosomi derivati dalle MSC si accumulano preferenzialmente nei tubuli prossimali danneggiati, un processo guidato dalle interazioni tra le integrine sulla superficie delle EV e le molecole di adesione sovra-regolate nei tessuti danneggiati (Cao et al., 2021, Radler et al., 2023). Queste caratteristiche, nel loro complesso, posizionano le EV come un'alternativa più sicura, più controllabile e altamente promettente alla terapia tradizionale con MSC nella medicina rigenerativa (Li et al., 2021).

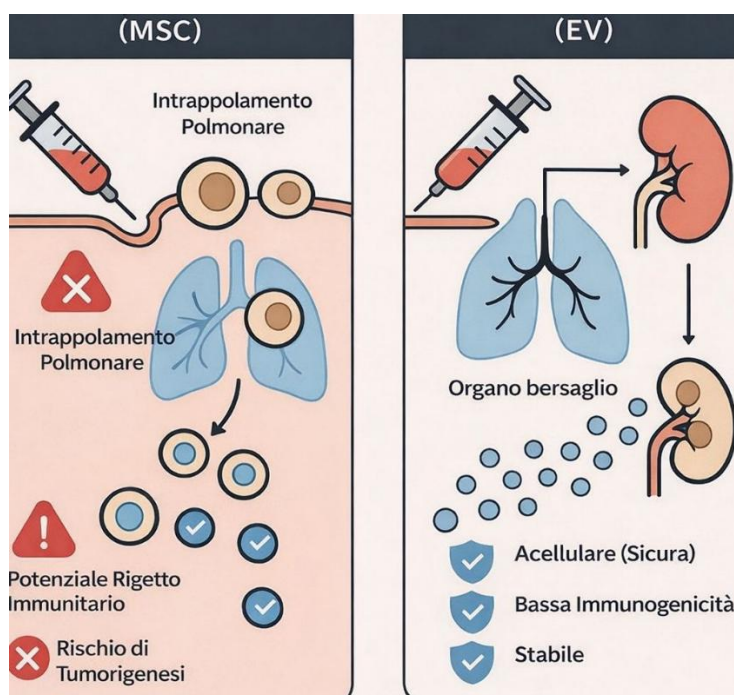


Figura 15: Confronto tra utilizzo di EV o MSC come approccio terapeutico

L'immagine 15 mette a confronto in modo schematico la terapia con l'utilizzo di cellule intere e il solo utilizzo delle EV, mettendo in luce i vantaggi di queste ultime.

La terapia basata su cellule MSC presenta diversi ostacoli, tra cui la rapida eliminazione e il significativo intrappolamento nei capillari polmonari, che limita il numero di cellule che raggiungono l'organo bersaglio. Comportano anche rischi intrinseci legati all'immunogenicità e alla proliferazione a lungo termine.

La terapia acellulare tramite le EV, essendo queste anche più piccole, possono aggirare l'intrappolamento polmonare, portando a una migliore biodistribuzione. Offrono un profilo di sicurezza superiore grazie alla loro bassa immunogenicità e all'incapacità di replicarsi, il che li rende un agente terapeutico più gestibile e prevedibile.

La validità di questo approccio acellulare è stata ampiamente dimostrata in numerosi studi preclinici sull'AKI.

Modelli animali di ischemia-riperfusionazione hanno costantemente dimostrato i potenti effetti terapeutici delle MSC-EV. In uno studio di rilievo, la somministrazione endovenosa di EV derivate da MSC del cordone ombelicale umano ha indotto un notevole recupero funzionale in un modello murino di AKI. A sole 48 ore dall'insulto, gli animali trattati hanno mostrato un drastico miglioramento della funzione renale, con una riduzione di oltre l'80% dei livelli di creatinina sierica rispetto al gruppo di controllo (Guillamat-Prats, 2021; Matsuzaka e Yashiro, 2022).

Ciò è stato accompagnato da una potente azione antinfiammatoria, evidenziata da un aumento della citochina antinfiammatoria IL-10 e da una ridotta attivazione del complemento (Zilberman Itskovich et al., 2025). Questi risultati confermano che le EV non solo raggiungono efficacemente il rene danneggiato; ma ne modulano attivamente il microambiente, spostando l'equilibrio da uno stato pro-infiammatorio e distruttivo a uno pro-rigenerativo. Gli effetti pleiotropici delle EV, che agiscono simultaneamente su infiammazione, stress ossidativo, apoptosi e fibrosi, sono alla base della loro robusta efficacia osservata in contesti sperimentali (Eirin e Lerman, 2021).

1.3.3 EV bioingegnerizzate: la nuova era della terapia acellulare

Mentre le EV naïve possiedono un notevole potenziale terapeutico intrinseco, la nuova frontiera della ricerca mira a migliorare ulteriormente l'efficacia attraverso la bioingegneria.

Questo approccio non si basa esclusivamente sul carico endogeno, ma modifica le cellule produttrici o le stesse EV per caricarle con specifiche molecole terapeutiche esogene, come proteine, acidi nucleici o farmaci (Radler et al., 2023).

Un esempio importante è stato fornito da (Deng et al., 2025), che hanno ingegnerizzato le MSC per sovraesprimere la proteina nefroprotettiva Klotho, dimostrando che le EV arricchite di Klotho risultanti avevano un'efficacia superiore al mitigare l'AKI nei modelli animali.

In questo contesto si inserisce l'impiego di EV ingegnerizzate come sistemi avanzati di drug delivery per il trasporto di ATP. La natura idrofila dell'ATP lo rende un candidato ideale per l'incapsulamento all'interno del nucleo acquoso delle EV.

Uno studio recente ha dimostrato che EV derivate da cellule stromali mesenchimali porcine, pur possedendo dei livelli basali di ATP, possono essere efficacemente caricate con ATP mediante tecniche di microfluidica, raggiungendo livelli di incapsulamento paragonabili a quelli ottenuti con liposomi ottenuti tramite caricamento diretto. Le EV presentano inoltre caratteristiche strutturali e funzionali potenzialmente vantaggiose rispetto ai liposomi, tra cui maggiore stabilità, migliore permeabilità e capacità di targeting cellulare, attribuibili alle proprietà della loro superficie e alla presenza di specifiche molecole di membrana. Nei modelli di danno ischemico su cellule tubulari renali prossimali (HK2), l'ATP veicolato da EV ha mostrato una maggiore efficacia funzionale rispetto alle formulazioni liposomiali, riuscendo a ripristinare i livelli intracellulari di ATP, migliorare la vitalità cellulare e ridurre l'attivazione di pathway apoptotici, come evidenziato dalla modulazione del rapporto BCL2/BAX. Inoltre, il profilo di rilascio differisce tra i due sistemi: mentre i liposomi rilasciano rapidamente il contenuto fino a completa deplezione, le EV mostrano un rilascio più controllato e prolungato nel tempo, suggerendo una migliore compatibilità con il fabbisogno energetico cellulare in condizioni di stress ischemico. Complessivamente, questi risultati indicano che le EV caricate con ATP rappresentano una piattaforma promettente per il ripristino diretto del metabolismo energetico cellulare, superando in parte le limitazioni osservate con i liposomi tradizionali nel contesto del danno tubulare renale. (Grignano et al., 2025)

La capacità di utilizzare le EV come piattaforma di somministrazione di farmaci di nuova generazione apre infinite possibilità terapeutiche (Matsuzaka e Yashiro, 2022).

Tuttavia, il percorso verso l'applicazione clinica presenta ancora delle sfide, come la necessità di standardizzare i metodi di produzione e di comprendere meglio il destino e la durata degli effetti delle EV in vivo (Eirin e Lerman, 2011).

Questo approccio risponde direttamente all'appello della comunità scientifica per terapie ottimizzate e mirate (Lee et al., 2021), cercando di fornire un salvataggio bioenergetico diretto alle cellule danneggiate.

2 SCOPO DEL LAVORO

Il profondo esaurimento energetico cellulare che caratterizza il danno da ipossia prolungata nel trapianto di rene rappresenta una sfida terapeutica importante.

In questo contesto, la presente tesi si basa sull'ipotesi che l'incapsulamento e il rilascio controllato di ATP mediante sistemi di nanovettori avanzati possano contribuire a contrastare la crisi bioenergetica e a limitare il conseguente danno cellulare. Le vescicole extracellulari sono proposte come piattaforme biologicamente compatibili e promettenti per questo scopo.

Sulla base di evidenze pregresse ottenute con vescicole extracellulari derivate da cellule stromali mesenchimali porcine, le quali hanno dimostrato la capacità di essere efficacemente caricate con ATP mantenendo elevata efficienza di incapsulamento e superiori proprietà funzionali rispetto ai liposomi, il presente lavoro amplia tale approccio verso un sistema umano e traslazionale.

In particolare, lo studio si focalizza sulla valutazione comparativa di diverse strategie di caricamento dell'ATP in vescicole extracellulari umane includendo cicli di congelamento–scongelo, elettroporazione e microfluidica, con l'obiettivo di identificare la metodica più efficace nel garantire elevato loading preservando al contempo integrità strutturale, stabilità e identità delle vescicole.

Parallelamente, è stato analizzato il profilo di ritenzione dell'ATP e la stabilità delle vescicole cariche di ATP ottenute mediante le diverse tecniche, al fine di selezionare la strategia ottimale per la produzione di un sistema ingegnerizzato riproducibile ed efficiente.

Una volta individuata la metodologia più performante, le vescicole extracellulari caricate con ATP sono state successivamente testate in vitro su cellule tubulari renali prossimali (HK2), utilizzando un modello di danno ipossico, più fisiologicamente rilevante rispetto ai precedenti modelli di deplezione energetica chimica. In questo sistema sperimentale è stata valutata l'efficacia delle vescicole ingegnerizzate nel modulare la vitalità cellulare e il metabolismo energetico in condizioni di stress ipossico.

Complessivamente, questo approccio mira a fornire una valutazione sistematica delle strategie di ingegnerizzazione delle vescicole per il trasporto di ATP e a stabilire le basi per lo sviluppo di una piattaforma terapeutica bioenergetica traslabile per il danno ischemico renale.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Isolamento di MSC-EV

Le vescicole extracellulari (EV) sono state isolate da supernatanti condizionati dalle colture di MSC utilizzando un protocollo a più fasi incentrato sulla ultracentrifugazione differenziale.

Per preparare il terreno di coltura condizionato per la raccolta, le MSC sono state sottoposte a un periodo di digiuno notturno. Questo passaggio è cruciale per garantire che la popolazione di vescicole isolate derivi effettivamente dalle MSC, minimizzando la contaminazione da vescicole esogene tipicamente presenti nel siero fetale bovino (FCS). Dopo questa incubazione senza siero, il surnatante, ora arricchito di vescicole extracellulari (EV) secrete, è stato raccolto. Il processo di purificazione è iniziato con una fase di pre-chiarificazione per rimuovere i contaminanti più grandi. Nello specifico, i surnatanti sono stati centrifugati a 2000 x g per 20 minuti a +4°C. Questa centrifugazione iniziale a bassa velocità è progettata per sedimentare ed eliminare efficacemente i detriti cellulari, i corpi apoptotici e le cellule distaccate, chiarendo così il surnatante per il successivo isolamento delle vescicole più piccole.

Dopo questa purificazione iniziale, il supernatante è stato raccolto con cura e trasferito per la fase principale di isolamento. Successivamente, è stata eseguita un'ultracentrifugazione ad alta velocità a 100.000 x g per 1 ora a +4°C, utilizzando un'ultracentrifuga Optima L-90K (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Questa fase sedimenta efficacemente le EV. Il surnatante risultante è stato scartato e il pellet grezzo di EV è stato quindi risospeso in PBS sterile. Per migliorare la purezza della preparazione, questa soluzione di EV risospesa è stata sottoposta a un secondo ciclo di ultracentrifugazione identico per un'altra ora nelle stesse condizioni.

Questa fase di lavaggio è fondamentale per rimuovere le proteine solubili contaminanti che potrebbero essere state co-pellettate con le vescicole. Infine, il pellet di EV lavato è stato accuratamente risospeso in una soluzione di PBS contenente l'1% di dimetilsolfossido (DMSO) per fungere da crioprotettore. La sospensione finale di EV è stata quindi aliquotata e conservata a -80°C per preservarne a lungo termine l'integrità e l'attività biologica fino a ulteriori analisi.

