

XV SESSIONE COMUNICAZIONI - METABOLISMO CALCIO FOSFORO SALA VERCELLONE

Martedì, 9 Ottobre 2007 - ore 16.00-17.30

IL PARACALCITOLE PREVIENE L'IPERPLASIA PARATIROIDEA ATTRAVERSO IL CONTROLLO DELL'ESPRESSIONE DI ATTIVATORE PROTEIN-2 (AP-2) NEL MODELLO SPERIMENTALE DEL RATTO UREMICO

Cozzolino M¹, Brancaccio D¹, Gallieni M¹, Slatopolsky E², Dusso A²
¹Cattedra di Nefrologia, AO San Paolo, Università di Milano, Milano; ²Renal Division, Washington University, St. Louis, MO, USA

Introduzione. L'iperplasia paratiroidea gioca un ruolo centrale nella patogenesi dell'iperparatiroidismo secondario (IPTS). Nel modello sperimentale del ratto uremico è stato dimostrato come variazioni dietetiche di fosforo (P) o di calcio (Ca) inducano o prevenivano l'iperplasia paratiroidea, rispettivamente attraverso l'aumentata o ridotta espressione paratiroidea di AP-2, un attivatore della trascrizione genica del fattore di crescita Transforming Growth Factor alpha (TGF- α) e del suo recettore Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). Il paricalcitol (19-Nor) è un analogo della vitamina D, che riduce i livelli di PTH, con ridotta tendenza ad aumentare i livelli di Ca e P.

Scopi. Per poter identificare il ruolo del 19-Nor nella regolazione dei meccanismi molecolari della patogenesi dell'iperplasia paratiroidea in corso di uremia, abbiamo studiato l'espressione ghiandolare di TGF- α , EGFR e AP-2.

Metodi. Sono stati studiati ratti normali (N) e uremici (U) nutriti con una dieta a contenuto di P elevato (HP: 1.2% P), trattati con placebo o con 16 ng di 19-Nor a giorni alterni per via intraperitoneale. Gli animali sono stati sacrificati dopo 7 giorni di uremia. I livelli di PTH e il peso delle paratiroidi sono stati i markers utilizzati per definire il grado di IPTS. L'analisi immunostochimica del contenuto paratiroideo di PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) ha determinato il grado di proliferazione cellulare delle paratiroidi.

Risultati. Dopo 7 giorni di uremia, lo stimolo mitogenico UHP ha determinato il classico quadro di IPTS, attraverso l'aumentata espressione paratiroidea di PCNA, TGF- α , EGFR e AP-2 (Tab. I). Al contrario, il trattamento con 19-Nor ha prevenuto l'instaurarsi dell'IPTS attraverso la riduzione del contenuto paratiroideo di queste proteine. In particolare, l'espressione paratiroidea di AP-2 si è ridotta del 33% nel gruppo trattato con 19-Nor, raggiungendo valori simili a quelli del gruppo di controllo non uremico.

Conclusioni. Questi studi evidenziano come l'attivazione di AP-2, proteina chiave nella regolazione di TGF- α e di EGFR, sia importante nella patogenesi dell'iperplasia paratiroidea in corso di uremia, e come la somministrazione di 19-Nor prevenga l'IPTS attraverso il controllo dell'espressione di AP-2, TGF- α e EGFR.

Tabella I

IOD/Area	N-HP (n=7)	U-HP (n=7)	U-HP+19Nor (n=7)
PCNA	0.54±0.12	8.90±2.54	2.05±0.33*
TGF- α	0.13±0.04	0.35±0.04	0.14±0.03*
EGFR	0.19±0.02	0.36±0.06	0.20±0.04*
AP-2	0.14±0.04	0.21±0.02	0.14±0.03*

*p<0.05 vs U-HP

1

IL MONITORAGGIO DEL DOSAGGIO RAPIDO DEL PTH INTATTO (QUICK IPTH) INTRAOPERATORIO È UNA METODICA DIAGNOSTICA IDONEA NEL PREDIRE IL SUCCESSO DELLA PARATIROIDECTOMIA NEL PAZIENTE UREMICO? CORRELAZIONI CLINICO-ISTOLOGICHE E FOLLOW-UP A LUNGO TERMINE

