

IV SESSIONE POSTER

RICERCA DI BASE

Venerdì, 10 Ottobre 2008 – ore 14.15-15.20

L'ATTIVAZIONE DEL RECETTORE VASOPRESSINICO V2r STIMOLA LA PROLIFERAZIONE CELLULARE DEL CARCINOMA RENALE UMANOBolgiano D, Coppolino G, Sciortino ML, Donato V, Medici MA, Buemi M
Cattedra di Nefrologia, Dipartimento di Medicina Interna, Università di Messina, Messina

Introduzione. Recenti evidenze suggeriscono che la vasopressina (AVP) è coinvolta nella crescita e nei meccanismi proliferativi di diversi tipi di tumori, non esclusivamente neuroendocrini. Recettori specifici V1r, V3r e soprattutto V2r sono stati riscontrati in neoplasie polmonari, pancreatiche e mammarie; la stimolazione, in particolare, del V2r tramite agonista selettivo (DDAVP) è alla base dei più importanti effetti mitogeni.

Nella malattia da rene policistico (ADPKD), una patologia che condivide molte similitudini con la crescita neoplastica, l'AVP svolge un altrettanto importante ruolo di proliferazione proprio grazie alla stimolazione del V2r iperespresso sulle cellule cistiche, cosicché l'uso di antagonisti V2r selettivi per bloccare tale meccanismo sta trovando un'importante razionale terapeutico nel trattamento di tale condizione.

Scopi. Lo scopo del presente studio è stato di analizzare per la prima volta se anche cellule derivate da neoplasie renali, una dei fisiologici organi-bersaglio dell'AVP, esprimono il recettore V2r e se la stimolazione di tale recettore possa influenzare la loro crescita.

Materiali e metodi. È stato utilizzato un modello culturale di cellule CAKI-2 ed A498 ottenute da adenocarcinomi renali. Le linee HEK-293 e CHO sono state invece utilizzate rispettivamente come controlli positivi e negativi per l'espressione del V2r che è stata valutata tramite tecniche di biologia molecolare (RT-PCR) ed immunofluorescenza. È stato quindi aggiunto al medium l'agonista V2r-selettivo DDAVP da solo (1 nM) e successivamente insieme all'antagonista V2r-selettivo Satavaptan (1 nM) per osservare l'effetto sulla crescita cellulare che è stata quantificata tramite emocitometro in termini di numero assoluto di cellule ad intervalli di tempo stabiliti (0, 24, 48, 72h).

Risultati. Le tecniche citologiche e molecolari hanno confermato l'idea iniziale, dimostrando che entrambe le linee cellulari sintetizzano ed esprimono il recettore V2r. L'aggiunta iniziale di DDAVP al medium ha indotto a tutti gli intervalli di tempo un importante aumento di crescita sia nelle CAKI-2 (+24, +32, +38% vs controlli, p<0.001) che nelle A498 (+28, +35, +42% vs controlli, p<0.005), laddove tale effetto è stato impedito dall'aggiunta contemporanea dell'antagonista selettivo Satavaptan.

Conclusioni. Similmente a quanto già osservato per altri tipi di neoplasie e per l'ADPKD, il presente studio ha dimostrato per la prima volta che l'AVP può svolgere un ruolo fondamentale anche nella crescita dei tumori renali. Ciò è strettamente legato alla capacità di queste cellule di esprimere il recettore V2r, allorché l'utilizzo dell'antagonista V2r selettivo Satavaptan è in grado di bloccare completamente l'effetto mitogeno ottenuto dall'azione dell'agonista DDAVP. Non è chiaro se la capacità di sintesi del V2r sia peculiare di tutti i tipi di cancro renale o se questa possa identificare in futuro citotipi a differente aggressività similmente ad altre neoplasie (es. tumore mammella/recettori estrogeni). La possibilità di bloccare l'effetto proliferativo AVP-mediato apre comunque nuovi interessanti scenari di applicazione terapeutica dei farmaci aquoretici (V2r antagonisti) come molecole dotate di azione antitumorale, nella speranza di un'efficacia clinica simile a quella già documentata nel trattamento della malattia da rene policistico.

110

EFFETTI DEI MEZZI DI CONTRASTO E DELLA N-ACETILCISTEINA SU MORFOLOGIA E FUNZIONE DELLE CELLULE ENDOTELIALI UMANERonda N¹, Potì F¹, Palmisano A¹, Orlandini G², Gatti R², Ardissino D³, Maggiore U¹, Cabassi A¹, Fiacadori E¹

¹ Dipartimento di Clinica Medica, Nefrologia e Scienze della Prevenzione, Università degli Studi di Parma, Parma; ² Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Parma, Parma; ³ UO Cardiologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, Parma

Introduzione. L'uso dei mezzi di contrasto in radiologia (MC) è associato a complicanze a breve termine come l'insufficienza renale acuta ma anche ad aumento di morbilità e mortalità a medio e lungo termine, soprattutto in pazienti a rischio. Anche l'utilizzo di MC a base di gadolinio, classicamente considerati più sicuri rispetto ai MC iodati, è stato messo in relazione con una sindrome fibrosante sistemica in pazienti con insufficienza renale. I meccanismi della tossicità dei MC sono probabilmente multipli e non sono completamente chiariti. Tra questi sembra avere un ruolo importante una sindrome infiammatoria sistemica con aumento dello stress ossidativo e attivazione/danno a carico delle cellule endoteliali (CE).

Scopi. Valutare gli effetti diretti dei MC sulla morfologia e sulla funzione delle cellule endoteliali umane in cultura. Studiare eventuali effetti protettivi della N-acetilcisteina (NAC).

Materiali e metodi. Le CE sono state isolate da cordone ombelicale e sottoposte a stimolazione con due MC iodati (iodixanolo e iomeprolo) e due MC a base di gadolinio (gadoterato meglumina e gadodiamide), a concentrazioni comprese tra 10 e 40 mg/ml. Le modificazioni morfologiche sono state evidenziate in tempo reale osservando nel tempo cellule vive tramite microscopio confocale laser dotato di cellula termostata. Lo stress ossidativo è stato misurato tramite analisi dell'incremento della fluorescenza della calceina intracellulare, sempre su cellule vive. La distribuzione della heat shock protein60 (HSP60) umana è stata studiata tramite immunofluorescenza diretta con anticorpo monoclonale anti-HSP60 e osservazione al microscopio confocale laser.

Risultati. L'incubazione delle CE con i MC iodati ha causato riduzione dell'area di adesione tra le cellule e tra cellule e supporto, con aumento dello spessore cellulare, entro 1 ora. Allo stesso tempo si riscontrava un importante e significativo aumento dello stress ossidativo. Entrambi questi effetti erano inibiti dalla preincubazione delle cellule con NAC. Infine CE esposte a MDC iodati per 16 ore mostravano una redistribuzione della HSP60 dal citoplasma perinucleare alla periferia cellulare e alla membrana. Nessuno dei fenomeni descritti era osservato utilizzando i mezzi di contrasto a base di gadolinio.

Conclusioni. I dati ottenuti indicano che i MC iodati inducono modificazioni morfologiche nelle CE con aumento degli spazi intercellulari, incremento dello stress ossidativo e mobilitazione della HSP60 sulla membrana cellulare. Tutti questi eventi sono potenzialmente importanti per lo sviluppo di complicanze vascolari acute e di progressione della malattia aterosclerotica. La preincubazione con NAC causa una inibizione significativa dello stress ossidativo e previene le alterazioni morfologiche delle CE da MDC.

112

BASSI LIVELLI CIRCOLANTI DI INTERLEUCHINA 6 SONO SUFFICIENTI, NEI PAZIENTI IN TRATTAMENTO DIALITICO CRONICO, AD ATTIVARE LO STAT3 ED A MODULARE L'ESPRESSIONE GENICA DI FETUINA-A ED EPCIDINASirico M.L¹, Memoli B¹, Salerno S³, Procino A¹, Postiglione L², Morelli S³, Drioli E³, Andreucci V.E¹, De Bartolo L³

¹Dipartimento di Nefrologia, Università Federico II di Napoli, Napoli; ²Patologia e Biologia Molecolare e Cellulare, Università Federico II di Napoli, Napoli; ³Istituto di Tecnologia delle Membrane, Consiglio Nazionale delle Ricerche, ITM-CNR c/o Università della Calabria, Rende, Cosenza

Introduzione. Le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di mortalità nella popolazione dialitica. Nonostante siano stati raggiunti notevoli progressi nel miglioramento della qualità e della biocompatibilità del trattamento dialitico, volti a migliorare lo stato infiammatorio di questi pazienti, la mortalità resta comunque elevata.

L'infiammazione occupa un ruolo determinante nella genesi del danno cardiovascolare dei pazienti in dialisi e l'interleuchina 6 (IL-6) circolante ne rappresenta il marker più significativo. Valori di 1pg/ml di IL-6 sono considerati nel range della normalità. L'IL-6 agisce legandosi ad un complesso recettoriale di membrana che negli epatociti attiva infine lo STAT3, un fattore di trascrizione di geni coinvolti nella risposta della fase acuta dell'infiammazione.