Quantificazione e analisi dimensione delle EV naïve sono state effettuate tramite analisi di tracciamento delle nanoparticelle (NTA), con strumento NanoSight LM10 (Alfatest, Roma, Italia),

3.2 Validazione dei test di caricamento di ATP nelle EV

Per progettare i nanovettori per il rilascio di ATP, è stato impiegato un processo di caricamento attivo utilizzando il sale di Magnesio dell'adenosina trifosfato (ATP-Mg²⁺), acquistato da Merck.

Le metodiche che sono state utilizzate per il caricamento dell'ATP nelle vescicole sono: microfluidica, elettroporazione e cicli di congelamento scongelamento.

Microfluidica (MF)

Data la loro natura biologica preformata, le EV sono state caricate esclusivamente utilizzando il metodo indiretto, strategia di post-formazione applicata a vescicole preesistenti.

Per questo approccio, il primo canale dello strumento è stato riempito con la soluzione madre di ATP-Mg²⁺ a 10 mM, mentre il secondo canale conteneva una sospensione di vescicole extracellulari isolate.

Lo strumento è stato utilizzato con una portata totale (TFR) di 8 mL/min e un rapporto di portata (FRR) di 3:1.

Questo processo, condotto a 25 ± 3 °C su un volume totale di 1 mL, ha prodotto ATP- EV

Elettroporazione (EP)

Per questo approccio, una cuvetta di 2 mm dello strumento è stata riempita con la soluzione madre di ATP-Mg²⁺ a 10 mM e una sospensione di vescicole extracellulari isolate.

La durata dell'impulso è stata impostata a 10 μ s, garantendo un equilibrio tra un'efficiente permeabilizzazione della membrana e la minimizzazione di un eccessivo stress cellulare. Ciascun campione è stato sottoposto a otto impulsi consecutivi a 100V, garantendo un'elettroporazione efficace e preservando la vitalità cellulare.

In questo studio, l'elettroporazione è stata eseguita utilizzando l'elettroporatore GenedriVe (IGEA Medical, S.p.A., Carpi, MO), scelto per la sua precisione e riproducibilità nell'erogazione di impulsi elettrici controllati.

L'elettroporatore GenedriVe funziona attraverso tre componenti principali che lavorano insieme per ottenere una permeabilizzazione controllata della membrana. Il generatore di impulsi eroga brevi impulsi elettrici con intensità regolabile, fornendo l'energia necessaria per

indurre l'elettroporazione. La camera di elettroporazione ospita la cuvetta, posizionata tra due elettrodi (anodo e catodo), dove il campione viene trattato.

L'interfaccia computerizzata consente il controllo in tempo reale e la configurazione dei parametri di elettroporazione, garantendo la riproducibilità tra gli esperimenti.

Cicli di congelamento-scongelo (freeze-thaw cycles T)

Questo processo prevede l'inserimento all'interno di una stessa eppendorf 100 μ L di soluzione madre di ATP-Mg²⁺ a 10 mM e 100 μ L di vescicole extracellulari isolate e procedere con i seguenti passaggi: congelamento ripetuto in azoto liquido a -196 °C, seguito dallo scongelamento in un bagnetto a 37 °C, ciò induce la rottura e la riparazione della membrana plasmatica più volte. In questo esperimento è stato eseguito questo ciclo per 5 volte.

Nel continuo processo di rottura e riparazione, l'ATP entra nella vescicola extracellulare, realizzando così il caricamento.

Il ciclo di congelamento-scongelo è una procedura delicata che non danneggia la struttura della membrana della vescicola.

Al termine delle procedure di caricamento con le tre differenti metodiche, è stato necessario separare l'ATP incapsulato con successo dall'ATP libero non incapsulato rimasto nella soluzione esterna.

Per far ciò, è stato necessario un metodo di separazione rigoroso a causa delle loro dimensioni ridotte e della minore densità. L'ATP non caricato è stato quindi rimosso mediante ultracentrifugazione (Beckman Coulter) a 100.000 \times g per 1 ora a 4 °C, che ha efficacemente sedimentato le ATP-EV.

Dopo la purificazione, i pellet di EV caricati con ATP (ATP-EV) sono stati processati per valutare la quantità di ATP incapsulato.

Efficacia di caricamento dell'ATP

Dopo la purificazione, i pellet di EV caricati con ATP (ATP-EV) sono stati processati per valutare la quantità di ATP incapsulato.

Per ottenere questo risultato, le membrane vescicolari dovevano essere completamente disgregate per rilasciare il loro contenuto interno.

Il pellet di ATP-EV è stato prima risospeso in 1 mL di PBS (pH 7,4) supplementato con il 2% (v/v) di Triton X-100, un detergente non ionico utilizzato per solubilizzare le membrane lipidiche.

Per garantire una lisi completa, questa sospensione è stata quindi sottoposta a una sequenza di tre fasi di disgregazione fisica.

In primo luogo, i campioni sono stati miscelati energicamente mediante agitazione al vortex per 1 minuto a 1600 giri/min (Advanced IR Vortex Mixer ZX4, Velp Scientifica). Successivamente, sono stati incubati in un bagno termostatico (Mettler) a 75 °C per 5 minuti per destabilizzare ulteriormente i doppi strati lipidici tramite il calore.

Infine, i campioni sono stati sottoposti a sonicazione per 1 minuto in un pulitore a ultrasuoni (SONICA, Soltec), che utilizza onde sonore ad alta frequenza per disgregare meccanicamente eventuali strutture vescicolari residue.

Questo protocollo di lisi completo ha garantito il rilascio totale dell'ATP incapsulato nella soluzione.

Efficacia di rilascio dell'ATP

Per studiare e confrontare la stabilità e la capacità di ritenzione del carico utile dei nanovettori ingegnerizzati secondo le varie metodologie, è stato condotto uno studio di rilascio in vitro.

Questo esperimento è stato progettato per valutare la cinetica del rilascio di ATP dalle vescicole extracellulari caricate con ATP (ATP-EV) in condizioni fisiologicamente rilevanti.

Per lo studio, i pellet di ATP-EV purificati sono stati inizialmente risospesi in un volume finale di 1 mL di PBS.

Il fulcro dell'apparato sperimentale era un sistema a membrana per dialisi, che fornisce una barriera fisica per separare i grandi nanovettori dalle piccole molecole di ATP liberamente diffusibili che vengono rilasciate nel tempo.

Nello specifico, è stato utilizzato un tubo per membrana di dialisi Spectrum™ Spectra/Por™ 2 RC (Fisher Scientific, Milano, Italia).

Questa membrana di cellulosa rigenerata possiede un limite di peso molecolare specifico che trattiene efficacemente le vescicole extracellulari (EV) intatte (che hanno dimensioni nell'ordine dei nanometri), consentendo al contempo alle molecole di ATP, molto più piccole (peso molecolare ~507 g/mol), di attraversarla e raggiungere il mezzo circostante. Le sospensioni di vescicole da 1 mL sono

state caricate nelle sacche per dialisi, che sono state poi sigillate ermeticamente e immerse in un serbatoio contenente 2 mL di PBS, che fungeva da mezzo di rilascio.

L'intero sistema è stato mantenuto in un incubatore a una temperatura costante di 37 °C per simulare la temperatura corporea.

La durata dello studio di rilascio è stata fissata a 4 ore, un intervallo di tempo scelto per simulare la durata dei successivi esperimenti di condizionamento cellulare.

Per monitorare il profilo di rilascio, sono stati prelevati campioni in punti predeterminati: nello specifico a 1, 2, 3 e 4 ore dopo l'incubazione.

Ad ogni intervallo, un'aliquota di 100 µL della soluzione esterna di PBS (il mezzo di rilascio) è stata prelevata con cura per l'analisi.

Per garantire che il volume totale del mezzo di rilascio rimanesse costante durante l'esperimento e per mantenere le condizioni di sink, che impediscono l'accumulo di ATP rilasciato e quindi di inibire un ulteriore rilascio, il volume prelevato è stato immediatamente reintegrato con 100 µL di PBS fresco e preriscaldato.

La quantità di ATP presente in ciascuna aliquota raccolta è stata quindi quantificata utilizzando il saggio colorimetrico. Misurando la concentrazione di ATP nel mezzo esterno in ogni punto temporale, è stata calcolata la percentuale cumulativa di ATP rilasciata rispetto alla quantità totale inizialmente incapsulata.

Ciò ha permesso un confronto diretto della cinetica di rilascio tra ATP-EV ottenute tramite le due metodiche: microfluidica ed elettroporazione.

Per garantire l'affidabilità dei dati cinetici, l'intero studio di rilascio è stato eseguito in triplicato per ciascun tipo di nanovettore.

3.3 Quantificazione dell'ATP nelle vescicole extracellulari

La concentrazione di ATP incapsulata nelle vescicole extracellulari (EV) è stata determinata con precisione utilizzando un test colorimetrico disponibile in commercio (ab83355, ATP Assay Kit; Abcam, Cambridge, Regno Unito). Questo test fornisce una misurazione sensibile e quantitativa dell'ATP basata su una reazione enzimatica che produce un segnale colorimetrico direttamente proporzionale alla quantità di ATP presente.

Tutte le procedure sono state eseguite in stretta conformità con il protocollo del produttore. Prima di iniziare il test, i reagenti liofilizzati per la conversione dell'ATP e per lo sviluppo sono stati preparati al momento sciogliendoli in 220 μ L del tampone per il test dell'ATP fornito.

Per consentire la quantificazione assoluta, è stata generata una curva standard utilizzando concentrazioni note di ATP.

Una soluzione standard di ATP da 1 mM è stata inizialmente preparata diluendo 10 μ L di una soluzione madre di ATP da 10 mM in 90 μ L di PBS. Da questa soluzione da 1 mM, sono state effettuate una serie di ulteriori diluizioni in PBS per creare una gamma di concentrazioni standard che, una volta aggiunte ai pozzetti, corrispondevano a quantità finali di 0, 2, 4, 6, 8 e 10 nmol di ATP per pozzetto. Per il test vero e proprio, è stata preparata una miscela di reazione master per l'ATP (ARM) combinando 44 μ L di tampone per il test dell'ATP, 2 μ L di sonda per l'ATP, 2 μ L di convertitore per l'ATP e 2 μ L di miscela di sviluppo per ciascuna reazione.

La quantificazione è stata eseguita in formato micropiastra a 96 pozzetti.

Per costruire la curva di calibrazione, 50 μ L di ciascuna soluzione standard di ATP sono stati pipettati in pozzetti individuali, seguiti dall'aggiunta di 50 μ L di ARM preparato di fresco. Analogamente, per determinare il contenuto di ATP nei campioni sperimentali (vescicole naïve, ATP-EV tutti precedentemente lisati), 50 μ L di ciascun lisato di campione sono stati miscelati con 50 μ L di ARM in pozzetti separati.

Una volta caricati tutti i campioni e gli standard, la piastra è stata incubata a temperatura ambiente per 30 minuti. Per proteggere i reagenti fotosensibili dalla degradazione, la piastra è stata schermata dalla luce durante questo periodo di incubazione.

Inoltre, la piastra è stata posizionata su una piattaforma oscillante per garantire una miscelazione delicata e continua, facilitando una reazione enzimatica completa.

Dopo l'incubazione, l'assorbanza del prodotto colorimetrico è stata misurata a una lunghezza d'onda di 570 nm utilizzando un fotometro per micropiastre HiPo MPP-96 (Biosan, Brescia, Italia).

I valori di assorbanza ottenuti dagli standard di ATP sono stati riportati in funzione delle rispettive concentrazioni per generare una curva di calibrazione lineare.

L'analisi di regressione risultante ha mostrato una relazione altamente lineare, descritta dall'equazione $y = 0,0442x - 0,0131$, con un coefficiente di determinazione (R^2) di 0,9972, confermando l'accuratezza e l'affidabilità del test.

La concentrazione di ATP in ciascun campione sperimentale è stata quindi calcolata interpolando il suo valore di assorbanza nell'equazione della curva standard. Per garantire la precisione e la riproducibilità dei risultati, tutte le misurazioni, sia per gli standard che per i campioni, sono state eseguite in triplice copia.

3.4 Valutazione morfologica e dimensionale delle EV-ATP

EV-ATP ottenute tramite le differenti metodiche di caricamento sono state caratterizzate dimensionalmente tramite la diffusione dinamica della luce (DLS), eseguita con un sistema Nicomp 380ZLS (Particle Sizing Systems, Qi Technologies, Santa Barbara, CA, USA).

