

**FISIOLOGIA E BIOLOGIA CELLULARE - TRASDUZIONE DEL SEGNALE - CELLULE STAMINALI****1 CO****LE MICROVESCICOLE DERIVATE DA CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI GLOMERULARI ACCELERANO LA RIPRESA FUNZIONALE DOPO DANNO DA ISCHEMIA-RIPERFUSIONE**Ranghino A.<sup>1</sup>, Bruno S.<sup>1</sup>, Grange C.<sup>1</sup>, Dolla C.<sup>1</sup>, Cantaluppi V.<sup>1</sup>, Biancone L.<sup>1</sup>, Tetta C.<sup>2</sup>, Segoloni G.P.<sup>1</sup>, Camussi G.<sup>1</sup><sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Interna, Università di Torino, Torino; <sup>2</sup>Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germania

**Introduzione.** Le staminali mesenchimali (MSCs) derivate dal midollo osseo accelerano la ripresa funzionale dopo danno renale acuto (AKI) con un meccanismo paracrino. Le microvescicole (MV) rilasciate dalle MSCs sono in parte responsabili dell'effetto paracrino attraverso il trasferimento di mRNA. Abbiamo isolato MSCs da glomeruli umani (GI-MSCs) co-esprimenti marcatori staminali e renali. Le GI-MSCs possono differenziarsi in cellule mesangiali ed endoteliali suggerendo un ruolo nel turnover cellulare glomerulare. Scopo dello studio è stato valutare se MVs derivate da GI-MSCs accelerano la ripresa funzionale in un modello murino di danno da ischemia-riperfusion (I/R).

**Materiali e Metodi.** In 3 gruppi (8/gruppo) di topi SCID sono stati somministrati ev rispettivamente 15 mcg di MVs e MVs inattivate con RNasi (MVRs) o veicolo (CTL) subito dopo l'intervento. Il danno da I/R (35 minuti di clampaggio del peduncolo vascolare renale sinistro) è stato associato a nefrectomia destra. Dopo 48 ore i topi sono stati sacrificati e creatinina (sCr) e BUN plasmatiche sono state dosate. Sono stati valutati mediante analisi morfometrica il danno renale (presenza di cilindri intraluminari e necrosi tubulare), la proliferazione come incorporazione di BrdU ed espressione di PCNA e l'apoptosi mediante TUNEL.

**Risultati.** Le MVs migliorano la ripresa funzionale dopo danno da I/R (sCr MVs vs CTL:  $0.7 \pm 0.21$  vs  $1.3 \pm 0.3$ ,  $p < 0.05$ ). Il danno renale è ridotto nel gruppo con MVs rispetto al gruppo CTL (cilindri/HPF:  $1.3 \pm 0.7$  vs  $4.7 \pm 1.1$ ,  $p < 0.05$ ; tubuli necrotici/HPF:  $7.6 \pm 1.5$  vs  $11.7 \pm 1.5$ ,  $p < 0.05$ ). La proliferazione cellulare è incrementata nel gruppo MVs rispetto al gruppo CTL (nuclei PCNA positivi/HPF:  $21.9 \pm 3.1$  vs  $12 \pm 1.4$ ,  $p < 0.05$ ; nuclei BrdU positivi/HPF  $17.7 \pm 3.8$  vs  $8 \pm 2.4$ ,  $p < 0.05$ ). Tali effetti sono ridotti dal trattamento con RNasi delle MVs.

**Conclusioni.** I risultati dello studio dimostrano che le MVs derivate da GI-MSC migliorano la ripresa della funzione renale dopo danno da I/R promuovendo la proliferazione delle cellule tubulari.

**2 CO****LA BONE MORPHOGENETIC PROTEIN (BMP)-2 INDUCE UN FENOTIPO PRO-FIBROTICO NELLE CELLULE PROGENITRICI RENALI ADULTE (ARPC) MEDIANTE L'ATTIVAZIONE DI Nox4 NEI PAZIENTI CON RITARDATA RIPRESA FUNZIONALE DEL GRAFT (DGF)**Cariello M.<sup>1</sup>, Simone S.<sup>1</sup>, Cosola C.<sup>1</sup>, Loverre A.<sup>1</sup>, Rascio F.<sup>1</sup>, Sallustio F.<sup>1</sup>, Schena F.P.<sup>1</sup>, Grandaliano G.<sup>2</sup>, Gesualdo L.<sup>1</sup>, Pertosa G.<sup>1</sup><sup>1</sup>UOC Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Univ. di Bari "Aldo Moro", Bari; <sup>2</sup>Dip. di Scienze Biomediche, Sez. di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Univ. di Foggia, Foggia

**Introduzione.** Le ARPC potrebbero contribuire ai processi rigenerativi dopo danno renale acuto. Le BMP regolano i processi di differenziamento, modeling e rigenerazione. Il ruolo della BMP-2 nella modulazione del danno renale acuto non è noto. Scopo del nostro studio è stato quello di studiare l'azione della BMP-2 sulle ARPC in vitro ed in vivo.