Scopo. Lo scopo di questo studio è valutare se bassi livelli circolanti di IL-6, tipici della micro-infiammazione, sono sufficienti ad attivare, nei pazienti in trattamento dialitico apparentemente indenni da patologie infiammatorie, i recettori di membrana dell'IL-6 (gp80 e gp130) ed il fattore di trascrizione STAT3, regolando quest'ultimo l'espressione genica di proteine della fase acuta dell'infiammazione, come fetuina-A ed epcidina, considerati fattori emergenti di mortalità cardiovascolare.

Materiali e metodi. Sono stati ottenuti, prelevandoli a soggetti sani ed a pazienti in trattamento dialitico, infiammati e non (sulla scorta dei valori della proteina C-reattiva), 3 pool di sieri contenenti varie concentrazioni di IL-6. Frazioni (20%) dei 3 pool sono state aggiunte a colture di epatociti umani. La concentrazione finale di IL-6 nelle varie colture era di 0.1 (con aggiunta di sieri di soggetti sani), 0.6 (sieri di pazienti dializzati non infiammati) ed 1.78pg/ml (sieri di pazienti dializzati infiammati). Sono state anche allestite colture di epatociti con differenti concentrazioni (1 e 240pg/ml) di IL-6 ricombinante (rIL-6). L'attivazione dello STAT3 è stata studiata con microscopia confocale, mentre l'espressione genica di epcidina e fetuina-A è stata valutata mediante RealTime-PCR.

Risultati. La microscopia confocale ha dimostrato l'attivazione dello STAT3 e l'aumentata espressione dei recettori dell'IL-6 negli epatociti coltivati per 24 ore con frazioni di siero contenenti 1.78pg/ml di IL-6. Gli stessi risultati sono stati ottenuti con l'aggiunta di 240pg/ml di rIL-6. Non sono stati riscontrati segni di attivazione con le altre concentrazioni di IL-6. L'attivazione di STAT3 è stata associata, inoltre, ad una aumentata espressione genica dell'epcidina e ad una ridotta espressione genica della fetuina-A.

Conclusioni. Questo studio ha dimostrato che basse concentrazioni di IL-6 (1.78pg/ml) sono in grado di attivare lo STAT3 e di regolare l'espressione di epcidina e fetuina-A. È sufficiente, pertanto, uno stato di microinfiammazione a determinare un incremento dei fattori di rischio cardiovascolare in questi pazienti.

111

TREDICI NUOVE MUTAZIONI DEL GENE CLCN5 E UN ALLELE COMPLESSO IN PAZIENTI CON MALATTIA DI DENTTosetto E¹, Ceol M¹, Mezzabotta F¹, Ammenti A², Peruzzi L³, Caruso MR⁴, Barbano G⁵, Vezzullo G⁶, Colussi G⁷, Vergine G⁸, Giordano M⁹, Sayer J¹⁰, D'Angelo A¹, Anglani F¹

¹Laboratorio di Istomorfologia e Biologia Molecolare del Rene, Clinica Nefrologica, Università di Padova, Padova; ²Dipartimento di Pediatria, Università di Parma, Parma; ³Divisione di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Ospedale Regina Margherita, Torino; ⁴Unità di Nefrologia, Ospedali Riuniti di Bergamo, Bergamo; ⁵Divisione di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Istituto Pediatrico G. Gaslini, Genova; ⁶Divisione di Nefrologia, Dialisi e Iperensione, IRCCS San Raffaele, Milano; ⁷Unità di Nefrologia, Ospedale di Varese, Varese; ⁸Divisione di Nefrologia e Dialisi, Ospedale Pediatrico Bambin Gesù, Roma; ⁹Unità di Nefrologia e Dialisi Pediatrica, Ospedale Pediatrico Bari; ¹⁰Istituto di Genetica Umana, Università di Newcastle, Newcastle, Inghilterra

Introduzione. La malattia di Dent di tipo 1 (DD) è causata da mutazioni del gene CLCN5 che codifica per l'antiporto Cl⁻/H⁺ CIC-5 (OMIM 300009). Difetti a carico di OCRL1, gene che codifica per una fosfatidil-inositolo 4,5 bifosfato 5-fosfatasi e generalmente mutato in pazienti con malattia di Lowe, sono responsabili di un fenotipo simil Dent a cui è stato dato il nome di Dent di tipo 2 (OMIM 300555). Sia nella DD di tipo 1 che nella DD di tipo 2 la nefropatia si caratterizza per la presenza di proteinuria a basso peso molecolare, ipercalcemia, nefrocalcolosi, calcolosi e insufficienza renale progressiva a cui talvolta si accompagna aminoaciduria, glicosuria, fosfaturia, ma non acidosi tubulare. Non sono presenti manifestazioni extrarenali eccetto rachitismo, in una minoranza di pazienti, anche se nella DD di tipo 2 sembrerebbe evidenziarsi una maggior frequenza di problemi cognitivi e comportamentali. Mutazioni del gene CLCN5 gene sono state riportate consistentemente in pazienti con DD e un totale di 143 diverse mutazioni sono state finora riportate.

Scopi. Approfondire la genetica molecolare della DD mediante l'analisi del gene CLCN5. **Pazienti e metodi.** Trenta pazienti con fenotipo suggestivo di DD sono stati indagati per la presenza di mutazioni a livello della regione codificante, dei confini introne-esone e della regione 5' non tradotta del gene CLCN5. L'analisi di mutazione è stata condotta mediante SSCP e sequenziamento diretto dei prodotti di PCR. È stata inoltre condotta un'analisi in RFLP e un'analisi di espressione del gene mediante RT/PCR dell'mRNA di CIC-5 da leucociti dei pazienti.

Risultati. Nel 50% dei pazienti sono state identificate 13 nuove mutazioni del gene CLCN5 e una mutazione ricorrente (S244L). Delle nuove mutazioni, 2 sono corte delezioni o inserzioni in-frame (261delG, T277_L278 ins S), 2 sono mutazioni frameshift (V192LfsX206, R589PfsX592), 3 sono mutazioni a carico dei siti donatori di splicing degli introni 4,8 e 11 rispettivamente (IVS4 +4 A>G, IVS8 +1 G>T, IVS11 +1G>T) e 6 sono mutazioni missenso che coinvolgono aminoacidi altamente conservati tra differenti specie (W58L)

(segue)

G261R, G512D, V519D, W547R, P621L]. I programmi web SIFT e Polyphen predicono che queste sostituzioni aminoacidiche danneggiano la proteina a livello funzionale: entrambi i risultati indicano perciò che queste mutazioni sono patogenetiche. Per 2 delle 3 mutazioni di splicing è stato possibile dimostrare la presenza nei pazienti di un mRNA aberrante. È stato inoltre identificato, in un bambino di 9 mesi, un allele complesso (S386F e L388SfsX434), ereditato dalla mamma e dalla nonna. L'analisi RFLP condotta su 311 cromosomi X da sangue di cordone ombelicale ha rivelato che la sostituzione missenso non è presente nei controlli.

Conclusioni. Il nostro studio 1) aumenta il numero delle nuove mutazioni del gene CLCN5 a 158 e 2) per la prima volta identifica un allele complesso come mutazione disease-causing. Questo allele sembra peggiorare il fenotipo associato alla malattia data la precoce comparsa dei sintomi nel paziente e data la presenza di un fenotipo sintomatico nella madre portatrice.

Lo studio indica inoltre che 3) gli esoni 8 e 10 sono più frequentemente mutati e quindi potrebbero essere indagati per primi nella diagnostica molecolare della DD e, 4) che i codoni altamente conservati 58, 261, 512 and 547 sono probabilmente degli hot spot di mutazione.

113

riduceva la % di tubuli positivi per MCP1 e le cellule MCP1 positive nello spazio interstiziale (% tubuli per campo microscopico A = 76.13 ± 18.73 , B = 33.47 ± 25.08 , $p < 0.0001$); (numero di cellule interstiziali per campo microscopico A = 15.23 ± 7.86 , B = 3.3 ± 2.6 , $p < 0.0001$).

Conclusioni. Il nostro studio dimostra che la neutralizzazione di MSP, riducendo l'espressione renale di MCP1 e l'afflusso di monociti nello spazio interstiziale, attenua il danno renale acuto nella ostruzione ureterale monolaterale nei ratti. Ulteriori studi sono necessari per comprendere i meccanismi alla base del suo effetto.

LA NEUTRALIZZAZIONE DI MACROPHAGE STIMULATING PROTEIN RIDUCE L'INFIAMMAZIONE TUBULOINTERSTIZIALE NELLA OSTRUZIONE URETERALE MONOLATERALE NEI RATTI

Gregorini M, Rampino T, Piacenza C, Bedino G, Piotti G, Gabanti E, Bosio F, Balenzano C.T, Roscini E, Soccio G, Dal Canton A

Unità di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Università e Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Introduzione. Macrophage stimulating protein (MSP) è un fattore appartenente alla famiglia degli scatter factors, descritto originariamente come fattore chemiotattico per i macrofagi residenti. Successivamente abbiamo dimostrato che MSP è prodotto dalle cellule tubulari renali e che induce un effetto chemiotattico anche sui monociti circolanti, ma solo se attivati da citochine ed LPS. L'ostruzione ureterale monolaterale (OUM) nel ratto è un modello sperimentale di infiammazione tubulo interstiziale renale, caratterizzato da dilatazione, atrofia tubulare ed infiltrazione leucocitaria, dove l'attivazione del sistema MCP1/CCR2 riveste un ruolo patogenetico importante.