La microscopia elettronica a trasmissione standard (TEM), utilizzando un microscopio JEM-1200EXIII (JEOL, Tokyo, Giappone), è stata impiegata per l'analisi morfologica, tramite procedura di colorazione negativa con acetato di uranile al 2%.

Immagini ad alta risoluzione dei campioni sono state acquisite a diversi ingrandimenti, in particolare a 50.000x, 150.000x e 300.000x, per osservare sia la popolazione complessiva di vescicole sia i dettagli più fini delle singole particelle.

3.5 Coltura di cellule tubulari renali

Per la valutazione in vitro del potenziale terapeutico dei nanovettori ingegnerizzati, è stata selezionata la linea cellulare di rene umano 2 (HK-2) come modello sperimentale. La linea cellulare HK-2, originariamente acquistata da Merck, è un modello consolidato e ampiamente utilizzato nella ricerca renale. È costituita da cellule epiteliali tubulari prossimali immortalizzate da un rene umano adulto normale e conserva le principali caratteristiche funzionali e morfologiche di questo specifico segmento del nefrone, rendendola altamente rilevante per lo studio della fisiopatologia renale, compreso il danno da ipossia.

Le cellule sono state mantenute in un terreno di coltura completo specificatamente formulato per supportare la loro proliferazione e preservare il fenotipo.

Il terreno basale consiste in una miscela 1:1 di Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) (Euroclone Spa, Milano, Italia). Questo è stato integrato con un set completo di fattori di crescita e nutrienti, tra cui l'8% (v/v) di FCS (R&D System, Minneapolis, MN, USA) per

fornire una ricca fonte di mitogeni. Per prevenire la contaminazione microbica, il terreno è stato anche integrato con una soluzione antibiotica standard di 100 U/mL di penicillina e 100 µL di streptomina (Merck).

Inoltre, per imitare meglio l'ambiente in vivo e supportare il metabolismo cellulare, il terreno di coltura è stato arricchito con una miscela definita di ormoni e oligoelementi, contenente 5 µg/ml di insulina, 5µg/ml di transferrina e 5 ng/ml di selenito di sodio (Gibco-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Le cellule HK-2 sono state coltivate in flask T-75 e mantenute in condizioni standard di coltura cellulare in un incubatore umidificato a 37°C con un'atmosfera al 5% di CO₂ e 20% di O₂.

3.6 Modello di ipossia

Per simulare la crisi energetica cellulare che si verifica durante l'ischemia renale in vivo, è stato implementato un modello in vitro consolidato di ipossia sulla linea cellulare HK- 2.

L'obiettivo principale di questo modello era indurre un esaurimento dell'ossigeno, mimando così un evento iniziale chiave nel danno cellulare ipossico.

Per questi esperimenti, le cellule HK-2 sono state coltivate fino a raggiungere uno stato di confluenza del 60-70%. Questo livello di confluenza garantisce che le cellule siano in uno stato di crescita attiva senza essere soggette a inibizione da contatto, rendendole un modello adatto per studi sul danno.

L'ipossia è stata indotta modificando i parametri dell'incubatore, abbassando da 20% la concentrazione di O₂ a 1%, utilizzando N₂, in condizioni di coltura standard (37 °C e 5% di CO₂).

Per le fasi sperimentali specifiche che prevedevano interventi di condizionamento con EV, EV-ATP o ATP è stata necessaria una condizione di coltura modificata. Per eliminare gli effetti confondenti dei fattori di crescita e delle vescicole presenti normalmente nel siero, le cellule sono state trasferite dal terreno di crescita completo a un terreno basale privo di siero, costituito solo da DMEM-LG.

Per valutare come l'ipossia impattava sulla vitalità e sulla necrosi cellulare, sono stati effettuati dei test di settaggio in cui le cellule HK-2 sono state sottoposte a danno ipossico per 8 ore e i campioni di surnatante sono stati raccolti ogni ora per il dosaggio dell'LDH extracellulare.

L'obiettivo era valutare il rilascio di LDH come marker di necrosi cellulare, così da definire l'half-time del danno, utilizzato successivamente come momento ottimale per la somministrazione del trattamento con EV.

Questa fase di ottimizzazione è stata fondamentale per definire la finestra sperimentale ottimale per i successivi esperimenti di recupero.

Ciascuna condizione all'interno di questi studi preliminari è stata testata in sestuplicato per garantire la robustezza dei risultati.

3.7 Disegno sperimentale

In seguito all'induzione di ipossia per la durata ottimizzata, sono stati condotti gli esperimenti primari per valutare la capacità delle diverse formulazioni di proteggere le cellule HK2 dal danno indotto.

Al tempo zero è stato aspirato delicatamente il mezzo di coltura completo ed è stato sostituito con terreno basale privo di siero (DMEM-LG) ad esclusione del gruppo di controllo positivo.

Successivamente per i gruppi CTRL+ e CTRL- sono stati in incubatore a condizioni di crescita standard per 8 ore, al termine delle quali sono state contate le cellule vive ed è stato raccolto il surnatante.

Per i gruppi sperimentali invece, dopo il cambio terreno, sono stati posti in incubatore in condizioni ipossiche, dopo 3 ore è stato nuovamente cambiato il terreno, utilizzando DMEM-LG implementato con le varie formulazioni, alle 8 ore totali, come per i controlli, sono state recuperate cellule e surnatanti per valutarne i vari parametri.

Le cellule sono state esposte a diversi mezzi di trattamento secondo un insieme di gruppi sperimentali precisamente definiti, ciascuno progettato per studiare un aspetto specifico dell'intervento terapeutico.

I gruppi di trattamento sperimentali erano i seguenti:

- CTRL+: cellule HK-2 coltivate in un terreno completo (contenente FCS), per tutta la durata dell'esperimento e che non effettuano un periodo di ipossia. Questo gruppo rappresenta la condizione di base di normale fisiologia e vitalità cellulare
- CTRL-: cellule HK-2 in cui al T0 il TC è stato rimosso e sostituito un terreno basale privo di siero (costituito solo da DMEM-LG). Questo gruppo è stato progettato per controllare eventuali effetti causati dalla sola carenza di siero, differenziandoli dagli effetti del danno ipossia.
- IP: cellule esposte a ipossia in DMEM a basso contenuto di glucosio. Questo gruppo è servito come controllo del danno, rappresentando la naturale risposta cellulare dopo l'esaurimento dell'ossigeno senza alcun intervento terapeutico.

- EV: cellule HK-2 esposte a ipossia in DMEM a basso contenuto di glucosio, con la supplementazione, dopo 3 ore di ipossia di EV naive a una concentrazione di 3×10^7 EV/mL. Questo gruppo è stato incluso per valutare l'effetto terapeutico intrinseco delle EV stesse, indipendentemente dal carico di ATP ingegnerizzato.
- EV-ATP: cellule HK-2 esposte a ipossia in DMEM a basso contenuto di glucosio, con l'aggiunta dopo 3 ore di ipossia di EV ingegnerizzate con ATP a una concentrazione di 3×10^7 ATP-EV/mL. Questo era il principale gruppo sperimentale, progettato per testare l'ipotesi primaria che le EV potessero fungere da efficaci vettori per il rilascio intracellulare di ATP.
- ATP: cellule HK-2 esposte a ipossia in DMEM a basso contenuto di glucosio, con l'aggiunta dopo 3 ore di ipossia di ATP esogeno libero non incapsulato, a una concentrazione di 0,05 nmol/mL. Questa concentrazione è stata scelta per corrispondere alla quantità stimata di ATP rilasciata dalle vescicole caricate. Questo gruppo è servito a determinare se l'ATP extracellulare da solo potesse fornire un effetto protettivo.

Per garantire la significatività statistica e l'affidabilità dei risultati sperimentali, ciascuna delle condizioni descritte, compresi tutti i gruppi di trattamento e di controllo, è stata eseguita in sestuplica copia.

3.8 Saggio di vitalità cellulare

Al termine del periodo di condizionamento di 8 ore di ipossia, la vitalità delle cellule HK-2 in ciascun gruppo sperimentale è stata valutata quantitativamente utilizzando il classico metodo di esclusione del Trypan Blue.

Questo saggio si basa sul principio che le cellule vitali, dotate di membrana cellulare intatte, sono in grado di escludere attivamente il colorante blu, mentre le cellule non vitali con integrità della membrana compromessa assorbono passivamente il colorante e appaiono blu al microscopio. Ai fini di questa analisi, la vitalità cellulare è stata definita da due criteri: la capacità delle cellule di rimanere attaccate alla superficie del matraccio di coltura e la loro capacità di escludere il colorante.

La procedura è iniziata rimuovendo con cura le cellule non aderenti, che si presume siano in gran parte non vitali o apoptotiche. Ciò è stato ottenuto aspirando il terreno di coltura e lavando delicatamente il monostrato di cellule due volte con PBS. Questo liquido è stato inserito all'interno di un tubo da 15 ml ed è stato utilizzato per avere una stima più accurata delle cellule morte.

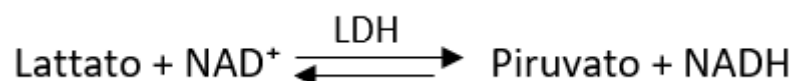
Successivamente, è stata raccolta la popolazione rimanente di cellule aderenti.

Per staccare le cellule dalla flask, sono state incubate con una soluzione di tripsina allo 0,05%-EDTA 4Na 0,53 mM (Merk) per 3 minuti a 37°C. L'azione enzimatica della tripsina scinde le proteine di adesione, rilasciando le cellule in sospensione. Una volta staccate le cellule, l'attività della tripsina è stata prontamente neutralizzata con l'aggiunta di DMEM supplementato con FCS al 10%; le proteine del siero nel mezzo inibiscono efficacemente l'enzima e prevengono un'eccessiva digestione, che altrimenti potrebbe danneggiare le cellule. La sospensione cellulare risultante è stata quindi trasferita in una provetta conica e centrifugata a 150 g per 10 minuti per ottenere un pellet. Dopo aver scartato il surnatante, il pellet cellulare è stato delicatamente risospeso in un volume noto di DMEM fresco. Per il conteggio cellulare finale, una piccola aliquota della sospensione cellulare è stata miscelata con una soluzione di Trypan Blue allo 0,2% (Gibco). La miscela è stata quindi caricata su un emocitometro e il numero di cellule vitali (trasparenti) e non (blu) è stato contato al microscopio ottico. La vitalità cellulare è stata quindi calcolata ed espressa come percentuale di cellule vitali rispetto al numero totale di cellule contate (cellule vitali + cellule non vitali). Questo metodo ha fornito una robusta misura quantitativa degli effetti protettivi dei diversi trattamenti sulla sopravvivenza cellulare in seguito all'ipossia.

3.9 Dosaggio Lattato Deidrogenasi (LDH)

I livelli di LDH nel surnatante all'inizio, all'half point e alla fine dei trattamenti, sono stati misurati utilizzando un analizzatore di chimica clinica (ARCHITECT, Abbott, Italia), che usa il metodo Atellica® CH Lactate Dehydrogenase L-P (LDLP) per la misurazione quantitativa dell'attività della lattato deidrogenasi utilizzando Atellica® CH Analyzer.

Il principio del metodo si basa sul fatto che, la lattato deidrogenasi catalizza la conversione di L-lattato in piruvato in presenza di nicotinammide adenina dinucleotide (NAD). L'attività enzimatica della LDH è proporzionale al tasso di produzione di NADH (NAD ridotta). La quantità di NADH prodotta viene determinata misurando l'aumento di assorbanza a 340/410 nm.



Questo metodo richiede 14 µL di campione per una singola determinazione. Il sistema esegue automaticamente i seguenti passaggi in 9 minuti totali:

- Eroga 50 µL di campione primario e 200 µL di Atellica CH Diluent in una cuvetta di diluizione

- Eroga 80 μL di Reagente 1 in una cuvetta di reazione
- Eroga 14 μL di campione prediluito in una cuvetta di reazione
- Misura l'assorbanza dopo l'aggiunta del campione
- Eroga 32 μL di Reagente 2 in una cuvetta di reazione
- Effettua la miscelazione e l'incubazione a 37°C
- Misura l'assorbanza dopo l'aggiunta di Reagente 2
- Referta i risultati in U/L

Mediante questo saggio abbiamo anche valutato la cinetica di rilascio dell'LDH per identificare la migliore tempistica per la somministrazione dei trattamenti sperimentali dopo aver indotto l'ipossia.