**Metodi.** L'espressione genica (RT-PCR) e proteica (ELISA/immunoblotting) di BMP-2 e dei suoi recettori è stata valutata in ARPC isolate da rene umano adulto (magnetic cell sorting). La produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è stata valutata con 2',7' DCF. L'attività enzimatica dell'NADPH ossidasi è stata studiata con chemiluminescenza. La Nox4 è stata studiata con immunoblotting e mediante silenziamento (siRNA). L'espressione di BMP-2, CD133,  $\alpha$ -SMA e NOX4 è stata, inoltre, valutata in biopsie renali di pazienti con DGF (n=10) mediante microscopia confocale.

**Risultati.** Le ARPC, in vitro, esprimono i recettori per le BMP. La BMP-2 (30 ng/ml) si è dimostrata in grado di aumentare la produzione dei ROS ( $p = 0.03$ ), l'attività dell'NADPH ossidasi ( $p = 0.01$ ) e l'espressione proteica di Nox4 ( $p = 0.03$ ) nelle ARPC. L'incubazione per 5 gg con BMP-2 induce nelle ARPCs l'espressione proteica di collagene-I ( $p = 0.03$ ), fibronectina ( $p = 0.04$ ) e  $\alpha$ -SMA ( $p = 0.02$ ), che viene inibita dal silenziamento della subunità Nox4 ( $p = 0.01$ ). Lo stimolo ossidativo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce l'espressione proteica di  $\alpha$ -SMA nelle ARPCs ( $p = 0.03$ ), inibita dall'anti-ossidante N-acetil-cisteina ( $p = 0.04$ ). Lo studio in vivo ha dimostrato un aumento significativo dell'espressione di BMP2 nelle ARPCs (CD133+/CD24+/PAX2+) dei pazienti con DGF ( $p = 0.02$ ). Le ARPC/BMP2+ esprimevano, inoltre, Nox4 e andavano incontro a fenomeni di differenziazione in senso miofibroblastico, come dimostrato dalla co-espressione di CD133 e  $\alpha$ -SMA.

**Conclusioni.** Nei pazienti con DGF la BMP-2 può indurre la trasformazione delle ARPC in un fenotipo miofibroblastico, attraverso l'attivazione di Nox4.

**3 CO****MICROVESCICOLE (MV) ORIGINATE DA CELLULE PROGENITRICI ENDOTELIALI (EPC) PROTEGGONO I RENI DAL DANNO DA ISCHEMIA-RIPERFUSIONE (IRI) MEDIANTE RIPROGRAMMAZIONE DELLE CELLULE (CELL) RENALI RESIDENTI DIPENDENTE DA MICRORNA (MIRNA)**Cantaluppi V.<sup>1</sup>, Gatti S.<sup>2</sup>, Medica D.<sup>1</sup>, Figliolini F.<sup>1</sup>, Bruno S.<sup>1</sup>, Deregibus M.C.<sup>1</sup>, Sordi A.<sup>2</sup>, Biancone L.<sup>1</sup>, Tetta C.<sup>3</sup>, Segoloni G.P.<sup>1</sup>, Camussi G.<sup>1</sup><sup>1</sup>S.C. Nefrologia, Dialisi e Trapianti, A.O.U. S. Giovanni Battista di Torino, Torino; <sup>2</sup>Centro Ricerche Chirurgiche IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico Milano, Milano; <sup>3</sup>Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germania

**Introduzione.** EPC sono cell circolanti midollari promuoventi rigenerazione cellulare con meccanismi paracrini quali secrezione di fattori di crescita o altri prodotti cellulari incluse MV, particelle di membrana essenziali nella comunicazione tra cell. MV rilasciate da EPC attivano angiogenesi in cell endoteliali tramite RNA transfer.

**Scopo.** 1) MV derivate da EPC possono prevenire danno renale acuto (AKI) legato ad IRI; 2) Identificazione di miRNA trasferiti dalle MV nella riprogrammazione di cell residenti renali ipossiche.

**Materiali e Metodi.** MV sono state isolate da EPC per ultracentrifugazione surnatanti e caratterizzate per proteine e RNA. IRI indotta nei ratti mediante clampaggio vascolare per 45 min. Isolamento da rene umano di cell endoteliali, epitelio tubulare e progenitori CD133+. Esposte tali cell a ipossia per ricreare IRI. Usate anche MV pretrattate con 1 U/ml di RNasi o MV da EPC private di miRNA tramite Dicer knock-down (siRNA).

**Risultati.** MV si localizzano nei capillari peritubulari e nei tubuli conferendo protezione da AKI, riducendo apoptosi, stimolando angiogenesi e proliferazione cell tubulari ed inibendo l'infiltrazione leucocitaria. In vitro MV inibiscono apoptosi da ipossia e le alterazioni funzionali endoteliali e tubulari; inoltre stimolano i geni coinvolti in proliferazione, angiogenesi ed inibizione apoptosi. MV inducono anche differenziazione di progenitori CD133+ in endotelio. L'effetto protettivo di MV si riduce se pretrattate con RNasi o con Dicer siRNA.

**Conclusioni.** MV derivate da EPC proteggono da AKI legata a IRI mediante la riprogrammazione delle cell renali residenti ipossiche mediata da miRNA transfer.