Bandini S¹, Tommasi M², Cicchi P³, Conti P¹, Mancini G¹, Cerretini C¹, Bergesio F¹, Gallo M⁴, Biagini M¹, Salvadori M¹

¹U.O. Nefrologia, Dialisi Trapianto, A.O.U. Careggi, Firenze; ²Dipartimento di Fisiopatologia, A.O.U. Careggi, Firenze; ³U.O. Chirurgia Generale, Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza, Firenze; ⁴Centro Dialisi Ulivella, Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza, Firenze

Introduzione. L'utilità clinica del monitoraggio del PTH intraoperatorio (QPTH I.O.) nei pazienti uremici sottoposti a paratiroidectomia (PTX) è da alcuni autori contestata.

Scopi. Un nostro precedente studio suggeriva, al contrario, che un decremento di QPTH I.O.>80% era in grado di predire il buon esito della PTX. Abbiamo voluto confermare questo dato con una casistica più numerosa ed un follow-up medio più lungo.

Pazienti e metodi. Sono stati studiati 64 pazienti (25 F, 39 M; età: 53±12 aa; media±SD) di cui 57 uremici (età dialitica: 94.9 ± 61.9 mesi) e 7 trapiantati renali, sottoposti a 66 PTX: 61 primi interventi (PTX subtotale n°=42; PTX totale n°=19), 5 re-interventi per iperparatiroidismo (IPT) persistente e per recidiva di PTX. I livelli di iPTH sono stati dosati al tempo 0 e dopo 20 minuti dalla asportazione dell'ultima ghiandola, mediante metodica rapida ICMA (QPTH) e con metodica IRMA standard (iPTH Nichols-Scantibodies). Il tessuto paratiroideo asportato è stato esaminato definendo per ogni ghiandola il grado di iperplasia. Il follow-up è stato di 36.5±14.3 mesi (media±SD) e la PTX veniva considerata adeguata se i livelli di iPTH a fine follow-up erano <100 pg/ml nei pazienti trapiantati e <200 pg/ml nei pazienti uremici.

Risultati. I livelli sierici di QPTH ed iPTH al tempo 0 e dopo 20 minuti correlavano significativamente tra loro (r=0.9; p<0.0001). 58/66 (87.8%) interventi di PTX hanno avuto esito favorevole: i livelli sierici di QPTH a 20 minuti erano diminuiti significativamente rispetto al tempo 0 (983.5±441 vs 140.7±89, media±SD, p<0.0001); il Δ medio del QPTH a 20 minuti è risultato 86.32±5.0 (media±SD) (Δ % Min 75-Max 97.30). 8/66 (12.2%) interventi di PTX hanno avuto esito negativo: i livelli di QPTH a 20 minuti erano significativamente diminuiti rispetto al tempo 0: 936.25±495 vs 387.9±193.8 (p<0.01), ma con un Δ medio a 20 minuti di 58.82±12.46 (Δ % Min36-Max72.1) significativamente inferiore rispetto ai pazienti eparatiroidici (p<0.0001). In 55/58 pazienti eparatiroidici, a fine follow-up, era presente un decremento di QPTH intraoperatorio >80%. È stata evidenziata un'associazione significativa tra Δ medio di QPTH >80 ed esito positivo della PTX (p<0.0001). Nei soggetti sottoposti a PTX 7/8 il reperto istologico di iperplasia paratiroidea diffusa si associa significativamente ad un Δ medio di QPTH intraoperatorio >80 (p<0.005). Negli 8 casi di insuccesso era prevalente un quadro di iperplasia nodulare.

Conclusioni. I nostri dati confermano che un Δ medio di QPTH I.O. >80 è in grado di predire il buon esito della PTX (specificità 100% - sensibilità 94.8%) riducendo il rischio di insuccesso per una non adeguata asportazione di tessuto paratiroideo in iperplasia nodulare o per la presenza di una ghiandola sovranumeraria iperplastica.