3.10 Emogas analisi

La misurazione quantitativa di pH, elettroliti (cK^+ , mmol/L; cNa^+ , mmol/L; cCa^{2+} , mmol/L; K^+ , mmol/L) e metaboliti lattato e glucosio (cLac , mmol/L; cGlu , mg/dL) nei surnatanti è stata effettuata tramite analisi di emogas (GEM Premier Werfen, Barcelona, Spain).

3.11 Analisi metabolomiche

Per la valutazione del profilo metabolico energetico delle cellule HK2, i campioni sono stati sottoposti a estrazione e analisi mediante spettroscopia NMR ad alta risoluzione. L'omogeneizzazione cellulare è stata effettuata utilizzando un omogeneizzatore tissutale Precellys Evolution Cryolys (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Francia) a 4°C , mediante tre cicli da 15 secondi a 6800 rpm.

L'omogenato ottenuto è stato centrifugato a 12.000 rpm per 10 minuti a 4°C e il surnatante contenente i metaboliti idrofili è stato successivamente essiccato sotto vuoto mediante SpeedVac (Eppendorf), senza applicazione di calore, per 3,5 ore.

Per l'acquisizione degli spettri NMR, i campioni essiccati sono stati ricostituiti in 0,2 mL di tampone fosfato deuterato (50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4), contenente 0,5 mM NaN_3 e 0,2 mM di 3-(trimetilsilil)-2,2,3,3- d_4 -propionato di sodio (TSP) come riferimento interno. L'acquisizione è stata avviata entro 30 minuti dalla ricostituzione, mantenendo i campioni su ghiaccio fino all'analisi. Gli spettri monodimensionali ^1H sono stati registrati a 25°C su spettrometro Bruker Avance NEO 700

MHz equipaggiato con sonda criogenica TCI (Bruker BioSpin, Karlsruhe, Germania), utilizzando la sequenza 1D ^1H NOESY con parametri standardizzati per applicazioni metabolomiche.

L'identificazione e la quantificazione dei metaboliti sono state eseguite mediante il software ASICS, utilizzando una libreria di riferimento comprendente 216 composti metabolici. Gli spettri sono stati successivamente normalizzati mediante approccio probabilistico (probabilistic quotient normalization), utilizzando lo spettro mediano come riferimento. L'analisi è stata condotta con strategia di quantificazione congiunta e pre-quantificazione indipendente, applicando una soglia di pulizia dell'1%. Questo approccio ha consentito la quantificazione dei principali metaboliti coinvolti nel metabolismo energetico cellulare nelle cellule HK2, permettendo la valutazione delle variazioni metaboliche in risposta ai diversi trattamenti sperimentali.

3.12 Analisi statistica

Tutti i dati quantitativi generati dagli esperimenti sono stati sottoposti a una rigorosa analisi statistica per determinare la significatività delle differenze osservate tra i gruppi sperimentali. Il metodo per descrivere la tendenza centrale e la dispersione dei dati è stato scelto in base alla loro distribuzione.

Per le variabili continue che seguivano una distribuzione normale (gaussiana), i dati sono stati riassunti e presentati come media, intervallo e deviazione standard (DS). Al contrario, per le variabili la cui distribuzione è risultata asimmetrica o non normale, sono stati utilizzati la mediana e l'intervallo interquartile (IQR), definito come l'intervallo tra il 25° e il 75° percentile (p25 - p75), come statistiche descrittive più appropriate.

Le concentrazioni relative dei metaboliti stimate ASICS sono state analizzate utilizzando l'analisi delle componenti principali (PCA) dopo la scalatura e varianza unitaria (Schreckenberget al., 2022).

Per l'analisi interferenziale, è stata impiegata una varietà di test statistici, con la scelta specifica a seconda del disegno sperimentale e delle caratteristiche dei dati. Per i confronti che coinvolgono tre o più gruppi sperimentali, è stata utilizzata un'analisi della varianza a una via (ANOVA) ordinaria per i dati con distribuzione normale, per i dati non distribuiti normalmente, è stato applicato il test non parametrico equivalente, ovvero il test di Friedman.

Per il confronto delle medie di due gruppi, sono stati utilizzati i test per i campioni appaiati o non appaiati, a seconda che le misurazioni provenissero da campioni indipendenti o correlati. Il T-test per campioni appaiati multipli è stato impiegato, ove appropriato, per specifici confronti tra gruppi correlati. In tutte le valutazioni statistiche, è stato predefinito un valore p-value inferiore a 0,05 come

soglia di significatività statistica. Tutti i calcoli statistici e la creazione delle rappresentazioni grafiche dei dati sono stati eseguiti utilizzando il programma demo GraphPad Prism 5.0.

4 RISULTATI

4.1 Caratterizzazione di EV naïve

L'analisi NTA ha rilevato una dimensione media delle particelle EV (504 ± 107 nm) con una concentrazione media di particelle di $1,08 \times 10^{11}$ particelle/mL,

4.2 Efficacia di caricamento tra MF, EP e T

In figura 16 la curva standard ottenuta dal test ELISA ($Y=0.04328*X + 0.01293$)

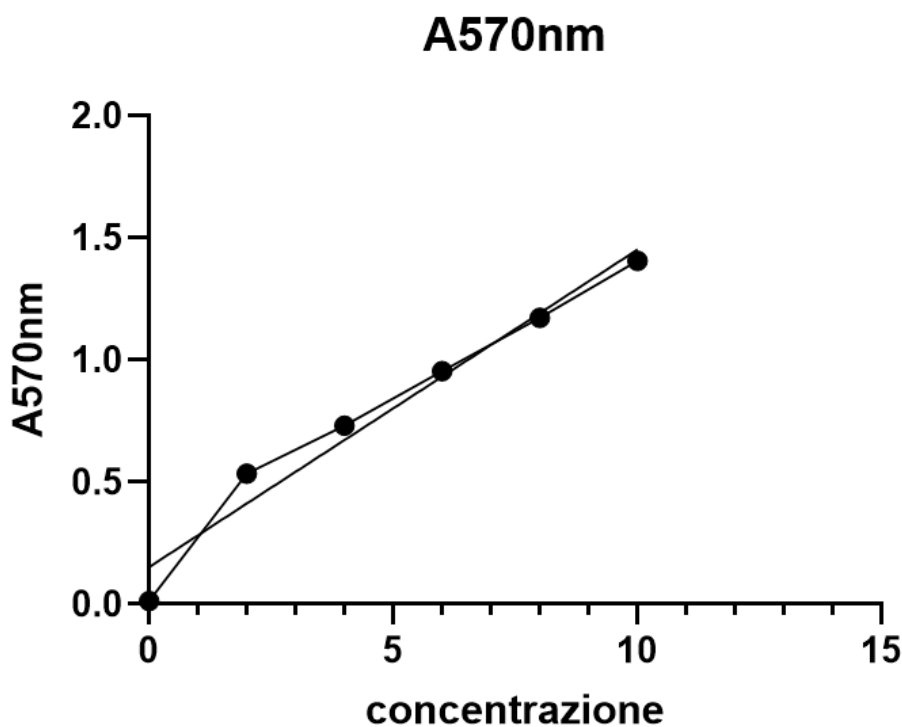


Figura 16: curva di concentrazione di ATP, ottenuta tramite kit ELISA

Come punto di riferimento critico, è stato innanzitutto misurato il contenuto endogeno di ATP delle EV derivate da cellule staminali mesenchimali (MSC) non modificate. Questa analisi ha rivelato che le EV non contenevano naturalmente una concentrazione basale di ATP (-1.017 ± 0.048 nm/mL).

In seguito sono state effettuate le analisi del contenuto di ATP, sfruttando i vari processi di ingegnerizzazione; elettroporazione, microfluidica e cicli di congelamento-scongelo.

Il contenuto di ATP all'interno di queste EV è stato significativamente aumentato in tutti e tre i gruppi.

La concentrazione finale nelle ATP-EV ingegnerizzate con elettroporazione ha raggiunto 10.91 ± 2.332 nm/mL, con microfluidica 11.48 ± 3.410 nm/mL, mentre i cicli congelamento-scongelamento mostravano caricamento di ATP meno efficace (2.227 ± 1.324 nm/mL). (Fig.17)

F/T è stata quindi esclusa come metodica efficace per la generazione di EV-ATP.

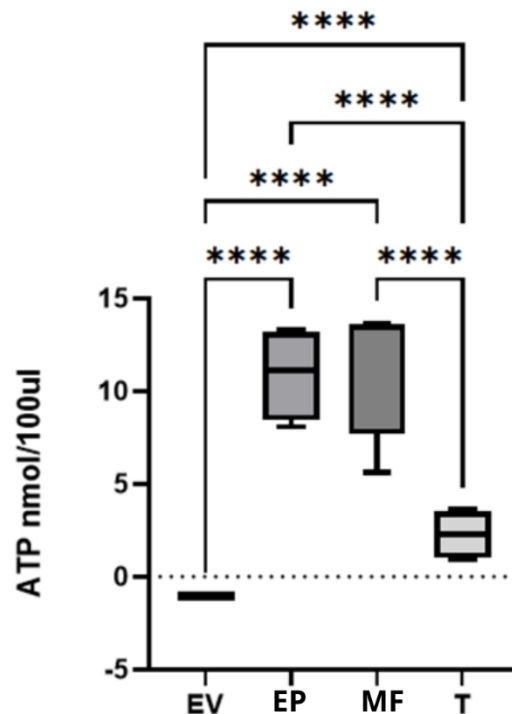


Figura 17: Livelli di ATP in EV naive e in EV-ATP caricate tramite elettroporazione (EP), microfluidica (MF) e Toking/cicli congelamento-scongelamento (T). I dati sono espressi come media e deviazione standard **** p<0.0001.

Questo incremento è risultato statisticamente significativo ($p < 0,01$), fornendo una chiara evidenza dell'efficacia della strategia di caricamento dell'elettroporazione e della microfluidica nell'arricchimento delle EV con ATP rispetto ai cicli di congelamento-scongelamento.

4.3 Analisi dimensione e morfologica tra MF ed EP

Analisi al DLS sono state effettuate per la caratterizzazione dimensionale post caricamento (Tabella 1 e Fig.18). L'indice di polidispersione (PI) indicava una popolazione più eterogenea di vescicole nella EV-ATP ottenute con MF, ma EV-ATP ottenute con EP mostravano una tendenza a dimensioni maggiori.

| Dimensione EV-ATP | PI | Media \pm SD (nm) |
|-------------------|-------|---------------------|
| EP | 0,814 | 559,0 \pm 123,3 |
| MF | 0,533 | 511,0 \pm 91,09 |

Tabella 1: Eterogeneità dimensionale dei campioni di EV-ATP, caricate tramite elettroporazione o microfluidica, indicata tramite indice di dispersione (PI).

All'analisi al TEM inoltre EV-ATP ottenute con EP mostravano un'integrità maggiore e morfologia maggiormente conservata.

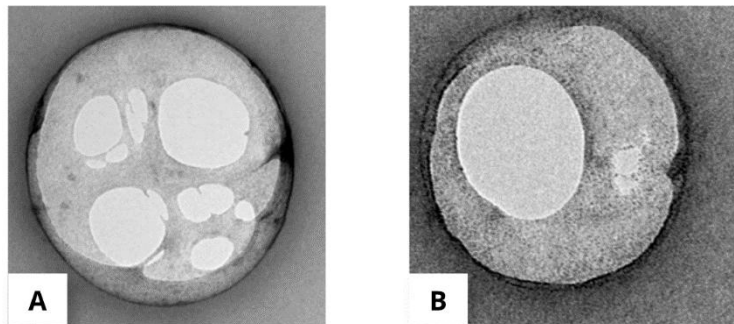


Figura 18: Immagini al TEM di EV-ATP caricate tramite elettroporazione (A) e microfluidica (B)

4.4 Studio di rilascio dell'ATP

Per studiare la stabilità e la capacità di ritenzione dell'ATP, è stato condotto uno studio di rilascio in vitro a 37°C per 4 ore.

I risultati di questa analisi cinetica sono illustrati nella Figura 19.