**4 CO****MICROVESCICOLE (MV) DERIVATE DA CELLULE PROGENITRICI ENDOTELIALI (EPC) RIDUCONO LA PROTEINURIA E ACCELERANO LA REMISSIONE ISTOLOGICA NELLA GLOMERULONEFRITE (GN) ANTI-THY1.1**Cantaluppi V.<sup>1</sup>, Medica D.<sup>1</sup>, Mannari C.<sup>2</sup>, Figliolini F.<sup>1</sup>, Beltramo S.<sup>1</sup>, De Lena M.<sup>1</sup>, Migliori M.<sup>3</sup>, Panichi V.<sup>3</sup>, Giovannini L.<sup>2</sup>, Tetta C.<sup>4</sup>, Segoloni G.P.<sup>1</sup>, Camussi G.<sup>1</sup><sup>1</sup>S.C. Nefrologia, Dialisi e Trapianti, A.O.U. S. Giovanni Battista di Torino, Torino; <sup>2</sup>Dipartimento di Neuroscienze, Sezione di Farmacologia, Università di Pisa, Pisa; <sup>3</sup>Nefrologia e Dialisi, Ospedale Versilia, Lido di Camaiore (LU); <sup>4</sup>Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germania

**Introduzione.** La perdita dei capillari glomerulari si associa a glomerulosclerosi e progressione verso insufficienza renale cronica. L'uso di cellule staminali per migliorare l'angiogenesi è proposto per ridurre il danno renale. EPC sono cellule staminali circolanti in grado di liberare MV, particelle biologicamente attive che stimolano angiogenesi mediante RNA transfer.

**Scopo.** Valutare se MV rilasciate da EPC accelerano riparazione glomerulare in GN anti-Thy1.1.

**Materiali e Metodi.** MV separate da surnatante EPC per ultracentrifugazione e caratterizzate per contenuto proteico e RNA. Ratti trattati: 1) salina; 2) 400 mcg antiThy 1.1; 3) antiThy 1.1+250 mcg/ml MV, 4) antiThy 1.1+250 mcg/ml MV pre-trattate con 1 U/ml RNasi. Controllo con MV di fibroblasti umani. Studiati effetti di MV su cellule endoteliali glomerulari, podociti e mesangiali umane isolate. Usate anche MV trattate con 1 U/ml RNasi o prodotte da EPC con siRNA Dicer, enzima essenziale per produzione microRNA.

**Risultati.** MV inducono diminuzione di proteinuria e migliore funzione renale, riduzione di mesangiolisi, microaneurismi, apoptosi ed infiltrazione leucocitaria. MV preservano l'integrità glomerulare (mantenuta espressione di RECA e sinaptopodina). MV marcate si incorporano nell'endotelio e podociti e promuovono l'angiogenesi endotelio glomerulare, la funzionalità dei podociti e riducono il danno complemento-mediato nel mesangio. L'effetto protettivo di MV si riduce se pretrattate con RNasi o con Dicer siRNA.

**Conclusioni.** MV accelerano riparazione in GN anti-Thy1.1 con mantenimento dell'integrità glomerulare. Effetto protettivo attribuibile ad internalizzazione MV in endotelio, podociti e mesangio per il transfer di mRNA e microRNA alle cellule glomerulari danneggiate.

## 5 CO

**PROTEOMIC PROFILE OF CD24+ CD133+ RENAL MULTIPOTENT PROGENITORS (RMP)**Praticchizzo C.<sup>1</sup>, Netti G.S.<sup>1</sup>, Cormio L.<sup>2</sup>, Carrieri G.<sup>2</sup>, Grandaliano G.<sup>1</sup>, Ranieri E.<sup>1</sup>, Gesualdo L.<sup>3</sup><sup>1</sup>BioAgroMed Research Center; <sup>2</sup>Dept. Surgical Sciences, Univ of Foggia, Foggia; <sup>3</sup>Chair of Nephrology, DETO, Univ. of Bari, Bari

**Introduction.** Renal Multipotent Progenitors (RMP) represent a population of undifferentiated pluripotent cells with both self-renewal and multilineage differentiation characteristics. A population of CD24+ and CD133+ RMP in adult human kidneys is able to repair injured renal tissue of SCID mice with acute tubular necrosis. Proteomics provides a powerful approach for studying the characteristics of RMP and discovering molecular markers.

**Materials and Methods.** RMP lines were isolated from normal kidneys of 30 patients undergoing nephrectomy for renal cell carcinoma. We have analyzed proteome profiles of two RMP lines using 2-DE analysis combined to nanoHPLC-ESI-ion trap-MS/MS and MALDI TOF-TOF analysis.

**Results.** An average of about 1080 spots, characterized by their pI and MW, were detected in the silver stained gels of total protein extract. The protein spots identified were involved in cellular cytoskeleton (28.6%), stress response (23.8%), cellular metabolism (14.3%), cell proliferation and differentiation (9.5%). In detail, a large number of proteins particularly high abundant ones were identified as chaperones, heat shock proteins, ubiquitin/proteasome, and oxidative stress responsive proteins underscoring the ability of these cells to resist oxidative stress and increase the life span. The protein expression pattern of two RMP lines were similar, several proteins involved in cell proliferation and differentiation were also among the highly expressed proteins. Most of these proteins were identified as proteins involved in cell growth, metabolism and signal transduction, which may affect the self-renewal and pluripotency.