3

ASSOCIAZIONE TRA POLIMORFISMO DI MMP3 (MATRIX METALLOPROTEINASE 3) E MORTALITÀ NEI PAZIENTI IN EMODIALISI

Cozzolino M¹, Biondi M², Galassi A¹, Turri O², Melzi-D'Eril G², Gallieni M¹, Brancaccio D¹
¹Cattedra di Nefrologia, AO San Paolo, Università di Milano, Milano; ²Dipartimento di Biochimica-Microbiologia, AO San Paolo, Università di Milano, Milano

Introduzione. Le calcificazioni vascolari e l'aterosclerosi accelerata sono tra le cause più frequenti di patologia cardiovascolare e di mortalità nei pazienti in dialisi. Le "matrix metalloproteinases" (MMPs) sono una famiglia di enzimi che hanno un ruolo importante nel riassorbimento della matrice extracellulare e nella patogenesi dell'aterosclerosi e delle calcificazioni vascolari. In particolare, MMP3 è colocalizzata soprattutto con il calcio e i depositi di fibrina nelle placche aterosclerotiche di arterie coronarie calcificate. Nella zona del promotore di MMP3 è stato individuato un polimorfismo funzionale caratterizzato dalla inserzione/delezione di una base (5A/6A). L'allele 5A induce un'aumentata espressione della proteina.

Scopi. Recentemente, questo polimorfismo è stato associato al grado di calcificazione coronarica in soggetti con funzione renale normale (Pollanen PJ et al, Atherosclerosis 2002, 164: 329-335). In questo studio abbiamo analizzato la possibile associazione tra il polimorfismo di MMP3 e la mortalità in una popolazione di pazienti in emodialisi.

Metodi. 99 pazienti emodializzati sono stati studiati e seguiti per un periodo di 36 mesi. 133 soggetti sani sono serviti da controlli.

Risultati. Nessuna differenza genotipica è stata osservata tra pazienti e controlli (Tab. I). Al contrario, dopo 36 mesi di follow-up, il genotipo 6A/6A era presente nel 34% dei 41 su 99 pazienti in emodialisi deceduti, mentre solo nel 12% dei pazienti ancora vivi (OR, 3.77; 95% CI, 1.23 to 12.30; p=0.0081).

Conclusioni. Questo studio evidenzia come i pazienti in emodialisi abbiano una simile distribuzione del genotipo per MMP3 rispetto alla popolazione di controllo con funzionalità renale normale. Tuttavia il polimorfismo di MMP3 potrebbe rappresentare un fattore prognostico critico per la mortalità dei pazienti in dialisi. In conclusione, questi dati configurano implicazioni importanti nella comprensione dei meccanismi dell'aterosclerosi accelerata e della mortalità nei pazienti in dialisi.

Tabella I

Polimorfismo di MMP3 nei Pazienti in emodialisi	Controlli (n=133)			Emodialisi (n=99)			Deceduti in emodialisi a 36 mesi (n=41)		
5A/5A	36	(27%)	18	(18%)	6	(15%)			
5A/6A	59	(44%)	60	(61%)	21	(51%)			
6A/6A	38	(28%)	21	(21%)	14	(34%)			

2

IN PAZIENTI INCIDENTI IN DIALISI CRONICA IL CHARLSON INDEX È UN PREDITTORE INDIPENDENTE DI BASSI LIVELLI CIRCOLANTI DI PARATORMONE. UNO STUDIO MULTICENTRICO ITALIANO

Marrone LF¹, Mazzaferro S², Cozzolino M³, Bolasco PG⁴, Malberti F⁵, Altieri P⁶, Mereu MC⁶, Schiavone P⁷, Russo D⁸, Dipalma T⁹, Aucella F¹⁰, Zazzera P¹¹, Di Stante S¹², Pertosa G¹³