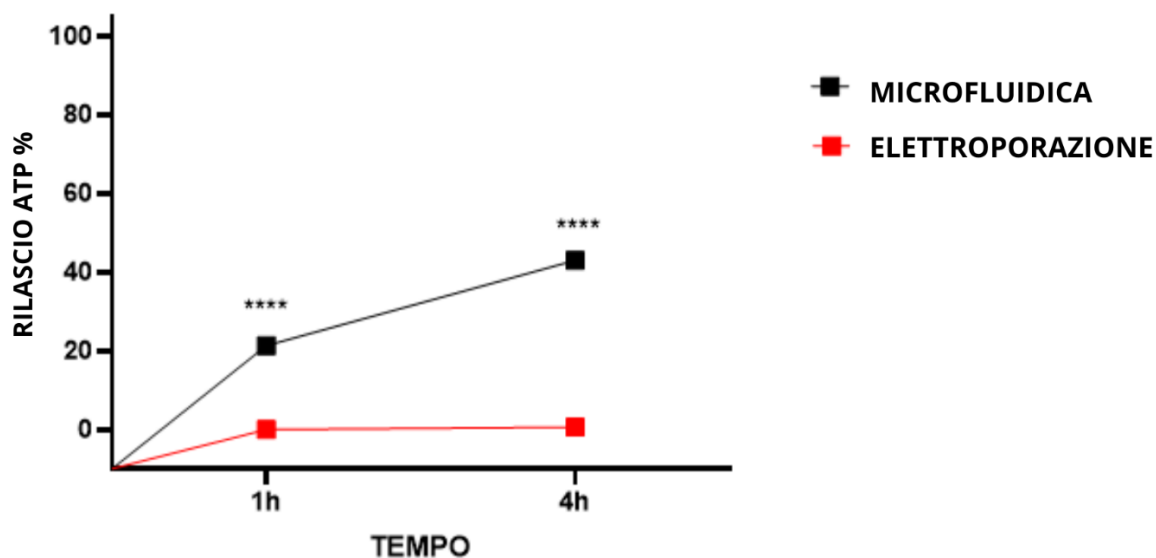


Figura 19: Rilascio in vitro di ATP da EV-ATP ottenuti mediante microfluidica (linea nera) ed elettroporazione (linea rossa) da vescicole extracellulari isolate da MSC a 37°C in PBS (pH=7.4). **** p > 0.0001

Sin dalla prima ora, i due metodi di incapsulamento hanno mostrato profili di rilascio di ATP marcatamente divergenti. Le EV caricate tramite microfluidica hanno rilasciato $21,30 \pm 15,34$ di ATP, mentre le EV preparate mediante elettroporazione non hanno rilasciato praticamente alcuna quantità rilevabile di ATP (0,000 unità), una differenza statisticamente molto significativa ($p=0,000003$). Dopo quattro ore, le EV caricate tramite microfluidica hanno raggiunto un rilascio cumulativo di 42,99 unità, rispetto a sole 0,774 unità per il gruppo sottoposto a elettroporazione ($p<0,000001$). EP ha quindi mostrato un meccanismo di rilascio più controllato e prolungato.

E' stata quindi selezionata la tecnica dell'elettroporazione per caricare le vescicole extracellulari ed effettuare l'esperimento delle 8 ore di ipossia.

4.5 Cinetica di rilascio dell'LDH

Dopo ipossia di 8 ore su cellule HK-2 in terreno DMEM-LG in assenza di FCS e recuperato 2 ml di terreno di coltura ogni ora, su quest'ultimo abbiamo effettuato il dosaggio di LDH e validato quale fosse la tempistica in cui somministrare i vari gruppi sperimentali.

E' stato identificato l'half-time (3.21 h) come momento ottimale per somministrare i trattamenti: la curva di rilascio di LDH segue un'equazione esponenziale del tipo:

$$Y = \text{Plateau} \times (1 - e^{(-K \times t)})$$

L'half-time è il tempo in cui la cellula ha già raggiunto il 50% del danno massimo atteso (plateau \approx 11.29 unità LDH).

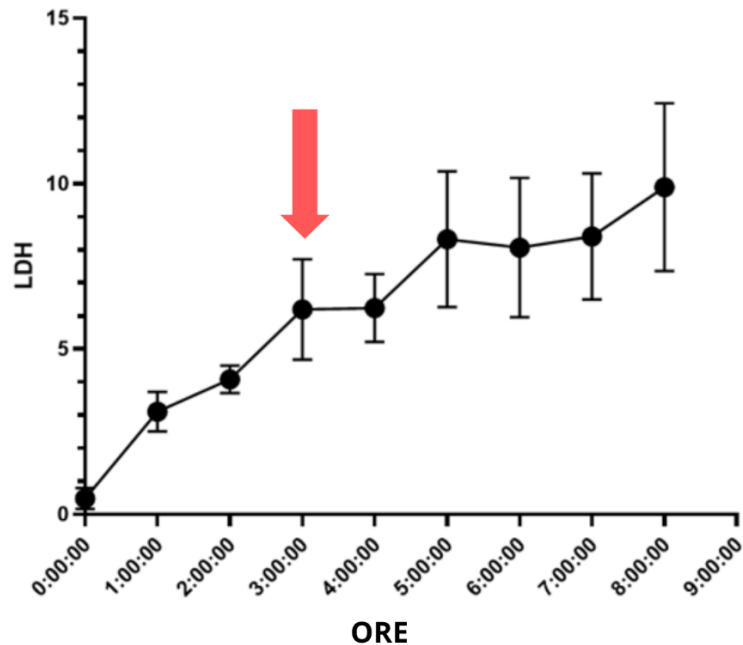


Figura 20: Curva della cinetica di rilascio dell'LDH delle cellule HK-2 in un modello di 8 ore di ipossia

4.6 Vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata e quantificata nelle cellule HK-2 dopo il danno ipossico, utilizzando il test di esclusione del Trypan Blue, che distingue tra cellule vitali e non vitali.

L'insulto ischemico (gruppo IP) ha portato a una riduzione statisticamente significativa della vitalità cellulare al $76,62 \pm 10,80\%$, rispetto al $99,52 \pm 0,63\%$ di vitalità del gruppo di controllo sano (CTRL+; $p < 0,05$). (Fig. 20)

Il trattamento con EV-ATP ($98,89 \pm 2,72\%$) ha preservato completamente la vitalità cellulare, non mostrando differenze significative rispetto al controllo ($p = 0,990$) e un miglioramento statisticamente significativo rispetto al gruppo IP ($p < 0,05$), suggerendo un effetto protettivo delle vescicole extracellulari caricate con ATP contro il danno ischemico. Il gruppo trattato con EV o con ATP libero invece, non mostravano differenze significative statisticamente, pur avendo un maggior tasso di vitalità rispetto alle cellule ipossiche non trattate.

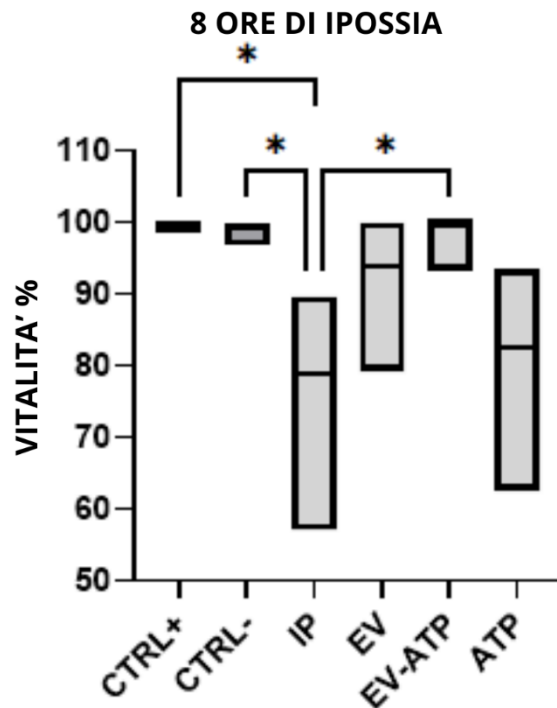


Figura 21: Vitalità cellulare dopo 8 ore di ipossia. Colorante di Tripán Blue. Le colonne rappresentano la vitalità cellulare espressa come media e deviazione standard. * $p < 0,05$.

4.7 Dosaggi LDH

La vitalità valutata al Trypan blu è stata poi confermata dalla valutazione del tasso di necrosi nei gruppi trattati

L'incremento di concentrazione di LDH nel surnatante del gruppo IP raccolto alle 3 ore (quindi prima dell'aggiunta dei vari trattamenti negli altri gruppi) era statisticamente maggiore rispetto al gruppo di controllo positivo (IP 4.911 ± 3.618 nm/mL, vs CTRL+ 0.00068 ± 0.00049 nm/mL, $p < 0,05$)

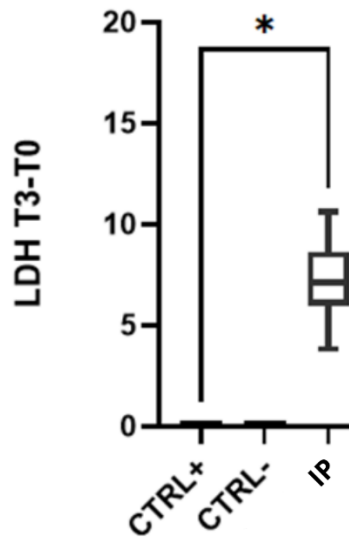


Figura 22: Livelli di LDH dopo 3 ore di ipossia nei vari gruppi di studio: CTRL+, CTRL-, IP, EV naive, EV-ATP e ATP caricate tramite elettroporazione. I dati sono espressi come media e deviazione standard * $p < 0.05$.

Dopo le 8 ore di ipossia, la variazione dei livelli di LDH nei gruppi EV ed EV-ATP era statisticamente minore rispetto al gruppo di cellule ipossiche non trattate ($p < 0.05$ e $p < 0,005$ rispettivamente)

Il gruppo trattato con ATP libero, non hanno raggiunto la significatività statistica nel confronto con IP confermando come la presenza di ATP libero non sia efficace nel mitigare il danno da ischemia renale.

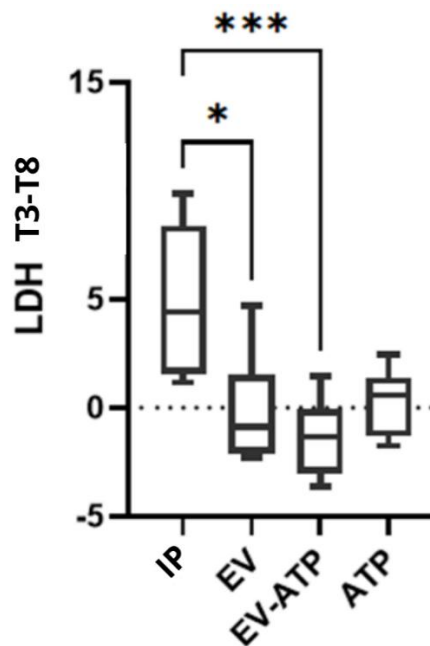


Figura 23: Livelli di LDH dopo 8 ore di ipossia nei vari gruppi di studio: CTRL+, CTRL-, IP, EV naive, EV-ATP e ATP caricate tramite elettroporazione. I dati sono espressi come media e deviazione standard * $p < 0.05$ *** < 0.001 .

4.8 Dosaggio elettroliti e pH

Il rapporto tra gli elettroliti Calcio (Ca^{2+}) e Sodio (Na^{+}), è risultato significativamente aumentato nel gruppo IP rispetto al controllo positivo ($p < 0.005$), mentre era ridotto nel gruppo EV-ATP rispetto al gruppo ipossico ($p < 0,05$).

In condizioni di ipossia si osservava infatti una mediana pari a 0,0094 (IQR: 0,0087–0,0097), mentre il gruppo EV-ATP mostrava valori inferiori e meno variabili (mediana 0,0083; IQR: 0,0083–0,0084). Anche il gruppo di cellule trattato con ATP libero mostrava valori statisticamente inferiori rispetto ad IP. ($p < 0,05$)

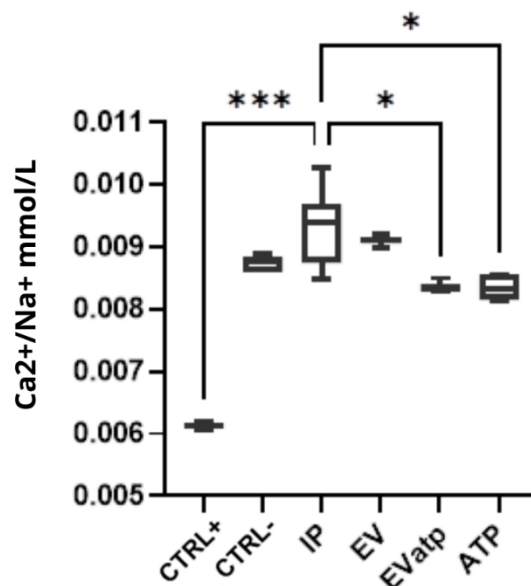


Figura 24: Livelli del rapporto degli elettroliti $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ dopo 8 ore di ipossia gruppi di studio: IP, EV naïve, EV-ATP e ATP caricate tramite elettroporazione. I dati sono espressi come mediana e deviazione standard * $p < 0.05$.