**Conclusion.** To our knowledge, this study represents the first proteomic dataset for RMP lines and may provide a better insight into the biology of RMP. The comparison with the corresponding differentiated cell types as well as a phosphoproteomic approach may allow us to discover proteomic signatures characteristic of RMP. All of these data will enhance our understanding of the molecular mechanisms involved in RMP biology and will bring us closer to the vast clinical potential of these cells.

## 6 PO

**EFFETTI DELL'H2S, IL TERZO GAS ENDOGENO CON PROPRIETÀ VASODILATRICI, SULL'ADESIONE MONOCITARIA A CELLULE ENDOTELIALI IN COLTURA**Sepe L.<sup>1</sup>, Lanza D.<sup>1</sup>, Capasso R.<sup>2</sup>, Ingrosso D.<sup>2</sup>, Perna A.F.<sup>1</sup><sup>1</sup>Prima Divisione di Nefrologia, Dipartimento di Internistica "F. Magrassi" SUN Napoli, Napoli; <sup>2</sup>Dipartimento di Biochimica "F. Cedrangolo", SUN Napoli, Napoli

**Introduzione.** L'acido solfidrico, H<sub>2</sub>S, è il terzo gas endogeno, dopo ossido nitrico (NO) e monossido di carbonio (CO), con proprietà modulatrici sul sistema cardiovascolare. L'H<sub>2</sub>S agisce come vasodilatatore, e numerosi studi hanno mostrato che un suo deficit è implicato nella patogenesi di aterosclerosi, disfunzione sessuale, infiammazione ed ipertensione arteriosa. È stato recentemente dimostrato che la concentrazione plasmatica di H<sub>2</sub>S è significativamente diminuita in pazienti uremici cronici in emodialisi. Lo scopo è quello di verificare se l'H<sub>2</sub>S è in grado di modulare l'adesione dei monociti a cellule endoteliali in coltura e la conseguente produzione di citochine, un precoce evento infiammatorio alla base della patogenesi della lesione aterosclerotica.

**Materiali e Metodi.** Monociti di cellule endoteliali umane EaHy926 sono stati incubati con una concentrazione 100 μM di NaHS (un donatore di H<sub>2</sub>S). È stato valutato il numero di monociti adesi al monostrato endoteliale attraverso conta diretta su microfotografie ad alto ingrandimento. È stata valutata la concentrazione della molecola di adesione ICAM-1 e della chemochina MCP-1 nel terreno di coltura attraverso metodica ELISA. È stata valutata con metodica Real Time PCR l'espressione genica di ICAM-1, di MCP-1 e della cistationina-γ-liasi (CSE), principale enzima produttore di H<sub>2</sub>S a livello endoteliale. La concentrazione, nei lisati delle cellule endoteliali trattate, di ICAM-1 è stata valutata mediante Western blotting.

**Risultati.** Il trattamento con H<sub>2</sub>S ha mostrato una significativa riduzione dell'adesione monocitaria rispetto al controllo positivo (TNF-α). Il meccanismo molecolare di tale riduzione dipende dalla significativa diminuzione della concentrazione della molecola di adesione ICAM-1 e della chemochina MCP-1 nel terreno di coltura e di ICAM-1 nei lisati cellulari, conseguente al trattamento con H<sub>2</sub>S. Inoltre, l'espressione genica di ICAM-1, di MCP-1 e della CSE è risultata significativamente ridotta nelle cellule trattate con H<sub>2</sub>S, rispetto al controllo non trattato.

**Conclusioni.** I nostri dati indicano che l'H<sub>2</sub>S mostra proprietà antinfiammatorie, prevenendo l'adesione monocitaria e diminuendo la produzione di molecole di adesione direttamente coinvolte nell'attivazione e nel danno endoteliale.

## 7 PO

**CIC-5 E NEFROPATIE PROTEINURICHE: QUALI IPOTESI SUGGERISCE LO STUDIO TUBULARE E GLOMERULARE DELLA PROTEINA?**Ceol M.<sup>1</sup>, Cremasco D.<sup>1</sup>, Peruzzi L.<sup>2</sup>, Mazzucco G.<sup>3</sup>, Marra G.<sup>4</sup>, Vezzoli G.<sup>5</sup>, Cristofaro R.<sup>1</sup>, D'Angelo A.<sup>1</sup>, Anglani F.<sup>1</sup>, Del Prete D.<sup>1</sup><sup>1</sup>Dip. di Sci Med Chir, Lab Istomorf Biol Molec Ren, Uni, Padova; <sup>2</sup>SC Nefr. Dial Trap, Osp Infant S Margherita, Torino; <sup>3</sup>UO Anat Patol Uni, Torino; <sup>4</sup>Nefr. Dial IRCCS Ca' Grande, Milano; <sup>5</sup>U. Nefr. Dial, IRCCS Osp S Raf, Milano

**Introduzione.** Lo scambiatore Cl-/H<sup>+</sup> (CIC-5), codificato dal gene CICN5, è espresso nel rene nel tubulo prossimale, nel tratto ascendente dell'ansa di Henle e nelle cellule intercalate del dotto collettore ed è coinvolto nell'endocitosi dell'albumina. Mutazioni a carico di CICN5 sono responsabili della malattia di Dent (DD1).

