

IMPIEGO DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DI DIVERSA ORIGINE COME TERAPIA PER L'INSUFFICIENZA RENALE ACUTA

Cinzia Rota, Marina Morigi

Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Centro Anna Maria Astori, Parco scientifico e tecnologico Kilometro Rosso, Bergamo

La ricerca di nuove strategie per ricostruire organi e tessuti danneggiati ha portato a identificare la terapia cellulare con cellule staminali come una possibile cura per la rigenerazione dei tessuti danneggiati (1-4). Negli ultimi anni sempre più evidenze documentano un effetto benefico delle cellule staminali mesenchimali (CSM) da midollo osseo (MO) in modelli sperimentali di infarto del miocardio (3), malattie neurologiche (5) e, più recentemente, in modelli di danno renale acuto (6-9).

Il nostro gruppo è stato uno dei primi a documentare l'efficacia delle MO-CSM nella riparazione del tessuto renale in un modello murino di insufficienza renale acuta (IRA) indotto dal cisplatino (6, 7). Tale farmaco è comunemente utilizzato nella terapia di tumori solidi e può indurre danno renale nel 20-25% dei pazienti. L'infusione di MO-CSM murine, un giorno dopo l'iniezione di cisplatino, proteggeva i topi con IRA migliorando la funzione renale e il danno tubulare e stimolando la proliferazione delle cellule renali residenti attraverso un meccanismo paracrino piuttosto che differenziativo (6). Studi in modelli di ischemia/riperfusionne nel ratto hanno dimostrato che l'effetto protettivo delle MO-CSM era dovuto alla produzione di fattori anti-apoptotici, mitogenici e vasculotropici come VEGF, HGF e IGF-1 e di citochine anti-infiammatorie (8, 10). Utilizzando cellule staminali trasfettate con piccoli RNA antisense (siRNA) in grado di bloccare selettivamente l'RNA messaggero dell'IGF-1, abbiamo dimostrato il ruolo fondamentale di tale fattore, prodotto dalle CSM, nell'induzione della proliferazione e nella riduzione dell'apoptosi in cellule tubulari prossimali in coltura danneggiate da cisplatino (11). Anche *in vivo*, l'infusione di MO-CSM silenziate per l'IGF-1 in animali con IRA diminuiva significativamente l'effetto reno-protettivo di queste cellule staminali (11).

In previsione di una futura applicazione clinica delle cellule staminali, abbiamo recentemente valutato l'effetto delle MO-CSM umane nel modello di IRA da cisplatino in topi immunodeficienti (7). Abbiamo osservato che il trattamento con queste cellule esercitava un chiaro effetto reno-protettivo e prolungava significativamente la sopravvivenza degli animali (Tab. I). La localizzazione delle cellule staminali umane prevalentemente nel compartimento tubulo-interstiziale del tessuto renale murino suggeriva che le MO-CSM umane non agivano differenziandosi in cellule renali, ma producendo localmente fattori di crescita che riducevano l'apoptosi, aumentavano la proliferazione delle cellule tubulari e proteggevano la microcircolazione renale (7).

Recentemente, oltre che dal midollo osseo, le cellule staminali mesenchimali sono state isolate anche da altri tessuti come il tessuto adiposo, la polpa dentale e il muscolo scheletrico e da annessi extraembrionali quali il liquido amniotico e il sangue del cordone ombelicale (12-15). L'efficacia di CSM

isolate dal tessuto adiposo è stata studiata in topi con IRA, ma, contrariamente a quanto previsto, non si è osservato alcun effetto protettivo sulla funzione e sulla struttura renali (dati non pubblicati) (Tab. I).