Il rapporto tra Na^{+} e K^{+} è risultato significativamente aumentato nel gruppo CTRL+, rispetto al gruppo IP ($p < 0,001$), mentre i gruppi EV ed EV-ATP mostravano valori notevolmente aumentati rispetto al gruppo ipossico (EV mediana 31.79; IQR: 31.61–32.34; EV-ATP mediana 31.88; IQR: 31.82–31.88; IP mediana 30.66; IQR: 30.18–30.78, $p < 0,005$). (Fig 24)

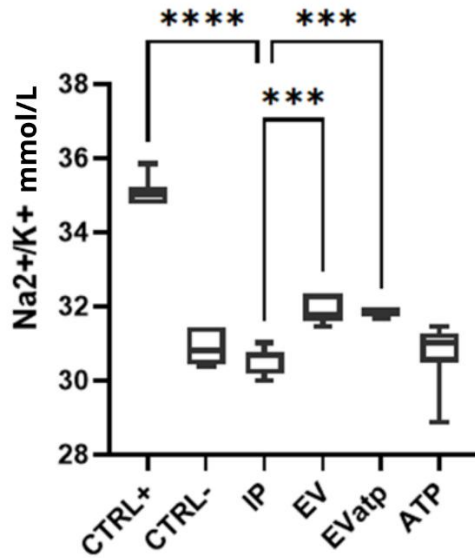


Figura 25: Livelli del rapporto degli elettroliti Na⁺/K⁺ dopo 8 ore di ipossia gruppi di studio: CTRL+, CTRL-, IP, EV naïve, EV-ATP e ATP caricate tramite elettroporazione. I dati sono espressi come mediana e deviazione standard **** p < 0.0001 *** p < 0.001.

I valori di pH invece mostravano un'acidificazione del mezzo più marcata tra IP e CTRL+ (p<0,05) senza differenze rilevabili tra i vari trattamenti de IP.

4.9 Analisi dei metaboliti

Il confronto statistico tra i gruppi, relativo ai metaboliti glucosio e lattato, valutati sia mediante NMR sia tramite emogasanalisi, ha evidenziato un'iniziale significatività statistica (p < 0,05), non confermata tuttavia dai test post-hoc. Nonostante ciò, si osserva un trend caratterizzato da valori di glucosio più elevati nel gruppo EV rispetto a IP, e da livelli di EV-ATP inferiori rispetto a IP. (Fig.26)

I livelli di lattato mostravano invece un trend totalmente speculare, con livelli di lattato più bassi in EV e più alti in EV-ATP rispetto a IP. (Fig.27)

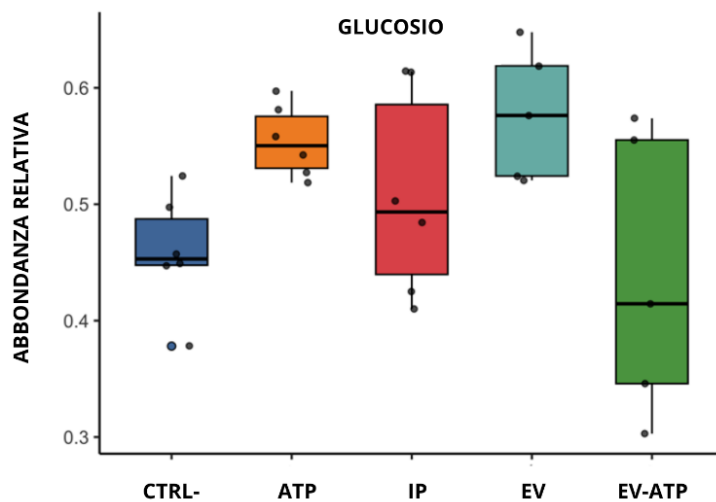


Figura 26: Livelli di Glucosio dopo 8 ore di ipossia nei gruppi: CTRL-, ATP, IP, EV naive e in EV-ATP caricate tramite elettroporazione.

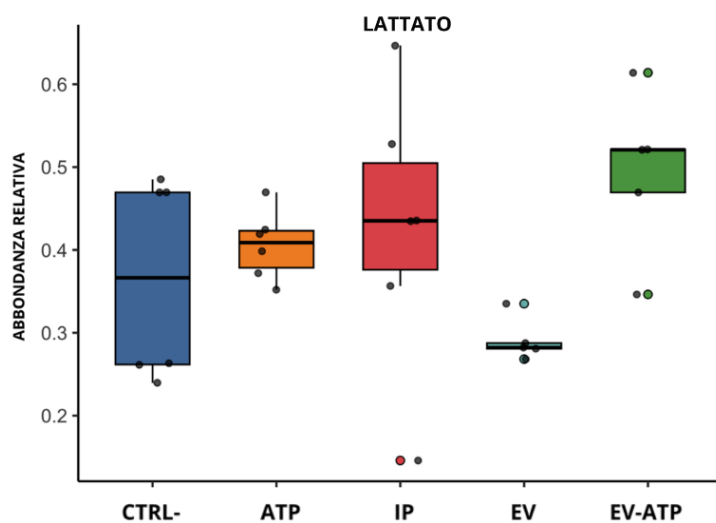


Figura 27: Livelli di Lattato dopo 8 ore di ipossia nei gruppi: CTRL-, ATP, IP, EV naive e in EV-ATP caricate tramite elettroporazione.

Dall'analisi NMR, il gruppo CTRL+ è stato escluso a causa della presenza di siero fetale bovino (FCS) nel terreno di coltura completo, che introduceva picchi aggiuntivi interferenti.

5 DISCUSSIONE

Questo studio introduce e ottimizza un approccio di ingegnerizzazione delle vescicole extracellulari (EV) derivate da cellule staminali mesenchimali umane per il trasporto di ATP, con l'obiettivo di ripristinare il deficit energetico associato al danno ipossico. A differenza di quanto riportato in precedenti lavori su vescicole extracellulari di origine porcina, i risultati preliminari ottenuti in questo studio indicano l'assenza di livelli basali significativi di ATP nelle EV umane naive, sottolineando ulteriormente la necessità di strategie di caricamento esogeno per ottenere un effetto terapeutico energetico. (Grignano et al., 2025).

Il confronto sistematico tra diverse metodiche di loading (congelamento–scongelo, elettroporazione e microfluidica) ha evidenziato differenze sostanziali in termini di efficienza e qualità del prodotto finale. In particolare, il ciclo freeze–thaw si è dimostrato la tecnica meno efficace, con una ridotta capacità di incapsulamento e scarsa ritenzione del carico. Al contrario, microfluidica ed elettroporazione hanno mostrato un'efficienza di caricamento comparabile; tuttavia, l'elettroporazione ha evidenziato vantaggi significativi in termini strutturali e funzionali, generando EV di dimensioni maggiori, con membrana più integra e una maggiore capacità di ritenzione dell'ATP nel tempo. Questi risultati suggeriscono che la qualità della membrana e la stabilità del carico rappresentano parametri critici per l'efficacia del sistema, oltre alla sola efficienza di loading.

Sulla base di questi dati, l'elettroporazione è stata selezionata come metodo ottimale per la successiva fase sperimentale. Per rendere il modello più traslazionale, è stato inoltre introdotto un approccio dinamico volto a definire la finestra temporale ottimale di intervento. A tal fine, è stato analizzato il rilascio di LDH in cellule HK2 sottoposte a condizioni di ipossia, per identificare il momento in cui il danno cellulare diventa irreversibile e prima dell'instaurarsi di una necrosi massiva. Questo ha permesso di stabilire una finestra terapeutica di circa 3 ore dall'inizio dell'insulto ipossico, indicando il timing più efficace per la somministrazione delle EV ingegnerizzate. Definire il “timing corretto di somministrazione” ha permesso di:

- Intervenire su un danno in corso: il contesto biologico è già quello dell'ischemia vera, non un pre-trattamento profilattico, rendendo il modello clinicamente più rilevante.
- Massimizzare la finestra terapeutica — oltre il plateau ($\approx 6-8$ h) la morte cellulare è quasi completa e qualunque intervento risulterebbe inefficace; prima dell'half-time il danno è ancora troppo lieve per valutare l'effetto protettivo.

- Riproducibilità — l'half-time è un punto matematicamente preciso della curva, indipendente dalla variabilità assoluta dei valori di LDH tra esperimenti.

Successivamente, le EV caricate con ATP ottenute mediante elettroporazione sono state testate su cellule tubulari renali prossimali (HK2), cellule particolarmente sensibili al danno ipossico. I risultati preliminari hanno dimostrato che le EV-ATP migliorano la vitalità cellulare rispetto alle EV naive, come evidenziato dal test di esclusione del trypan blue, e riducono la necrosi, come indicato da una diminuzione del rilascio di LDH. Inoltre, le EV caricate con ATP hanno mostrato un trend positivo nel miglioramento del metabolismo energetico cellulare, suggerito da una maggiore funzionalità delle pompe di membrana e da alterazioni favorevoli nei livelli di elettroliti.

L'aumento del rapporto $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ osservato nel gruppo ipossico, infatti, riflette una marcata alterazione dell'omeostasi ionica, verosimilmente dovuta a una ridotta disponibilità di ATP e al conseguente malfunzionamento dei sistemi di trasporto ionico ATP-dipendenti, inclusi gli scambiatori $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ e le pompe di membrana. L'accumulo intracellulare di Ca^{2+} rappresenta infatti un noto indicatore di stress cellulare e può contribuire all'attivazione di pathway lesivi (Rampino *et al.*, 2022). Al contrario, i valori significativamente inferiori riscontrati nel gruppo trattato con EV-ATP suggeriscono un mantenimento più efficace dei gradienti ionici e una limitazione del sovraccarico di Ca^{2+} .

Nel complesso, questi dati indicano che il trattamento con EV-ATP esercita un effetto protettivo nei confronti dello stress ipossico, contribuendo a preservare l'omeostasi ionica e l'integrità funzionale cellulare.

Analisi aggiuntive su emogas e metabolomica (glucosio e lattato) hanno evidenziato ulteriori tendenze coerenti con un miglioramento dello stato energetico cellulare, sebbene non sempre statisticamente significative.

I risultati ottenuti infatti suggeriscono una modulazione differenziale del metabolismo energetico glicolitico, sopprimendolo (in EV) o amplificandolo (in EV-ATP).

Poiché in condizioni di ipossia e ridotta disponibilità di nutrienti le cellule attivano la glicolisi anaerobia, caratterizzata da consumo di glucosio e produzione di lattato, l'aumento dei livelli di glucosio residuo associato a una riduzione del lattato, come risultato del trattamento con EV potrebbe indicare una probabile inibizione del flusso glicolitico o, alternativamente, una riduzione dell'attività metabolica complessiva (Grignano, *et al.*, 2025).

Al contrario, il trattamento con EV-ATP sembrerebbe associato ad un potenziamento della glicolisi anaerobia, risultante in una diminuzione del glucosio e un incremento del lattato.

Nel complesso, questi dati supportano l'ipotesi che la somministrazione tempestiva di ATP tramite EV ingegnerizzate possa contribuire al ripristino del bilancio energetico cellulare e alla riduzione del danno ipossico.

Rispetto agli approcci precedenti basati esclusivamente su EV naive o su sistemi porcini, questo lavoro evidenzia il valore aggiunto dell'ingegnerizzazione controllata e della selezione razionale del metodo di caricamento come elementi chiave per l'efficacia terapeutica.

Tuttavia, lo studio presenta alcune limitazioni, tra cui la natura in vitro dei modelli utilizzati e la necessità di ulteriori validazioni in vivo per confermare la sicurezza, la biodistribuzione e l'efficacia funzionale del sistema. Inoltre, saranno necessari approfondimenti specifici sul metabolismo energetico cellulare per chiarire in modo più dettagliato i meccanismi alla base dell'effetto protettivo osservato.

In prospettiva, la traslazione clinica delle EV ingegnerizzate rappresenta una strategia altamente promettente per il trattamento del danno ischemico, in particolare in ambito trapiantologico e nelle patologie caratterizzate da ipossia tissutale. Tuttavia, sfide cruciali rimangono ancora aperte, tra cui la standardizzazione dei processi di produzione, la scalabilità e la definizione di criteri condivisi di qualità e sicurezza.