**Scopo.** Valutare la proteina CIC-5 in biopsie renali (bp) di pazienti (pz) affetti da nefropatie proteinuriche, da DD1 e di un pz con malattia di Dent ma senza mutazioni CICN5 (DD).

**Materiali e Metodi.** Biopsie renali di pz con DD1 (uprot. media 1.28 g/die), DD (1.6 g/die), LES (3.9 g/die), IgAN (4.2 g/die), glomerulonefrite membranosa (GM) (7.1 g/die) sono state analizzate mediante immunostochimica indiretta con Abs anti-human CIC-5 e anti WT1.

**Risultati.** Valutazione semiquantitativa compartimento glomerulare: no segnale in DD1, DD e LES (-), in IgAN (+), in GM (++). Il segnale glomerulare per CIC-5 colocalizza con WT1 indicando i podociti come le cellule responsabili della sua espressione. Nel compartimento tubulo interstiziale (ti): in DD1 (-/+), in DD (+), in LES (+/+), in IgAN (++), in GM (++/+++). Nelle cellule tubulari presenza di CIC-5 nella regione apicale di tutte le glomerulonefriti ed anche in DD, mentre nei pz con DD1 il segnale è assente. CIC-5 è presente inoltre nella zona basolaterale delle cellule tubulari di tutte le bp in maniera molto lieve nei DD1. CIC-5 glomerulare vs ti r=0.90 p=0.035; CIC-5 glomerulare vs uprot r=0.89 p=0.038; CIC-5 ti vs uprot r=0.96 p=0.006.

**Conclusioni.** Nei pz DD1 l'assenza di CIC-5 nella regione apicale potrebbe indicare una proteina alterata che non si colloca nella sua sede corretta e che viene sintetizzata in maniera ridotta (segnale baso-laterale come sede di sintesi proteica). La proteinuria gioca un ruolo nell'espressione di CIC-5 sia nei ti che nei glomeruli; in questi ultimi i podociti sembrano coinvolti nell'endocitosi proteica.

## 8 PO

**LE CELLULE PROGENITRICI ADULTE RENALI CONTRIBUISCONO AL RIPARO DEL DANNO RENALE ACUTO MEDIANTE LA SECREZIONE DI SPECIFICI FATTORI PARACRINI (SECRETOMA)**

Costantino V., Sallustio F., Cox S., Loverre A., Schena F.P.

Consorzio C.A.R.S.O., Valenzano (BA)

L'insufficienza renale acuta (IRA) rappresenta la più frequente complicanza (incidenza 5/1000 pazienti) nei pazienti ricoverati nelle unità di terapia intensiva ed ha un'elevata mortalità. A seconda della gravità e della durata, il danno tubulare di origine apoptotica o necrotica può regredire, sebbene serva un numero critico di cellule tubulari sopravvissute per ricostituire l'integrità strutturale. In studi recenti è stato dimostrato che il contributo delle cellule staminali extra renali è meno importante di quello delle cellule residenti e l'attenzione è stata focalizzata sulla possibilità di utilizzare le cellule progenitrici adulte renali (ARPC) per migliorare la rigenerazione cellulare post IRA. Nel nostro studio abbiamo analizzato l'influenza delle ARPC sui processi rigenerativi di cellule tubulari epiteliali renali (RPTEC) o Human Kidney 2 (HK2) danneggiate da cisplatino in un modello in vitro di co-cultura con le ARPC. L'esposizione delle RPTEC o HK2 al cisplatino riduceva marcatamente il numero di cellule e la loro vitalità, invece in co-cultura con le ARPC, si osservava un effetto protettivo consistente nella proliferazione ed un'inibizione dell'apoptosi delle RPTEC/HK2. L'effetto rigenerativo delle ARPC è stato analizzato anche utilizzando i surnatanti provenienti dalle co-culture di le ARPC, si osservava un effetto protettivo consistente nella proliferazione ed un'inibizione dell'apoptosi delle RPTEC/HK2. L'effetto rigenerativo delle ARPC è stato analizzato anche utilizzando i surnatanti provenienti dalle co-culture di 1 giorno che confermano l'azione protettiva delle ARPC attraverso un meccanismo paracrina. Per analizzare la natura dei fattori rigenerativi secreti dalle ARPCs abbiamo effettuato un'analisi bioinformatica sui nostri precedenti dati inerenti il profilo di espressione genica delle ARPC (Sallustio et al. Faseb J., 2010), selezionando 15 geni maggiormente espressi e codificanti per le citochine e i fattori di crescita secreti nella co-cultura. Infine veniva validata la loro presenza nei surnatanti delle co-culture mediante l'identificazione di alcuni fattori essenziali per la rigenerazione ARPC-mediata. In conclusione, questi risultati dimostrano che le ARPC sono in grado di riparare il danno tubulare indotto da cisplatino, producendo specifici fattori paracrinici antiapoptotici e induttori di proliferazione che hanno un'importante azione nel complicato processo della rigenerazione renale.