Alla ricerca della migliore e più efficace sorgente di CSM, abbiamo testato le cellule staminali ottenute da tessuti più immaturi e fetali come il sangue del cordone ombelicale e il liquido amniotico. Il sangue del cordone ombelicale (CO) è considerato una sorgente di facile accesso, ricca di cellule staminali mesenchimali con caratteristiche morfologiche e plastiche simili a quelle del midollo osseo (16, 17). Inoltre, alcuni lavori hanno mostrato una maggiore capacità delle CO-CSM rispetto a quelle del MO di produrre fattori di crescita e citochine con attività angiogenica e rigenerativa (18, 19). Evidenze cliniche hanno dimostrato la loro efficacia in malattie ematologiche e neurologiche e in malattie metaboliche infantili (16, 20, 21). Il potenziale rigenerativo delle CO-CSM è stato chiaramente dimostrato in topi immunodeficienti con IRA (15) che mostravano un marcato miglioramento della funzione e del danno renale. Tale effetto reno-protettivo si traduceva in un sorprendente aumento della sopravvivenza degli animali (Tab. I) a 7 giorni dall'induzione della malattia rispetto all'effetto più modesto osservato in animali trattati con MO-CSM (Tab. I) (15). L'effetto benefico delle CO-CSM era dovuto alla loro capacità di raggiungere il rene danneggiato, localizzandosi prevalentemente a livello peritubulare, dove riducevano la produzione locale di radicali ossigeno e, conseguentemente, l'apoptosi delle cellule renali residenti, mentre ne aumentavano la proliferazione. La rigenerazione del tessuto renale in animali che ricevevano CO-CSM era supportata anche dall'attivazione/fosforilazione a livello tubulare dell'Akt, una chinasi nota per modulare la proliferazione e la sopravvivenza cellulare (22). Esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che, in un sistema di co-cultura di CO-CSM con cellule tubulari danneggiate da cisplatino, i livelli di fattori di crescita quali FGF, HB-EGF, VEGF e HGF con attività mitogenica, anti-apoptotica e anti-infiammatoria (19, 23) erano significativamente aumentati. Inoltre, le CO-CSM erano in grado di ridurre la produzione di citochine infiammatorie come TNF- α e IL-1 β da parte delle cellule tubulari danneggiate. L'evidenza che tali cellule esercitavano un'azione anti-infiammatoria anche *in vivo* deriva da studi di microscopia elettronica, dove si osservava una marcata riduzione di cellule infiammatorie nei capillari peritubulari, associata a una riduzione del danno endoteliale in animali infusi con le cellule staminali rispetto a quelli trattati con salina.

Sono in corso studi con cellule staminali isolate dal liquido amniotico recentemente identificato come una fonte di cellule staminali altamente plastiche, con caratteristiche intermedie tra le cellule staminali embrionali e quelle adulte (24). Le cellule

TABELLA I - EFFETTI DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DI DIVERSA ORIGINE, IN TOPI NOD-SCID CON IRA

	FUNZIONE RENALE (mg/dl)	DANNO ISTOLOGICO RENALE	SOPRAVVIVENZA (7 giorni)
Salina	123±19	Nessun effetto	0%
Midollo osseo	63±5	Protezione	50%
Tessuto adiposo	125±17	Nessun effetto	0%
Cordone ombelicale	51±8	Protezione	86%

Topi trattati con cisplatino ricevevano un giorno dopo, l'iniezione di salina o di cellule staminali mesenchimali di diversa origine (5×10^5 cellule). La funzione renale è stata valutata come azoto ureico sierico. Danno istologico renale caratterizzato da necrosi tubulare e cilindri proteici. I dati sono indicati come media±SE.

staminali del liquido amniotico esprimono, infatti, marcatori tipici delle cellule staminali mesenchimali come CD44, CD73, CD105 e CD90, ma esprimono anche marcatori embrionali, come Oct-4 e SSEA-4 (24). Queste cellule crescono facilmente in coltura, mantengono un cariotipo stabile durante la loro espansione e possono differenziare in cellule appartenenti a tutti e tre i foglietti embrionali. La loro immaturità e la loro plasticità ci ha spinti a testarne l'effetto nel nostro modello di IRA. Il trapianto di cellule staminali del liquido amniotico in topi immunodeficienti, iniettati con cisplatino, migliorava significativamente la funzione e la struttura renale prolungando la sopravvivenza degli animali. Queste cellule erano in grado di raggiungere il rene danneggiato ma, con sorpresa, nonostante la loro plasticità e immaturità, non erano in grado di rigenerare il rene attraverso un'incorporazione diretta e una differenziazione in cellule epiteliali tubulari. Considerando l'elevata facilità di trasfezione delle cellule staminali del liquido amniotico, modificazioni genetiche potrebbero essere strumenti utili per migliorare la loro capacità migratoria aumentando l'effetto terapeutico.