Scopo. Valutare se la neutralizzazione di MSP in un modello sperimentale di ostruzione ureterale monolaterale nel ratto modifica il danno renale.

Pazienti e metodi. OUM era eseguita in ratti Sprague Dawley wild-type. Tre gruppi di ratti erano studiati. Gruppo A: 6 ratti erano sottoposti alla legatura unilaterale dell'uretere al giorno 0; Gruppo B: 6 ratti erano sottoposti alla legatura unilaterale dell'uretere e ricevevano soluzione salina che conteneva 100 µg di anti MSP IgG policlonale nella vena della coda al giorno 0. Gruppo C 3 ratti sham operati. Gli animali erano sacrificati al giorno 6 ed il rene ostruito ed il controlaterale erano rimossi per lo studio morfologico. La creatinina sierica era misurata ai giorni 0, 3 e 6. Il diametro massimo tubulare era misurato sulle sezioni di rene legato e controlaterale in tutti i ratti mediante analisi morfometrica. Le cellule monocito-macrofagiche (ED1 positive), le cellule interstiziali ed i tubuli positivi per monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) erano valutate mediante immunostochimica.

Risultati. I risultati sono espressi come media e DS. La neutralizzazione di MSP migliorava la funzione renale (giorno 3: A = ± 0.06 ; B = 0.63 ± 0.06 mg%, $p < 0.05$). Il diametro massimo tubulare era significativamente inferiore nei reni controlaterali rispetto ai legati nei ratti del gruppo A (controlaterale = 25.54 ± 6.1 ; legato = 81.29 ± 54.3 µm, $p < 0.0001$) e nei ratti del gruppo B (controlaterale = 20.2 ± 10.3 ; legato = 60.48 ± 36.6 µm, $p < 0.0001$). I diametri massimi tubulari nei reni legati del gruppo B (trattato con anti MSP) erano significativamente inferiori rispetto ai reni legati del gruppo A (B = 60.48 ± 36.6 ; A = 81.29 ± 54.3 µm, $p < 0.0001$). Nel gruppo B il numero di cellule ED1 positive era significativamente minore rispetto al gruppo A (numero di cellule per campo microscopico A = 43.2 ± 10.36 , B = 21.44 ± 7.8 , $p < 0.0001$). La neutralizzazione di MSP

(segue)

L'ESPOSIZIONE DELLE CELLULE TUBULARI RENALI UMANE AL LIPOPOLISACCARIDE (LPS) INDUCE L'ESPRESSIONE DEL NERVE GROWTH FACTOR (NGF) E DEI SUOI RECCETTORI

Bonfiglio R¹, Antonucci MT², Carito V², Russo A², Papalia T¹, Mancuso D¹, Aloe L³, Caroleo MC²

¹UOC Nefrologia- Dialisi-Trapianto, AO Annunziata, Cosenza; ²Dip. Farmaco-Biologico UNICAL, Arcavata-Rende, Cosenza; ³Istituto di Neurobiologia e Medicina Molecolare, CNR, Roma

Introduzione. L'NGF è una proteina solubile facente parte della famiglia dei fattori di crescita. Dati recenti indicano che NGF e i suoi recettori sono presenti sia nel rene sano che in corso di varie patologie glomerulari. Tuttavia è ancora poco nota l'esatta funzione che NGF riveste nel controllo dell'attività funzionale delle varie popolazioni cellulari renali. Scopo del presente studio è stato quello di valutare se le cellule tubulari renali esprimono NGF e i suoi recettori (TrkA e p75), in corso di stimolo infiammatorio acuto e cronico. A tal fine è stata utilizzata la linea cellulare HK-2 di derivazione umana esposta a varie concentrazioni di LPS.

Materiali e metodi. La linea cellulare HK-2 è stata mantenuta in coltura in mezzo Keratinocyte serum free arricchito con Epidermal Growth Factor (5 ng/ml) ed estratti di ipofisi bovina (BPE, 0.05 mg/ml) e penicillina-streptomina (1% v/v) a 37°C ed al 5% CO₂ ed utilizzate per la sperimentazione al 7° passaggio. Le colture sono state sottoposte a stimolazione con LPS a varie concentrazioni (100-1000 ng/ml) ed a vari intervalli di tempo (6-12-24 h e 7 giorni). La presenza di NGF e dei suoi recettori è stata valutata mediante metodica di rt-PCR e Western Blotting. L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata tramite ANOVA ad una via seguita come post-hoc dal test di Tukey-Kramer.

Risultati. I risultati hanno dimostrato che l'esposizione delle colture all'LPS (100-1000 ng/ml) è in grado di indurre un aumento dell'RNA messaggero per NGF e per il suo recettore ad alta affinità, TrkA, rispetto alle colture di controllo. L'analisi dell'espressione proteica mediante Western Blotting ha dimostrato che vi era un incremento statisticamente significativo ($p < 0.05$) dei livelli proteici di NGF e TrkA nelle cellule trattate con LPS dopo 18 h dalla stimolazione rispetto alle cellule esposte al solo mezzo di coltura. Per contro il trattamento cronico per 7 giorni con LPS era in grado di indurre un aumento dell'RNA messaggero per NGF associato ad una concomitante riduzione dei livelli di mRNA per TrkA e ad un aumento dell'RNA messaggero per il recettore a bassa affinità p75. L'analisi dell'espressione proteica mediante western blotting ha dimostrato un aumento dei livelli proteici di NGF e p75 ed una drastica riduzione dell'espressione di TrkA rispetto alle colture di controllo ($p < 0.05$).

Conclusioni. I presenti risultati dimostrano per la prima volta che l'esposizione all'LPS delle cellule tubulari renali umane è in grado di modulare in modo selettivo la produzione di NGF e l'espressione dei suoi recettori con modalità dose e tempo dipendente. Considerando il ruolo di controllo che NGF svolge su altre popolazioni cellulari nei meccanismi di sopravvivenza rimane da dimostrare se la modulazione della neurotrofina e dei suoi recettori possa rappresentare un evento protettivo per le cellule tubulari in corso di stimolo infiammatorio.

114

115

IL TRATTAMENTO CRONICO CON Ac-SDKP MODULA I PROFILI PROTEICI RENALI NEL RATTO DIABETICOCastoldi G¹, Galbusera C², Bombardi C¹, Sarto C³, Brambilla P^{2,3}, Di Gioia C⁴, Corradi B¹, Zerbini G⁵, Magni F², Galli-Kienle M², Stella A¹¹ Clinica Nefrologica, Osp. San Gerardo Monza, DIMEP, Univ. Milano-Bicocca; ² Dip. Medicina Sperimentale, Univ. Milano-Bicocca, Monza, Milano; ³ Dip. Laboratorio di Medicina, Osp. di Desio, Univ. Milano-Bicocca, Milano; ⁴ Dip. Medicina Sperimentale, Univ. La Sapienza, Roma; ⁵ Unità di Fisiopatologia Renale del Diabete, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano**Introduzione.** N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (Ac-SDKP) è un tetrapeptide fisiologicamente presente nel plasma e idrolizzato dall'enzima di conversione dell'angiotensina. È stato dimostrato che Ac-SDKP riduce l'escrezione urinaria di albumina e la fibrosi renale nel ratto diabetico (1).**Scopo.** Valutare l'effetto della somministrazione cronica di Ac-SDKP sull'espressione proteica differenziale a livello del tessuto renale nel ratto diabetico.**Metodi.** A 11 ratti SD è stato indotto diabete mellito con un'iniezione di streptozotocina (75 mg/kg i.p.). A 6 ratti SD (gruppo controllo) si somministrava soluzione tampone. Dopo 2 mesi dallo sviluppo di diabete, a 6 ratti si somministrava Ac-SDKP (1 mg/kg/die s.c.) per due mesi tramite minipompa osmotica. Nei due mesi precedenti l'impianto della minipompa e per tutto il periodo sperimentale si misuravano ogni 15 giorni la pressione arteriosa sistolica (tail cuff) e la glicemia. Al termine della fase sperimentale i ratti venivano sacrificati e si prelevavano i reni.È stata effettuata un'analisi proteomica comparativa multipla sui reni dei gruppi di ratti studiati. Le proteine estratte dal tessuto renale sono state separate mediante elettroforesi 2D-PAGE, e le immagini dei gel sono state confrontate. Le spot con intensità statisticamente variata ($p < 0.05$) sono state prelevate, sottoposte a digestione enzimatica e successivamente analizzate in spettrometria di massa MALDI-TOF-Reflex IV (Bruker-Daltonik). L'identificazione delle proteine è stata condotta mediante la tecnica del "Peptide-Mass Fingerprinting".

La nostra analisi si è focalizzata solo sulle proteine che presentavano una risposta tutto/nulla, cioè che venivano indotte o inibite nel diabete e venivano riportate alla situazione di controllo nell'animale diabetico trattato con tetrapeptide.