## 9 PO

**L'ACIDO MICOFENOLICO INIBISCE LA DOWN-REGULATION DELLA GLICO-PROTEINA P INDOTTA DALL'ALBUMINA NELLE CELLULE TUBULARI UMANE**Tramonti G.<sup>1</sup>, Romiti N.<sup>2</sup>, Chieli E.<sup>2</sup><sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Interna-Nefrologia; <sup>2</sup>Dipartimento di Patologia Sperimentale-Patologia Generale, Università di Pisa, Pisa

**Introduzione.** La proteinuria è strettamente legata al danno tubulo-interstiziale e rappresenta un importante fattore di progressione del danno renale. In presenza di proteinuria le cellule tubulari producono mediatori che promuovono infiammazione, danno tubulare e fibrosi. L'acido micofenolico (MPA) è in grado di inibire l'attivazione di molecole pro-infiammatorie nelle cellule tubulari sottoposte a stress ossidativo. Nelle cellule tubulari la proteinuria modifica l'espressione e la funzione di alcuni trasportatori di membrana. La glicoproteina P (Pgp) è una proteina di membrana che provvede all'efflusso transmembrana ATP-dipendente di sostanze di diversa natura con conseguente riduzione della loro concentrazione intracellulare. Nel rene la Pgp è espressa principalmente nelle cellule tubulari prossimali. Lo scopo di questo studio era la valutazione dell'effetto della albumina sull'espressione e sulla funzione della Pgp nelle cellule tubulari prossimali HK-2 in presenza di MPA.

**Metodi.** Le cellule tubulari sono state coltivate in presenza di albumina (15 mg/mL) e MPA (100  $\mu$ M). L'espressione della Pgp è stata valutata mediante Western Blot (WB). L'espressione del gene di codifica ABCB1 è stata determinata mediante RT-PCR semiquantitativa. La funzione di trasporto è stata studiata con il test dell'accumulo intracellulare di rodamina-123.

**Risultati.** Dopo esposizione di 72 ore all'albumina l'espressione della Pgp (WB) è risultata ridotta al 22.8% dei controlli. L'espressione del gene ABCB1 (RT-PCR) è risultata il 66% dei controlli. Anche la funzione di trasporto è risultata alterata dalla presenza di albumina. Infatti la fluorescenza delle cellule HK-2 è aumentata 1.47 volte rispetto ai controlli. La presenza di MPA ha indotto un aumento dell'espressione della Pgp al 66% dei controlli ed una riduzione della fluorescenza ad 1.37 volte.

**Conclusioni.** Questi risultati dimostrano che le cellule tubulari prossimali esposte all'albumina presentano una riduzione dell'espressione della proteina e del gene di codifica della Pgp con conseguente compromissione della funzione di trasporto transmembrana. La presenza di MPA induce un aumento sia dell'espressione che della funzione della Pgp. L'MPA verosimilmente interferisce con l'effetto proinfiammatorio indotto dall'albumina nelle cellule tubulari.

## 10 PO

**L'IPPOSSIA MANTIENE LE CARATTERISTICHE STAMINALI DEI PROGENITORI RENALI UMANI CD133+ MEDIANTE REGOLAZIONE DELLE BILANCIA TRA Oct4 E MicroRNA-145**Bussolati B., Moggio A., Collino F., Grange C., Camusi G.  
Dipartimento di Medicina Interna, Università di Torino, Torino

**Introduzione.** Cellule CD133+ con caratteristiche di progenitori staminali sono state isolate e caratterizzate dal compartimento tubulare del rene. Tuttavia, i meccanismi coinvolti nel contributo di questa popolazione alla riparazione tissutale non sono noti. Dati recenti suggeriscono che il microambiente sia fondamentale nella regolazione del fenotipo dei progenitori. Lo scopo di questo studio è di valutare la possibile modulazione della plasticità delle cellule CD133+ da parte dell'ipossia ed i meccanismi molecolari coinvolti.

**Materiale e Metodi.** I progenitori renali umani CD133+ sono stati isolati e coltivati in condizioni normali e ipossiche (1% O<sub>2</sub>) ed è stata valutata l'espressione di marcatori renali ed embrionali mediante Western Blot e PCR quantitativa. L'attivazione del promotore Oct4 è stata valutata attraverso l'infezione con vettori lentivirali con un sistema GFP-reporter. Il differenziamento in vivo è stato valutato mediante l'inoculo di cellule in Matrigel nella capsula renale di topi immunocompromessi. La trasfezione del miRNA-145 è stata effettuata con il metodo HiPerFect (Qiagen).