In conclusione, questo studio fornisce una prova di principio del potenziale delle EV ingegnerizzate con ATP come piattaforma terapeutica per il ripristino energetico cellulare nel danno ipossico renale, ponendo le basi per futuri sviluppi traslazionali in ambito clinico.

6 CONCLUSIONE

Questa tesi ha sviluppato e valutato una strategia innovativa basata su vescicole extracellulari (EV) ingegnerizzate per il trasporto di ATP, finalizzata al contrasto del deficit energetico associato al danno ipossico renale. A differenza delle EV naïve, le EV umane risultano prive di livelli basali significativi di ATP, rendendo necessario un approccio di ingegnerizzazione per ottenere un effetto bioenergetico.

I risultati hanno evidenziato un effetto citoprotettivo delle EV-ATP, con miglioramento della vitalità cellulare e riduzione della necrosi, come dimostrato dalla diminuzione del rilascio di LDH. Inoltre, i dati preliminari suggeriscono un miglioramento del metabolismo energetico cellulare e della funzionalità delle pompe di membrana, indicando un parziale ripristino dell'omeostasi energetica. È stata inoltre identificata una finestra temporale ottimale di intervento di circa 3 ore dall'inizio del danno ipossico, elemento rilevante in ottica traslazionale.

Sebbene siano necessari ulteriori studi in vivo per confermare efficacia, sicurezza e biodistribuzione del sistema, questo lavoro fornisce una prova di principio del potenziale delle EV ingegnerizzate con ATP come piattaforma terapeutica per il trattamento del danno ipossico renale e delle patologie ischemiche.

Bibliografía

- Aghajani Nargesi, A., Lerman, L.O. and Eirin, A. (2017) ‘Mesenchymal stem cell- derived extracellular vesicles for kidney repair: current status and looming challenges’, *Stem Cell Research & Therapy*, 8, p. 273. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0727-7>.
 - Aranda-Rivera, A.K. et al. (2021) ‘Mitochondrial Redox Signaling and Oxidative Stress in Kidney Diseases’, *Biomolecules*, 11(8), p. 1144. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom11081144>.
 - Bader, J., Brigger, F. and Leroux, J.-C. (2024) ‘Extracellular vesicles versus lipid nanoparticles for the delivery of nucleic acids’, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 215, p. 115461. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2024.115461>.
 - Bellini, L. et al. (2016) ‘Effects of opioids on proximal renal tubular cells undergoing ATP depletion’, *Journal of Pharmacological Sciences*, 131(4), pp. 288–291. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2016.08.002>.
- Bernal-Chávez SA, Romero-Montero A, Hernández-Parra H, Peña-Corona SI, Del Prado-Audelo ML, Alcalá-Alcalá S, Cortés H, Kiyekbayeva L, Sharifi-Rad J, Leyva-Gómez G. (2023) Enhancing chemical and physical stability of pharmaceuticals using freeze-thaw method: challenges and opportunities for process optimization through quality by design approach. pp. 2-3. <https://doi.org/10.1002/biot.7017>
- Bezelya, A., Küçüktürkmen, B. and Bozkır, A. (2023) ‘Microfluidic Devices for Precision Nanoparticle Production’, *Micro*, 3(4), pp. 822–866. Available at: <https://doi.org/10.3390/micro3040058>.
 - Blum, M.F. et al. (2017) ‘Comparison of normothermic and hypothermic perfusion in porcine kidneys donated after cardiac death’, *The Journal of Surgical Research*, 216, pp. 35–45. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2017.04.008>.
 - Bruno, S. et al. (2009) ‘Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury’, *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 20(5), pp. 1053–1067. Available at: <https://doi.org/10.1681/ASN.2008070798>.
 - Bruno, S. et al. (2016) ‘Survival of patients with HCV cirrhosis and sustained virologic response is similar to the general population’, *Journal of Hepatology*, 64(6), pp. 1217–1223. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.01.034>.

- Busutti, M. et al. (2019) '[Kidney Transplant from donors after cardiac death (DCD): monocentric experience and literature review]', *Giornale Italiano Di Nefrologia: Organo Ufficiale Della Societa Italiana Di Nefrologia*, 36(4), pp. 2019-vol4.
- Bzeizi, K.I. et al. (1997) 'Primary graft dysfunction after liver transplantation: from pathogenesis to prevention', *Liver Transplantation and Surgery: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 3(2), pp. 137–148. Available at: <https://doi.org/10.1002/lt.500030206>.
- Camussi, G. et al. (2010) 'Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication', *Kidney International*, 78(9), pp. 838–848. Available at: <https://doi.org/10.1038/ki.2010.278>.
- Cao, J.-Y. et al. (2021) 'Exosomal miR-125b-5p deriving from mesenchymal stem cells promotes tubular repair by suppression of p53 in ischemic acute kidney injury', *Theranostics*, 11(11), pp. 5248–5266. Available at: <https://doi.org/10.7150/thno.54550>.
- Cavallo, M.C. et al. (2014) 'Cost-effectiveness of kidney transplantation from DCD in Italy', *Transplantation Proceedings*, 46(10), pp. 3289–3296. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.09.146>.
- Ceccotti, E. et al. (2023) 'Naïve or Engineered Extracellular Vesicles from Different Cell Sources: Therapeutic Tools for Kidney Diseases', *Pharmaceutics*, 15(6), p. 1715. Available at: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061715>.
- Chiesa, E. et al. (2018) 'The Microfluidic Technique and the Manufacturing of Polysaccharide Nanoparticles', *Pharmaceutics*, 10(4), p. 267. Available at: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040267>.
- Cocucci, E. and Meldolesi, J. (2015) 'Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles', *Trends in Cell Biology*, 25(6), pp. 364–372. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.01.004>.
- Collard, C.D. and Gelman, S. (2001) 'Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury', *Anesthesiology*, 94(6), pp. 1133–1138. Available at: <https://doi.org/10.1097/00000542-200106000-00030>.
- Comite, P. et al. (2010) 'Isolation and ex vivo expansion of bone marrow-derived porcine mesenchymal stromal cells: potential for application in an experimental model of solid organ

transplantation in large animals’, *Transplantation Proceedings*, 42(4), pp. 1341–1343. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.03.080>.

- Cowled, P. and Fitridge, R. (2011) ‘Pathophysiology of Reperfusion Injury’, in R. Fitridge and M. Thompson (eds) *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists*. Adelaide (AU): University of Adelaide Press. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534267/> (Accessed: 4 August 2025).

- Danilushkina, A.A. et al. (2023) ‘Strategies for Engineering of Extracellular Vesicles’, *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17), p. 13247. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms241713247>.

- Demiselle, J. et al. (2016) ‘Transplantation of kidneys from uncontrolled donation after circulatory determination of death: comparison with brain death donors with or without extended criteria and impact of normothermic regional perfusion’, *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation*, 29(4), pp. 432–442. Available at: <https://doi.org/10.1111/tri.12722>.

- Deng, X.-H. et al. (2025) ‘The effects of Klotho delivering mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles on acute kidney injury’, *Journal of Nanobiotechnology*, 23(1), p. 427. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12951-025-03499-4>.

- DeSantiago, J., Bare, D.J. and Banach, K. (2013) ‘Ischemia/Reperfusion injury protection by mesenchymal stem cell derived antioxidant capacity’, *Stem Cells and Development*, 22(18), pp. 2497–2507. Available at: <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0136>.

- Devarajan, P. (2006) ‘Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury’, *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 17(6), pp. 1503–1520. Available at: <https://doi.org/10.1681/ASN.2006010017>.

- Dominici, M. et al. (2006) ‘Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement’, *Cytotherapy*, 8(4), pp. 315–317. Available at: <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.

- Dosch, M. et al. (2018) ‘Mechanisms of ATP Release by Inflammatory Cells’, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), p. 1222. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms19041222>.

- Dvorianchikova, G. et al. (2010) ‘Liposome-delivered ATP effectively protects the retina against ischemia-reperfusion injury’, *Molecular Vision*, 16, pp. 2882–2890.

- Eirin, A. et al. (2015) ‘Intra-renal delivery of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury after reversal of hypertension in porcine renovascular disease’, *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), p. 7. Available at: <https://doi.org/10.1186/scrt541>.
- Eirin, A. and Lerman, L.O. (2021) ‘Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles for Chronic Kidney Disease: Are We There Yet?’, *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 78(2), pp. 261–269. Available at: <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.14596>.
- Fernández, A.R. et al. (2020) ‘Review: Ischemia Reperfusion Injury-A Translational Perspective in Organ Transplantation’, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), p. 8549. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21228549>.
- Filiopoulos, V. and Boletis, J.N. (2016) ‘Renal transplantation with expanded criteria donors: Which is the optimal immunosuppression?’, *World Journal of Transplantation*, 6(1), pp. 103–114. Available at: <https://doi.org/10.5500/wjt.v6.i1.103>.
- Force, E. and Andreu, L. (2005) ‘Kidney transplantation’, *EDTNA/ERCA journal (English ed.)*, 31(4), pp. 172–175; quiz 176–177. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1755-6686.2005.tb00423.x>.
- Gordon, J.L. (1986) ‘Extracellular ATP: effects, sources and fate.’, *Biochemical Journal*, 233(2), pp. 309–319.
- Grignano MA, Pisani S, Gregorini M, Rainaudo G, Avanzini MA, Croce S, Valsecchi C, Ceccarelli G, Islami T, Margiotta E, Portalupi V, De Mauri A, Stea ED, Pattonieri EF, Iadarola P, Viglio S, Conti B, Rampino T. Engineered ATP-Loaded Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stromal Cells: A Novel Strategy to Counteract Cell ATP Depletion in an In Vitro Model. *Int J Mol Sci*. 2025 Apr 5;26(7):3424. doi: 10.3390/ijms26073424. PMID: 40244293; PMCID: PMC11990007.
- Guillamat-Prats, R. (2021) ‘The Role of MSC in Wound Healing, Scarring and Regeneration’, *Cells*, 10(7), p. 1729. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells10071729>.
- Guimarães, D., Cavaco-Paulo, A. and Nogueira, E. (2021) ‘Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications’, *International Journal of Pharmaceutics*, 601, p. 120571. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120571>.

- Hartner, W.C. et al. (2009) 'ATP-loaded liposomes for treatment of myocardial ischemia', *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1(5), pp. 530–539. Available at: <https://doi.org/10.1002/wnan.46>.
- Hood, R.R., Vreeland, W.N. and DeVoe, D.L. (2014) 'Microfluidic remote loading for rapid single-step liposomal drug preparation', *Lab on a Chip*, 14(17), pp. 3359–3367. Available at: <https://doi.org/10.1039/C4LC00390J>.
- Jafarinaia, M. et al. (2020) 'Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: A Novel Cell-Free Therapy', *Immunological Investigations*, 49(7), pp. 758–780. Available at: <https://doi.org/10.1080/08820139.2020.1712416>.
- Kezić, A., Stajic, N. and Thaiss, F. (2017) 'Innate Immune Response in Kidney Ischemia/Reperfusion Injury: Potential Target for Therapy', *Journal of Immunology Research*, 2017, p. 6305439. Available at: <https://doi.org/10.1155/2017/6305439>.
- Kim, M.-J. et al. (2024) 'Comprehensive overview of the role of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of acute kidney ischemia-reperfusion injury: a narrative review', *Journal of Yeungnam Medical Science*, 41(2), pp. 61–73. Available at: <https://doi.org/10.12701/jyms.2023.01347>.
- Koniusz, S. et al. (2016) 'Extracellular Vesicles in Physiology, Pathology, and Therapy of the Immune and Central Nervous System, with Focus on Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells as Therapeutic Tools', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10, p. 109. Available at: <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00109>.
- Kootstra, G. and van Heurn, E. (2007) 'Non-heartbeating donation of kidneys for transplantation', *Nature Clinical Practice. Nephrology*, 3(3), pp. 154–163. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncpneph0426>.
- Korb, V. et al. (2008) 'Current data on ATP-containing liposomes and potential prospects to enhance cellular energy status for hepatic applications', *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 25(4), pp. 305–345. Available at: <https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v25.i4.10>.
- Laham, A. et al. (1988) 'Intracarotid administration of liposomally-entrapped ATP: improved efficiency against experimental brain ischemia',

- Pharmacological Research Communications, 20(8), pp. 699–705. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0031-6989\(88\)80117-6](https://doi.org/10.1016/s0031-6989(88)80117-6).
- Lai, Y. et al. (2023) ‘Structure of the human ATP synthase’, *Molecular Cell*, 83(12), pp. 2137-2147.e4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.04.029>.
- Large, D.E. et al. (2021) ‘Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application’, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 176, p. 113851. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113851>.
- Lee, H.T. and Emala, C.W. (2002) ‘Preconditioning and adenosine protect human proximal tubule cells in an in vitro model of ischemic injury’, *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 13(11), pp. 2753–2761. Available at: <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000032421.79225.6e>.
- Lee, P.-W. et al. (2021) ‘Molecular Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell- Based Therapy in Acute Kidney Injury’, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), p. 11406. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms222111406>.
- Li, A. et al. (2021) ‘Mesenchymal Stem Cell Therapy: Hope for Patients With Systemic Lupus Erythematosus’, *Frontiers in Immunology*, 12, p. 728190. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.728190>.
- Lindoso, R.S. et al. (2014) ‘Extracellular vesicles released from mesenchymal stromal cells modulate miRNA in renal tubular cells and inhibit ATP depletion injury’, *Stem Cells and Development*, 23(15), pp. 1809–1819. Available at: <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0618>.
- Liu, C.-P. et al. (2019) ‘Targeting strategies for drug delivery to the kidney: From renal glomeruli to tubules’, *Medicinal Research Reviews*, 39(2), pp. 561–578. Available at: <https://doi.org/10.1002/med.21532>.
- Liu, Z. et al. (2022) ‘Tilianin Reduces Apoptosis via the ERK/EGR1/BCL2L1 Pathway in Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Kidney Injury Mice’, *Frontiers in Pharmacology*, 13, p. 862584. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.862584>.
- Llorente, A. et al. (2013) ‘Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells’, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1831(7), pp. 1302–1309. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2013.04.011>.