¹Unità Operativa di Nefrologia e Dialisi, Azienda Ospedaliera Rummo, Benevento; ²Unità Operativa di Nefrologia e Dialisi, Università degli Studi "La Sapienza", Roma; ³Unità Operativa di Nefrologia e Dialisi, Azienda Ospedaliera S. Paolo, Milano; ⁴Unità Territoriale di Nefrologia e Dialisi, USL n.8, Cagliari; ⁵Unità Operativa di Nefrologia e Dialisi, Istituti Ospitalieri, Cremona; ⁶Unità Operativa di Nefrologia, Dialisi, Trapianto, Azienda Ospedaliera Brotzu, Cagliari; ⁷Unità Operativa di Nefrologia e Dialisi, Azienda Ospedaliera Perrino, Brindisi; ⁸Unità Operativa di Nefrologia e Dialisi, Università degli Studi "Federico II", Napoli; ⁹Unità Operativa di Nefrologia e Dialisi, Università degli Studi di Verona, Verona; ¹⁰Unità Operativa di Nefrologia e Dialisi, Azienda Ospedaliera Lastaria, Lucera, Foggia; ¹¹Centro New Dial, Bari; ¹²Struttura Complessa di Nefrologia e Dialisi, Azienda Ospedaliera Cardarelli, Campobasso; ¹³Gruppo di studio elementi traccia e metabolismo minerale

Introduzione. Vi è una crescente necessità di avviare a trattamento dialitico cronico pazienti anziani, frequentemente affetti da plurime comorbidità. Allo stato delle conoscenze non è noto se tale fenomeno interferisca con la presenza di alterazioni della funzione paratiroidea e del metabolismo minerale.

Scopi. Scopo del lavoro è stato quello di studiare la prevalenza delle principali alterazioni della funzione paratiroidea e del metabolismo minerale in pazienti incidenti in dialisi cronica, descrivendo tali alterazioni in rapporto al grado di comorbidità presente.

Pazienti e metodi. È stato condotto uno studio osservazionale cross-sectional che ha coinvolto 37 Centri Italiani. In ciascun Centro sono stati raccolti dati di tutti i pazienti adulti che, per esaurimento della funzione renale nativa, sono stati consecutivamente avviati a trattamento dialitico cronico nel corso dell'ultimo anno. Sono stati raccolti dati di 364 pazienti incidenti in dialisi con età media 64 ± 15 anni (65% di sesso maschile, 37% con diagnosi di nefropatia diabetica e/o ipertensiva, 8% avviati a dialisi peritoneale). Il Charlson Index, uno score validato che include numerose patologie croniche, è stato utilizzato per misurare il grado di comorbidità.

Risultati. Oltre il 25% dei pazienti incidenti in dialisi era ultrasettantacinquenne ed il 14.3% era ultraottantenne. Il 21.3% dei pazienti presentava difficoltà a muoversi autonomamente e l'indice di comorbidità (Charlson score M±DS) era 4.01 ± 2.89. Ad avvio dialisi solo il 27% dei pazienti aveva iPTH compreso tra 150 e 300 pg/ml, mentre il 73% era al di fuori di tale intervallo target. Alterazioni del metabolismo minerale ed importanti quadri di disfunzione paratiroidea erano tutt'altro che infrequenti: iPTH < 100 pg/ml era pre-

(segue)

sente nel 22.3% ed iPTH > 500 pg/ml era presente nel 16.5% dei pazienti. In meno della metà dei pazienti la calcemia corretta era nell'intervallo target 8.4-9.5 mg/dl: il 39% era al di sopra ed il 14% al di sotto di tale range calcemico. Inoltre una fosforemia > 5.5 mg/dl era presente nel 36% dei casi.

Nei pazienti che presentavano comorbidità, il Charlson score presentava una significativa correlazione inversa con i livelli di iPTH (Spearman rho -0.17, P=0.002). La significativa relazione inversa tra la variabile dipendente iPTH ed il Charlson score (β -0.20, P=0.009) era anche riscontrata in un modello di regressione multipla in cui le altre covariate erano: l'età (P=N/S), il sesso (P=N/S), la fosforemia (β 0.19, P=0.005), la calcemia corretta (β -0.20, P=0.003) e la somministrazione di sali di calcio (P=N/S) ed analoghi della vitamina D (β 0.30, P<0.001).