Risultati. I ratti diabetici presentavano aumentati valori di glicemia durante tutto il periodo sperimentale ($p < 0.01$ vs gruppo controllo), mentre non si osservavano modificazioni della pressione arteriosa sistolica. L'analisi proteomica del tessuto renale ha dimostrato che lo sviluppo di diabete ha indotto 8 proteine, che non erano espresse nel rene del ratto diabetico trattato con tetrapeptide. La presenza di diabete aveva inibito l'espressione di 11 proteine, che erano invece espresse nel rene dei ratti diabetici trattati con tetrapeptide.

(segue)

I GLOBULI ROSSI OTTENUTI DA PAZIENTI UREMICI ESPRIMONO UNA ISOFORMA DI OSSIDO NITRICO SINTASI ENDOTELIALE (eNOS) DISFUNZIONALEDi Cesare M¹, Giardinelli A², Di Tomo P², Amoroso L¹, Sirolli V¹, Di Silvestre S², Libardi F¹, Felaco P¹, Di Pietro N², Pandolfi A², Bonomini M¹¹ Clinica Nefrologica, Dipartimento di Medicina, Università "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara; ² Dipartimento di Scienze Biomediche, CeSI, Fondazione "Gabriele d'Annunzio" Chieti-Pescara**Introduzione.** Nei pazienti uremici è stata dimostrata una ridotta biodisponibilità di Ossido Nitrico (ON), considerata potenzialmente associata alle note complicanze vascolari dell'uremia. L'ON è una molecola gassosa che regola numerosi meccanismi in molteplici sistemi cellulari. La produzione dell'ON presente in circolo è stata generalmente attribuita all'attività dell'isoforma endoteliale dell'enzima NOS (eNOS). Nonostante recenti evidenze indichino la presenza nei globuli rossi dell'isoforma eNOS funzionale, ad oggi non sono disponibili dati che mettano in relazione potenziali alterazioni nel rilascio di tale gas da parte degli eritrociti di soggetti uremici e la ridotta biodisponibilità di ON nell'uremia.**Scopo.** Scopo del presente studio è stato valutare l'espressione, l'attività della eNOS ed il rilascio di ON in eritrociti di soggetti affetti da uremia cronica e relativi controlli.**Materiali e metodi.** Gli eritrociti sono stati ottenuti da 10 soggetti sani e da 12 pazienti uremici in emodialisi regolare. Aliquote diverse di globuli rossi sono state utilizzate per valutare: i) i livelli di mRNA (Real Time PCR), ii) i livelli e la localizzazione intracellulare di eNOS e fosfo-eNOS (Microscopia Confocale a Fluorescenza e Citofluorimetria), iii) l'attività enzimatica di eNOS e la produzione di ON (conversione 3H-Arginina in 3H-Citrullina e DAF-2DA in citofluorimetria), iiiii) i livelli di nitrorosina (citofluorimetria).**Risultati.** I risultati ottenuti dimostrano che gli eritrociti dei pazienti uremici esprimono una forma attiva di eNOS, con localizzazione di membrana e citoplasmatica. Sebbene rispetto ai relativi controlli sani i livelli di mRNA ($p < 0.05$), proteina ($p < 0.05$) e di fosforilazione in Ser1177 ($p < 0.05$) siano significativamente aumentati negli eritrociti dei pazienti uremici, la produzione stimolata (insulina o ionomicina) di ON risulta sensibilmente diminuita. I livelli intracellulari di nitrorosina (marker di stress nitrossidativo) non differiscono tra eritrociti di pazienti uremici rispetto ai relativi controlli.**Conclusioni.** I nostri risultati dimostrano che gli eritrociti di pazienti uremici producono una ridotta quota di ON a fronte di un'aumentata espressione di eNOS. È possibile ipotizzare che il milieu pro-ossidante uremico induca disaccoppiamento dell'attività enzimatica di eNOS con conseguente diminuzione del rilascio di ON. Tale alterazione può contribuire al deficit di ON che caratterizza l'uremia cronica e che può favorire il processo aterogeno.

117

Queste proteine differenzialmente modulate nei diversi gruppi sperimentali, sono state analizzate tramite il software IPA (Ingenuity Pathway Analysis) per la costruzione di pathway metabolici e network di interazione biologica. In particolare le 11 proteine sottoesprese solo nel ratto diabetico, sono state tutte classificate in un unico network associato allo sviluppo cellulare, crescita e proliferazione cellulare, funzione e sviluppo del sistema scheletrico e muscolare. Fra le 8 proteine indotte nel rene del ratto diabetico, ma sottoesprese nel ratto diabetico trattato con tetrapeptide sono state identificate le proteine ezrin (EZRI_RAT) e moesin (MOES_RAT), appartenenti alla famiglia ERM (Ezrin Radixin Moesin), che svolgono un ruolo fondamentale nella motilità cellulare, nell'interazione cellula-cellula, e nella trasduzione del segnale.

Conclusioni. I nostri risultati dimostrano che la somministrazione cronica di Ac-SDKP in questo modello sperimentale di diabete mellito modula l'espressione di diverse proteine implicate in diversi pathway intracellulari, suggerendo il loro possibile coinvolgimento nell'effetto protettivo del tetrapeptide a livello renale.

(1) Castoldi G et al. Gior Ital Nefrologia 2007, S-39, S11.

PATOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE UMOD: IL CASO DI IPERURICEMIA FAMILIARE GIOVANILE ASSOCIATO A DUE MUTAZIONI DI UMODDagnino M¹, Anglani F², Rampoldi L³, Schaeffer C³, Tosetto E², Del Prete D², Dali D², Poverino B², Ghiggeri G.M¹, Caridi G¹, D'Angelo A²¹Laboratorio di Fisiopatologia dell'Uremia, Istituto Gaslini, Genova; ² Clinica Nefrologica, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Padova, Padova; ³ Dulbecco Telethon Institute, Dibat, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano**Introduzione.** Le Mutazioni del gene UMOD sono responsabili di un gruppo di nefropatie a trasmissione autosomica dominante che includono la malattia cistica della midollare (MCKD), la nefropatia iperuricemica giovanile (FJHN) e la malattia glomerulocistica (GCKD) ora accomunate dal termine uromodulopatie. La maggior parte delle mutazioni di UMOD descritte in letteratura modificano uno dei 48 residui di cisteina. Queste mutazioni alterano la struttura terziaria causando accumulo intracellulare e conseguente disfunzione tubulare. Riportiamo il caso di una giovane donna con diagnosi clinica di FJHN e con una diagnosi genetica inusuale di eterozigote composta per due mutazioni di UMOD.**Scopo.** Studiare il significato funzionale delle due mutazioni e la loro correlazione con il fenotipo clinico e la storia familiare della paziente.**Materiali e metodi.** Giovane donna con iperuricemia, gotta, insufficienza renale cronica (IRC), e un'importante storia familiare, nel ramo materno, di iperuricemia e IRC (5 su 7 membri, di cui 3 in terapia sostitutiva, dialisi o trapianto). L'analisi genetica evidenziava la presenza di due mutazioni missenso di UMOD, mai descritte precedentemente, l'una Trp202Arg ereditata dalla madre affetta anch'essa da FJHN, l'altra Gly131Asp ereditata dal padre e presente anche nel fratello della probanda, ambedue tuttavia asintomatiche. Lo studio funzionale è stato condotto in cellule MCDK stabilmente trasfettate con le due isoforme mutate.**Risultati.** Sebbene l'analisi in silico con i software predittivi SIFT and PolyPhen predica che le due sostituzioni aminoacidiche alterino la struttura della proteina, studi funzionali indicano che la mutazione Trp202Arg, pur non interessando un residuo di cisteina, induce ritardo nel trasporto sulla membrana plasmatica e ritenzione nel reticolo endoplasmatico mentre la Gly131Asp non altera il normale trasporto della proteina. Questo conferma i dati clinici e familiari e suggerisce che la Gly131Asp non è una mutazione patogena per FJHN. Non è escluso tuttavia che essa possa avere un ruolo come allele modificatore del fenotipo o essere associata ad un fenotipo clinico diverso. Lo studio della sua frequenza in popolazione di controllo indica infatti che è molto rara, non essendo stata riscontrata in più di 500 individui normali e un'attenta anamnesi familiare del ramo paterno evidenzia una importante ricorrenza per ipertensione essenziale (nonna paterna e tre zii paterni), peraltro presente anche nel padre in terapia antiipertensiva da venti anni.**Conclusioni.** Il caso clinico ci permette di acquisire nuove informazioni sulla patologia molecolare di UMOD: 1) sostituzioni in residui non cisteinici sono in grado di indurre accumulo intracellulare di uromodulina e conseguentemente la nefropatia; 2) varianti aminoacidiche che non causano l'accumulo di uromodulina, non causano la nefropatia ma potrebbero essere associate a ipertensione, come recentemente evidenziato in altri lavori scientifici.