Considerati nel loro insieme, questi dati sperimentali suggeriscono che la terapia cellulare con cellule staminali mesenchimali di diversa origine potrebbe rappresentare una nuova e valida strategia per indurre la rigenerazione renale in pazienti con IRA. I meccanismi alla base dell'effetto protettivo sono da ricercare nel marcato renotropismo di queste cellule e nella loro capacità di riparare il danno tissutale attraverso un'azione paracrina sulle cellule residenti renali.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano per la proficua collaborazione il Dr. M. Introna (Laboratorio di Terapia Cellulare e Genetica "G. Lanzani", Bergamo, Italia), la Dr.ssa L. Lazzari (Cell Factory, Centro di Medicina TrASFusionale dell'Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano, Italia), la Dr.ssa M. Nolli (Areta International Srl, Gerenzano, Italia) e il Dr. P. De Coppi (Great Ormond Street Hospital and Institute of Child Health, Londra, Gran Bretagna), che ci hanno fornito rispettivamente le cellule staminali umane da midollo osseo, da sangue del cordone ombelicale, da tessuto adiposo e da liquido amniotico.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI: Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

Indirizzo degli Autori:

Dr.ssa Marina Morigi
Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri"
Centro Anna Maria Astori
Parco scientifico e tecnologico Kilometro Rosso
Via Stezzano 87
24126 Bergamo
e-mail: marina.morigi@marionegri.it

BIBLIOGRAFIA

- Shimada IS, Spees JL. Stem and progenitor cells for neurological repair: minor issues, major hurdles, and exciting opportunities for paracrine-based therapeutics. *J Cell Biochem* 2011; 112: 374.
- Morigi M, Benigni A, Remuzzi G, Imberti B. The regenerative potential of stem cells in acute renal failure. *Cell Transplant* 2006; 15 (Suppl. 1): S111.
- Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 845.
- Bussolati B, Tetta C, Camussi G. Contribution of stem cells to kidney repair. *Am J Nephrol* 2008; 28: 813.
- Torrente Y, Polli E. Mesenchymal stem cell transplantation for neurodegenerative diseases. *Cell Transplant* 2008; 17: 1103.
- Morigi M, Imberti B, Zoja C, et al. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1794.
- Morigi M, Introna M, Imberti B, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. *Stem Cells* 2008; 26: 2075.
- Togel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F31.

9. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Fonsato V, Romanazzi GM, Camussi G. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med* 2004; 14: 1035.
10. Togel F, Weiss K, Yang Y, Hu Z, Zhang P, Westenfelder C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: F1626.
11. Imberti B, Morigi M, Tomasoni S, et al. Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell mediated renal repair. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2921.
12. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 313.
13. Jo YY, Lee HJ, Kook SY, et al. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng* 2007; 13: 767.
14. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod* 2004; 19: 1450.
15. Morigi M, Rota C, Montemurro T, et al. Life-sparing effect of human cord blood-mesenchymal stem cells in experimental acute kidney injury. *Stem Cells* 2010; 28: 513.
16. Sanchez-Ramos J. Stem cells from umbilical cord blood. *Semin Reprod Med* 2006; 24: 358.
17. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24: 1294.
18. Panepucci RA, Siufi JL, Silva WA Jr, et al. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2004; 22: 1263.
19. Liu CH, Hwang SM. Cytokine interactions in mesenchymal stem cells from cord blood. *Cytokine* 2005; 32: 270.
20. Edwards RG, Hollands P. Will stem cells in cord blood, amniotic fluid, bone marrow and peripheral blood soon be unnecessary in transplantation? *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 396.
21. Escolar ML, Poe MD, Provenzale JM, et al. Transplantation of umbilical-cord blood in babies with infantile Krabbe's disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 2069.
22. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev* 1999; 13: 2905.
23. Kogler G, Radke TF, Lefort A, et al. Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Exp Hematol* 2005; 33: 573.
24. De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 100.