Conclusioni. Questo studio evidenzia come la popolazione incidente in dialisi cronica sia caratterizzata da un alto indice di comorbidità e da alterazioni del metabolismo minerale e della funzione paratiroidica, spesso severe già in queste fasi. L'indice di comorbidità si è dimostrato un significativo ed indipendente predittore di bassi livelli di iPTH.

4

LA CELIACHIA COME "NUOVA" CAUSA DI CALCOLOSI URINARIA

Cirillo M¹, Iudici M¹, Marcarelli F¹, Laudato M¹, De Santo NG¹, Ciacci C²
¹Nefrologia, Seconda Università di Napoli; ²Gastroenterologia, Università "Federico II", Napoli

Introduzione. Disordini malassorbitivi da enteriti, intestino corto, by-pass intestinale, pancreatiti, itteri ostruttivi ecc. causano talvolta calcolosi urinaria (CU) per il combinarsi di iperossaluria, ipocitraturia e disidratazione secondarie a malassorbimento lipidico/diarrea. Eccezion fatta per poche case report, non ci sono dati sui rapporti tra celiachia (il più comune malassorbimento in occidente) e CU.

Scopi. Analizzare frequenza di CU e livelli di fattori urinari litogeni in celiaci adulti, non trattati e dopo terapia con dieta senza glutine.

Metodi. La coorte di casi era costituita da pazienti di età ≥ 18 anni con diagnosi di celiachia (istologia di biopsia duodenale, anticorpi antiendomiosio ed antitransglutaminasi). La severità della celiachia era valutata in base al numero di disordini presenti alla diagnosi tra i seguenti cinque: deficit calorico (basso indice di massa corporea e/o calo ponderale), diarrea (n scariche/di), deficit lipidico (ridotta attività protombinica e/o ipolipidemia), deficit marziale (anemia o sideropenia), deficit di calcio (ridotta densità ossea o ipocalcemia). La presenza di CU era valutata con questionario standardizzato (evidenza ecografica o radiologica, o espulsione calcolo, o rimozione/distruzione calcolo). Raccolte urinarie erano usate per misurare escrezione di fattori litogeni (ossalato, calcio, acido urico, fosfati, citrati). Tali valutazioni si effettuavano al basale (pazienti non trattati) ed in corso di terapia (dieta senza glutine, compliance monitorata antitransglutaminasi sierica). Coorte controllo era un campione di popolazione generale con età (2) ≥ 18 anni partecipante nello stesso periodo a studio epidemiologico con identici questionari su CU.

Risultati. La coorte di casi era di 566 celiaci non trattati, la coorte controllo di 4.640 individui. Donne ed età giovani erano più frequenti nella coorte celiaci che nella coorte controllo. La CU era più prevalente nei celiaci non trattati che nella coorte controllo (8.5% vs 6.3%; odds ratio, OR=1.39; intervallo confidenza al 95%, IC95%= 1.1/1.9) anche in analisi controllate per sesso ed età (OR=3.64, IC95%=2.5/5.3). Nei celiaci non trattati, la prevalenza di pregressa CU non differiva tra forme subcliniche (α -o pauci-sintomatiche) e severe (multi-sintomatiche). Nei 257 celiaci con follow-up in terapia completata, l'incidenza di nuova CU non era diversa rispetto a coorte controllo (3,5% vs 3,9%, OR=0,90, IC95%=0,4/1,8) anche in analisi controllate per sesso, età e durata follow-up (OR=1,04, IC95%=0,3/2,0). Le analisi urinarie (limitate agli ultimi 50 celiaci arruolati) indicavano che un anno di dieta senza glutine modificava solo ossaluria (-38%, P<0.01) e calciuria (+67%, P<0.01), non fosfaturia, uricuria, citraturia e volume urinario.

Conclusioni. La celiachia non trattata è causa di CU osservabile anche in assenza di malassorbimento conclamato. La dieta senza glutine abolisce l'eccesso di CU nella celiachia verosimilmente attraverso una riduzione dell'ossaluria.