116

118

LA RAPAMICINA RIDUCE IL DANNO RENALE NEL RATTO CON NEFRECTOMIA 5/6

Villa L, Grosjean F, Mangione F, Castoldi F, Serpieri N, Arra MA, Pertile E, Valentino R, Migotto C, Montagna F, Maggi N, Esposito V, Esposito C, Dal Canton A
U.O. di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Università di Pavia, Policlinico San Matteo, Pavia

Introduzione. La Rapamicina è un potente farmaco immunosoppressore utilizzato per la prevenzione del rigetto acuto nel trapianto di organo solido, dotato di minor nefrotossicità rispetto agli inibitori delle calcineurine. Nelle nefropatie croniche proteinuriche il trattamento con rapamicina ha però mostrato effetti contrastanti, in alcuni casi aggravando l'entità della malattia renale.

Scopi. Il nostro studio ha valutato l'effetto di rapamicina in ratti con nefrectomia 5/6, un modello sperimentale di insufficienza renale cronica progressiva e proteinurica.

Materiali e metodi. Ratti Sprague-Dawley sono stati sottoposti a nefrectomia 5/6 mediante legatura selettiva delle aa. renali e dopo 14 giorni sono stati randomizzati a ricevere rapamicina (RA, 1.5 mg/kg i.p.; media trough level 11 ng/ml) o veicolo (CT). Nel corso del follow-up ed al sacrificio, avvenuto dopo 90 giorni, siero ed urine sono stati raccolti per il dosaggio di creatinemia, clearance creatinina e proteinuria; il tessuto renale è stato colorato con metodica PAS per valutare volume glomerulare (Vg), sclerosi glomerulare (%glomeruli sclerotici, GS) e tubulo-interstiziale (score tubulo-interstiziale: atrofia/fibrosi/infiammazione, STI); con sirio rosso per quantificare fibrosi glomerulare e tubulo-interstiziale (% area positiva, SR) e con metodica immunohistochimica per valutare la transizione epitelo-mesenchimale [score semiquantitativo per α -smooth muscle actin (α SMA) e vimentina (VIM)] ed infiltrazione monocito/macrofagica (numero cellule ED-1 positive). I risultati sono stati espressi come media \pm SD ed analizzati con t-test ($p < 0.05$).

Risultati. La rapamicina non modificava creatinemia e clearance della creatinina tuttavia riduceva significativamente il volume glomerulare (CT $5.9 \times 10^6 \pm 3.1 \times 10^6 \mu^3$, RA $1.3 \times 10^6 \pm 0.7 \times 10^6 \mu^3$) e la proteinuria (CT 349 ± 146 mg/24h, RA 56 ± 27 mg/24h, $p < 0.05$); la sclerosi glomerulare (GS: CT $78 \pm 7\%$, RA $36 \pm 7\%$, $p < 0.05$; SR: CT $13.2 \pm 3.5\%$, RA $3.8 \pm 1.0\%$, $p < 0.05$) e la fibrosi tubulo-interstiziale (STI: CT 3.25 ± 0.5 , RA 1.0 ± 0.1 , $p < 0.05$; SR: CT $29 \pm 3\%$, RA $11 \pm 3\%$, $p < 0.05$). α SMA (CT 3.25 ± 0.5 , RA 1.0 ± 0.1 , $p < 0.05$) e VIM (CT 3.5 ± 0.6 , RA 1.0 ± 1.4 , $p < 0.05$), indici di transizione epitelo-mesenchimale, erano aumentati nei ratti non trattati. Le cellule ED-1 positive erano ridotte dal trattamento con rapamicina (CT 110 ± 43 cell, RA 24 ± 1 cell, $p < 0.05$).

Conclusioni. Il nostro studio dimostra che la rapamicina riduce la proteinuria, la sclerosi glomerulare e la fibrosi tubulo-interstiziale in un modello di danno cronico nel ratto. Il volume glomerulare e la transizione epitelo-mesenchimale, significativamente ridotti nei ratti trattati con rapamicina, indicano che il suo effetto protettivo essere secondario alla riduzione dell'ipertensione intraglomerulare e alla modulazione del turnover della matrice extracellulare in senso antifibrotico sia a livello glomerulare che tubulo interstiziale.

119

RIDUZIONE DELL'ESPRESSIONE E DELLA FUNZIONE DELLA GLICOPROTEINA-P E RUOLO DELLA MAP KINASI NELLE CELLULE TUBULARI UMANE HK-2 ESPOSTE ALL'ALBUMINA

Tramonti G¹, Romiti N², Chieli E²

¹Dipartimento di Medicina Interna, Sezione di Nefrologia, Università di Pisa, Pisa;
²Dipartimento di Patologia Sperimentale, Università di Pisa, Pisa

Introduzione. La proteinuria determina flogosi e fibrosi interstiziale e contribuisce alla progressione del danno renale. L'albumina è la proteina filtrata in maggiore quantità dai glomeruli ed è riassorbita dalle cellule tubulari nelle quali esercita diversi effetti. Tra questi è la variazione della espressione dei geni di codifica di alcuni trasportatori di membrana. La glicoproteina-P (Pgp) è un trasportatore di membrana localizzato sull'orletto a spazzola delle cellule del tubulo prossimale. La Pgp rappresenta uno dei principali meccanismi di trasporto di farmaci e di xenobiotici dall'interno della cellula tubulare al polo urinario. Studi precedenti hanno dimostrato che l'albumina riduce l'espressione e la funzione di trasporto della Pgp in cellule tubulari umane in coltura (HK-2).

Scopo. Valutazione dei meccanismi cellulari coinvolti nella riduzione della espressione e della funzione di trasporto della Pgp indotta dall'albumina nelle cellule HK-2.

Materiali e metodi. Le cellule tubulari HK-2 sono state coltivate in presenza di albumina (20 mg/ml, Scipac Ltd, UK) per 72 ore. L'espressione della proteina è stata valutata nelle membrane isolate mediante western blot (WB, anticorpo mdr Ab-1). L'espressione del gene di codifica ABCB1 è stata determinata mediante RTPCR semiquantitativa. La funzione di trasporto è stata valutata con il test di accumulo della Rodamina-123 (R123). È stato studiato l'effetto dell'albumina e del TNF- α sull'attività del NF- κ B (p65) e della p42/p44 MAP kinasi (MAPK). Tutti gli esperimenti sono stati condotti almeno in triplo. L'analisi statistica è stata eseguita mediante GraphPadPrism Software t test. Significativo era considerato un valore di $p < 0.05$.

Risultati. La presenza di albumina ha indotto una notevole riduzione dell'espressione (WB) che è risultata al 39.9% dei controlli, $p < 0.001$. La RTPCR ha dimostrato una riduzione dell'espressione del gene ABCB1 (66.9% dei controlli, $p < 0.01$). Il test R123 ha mostrato un accumulo del probe 2.7 volte superiore ai controlli ($p < 0.02$). La MAPK ha mostrato una riduzione di attività (47% dei controlli) mentre il NF- κ B non ha mostrato variazioni. La aggiunta di TNF- α ha indotto nelle cellule esposte all'albumina un incremento della MAPK (64% dei controlli) e della espressione della Pgp (63.5% dei controlli). Anche il NF- κ B mostrava un incremento di attività (+110%) dei controlli.

Conclusioni. Le cellule tubulari umane HK-2 esposte all'albumina presentano una riduzione della attività della MAPK e della espressione e della funzione della Pgp. Il TNF- α aumenta l'attività della MAPK e l'espressione e la funzione della Pgp. Questi risultati suggeriscono che l'effetto della albumina sulla Pgp nelle cellule HK-2 avviene attraverso il pathway della MAPK ed aprono nuove prospettive sui meccanismi patogenetici della proteinuria e sulle possibilità di intervento terapeutico nella progressione del danno renale.

121

ANTICORPI CONTRO FOSFOLIPIDI OSSIDATI E PROTEINE INTERFERON-INDOTTE: QUALE CONTRIBUTO ALLA DIAGNOSTICA DELLE MALATTIE AUTOIMMUNI?

Fenoglio R¹, Quaglia M¹, Lazzarich E¹, Rizzo M.A¹, Airoldi A¹, Vidali M², Albano E², Gariglio M², Stratta P¹, Cena T³, Magnani C³

¹SCDU Nefrologia Trapianto, Università Piemonte Orientale, Ospedale Maggiore della Carità, Novara; ²Dipartimento Scienze Mediche, Università Piemonte Orientale, Ospedale Maggiore della Carità, Novara; ³Servizio di Epidemiologia e Statistica, Ospedale Maggiore della Carità, Novara

Introduzione. Il ruolo degli anticorpi (Ab) antifosfolipidi nelle malattie immunologiche e nella patologia nefrologica è noto. Nuovo è il ruolo dell'ossidazione dei fosfolipidi (P) nell'indurre uno stimolo antigenico, e si discute se questo processo di ossidazione avvenga o meno *in vivo*. Nelle patologie autoimmuni inoltre, sta emergendo un interesse per gli Ab anti-proteine indotte dall'interferone (IFN).

Scopo. Analizzare la prevalenza degli Ab anti-P ossidati e anti-proteine IFN-indotte nei pazienti (pz) con lupus eritematoso sistemico (LES) e sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS) e in un gruppo controllo di pz con altre nefropatie. Valutare: 1) la specificità degli Ab per gruppi di patologie o particolari caratteristiche clinico-laboratoristiche; 2) le correlazioni tra diversi Ab.