- Lombardi, M. et al. (2021) ‘Role of ATP in Extracellular Vesicle Biogenesis and Dynamics’, *Frontiers in Pharmacology*, 12, p. 654023. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.654023>.
- Ma, H., Siu, W.-S. and Leung, P.-C. (2023) ‘The Potential of MSC-Based Cell- Free Therapy in Wound Healing-A Thorough Literature Review’, *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), p. 9356. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms24119356>.
- Ma, Y. et al. (2025) ‘Engineering therapeutical extracellular vesicles for clinical translation’, *Trends in Biotechnology*, 43(1), pp. 61–82. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2024.08.007>.
- Ma, Z. et al. (2014) ‘DNA damage response in renal ischemia-reperfusion and ATP-depletion injury of renal tubular cells’, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1842(7), pp. 1088–1096. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.04.002>.
- Maathuis, M.-H.J., Leuvenink, H.G.D. and Ploeg, R.J. (2007) ‘Perspectives in organ preservation’, *Transplantation*, 83(10), pp. 1289–1298. Available at: <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000265586.66475.cc>.
- Maeki, M. et al. (2022) ‘Microfluidic technologies and devices for lipid nanoparticle-based RNA delivery’, *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 344, pp. 80–96. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.02.017>.
- Magistri, E. (2025) ‘Donazioni e trapianti, per l’Italia il 2024 è un anno da record’, AVIS, 14 January. Available at: <https://www.avis.it/donazioni-e-trapianti-per-litalia-il-2024-e-un-anno-da-record/> (Accessed: 12 August 2025).
- Matsuzaka, Y. and Yashiro, R. (2022) ‘Therapeutic Strategy of Mesenchymal- Stem-Cell-Derived Extracellular Vesicles as Regenerative Medicine’, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), p. 6480. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23126480>.
- Moers, C. et al. (2010) ‘The value of machine perfusion perfusate biomarkers for predicting kidney transplant outcome’, *Transplantation*, 90(9), pp. 966–973. Available at: <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181f5c40c>.
- N, L. et al. (2018) ‘Liposomes: Clinical Applications and Potential for Image- Guided Drug Delivery’, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(2). Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules23020288>.

- Niculae, A. et al. (2023) ‘Pathway from Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease: Molecules Involved in Renal Fibrosis’, *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), p. 14019. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms241814019>.
- Nieuwenhuijs-Moeke, G.J. et al. (2020) ‘Ischemia and Reperfusion Injury in Kidney Transplantation: Relevant Mechanisms in Injury and Repair’, *Journal of Clinical Medicine*, 9(1), p. 253. Available at: <https://doi.org/10.3390/jcm9010253>.
- Nirody, J.A., Budin, I. and Rangamani, P. (2020) ‘ATP synthase: Evolution, energetics, and membrane interactions’, *The Journal of General Physiology*, 152(11), p. e201912475. Available at: <https://doi.org/10.1085/jgp.201912475>.
- Nowak, M. et al. (2023) ‘Extracellular Vesicles as Drug Transporters’, *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), p. 10267. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms241210267>.
- Nsairat, H. et al. (2022) ‘Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications’, *Heliyon*, 8(5), p. e09394. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394>.
- Paller, M.S., Hoidal, J.R. and Ferris, T.F. (1984) ‘Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat’, *The Journal of Clinical Investigation*, 74(4), pp. 1156–1164. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI111524>.
- Piffoux, M. et al. (2021) ‘Engineering and loading therapeutic extracellular vesicles for clinical translation: A data reporting frame for comparability’, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 178, p. 113972. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113972>.
- Pisani, S. et al. (2022) ‘Liposome Formulation and In Vitro Testing in Non- Physiological Conditions Addressed to Ex Vivo Kidney Perfusion’, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), p. 7999. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23147999>.
- Pisani, S. et al. (2023) ‘Investigation and Comparison of Active and Passive Encapsulation Methods for Loading Proteins into Liposomes’, *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17), p. 13542. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms241713542>.
- Ponticelli, C. (2014) ‘Ischaemia-reperfusion injury: a major protagonist in kidney transplantation’, *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 29(6), pp. 1134–1140. Available at: <https://doi.org/10.1093/ndt/gft488>.

- Puisieux, F. et al. (1994) ‘Liposomes, an interesting tool to deliver a bioenergetic substrate (ATP). in vitro and in vivo studies’, *Journal of Drug Targeting*, 2(5), pp. 443–448. Available at: <https://doi.org/10.3109/10611869408996820>.
- Quader, M. et al. (2020) ‘Temperature and flow rate limit the optimal ex-vivo perfusion of the heart - an experimental study’, *Journal of Cardiothoracic Surgery*, 15(1), p. 180. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13019-020-01223-x>.
- Radajewska, A., Krzywonos-Zawadzka, A. and Bil-Lula, I. (2022) ‘Recent Methods of Kidney Storage and Therapeutic Possibilities of Transplant Kidney’, *Biomedicines*, 10(5), p. 1013. Available at: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10051013>.
- Rädler, J. et al. (2023) ‘Exploiting the biogenesis of extracellular vesicles for bioengineering and therapeutic cargo loading’, *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 31(5), pp. 1231–1250. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2023.02.013>.
- Rampino, T. et al. (2022) ‘Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stromal Cells Delivered during Hypothermic Oxygenated Machine Perfusion Repair Ischemic/Reperfusion Damage of Kidneys from Extended Criteria Donors’, *Biology*, 11(3), p. 350. Available at: <https://doi.org/10.3390/biology11030350>.
- Raposo, G. and Stoorvogel, W. (2013) ‘Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends’, *The Journal of Cell Biology*, 200(4), pp. 373–383. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>.
- Remuzzi, G. et al. (1999) ‘Early experience with dual kidney transplantation in adults using expanded donor criteria. Double Kidney Transplant Group (DKG)’, *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 10(12), pp. 2591–2598. Available at: <https://doi.org/10.1681/ASN.V10122591>.
- Remuzzi, G. et al. (2006) ‘Long-term outcome of renal transplantation from older donors’, *The New England Journal of Medicine*, 354(4), pp. 343–352. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052891>.
- Saller, B.S. et al. (2025) ‘Acute suppression of mitochondrial ATP production prevents apoptosis and provides an essential signal for NLRP3 inflammasome activation’, *Immunity*, 58(1), pp. 90-107.e11. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2024.10.012>.

- Salvadori, M., Rosso, G. and Bertoni, E. (2015) ‘Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment’, *World Journal of Transplantation*, 5(2), pp. 52–67. Available at: <https://doi.org/10.5500/wjt.v5.i2.52>.
- Sameiyan, E. et al. (2021) ‘Aptamer-based ATP-responsive delivery systems for cancer diagnosis and treatment’, *Acta Biomaterialia*, 123, pp. 110–122. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.12.057>.
- Schreckenber, R.; Wolf, A.; Szabados, T.; Gömöri, K.; Szabó, I.A.; Ágoston, G.; Brenner, G.; Bencsik, P.; Ferdinandy, P.; Schulz, R.; et al. Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 (PCSK9) Deletion but Not Inhibition of Extracellular PCSK9 Reduces Infarct Sizes Ex Vivo but Not In Vivo. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 6512.
- Silva, S.B. et al. (2016) ‘Cost comparison of kidney transplant versus dialysis in Brazil’, *Cadernos De Saude Publica*, 32(6), pp. S0102-311X2016000605005. Available at: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00013515>.
- Sung, F.L. et al. (2002) ‘Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF-kappaB’, *Kidney International*, 62(4), pp. 1160–1170. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2002.kid577.x>.
- Taylor, M.J. and Baicu, S.C. (2010) ‘Current state of hypothermic machine perfusion preservation of organs: The clinical perspective’, *Cryobiology*, 60(3 Suppl), pp. S20-35. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.10.006>.
- Tingle, S.J. et al. (2024) ‘Normothermic and hypothermic machine perfusion preservation versus static cold storage for deceased donor kidney transplantation’, *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 7(7), p. CD011671. Available at: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011671.pub3>.
- Verma, D.D. et al. (2005) ‘ATP-loaded liposomes effectively protect mechanical functions of the myocardium from global ischemia in an isolated rat heart model’, *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 108(2–3), pp. 460–471. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.08.029>.
- Versteilen, A.M.G. et al. (2004) ‘Molecular mechanisms of acute renal failure following ischemia/reperfusion’, *The International Journal of Artificial Organs*, 27(12), pp. 1019–1029. Available at: <https://doi.org/10.1177/039139880402701203>.

- Villa-Bellosta, R. (2023) ‘Role of the extracellular ATP/pyrophosphate metabolism cycle in vascular calcification’, *Purinergic Signalling*, 19(2), pp. 345–352. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11302-022-09867-1>.
- Wiklander, O.P.B. et al. (2015) ‘Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting’, *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, p. 26316. Available at: <https://doi.org/10.3402/jev.v4.26316>.
- fonte: Wu A, Wolley MJ, Fenton RA, Stowasser M. Using human urinary extracellular vesicles to study physiological and pathophysiological states and regulation of the sodium chloride cotransporter. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Aug 29;13:981317. doi: 10.3389/fendo.2022.981317. PMID: 36105401; PMCID: PMC9465297.
- Wu, L. et al. (2022) ‘Biomimetic Nanocarriers Guide Extracellular ATP Homeostasis to Remodel Energy Metabolism for Activating Innate and Adaptive Immunity System’, *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, 9(17), p. e2105376. Available at: <https://doi.org/10.1002/advs.202105376>.
- Zaborowski, M.P. et al. (2015) ‘Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study’, *Bioscience*, 65(8), pp. 783–797. Available at: <https://doi.org/10.1093/biosci/biv084>.
- Zhang, T., Widdop, R.E. and Ricardo, S.D. (2024) ‘Transition from acute kidney injury to chronic kidney disease: mechanisms, models, and biomarkers’, *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 327(5), pp. F788–F805. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00184.2024>.
- Zhong, E.H. et al. (2021) ‘Structural and functional characterization of engineered bifunctional fusion proteins of CD39 and CD73 ectonucleotidases’, *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 320(1), pp. C15–C29. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00430.2020>.
- Zhu, D. et al. (2018) ‘Outcome of Kidney Transplantation From Donor After Cardiac Death: Reanalysis of the US Mycophenolic Renal Transplant Registry’, *Transplantation Proceedings*, 50(5), pp. 1258–1263. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2018.01.051>.
- Zilberman Itskovich, S. et al. (2025) ‘Effects of Small Extracellular Vesicles Derived From Mesenchymal Stromal Cells on Acute Kidney Injury: A Rat Ischemia-Reperfusion Model’, *Cureus*, 17(5), p. e84411. Available at: <https://doi.org/10.7759/cureus.84411>.