6

PROGRESSIONE DELLE CALCIFICAZIONI CORONARICHE NEI PAZIENTI IN PRE-DIALISI

Buonanno E, Battaglia Y, Fimiani V, Miranda I, Ruocco C, Russo D
 Dipartimento di Nefrologia, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli

Introduzione. Nei pazienti in dialisi (D-pz) mortalità e morbilità cardiovascolare sono maggiori rispetto alla popolazione generale e sono imputabili sia ai fattori di rischio cardiovascolare "tradizionali" sia a quelli legati all'uremia.

Le calcificazioni vascolari, in particolare quelle coronariche (CAC), rappresentano fattori di rischio cardiovascolare legati all'uremia e hanno un ruolo importante negli eventi osservati in D-pz. CAC sono state messe in evidenza anche in pazienti in pre-dialisi (CKD-pz) ma la loro progressione non è stata valutata.

Scopi. Nel presente studio la progressione delle CAC è stata valutata in CKD-pz. Una maggiore conoscenza di tale fenomeno potrebbe contribuire a ridurre mortalità e morbilità cardiovascolare.

Pazienti e metodi. 101 pazienti ambulatoriali (diabetici 15%) di età compresa tra 18-70 anni erano arruolati nello studio: 26% avevano funzione renale normale (FRN-pz) e 74% erano CKD-pz (stadio 3-5 CKD; classificazione K-DOQI).

Criteri di esclusione erano: malattia coronaria sintomatica, aritmia, pregresso infarto del miocardio, angioplastica o by-pass coronarico, stroke, malattia renale progressiva.

In ogni paziente erano raccolti i fattori di rischio "tradizionali" e legati all'uremia.

Calcio, fosforo, paratormone (i-PTH), omocisteina, proteina C-reattiva (CRP), trigliceridi, colesterolo, HDL e LDL-colesterolo erano misurati ogni 3 mesi. La media dei valori era utilizzata per l'analisi statistica. Il GFR era misurato con la clearance della creatinina. Mediante TC spirale le CAC erano rilevate a carico di ciascuna delle 4 coronarie e i punteggi del calcio erano sommati per ottenere lo score del calcio totale (SCT).

Risultati. All'inizio dello studio, CAC erano presenti in 26% di FRN-pz e in 56% di CKD-pz.

Rispetto ai non-calcificati, i pazienti con CAC avevano: maggiore età media (p<0.001); più numerosi fattori di rischio tradizionali (p<0.01); maggiore durata di ipertensione (p<0.001); più elevato i-PTH e fibrinogeno (p<0.05). Non differivano le altre variabili misurate.

Alla fine dello studio (durata del follow-up: 18 \pm 2.0 media \pm SD) CAC progredivano in 88% dei pazienti calcificati in basale e si riscontravano ex novo in 6 pazienti. Non si osservavano differenze significative tra le altre variabili rispetto al basale.

L'SCT aumentava da 333 \pm 93 ES a 560 \pm 114 ES (68%; p<0.0001) in CKD-pz e da 253 \pm 153 ES a 373 \pm 223 ES (47%; p=NS) in FRN-pz.

Dei markers del metabolismo minerale solo la fosforemia si associava (p<0.01) alla progressione di CAC.

Conclusioni. Questo studio conferma che la prevalenza e la progressione di CAC è maggiore in CKD-pz; evidenzia un'associazione tra progressione di CAC e valori di fosforemia compresi nei range consigliati dalle attuali linee guida.

Pertanto, la ricerca di CAC deve essere incentivata in CKD-pz e sono necessari nuovi studi per stabilire se livelli di fosforo più bassi si possono associare ad una ridotta mortalità cardiovascolare.