Metodi. Sono stati arruolati 151 pz: 93 con LES, 13 con APS secondaria, 18 con APS primitiva, 40 con glomerulopatie primitive o secondarie. Sono stati ricercati Ab anti-cardiolipina ossidata (CLOX), anti-fosfatidilserina ossidata (PSOX) e anti-IFN16, proteina IFN-indotta. Il titolo anticorpale è stato ottenuto con metodo ELISA, previa ossidazione controllata dei P ed espressione di una proteina ricombinante IFN16 in un vettore procariotico.

Risultati. La prevalenza degli Ab anti-P ossidati è risultata maggiore nella APS primitiva (50% CLOX e PSOX) e nel LES (45.6% CLOX, 35.48% PSOX) rispetto ai controlli (7.5% CLOX, 2.5% PSOX) ($p < 0.0001$). Non si sono osservate differenze significative per gli Ab anti-IFN16: 37.63% nel LES, 27.68% in APS primitiva, 20% nei controlli ($p < 0.12$). Gli Ab anti-P ossidati non correlavano con la diagnosi di APS (69.23% PSOX, 92.31% CLOX in APS secondaria; 50% PSOX e CLOX in APS primitiva), ma sono risultati associati in modo significativo alla durata di malattia. Gli Ab anti-IFN16 sono invece risultati associati significativamente alla presenza di Ab anti-nucleo (ANA) ($p < 0.045$). Infine, si è osservata una correlazione quasi completa tra le positività degli Ab anti-P ossidati CLOX e PSOX (100% APS primitiva, 57% LES, 70% APS secondaria) ($p < 0.001$), e, inaspettatamente, tra Ab anti-P ossidati e anti-IFN16 (55.5% APS primitiva, 46% APS secondaria, 37.5% LES).

Conclusioni. Gli Ab anti-P ossidati non sono risultati positivi in tutte le APS ma solo in quelle con storia clinica più lunga. Gli Ab anti-IFN16 non sono risultati marcatori specifici per il LES, ma si sono dimostrati correlati con la positività ANA e sovrapponibili agli Ab anti-P ossidati, confermando i dati sperimentali di un innesco di sintesi di queste proteine in presenza di ossidazione endoteliale. La corrispondenza tra positività di CLOX, PSOX e anti IFN16 suggerisce che questi Ab possano essere marker di danno endoteliale, come comune denominatore in diverse patologie autoimmuni, e che il loro contributo non sia tanto diagnostico di patologia, quanto di durata di malattia.

120

ATTIVAZIONE DI FATTORI TRASCRIZIONALI NF-KB, AP-1 E SP-1 IN LINFOMONOCITI DI PAZIENTI CON RECIDIVA DI NEFROPATIA A DEPOSITI DI IGA POST-TRAPIANTO

Coppo R¹, Camilla R¹, Amore A¹, Peruzzi L¹, Segolini G², Giraudi R², Montagnino G³, Messa PG³, Venturini C⁴, Scolari F⁴, Esposito C⁵, Dal Canton A⁵, De Mauri A⁶, Grandaliano G⁶, Schena F.P.⁶, Salvadori M⁷, Bertoni E⁷

Consorzio Italiano per lo studio della recidiva di nefrite a depositi IgA.
Divisioni di Nefrologia di: ¹Ospedale Regina Margherita, Torino; ²Ospedale S. Giovanni, Torino; ³Ospedale Policlinico Mangiagalli Regina Elena, IRCCS, Milano; ⁴Brescia; ⁵Pavia; ⁶Bari; ⁷Firenze

Introduzione. Non sono ad oggi ancora del tutto definiti i fattori che condizionano la recidiva di nefropatia a depositi IgA (IgAN) nel rene trapiantato. Il nostro gruppo aveva indagato sia le caratteristiche delle IgA, sia possibili fattori genetici, rilevando uno squilibrio della sottoclasse Th2 associato a recidiva di IgAN. Il consorzio italiano costituitosi per il Progetto Ministeriale sulla recidiva di IgAN ha permesso di analizzare dati retrospettivi di 361 pazienti trapiantati con diagnosi istologica di IgAN come malattia nel rene nativo ed ha dato inizio ad uno studio prospettico.

Scopi. Il presente studio è stato focalizzato sull'indagine dell'attivazione dei fattori trascrizionali NF- κ B, AP-1 (c-Fos, c-Jun) e Sp-1 in linfomonociti circolanti (PBMC) quale fattore immunologico correlato con recidiva di IgAN.

Materiali e metodi. Sono stati studiati i PBMC di soggetti progrediti alla dialisi e trapianto (Tx) per IgAN afferenti da: a) Studio retrospettivo: 21 pazienti (età media 56 anni) di cui 7 con recidiva di IgAN diagnosticata istologicamente dopo un tempo mediano di 84.1 mesi dopo il trapianto; b) studio prospettico: 17 pazienti con IgAN come malattia di base studiati al momento del Tx e 12 mesi dopo, nessuno con recidiva. I fattori trascrizionali sono stati studiati su estratti citoplasmatici e nucleari di PBMC in western blot, utilizzando anticorpi monoclonali specifici per le subunità attive (p50 e p65; cJun e cFos; Sp-1). Le bande sono state visualizzate con il sistema ECL e quantificate in densitometria (Image Master, Total Lab). I dati sono stati espressi con unità relative (UR).

Come controllo sono stati indagati 21 controlli sani di età e sesso paragonabili.

Risultati. Nello studio prospettico tutti i fattori trascrizionali indagati mostravano una significativa attivazione al momento del trapianto, che si riduceva nettamente a 12 mesi. Nello studio retrospettivo risultava che i casi senza recidiva tendevano ad una riduzione dei livelli verso il target normale, mentre nei casi con recidiva i fattori trascrizionali erano maggiormente attivati, con valori significativamente differenti dai non recidivanti per NF- κ B.

(segue)

Unità relative: UR	Contr. sani	Retrosp. IgAN TX	Prospett. IgAN TX Basale	Prospett. IgAN TX A 12 mesi	Retrosp. Non recid. IgAN TX	Retrosp. Recidiva IgAN TX
N. casi	21	21	17	17	14	7
NF-kBp50	5.64±2	9.91±4	12.69±15	9.30±6	9.00±3	11.27±7
NFKB p65	2.84±1.3	4.48±3	5.92±4	4.59±4	3.83±2	6.12±3 §
AP-1(c-Fos)	85.54±37	149.2±13 *	87.6±15	773.6±12	165.1±1303	117.3±1415
AP-1(c-Jun)	19.92±9	36.62±61	44.86±76	40.78±74	22.57±20	64.71±102
Sp-1	21.19±9	28.48±23	50.44±22	36.65±26	21.0±23.69	41.9±14.70

* p=0.0043 IgAN TX vs controlli sani § p=0.03 IgAN recidivati vs non recidivati

Conclusioni. Questi dati iniziali suggeriscono che una attivazione linfomonocitaria dei fattori trascrizionali NF-kB, AP-1 ed Sp-1 si associ alla recidiva di IgAN nel rene trapiantato. Lo studio prospettico in corso potrà fornire ulteriori dati per stabilire il valore predittivo di tale anomalia immunologica.

MALATTIA DI FABRY: RICERCA DI DELEZIONI NEL GENE GLA MEDIANTE UN TEST RAPIDO ED EFFICACE, LA MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)

Schirinzi A¹, Centra M¹, Praticchio C¹, Gigante M², Giancaspro V³, Petrarolo F³, De Fabritius M², Santacroce R⁴, Margaglione M⁴, Gesualdo L², Ranieri E¹
¹ Patologia Clinica, Univ. di Foggia, Foggia; ² Nefrologia, Univ. di Foggia, Foggia; ³ Nefrologia, Osp. Di Venere, Bari; ⁴ Genetica Medica, Università di Foggia, Foggia

Introduzione. I pazienti affetti da Malattia di Fabry (MF), una rara malattia genetica con trasmissione Xlinked, presentano mutazioni del gene GLA che codifica l'enzima lisosomiale α -galattosidasi A. La riduzione o assenza di tale enzima comporta un progressivo accumulo di 2 glicosfingolipidi nel rene. Le manifestazioni renali includono proteinuria che, nella maggior parte dei casi, compare nella terza o quarta decade di vita, e una progressiva compromissione degli indici di funzionalità renale. La diagnosi di laboratorio per la MF nei maschi è ampiamente definita dal dosaggio dell'attività enzimatica; viceversa nelle femmine tale protocollo fornisce spesso dubbi risultati. Questa differenza è attribuibile alla presenza, nelle femmine, di un cromosoma X normale e alla possibilità di un alterato pattern di inattivazione dell'X. Pertanto lo screening molecolare rappresenta un valido strumento di diagnosi. Tuttavia ad oggi non vi è un unico protocollo in grado di individuare tutte le mutazioni del gene GLA a causa dell'estrema variabilità delle stesse.

Scopi. Lo scopo del presente studio è stato la valutazione del potenziale ruolo nella ricerca di mutazioni della MF di un nuovo metodo denominato MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification), in grado di identificare le delezioni del gene GLA, in soggetti affetti da MF.