**Risultati.** I progenitori CD133+ coltivati in ipossia mostrano un aumento di proliferazione e capacità clonogenica. Quando inoculati in vivo, i progenitori CD133+ ipossici differenziano in strutture simil tubulari esprimendo marcatori di segmenti del nefrone. Inoltre, l'ipossia causa un aumento di espressione delle isoforme di Oct4 e in parallelo regola negativamente quella del microRNA-145 (miR-145), noto repressore dell'Oct4 nelle staminali embrionali. L'iperespressione del miR-145 induce riduzione di Oct4 a livello proteico, suggerendo un bilanciamento tra Oct4 e miR-145. Inoltre, induce inibizione della proliferazione cellulare e induzione del differenziamento epiteliale in vitro ed in vivo.

**Conclusioni.** Questi risultati suggeriscono come l'ipossia possa influenzare i progenitori CD133+ verso un fenotipo più staminale, attraverso l'equilibrio Oct4/miR-145. La plasticità delle cellule CD133+ potrebbe essere implicata nella rigenerazione renale in seguito a condizioni di ipossia.

## 11 PO

**LE CELLULE MESENCHIMALI STAMINALI ATTENUANO IL DANNO RENALE IN UN MODELLO DI RIGETTO ACUTO DI RENE NEL RATTO MODULANDO GLI SCATTER FACTORS**

Gregorini M., Rampino T., Rocca C., Corradetti V., Valsania T., Bosio F., Pattonieri E.F., Bedino G., Esposito P., Dal Canton A.

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

**Introduzione.** Le cellule mesenchimali staminali (MSC) sono cellule multipotenti che contribuiscono alla rigenerazione tissutale mediante un'azione paracrina. In un modello di trapianto di rene l'infusione di MSC migliora il danno renale riducendo la tubulite, la vasculite e la glomerulite. I fattori che mediano gli effetti di MSC non si conoscono ancora. Gli Scatter Factors sono fattori morfogenetici che regolano il rimodellamento dei tessuti danneggiati e riducono l'apoptosi e l'infiltrazione di cellule infiammatorie. In questo studio investighiamo se nel rigetto acuto gli effetti di MSC sono mediati dal rilascio degli Scatter Factors.

**Materiali e Metodi.** In ratti Lewis RT1 era eseguito trapianto di rene da donatore Fisher F344 dopo nefrectomia bilaterale. A : 7 ratti ricevevano soluzione salina, B: 7 ratti ricevevano 3 milioni di MSC nell'arteria renale. Nessuna terapia immunosoppressiva era somministrata. I ratti erano sacrificati dopo 7 giorni dal trapianto. MSP and Ron (recettore di MSP), c-met (recettore di HGF), PCNA erano valutati mediante immunostochimica. MSP mRNA e HGF mRNA erano valutati nel rene prima e dopo 7 giorni dal trapianto mediante real time PCR.

**Risultati.** MSP mRNA e HGF mRNA nei ratti con trapianto erano più bassi che nei ratti sani. MSC inducevano un incremento di MSP mRNA, ma non di HGF mRNA. MSP nei tubuli del rene sano era espresso con pattern citoplasmatico, mentre nel trapianto con pattern luminale. I tubuli rispettivamente MSP, Ron, c-met positivi/HPF erano significativamente più numerosi in B che in A (Mediana MSP A: 3; B:6, p<0.005), (Mediana Ron A: 1; B:3, p<0.005), (Mediana c-met A: 2; B:8, p<0.005). Le cellule proliferanti tubulari erano significativamente più alte in B che in A (p<0.005).

**Conclusioni.** I nostri risultati mostrano che MSC inducono un'attivazione del sistema Scatter Factor nel rigetto acuto del rene. MSP e HGF potrebbero favorire la riparazione renale inibendo l'apoptosi delle cellule tubulari danneggiate e promuovendo migrazione, scattering e tubulogenesi delle cellule tubulari sopravvissute.

## 12 PO

**APOPTOSI E SENESCENZA CELLULARE CONTRIBUISCONO ALLA PERDITA DI CELLULE GLOMERULARI NELLA GLOMERULOSCLEROSI FOCALE SEGMENTALE (FSGS) IDIOPATICA**

Cappuccino L., Verzola D., Tosetti F., Marre S., Mij M., Ervo R., Di Martino M., Salvadio G., Garibotto G.

Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Università di Genova e AOU San Martino, Genova

**Introduzione.** La senescenza cellulare è caratterizzata da uno stato di arresto della crescita irreversibile, con comparsa di alterazioni morfologiche e aumentata espressione di inibitori del ciclo cellulare (p16 INK4A) e dell'ossidazione del DNA e dall'attività della  $\beta$ -galattosidasi (SA- $\beta$ -Gal). Abbiamo esaminato l'ipotesi che la senescenza cellulare (espressione di alterata capacità di riparazione da parte delle cellule renali) e l'apoptosi (morte programmata) rappresentino processi patogenetici coinvolti nello sviluppo della FSGS, malattia nella quale la perdita di podociti caratterizza la progressione del danno renale.