5

IL POLIMORFISMO ARG990GLY DEL GENE DEL CALCIUM-SENSING RECEPTOR AUMENTA L'EFFETTO DEL CALCIOMIMETICO R-568 NELLE CELLULE HEK-293 TRASFETTATE

Terranegra A¹, Arcidiacono T², Biasion R¹, Cusi D¹, Dogliotti E¹, Paloschi V², Vezzoli G², Soldati L¹

¹Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università di Milano, Milano; ²Unità di Nefrologia, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

Introduzione. Precedenti studi *in vitro* e in pazienti con iperparatiroidismo primitivo o con ipercalcemia primaria suggeriscono che il polimorfismo Arg990Gly del gene calcium sensing receptor (CaSR) induca un guadagno di funzione del recettore. Una ricerca preliminare condotta da Rothe et al. ha mostrato come i pazienti uremici con HPT secondario e portatori dell'allele 990Gly possano essere più sensibili ai trattamenti con i calcimimetici.

Scopo. dello studio era confermare il guadagno funzionale prodotto dal polimorfismo Arg990Gly sull'attività del CaSR e studiare la risposta al calcimimetico R-568 (agonista allosterico del CaSR) da parte del CaSR in cellule embrionali umane di rene HEK-293 trasfettate con l'allele 990Gly o 990Arg.

Metodi. Le cellule HEK-293 sono state trasfettate stabilmente con gli alleli del polimorfismo Arg990Gly; l'allele 990Arg è il più comune nella popolazione europea, mentre l'allele 990Gly il più raro. Le cellule trasfettate erano definite HEK-990Gly o HEK-990Arg, rispettivamente. Le cellule esprimevano lo stesso livello di CaSR al western blot. E' stato misurato nelle cellule mediante il colorante fluorescente fura 2 l'incremento della concentrazione intracellulare di calcio ([Ca²⁺]_i) in risposta all'aumento del calcio extracellulare ([Ca²⁺]_e) ed in presenza del calcimimetico R-568 [Amgen Inc, Thousand Oaks, CA, USA]. La EC50 è stata calcolata come la concentrazione di [Ca²⁺]_e oppure di R-568 che produceva il 50% della risposta massima del [Ca²⁺]_i (definite rispettivamente come [Ca²⁺]_e-EC₅₀ o R-568-EC₅₀).

Risultati. In assenza del farmaco, le cellule HEK-990Arg avevano una più alta [Ca²⁺]_e-EC₅₀ rispetto alle HEK-990Gly (4.49 \pm 0.15 mM, n=12 vs 2.69 \pm 0.11 mM, n=19, p=0.0001). Le cellule stimolate con concentrazioni di farmaco crescenti in presenza di 1 mM [Ca²⁺]_e mostravano una R-568-EC₅₀ più alta nelle cellule HEK-990Arg rispetto alle cellule HEK-990Gly (1.41 \pm 0.09 mM [n=16] vs 0.67 \pm 0.08 mM [n=15]; p=0.0001).

A basse concentrazioni di R-568, la risposta delle cellule HEK-990Gly stimolate con crescenti concentrazioni di [Ca²⁺]_e era più attiva rispetto alle cellule HEK-990Arg. Alla concentrazione R-568=0.01 μ M la [Ca²⁺]_i EC50 era più alta nelle cellule HEK-990Arg rispetto alle HEK-990Gly (4.31 \pm 0.09 mM [n=13] vs 2.72 \pm 0.20 mM [n=7], p=0.0001). Alla concentrazione R-568=0.05 mM la [Ca²⁺]_i-EC₅₀ persisteva più alta nelle cellule HEK-990Arg (3.38 \pm 0.12 mM [n=12] vs 2.85 \pm 0.14 mM [n=13], p=0.0087). Alla concentrazione R-568=0.1 mM, la differenza delle [Ca²⁺]_i-EC₅₀ non era più significativa (2.40 \pm 0.13 mM nelle HEK-990Arg [n=9], 2.10 \pm 0.22 mM nelle HEK-990Gly [n=8]), come pure a concentrazioni maggiori.

Conclusioni. Le cellule trasfettate con l'allele più raro 990Gly erano più sensibili alle concentrazioni di calcio e al calcimimetico R-568. Questi dati fanno supporre che una risposta differente al trattamento con calcimimetici possa verificarsi nei soggetti con genotipo differente al polimorfismo Arg990Gly.

7