Materiali e metodi. Due fratelli e una donna, affetti da malattia renale cronica e con sospetto clinico di MF, sono stati sottoposti a un saggio fluorimetrico per determinare l'attività enzimatica, e al sequenziamento di tutti gli esoni del gene GLA. Successivamente è stata effettuata l'analisi MLPA per determinare il numero di copie degli esoni del gene, ossia le eventuali delezioni o duplicazioni.

Risultati. In entrambi i fratelli, l'evidenza clinica (comprendente rispettivamente alta proteinuria e insufficienza renale) e la bassa attività enzimatica (rispettivamente 2 e 4 nmol/mg/h) erano sufficienti a confermare la diagnosi di MF. Tuttavia, l'analisi MLPA ci ha permesso anche di evidenziare una delezione degli esoni 3 e 4 in quanto i picchi relativi a tali esoni nell'elettroferogramma risultavano assenti. Nella paziente di sesso femminile, invece, la cui attività enzimatica è risultata normale (30 nmol/mg/h, range normale: 20-64 nmol/mg/h), l'analisi MLPA ha rivelato una delezione comprendente gli esoni 1 e 2 del gene GLA, e il gene fiancheggiante HNRPH2.

Conclusioni. Questi risultati dimostrano che per effettuare un'accurata diagnosi di MF è necessaria un'analisi molecolare e il MLPA rappresenta un valido test per evidenziare le eventuali delezioni che possono sfuggire ai metodi standard. Questo aspetto ha importanti implicazioni per la diagnosi e il counseling genetico, soprattutto grazie alla disponibilità di un trattamento specifico e della diagnosi prenatale. I nostri dati suggeriscono che il MLPA rappresenta un test facile, di basso costo e facilmente realizzabile nei laboratori di diagnostica molecolare. Pertanto questo approccio metodologico dovrebbe essere sistematicamente incluso nel test genetico dei pazienti Fabry.

122

123

MODULAZIONE DELL'IMMUNOPROTEASOMA NEI LINFOMONOCITI CIRCOLANTI DEI PAZIENTI CON RECIDIVA DI NEFROPATIA A DEPOSITI DI IgA DOPO IL TRAPIANTO RENALE

Camilla R¹, Loiacono E¹, Peruzzi L¹, Amore A¹, Alfaro A², Minieri V¹, Daprà V¹, Salvadori M³, Bertoni E³, Montagnino G⁴, Giraudi R⁵, Segoloni G⁵, Venturini C⁶, Scolari F⁶, Dal Canton A⁷, Coppo R¹
¹ Nefrologia Dialisi Trapianto, Ospedale R. Margherita, Torino; ² Cattedra di Pediatria, Università di Torino, Torino; ³ Nefrologia Dialisi Trapianto, Ospedale Careggi, Firenze; ⁴ Nefrologia Dialisi Trapianto, Policlinico, Milano; ⁵ Cattedra di Nefrologia, Università di Torino, Torino; ⁶ Cattedra di Nefrologia, Università di Brescia, Brescia; ⁷ Cattedra di Nefrologia, Università di Pavia, Pavia

Introduzione. L'immunoproteasoma (iPS) deriva da una modificazione del proteosoma (PS) indotta dall'interferone (sostituzione di subunità catalitiche β 1,2 e 5 con proteine a basso peso molecolare, LMP2 ed LMP5, e con un complesso endopeptidasi-simile, MECL1). Questo conferisce all'iPS una capacità catalitica ottimale per la processazione e presentazione di peptidi di classe MHC I e II, sensibilizzando quindi la risposta T linfocitaria. Abbiamo precedentemente dimostrato in linfomonociti periferici (PBMC) di soggetti con nefropatia a depositi IgA (IgAN) un significativo switch del PS a iPS (sostituzione di β 2 con MECL1 e di β 5 con LMP7).

Scopi. Indagare un eventuale coinvolgimento dello switch da PS a iPS nella recidiva della IgAN in pazienti portatori di trapianto renale (TX).

Metodi. Abbiamo studiato prospetticamente 8 pazienti giunti al TX per una IgAN a 24 ore dal TX e dopo 12 mesi. Altri 12 pazienti (con un follow-up post-TX > 5 anni) sono stati studiati retrospettivamente; 5/12 presentavano una recidiva di IgAN confermata biopicamente. Gli RNAm specifici per le subunità del PS e dell'iPS sono stati studiati quantitativamente in Real time PCR (Taqman). I dati sono espressi come rapporto tra le subunità dell'iPS e le corrispondenti subunità del PS, dopo normalizzazione sul gene costitutivo Abelson.

Risultati. Nello studio prospettico il rapporto MECL1/ β 2 è risultato significativamente maggiore nei pazienti con IgAN al TX rispetto ai soggetti sani di controllo (p=0.0002) e a 56 pazienti affetti da IgAN su rene nativo con normofunzione renale (p<0.0001). Dopo 12 mesi dal TX, il rapporto MECL1/ β 2 è risultato significativamente ridotto (p=0.028) con valori sovrapponibili a quelli di pazienti con IgAN su rene nativo normofunzionanti. A lungo termine, nei pazienti studiati retrospettivamente dopo più di 5 anni dal TX, il rapporto MECL1/ β 2 aumentava significativamente rispetto ai valori ottenuti dopo 12 mesi (p=0.02). I pazienti con recidiva di IgAN su TX presentavano un rapporto MECL1/ β 2 significativamente aumentato rispetto a quelli senza recidiva (p 0.049). Non si sono osservate modificazioni significative delle altre subunità.

(segue)

	Controlli	IgAN	IgAN al TX a 12m	IgAN TX >5 anni	IgAN TX IgAN	Recidiva	Non recidiva IgAN
MECL-1/ β 2	1.02±0.30	1.49±0.89	6.17±6.24	1.30±0.11	2.35±1.12	2.83±1.26	1.73±0.46
LMP2/ β 1	0.9±0.42	1.01±0.65	2.05±0.69	1.69±0.78	1.53±0.60	1.26±0.33	1.91±0.72
LMP7/ β 5	1.07±0.33	1.73±1.36	1.09±0.27	1.33±0.55	1.32±0.44	1.37±0.42	1.23±0.51

Conclusioni. Abbiamo osservato modificazioni significative del rapporto tra la subunità costitutiva del PS β 2 e la corrispondente subunità dell'iPS MECL1 nel follow-up post-TX di pazienti con IgAN. Lo switch da PS a iPS è modulato dalla terapia immunosoppressiva ed è significativamente maggiore nei pazienti con recidiva rispetto ai non recidivanti.

MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEI TOLL-LIKE RECEPTORS IN CELLULE MESANGIALI UMANE IN CULTURA DA PARTE DI IgA POLIMERICHE AD ALTERATA GLICOSILAZIONE

Amore A¹, Loiacono E¹, Minieri V¹, Dapra V¹, Ricotti E², Alfara A², Camilla R¹, Peruzzi L¹, Coppo R¹

¹Nefrologia, Dialisi, Trapianto, Ospedale Regina Margherita, Torino; ²Divisione di Pediatria, Università di Torino, Torino

Introduzione. Il nostro gruppo ha precedentemente riportato un'aumentata espressione del tolllike receptor 4 (TLR-4) su cellule mononucleate da sangue periferico di pazienti con nefropatia a depositi IgA (IgAN), mentre non erano state rilevate differenze per TLR-3 e TLR-7. I TLR sono recettori che riconoscono sequenze molecolari associate a patogeni coinvolti nella risposta immunitaria innata. Il coinvolgimento dei TLR da parte di numerosi ligandi sia endogeni che esogeni può influenzare l'andamento e l'evoluzione delle malattie immunologiche glomerulari. Alcuni TLRs sono espressi anche sulle cellule mesangiali (CM), e sovraespressi in corso di sviluppo della comparsa di lesioni lupiche sistemiche nei tipi mI pr/1pr; l'espressione aumenta quando si sviluppano lesioni infiammatorie glomerulari e interstiziali.

Scopi. Scopo di questo lavoro è stato quello di studiare l'espressione dei TLRs in CM umane in cultura e l'eventuale modulazione indotta dal condizionamento con IgA ad alterata glicosilazione, considerate patogenetiche nella IgAN.

Materiali e metodi. Nelle CM in cultura l'espressione dei TLRs è stata valutata in condizioni basali e dopo l'incubazione in mezzi di cultura addizionati con IgA polimeriche (plgA) e IgA ad alterata glicosilazione (deSia/deGal plgA) preparate *in vitro* mediante trattamento con glicosidasi specifiche (neuraminidasi 0.1 U/mg plgA e beta-galattosidasi 0.1 U/200 mg plgA). L'effettiva desializzazione e degalattosilazione delle plgA (deSia/deGal plgA) è stata verificata mediante legame alla Vicia villosa (specifico per i residui GalNAc) in ELISA. L'espressione di TLR-4, TLR-3 e TLR-7 è stata misurata in citofluorimetria (FACS) su CM coltivate per 12 o 24h in terreno di cultura completo (20% siero di bovino fetale), addizionato con plgA o deSia/deGal plgA 50 µg/ml.

Risultati. La tabella riporta la percentuale di cellule positive (cell +ve) e la mean peak position (PkPosX) dell'analisi in FACS per ciascuno dei TLRs studiati dopo 24h di incubazione con IgA ad alterata glicosilazione.

	TLR-4 %+ve CM	TLR-4 PkPosX	TLR-3 %+ve CM	TLR-3 PkPosX	TLR-7 %+ ve CM	TLR-7 PkPosX
CM non condizionate	34.0 ± 4	1.4 ± 0.4	43.0 ± 5	1.05 ± 0.1	6.5 ± 3	1.07 ± 0.1
CM + plgA	34.2 ± 5	2.4 ± 0.3	41.4 ± 4	1.05 ± 0.1	2.8 ± 1	1.01 ± 0.2
CM+ deSia/deGal plgA	46.8 ± 4 *	3.2 ± 0.8 *	40.1 ± 4	1.05 ± 0.1	2.1 ± 2	1.06 ± 0.1

*p<0.05
Abbiamo osservato una significativa sovraregolazione del TLR4 nelle CM in cultura condizionate con deSia/deGal plgA rispetto alle condizioni basali e all'incubazione con plgA native, mentre TLR3 e TLR7 (su cellule permeabilizzate) non risultavano modificati.

Conclusioni. Questi dati supportano l'ipotesi di un'attivazione, diretta o indiretta, del TLR4 sulla superficie delle cellule mesangiali da parte di IgA desialate e degalattosilate, che agiscono probabilmente mediante l'interazione dei residui glicidici esposti provvisti di dominio lectinico. Questi risultati preliminari potrebbero spiegare il meccanismo patogenetico delle macroematurie sinfrangitiche in corso di IgAN.

125

LIVELLI CIRCOLANTI DI NGF ED ESPRESSIONE DEI RECETTORI PER NGF NEI PAZIENTI AFFETTI DA GLOMERULONEFRITE E NEGLI EMODIALIZZATI

Antonucci MT¹, Bonfiglio R², Papalia T², Caruso F², Caroleo MC¹, Mancuso D², Aloe L³
¹Dip. Farmaco-Biologico UNICAL, Arcavata-Rende, Cosenza; ²UOC Nefrologia-Dialisi-Trapianto, AO Annunziata, Cosenza; ³Istituto di Neurobiologia e Medicina Molecolare, CNR, Roma

Introduzione. Il Nerve Growth Factor (NGF) gioca un ruolo chiave nello sviluppo, nella sopravvivenza e nella funzione del sistema nervoso centrale. L'NGF è inoltre un fattore circolante implicato nella genesi di diverse patologie. I suoi effetti biologici sono mediati da due recettori (NGF-R): ad alta affinità, TrkA ed a bassa affinità, p75. Il nostro gruppo ha recentemente riportato che l'NGF e gli NGF-R sono over espressi in diverse patologie renali.

Scopo. Determinare i livelli sierici di NGF e l'espressione di NGF-R in polimorfonucleati (PBMC) di soggetti affetti da glomerulonefriti (GN) ed in trattamento emodialitico (HD).

Pazienti e metodi. Abbiamo arruolato 48 pazienti consecutivamente affetti alla nostra UO in un periodo di 24 mesi, con diagnosi istologica di GN (gruppo GN) e 16 pazienti sottoposti ad HD cronica (gruppo HD). La durata della dialisi era standardizzata per tutti i pazienti. Sono stati arruolati 25 pazienti come gruppo di controllo (C). La quantificazione dell'NGF è stata eseguita in immunoassay. I PBMC positivi per il recettore dell'NGF sono stati identificati utilizzando un microscopio Zeiss Axiophot. I risultati sono stati espressi come % di cellule positive per il recettore dell'NGF.

Risultati. I nostri dati dimostrano per la prima volta che la concentrazione sierica di NGF è elevata nei pazienti affetti da GN, comparata rispetto ai C. Analogamente, abbiamo riscontrato elevati livelli circolanti di NGF nei pazienti uremici in condizioni basali. Il trattamento emodialitico è in grado di ripristinare i valori di NGF a livello dei C. Di rilievo è la differente espressione recettoriale nei pazienti del gruppo GN rispetto ai pazienti del gruppo HD. L'incremento di NGF nel gruppo GN, infatti, è associato ad iper-espressione di trkA senza variazioni di p75 rispetto ai controlli. Per contro, nel gruppo HD, prima e dopo HD, l'espressione di trkA è associata ad un concomitante incremento dei livelli di p75.

Conclusioni. L'incremento dei livelli di NGF rappresenta un meccanismo adattativo coinvolto nella limitazione della risposta infiammatoria. In corso di HD, l'NGF agisce come fattore protettivo e di sopravvivenza per i PBMC. Tale ipotesi è rafforzata da recenti studi pre-clinici e clinici. Non sorprende, dunque, che l'espressione di p75 sia aumentata nel gruppo HD dove i PBMC sono esposti a stimoli infiammatori cronici. Tuttavia, p75 gioca un ruolo sia nella sopravvivenza che nella morte cellulare in dipendenza dalla presenza di ligando e dall'interazione con trkA. I nostri risultati suggeriscono che una concentrazione adeguata di NGF consente la sopravvivenza nelle cellule NGF-responsive. In conclusione, gli alterati livelli di NGF e la differente espressione recettoriale in corso di GN e di HD possono rappresentare un meccanismo adattativo per la prevenzione del danno apoptotico. Tuttavia, sono richieste ulteriori osservazioni su popolazioni più ampie per confermare queste ipotesi.

126

È L'ERITROPOIETINA SEMPRE CITOPROTETTIVA NEI CONFRONTI DELLO STRESS OSSIDATIVO?

Andreucci M¹, Fuiano G¹, Presta P¹, Lucisano G¹, Leone F¹, Fuiano L¹, Bisesti V², Procinò A², Russo D², Memoli B², Faga T¹, Michael A^{1,2}

¹Cattedra di Nefrologia, Università "Magna Graecia" di Catanzaro, Catanzaro;

²Cattedra di Nefrologia, Università "Federico II" di Napoli, Napoli

Introduzione. È stato dimostrato da vari gruppi di ricerca che l'eritropoietina (Epo) può avere un effetto protettivo in alcuni modelli sperimentali di ischemia-riperfusion (anche renale); in alcuni casi tale effetto è stato correlato all'attivazione di alcune vie del segnale ("pathways") intracellulari note per avere un ruolo cruciale nella sopravvivenza cellulare.

Scopo. Abbiamo pensato di valutare se tali effetti citoprotettivi dell'Epo fossero (o meno) confermati a diverse concentrazioni, utilizzando una nota linea di cellule renali tubulari prossimali umane (HK-2) sottoposte a stress ossidativo mediante incubazione con H₂O₂ (2mM), noto per essere uno dei radicali liberi dell'ossigeno che si vengono a formare dopo il danno da ischemia-riperfusion.

Materiali e metodi. Le cellule HK-2 sono state incubate con H₂O₂ per diversi tempi di incubazione (fino ad un massimo di 2 ore) con (o senza) alfa-Epo (a due diverse concentrazioni: 100 U/ml e 400 U/ml). La loro sopravvivenza è stata analizzata mediante la valutazione del grado di riduzione chimica (nelle cellule sopravvissute) del sale tetrazolico "MTT". Abbiamo anche analizzato, mediante Western Blotting, gli eventuali cambiamenti dello stato di fosforilazione (quindi di attivazione/inattivazione) di varie chinasi cruciali per la sopravvivenza cellulare: Akt/PKB, GSK-3β, mTOR ed ERK1/2.

Risultati. Le cellule HK-2 incubate con il solo H₂O₂ hanno mostrato una significativa riduzione della loro sopravvivenza che non cambiava in modo significativo con l'aggiunta di Epo ad una concentrazione di 100 U/ml. La sopravvivenza cellulare era invece significativamente (e sorprendentemente) ridotta quando la concentrazione di Epo utilizzata era pari a 400 U/ml. Lo stato di fosforilazione delle chinasi sopra citate nelle cellule trattate con H₂O₂ era solo lievemente alterato in presenza di Epo alla concentrazione di 100 U/ml, mentre era significativamente ridotto quando la concentrazione di Epo utilizzata era pari a 400 U/ml. Lo stato di fosforilazione del fattore di trascrizione della famiglia "Forkhead" FKHR-L1, un "target" di Akt/PKB, era significativamente ridotto nelle cellule incubate con H₂O₂ e con Epo alla concentrazione di 400 U/ml.

Conclusioni. L'([alfa]-Epo ad elevate concentrazioni) è in grado di incrementare l'entità del danno cellulare nelle cellule HK-2 sottoposte a stress ossidativo; ciò potrebbe essere, almeno in parte, dovuto ad una ridotta attivazione di importanti "pathways" intracellulari coinvolti nella sopravvivenza cellulare.

Il nostro studio pertanto confermerebbe per la prima volta (almeno *in vitro*, in presenza di stress ossidativo) gli effetti citotossici di elevate dosi di Epo, come anche ipotizzato in alcuni recenti editoriali in cui si afferma che più che il "target" di emoglobina da raggiungere nei pazienti nefropatici (e nei pazienti oncologici a cui notoriamente devono essere spesso somministrate elevatissime dosi di Epo) è importante la dose di Epo con cui tale "target" viene ad essere raggiunto.

127