**Metodi.** Abbiamo valutato l'espressione di apoptosi (anti-ssDNA Ab) e di senescenza (SA- $\beta$ -Gal, p16INK4A) in biopsie renali di pz. adulti affetti da FSGS idiopatica (n=21, 12M/9F, età 50 $\pm$ 4 anni, proteinuria 5 $\pm$ 2 g/die, eGFR 73  $\pm$ 10 mL/min) ed in reni normali provenienti da nefrectomie (C) (7M/2F, età 50 $\pm$ 5 anni).

**Risultati.** Nelle biopsie renali dei pz. con FSGS, rispetto ai C: a) l'apoptosi era 4-5 volte aumentata sia nell'endotelio e nei podociti (p<0.05-0.03) sia nei tubuli (p<0.05), b) l'espressione di p16INK4A era aumentata del 50-70% nelle cellule endoteliali glomerulari (p<0.005) e nei podociti (p=0.04), c) l'espressione di SA- $\beta$ -Gal era 2 volte maggiore nei tubuli (p<0.02), d) l'aumentato segnale di p16INK4A correlava direttamente con la proteinuria (p<0.05), e) SA- $\beta$ -Gal tubulare era direttamente associata alla sclerosi glomerulare (p=0.03) ed alla pressione arteriosa diastolica (p<0.05).

**Conclusioni.** Questi dati dimostrano che sia un'alterata capacità di riparazione e di rigenerazione cellulare che un aumento dell'apoptosi sono alla base della perdita cellulare in corso di FSGS. La perdita cellulare non coinvolge solo il podocita, ma anche la cellula endoteliale, suggerendo che entrambe le popolazioni cellulari siano coinvolte nell'alterazione del processo di rimodellamento e della permeabilità del glomerulo.

## 13 PO

**VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL PARACALCITOLE SU CELLULE ENDOTELIALI UMANE CRESCIUTE IN AMBIENTE "OSTILE"**

D'Arcangelo D.<sup>1</sup>, Gorini A.<sup>2</sup>, Capogrossi M.C.<sup>1</sup>, Facchiano A.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Istituto Dermatologico dell'Immacolata IDI-IRCCS, Roma; <sup>2</sup>U.O.C. di Nefrologia e Dialisi, Ospedale S. Giovanni Evangelista, Tivoli, Roma

**Introduzione.** È noto che nel paziente affetto da insufficienza renale le cellule dell'organismo sono sottoposte a una condizione accentuata di stress ossidativo, infiammazione e acidosi. Nel presente studio abbiamo analizzato l'effetto di un analogo della vitamina D attiva (il Paracalcitolo) su cellule endoteliali umane cresciute in condizioni sperimentali che simulano lo stress al quale sono sottoposte in condizioni patologiche. Dalla letteratura conosciamo l'effetto anti-infiammatorio dell'attivazione dei recettori della vitamina D (VDR) da parte del Calcitriolo su cellule endoteliali e del Calcitriolo e Paracalcitolo su monociti umani. L'interesse della comunità scientifica e le evidenze della letteratura sugli effetti pleiotropici del Paracalcitolo richiedono una maggiore conoscenza degli effetti di questo Attivatore dei VDR (VDRA) sulle cellule endoteliali cresciute in un ambiente che mimi quello del soggetto uremico.

**Materiali e metodi.** Sono stati effettuati esperimenti dose risposta e time-course su cellule endoteliali primarie umane (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) per misurare l'effetto protettivo di dosi crescenti di Paracalcitolo. Le HUVEC, coltivate in assenza di siero e in assenza di fattori di crescita, sono state esposte per 24 e 48 ore a condizioni di normossia (21% ossigeno, pH 7.4) o di ipossia (1% ossigeno, pH 7.4) o di acidosi (21% ossigeno, pH 7.0). Queste condizioni sono state specificamente scelte per mimare lo stress al quale le cellule endoteliali sono esposte in seguito a condizioni infiammatorie, diabete, patologie renali e polmonari, in condizioni di ridotto flusso sanguigno. È stata dunque misurata la morte cellulare di HUVEC esposte in queste condizioni sperimentali a dosi crescenti di Paracalcitolo (da 0 a 50 ng/ml). Tutti i dati sono riportati come numero totale di cellule, espresso in percentuale rispetto al controllo (cioè rispetto al numero di cellule in normossia a 0 ng/ml di Paracalcitolo a 24 ore).

**Risultati.** Il Paracalcitolo: mostra un effetto protettivo sulla morte cellulare indotta dalla deprivazione di siero e di fattori di crescita; l'effetto protettivo è evidente e dose-dipendente in condizioni di normossia sia a 24 ore di trattamento, sia a 48 ore (in maniera meno evidente); l'effetto protettivo si osserva anche in condizioni di acidosi, sebbene solo a 48 ore di trattamento e in maniera meno marcata. Dalla letteratura sappiamo che in queste condizioni sperimentali l'acidosi è nota avere un effetto protettivo sulla morte di cellule endoteliali indotta da deprivazione di siero e di fattori di crescita; pertanto il Paracalcitolo sembra avere un effetto protettivo simile a quello dell'acidosi, che però non si somma a quello dell'acidosi stessa. L'effetto protettivo non si evidenzia in maniera così chiara in condizioni di ipossia.

**Conclusioni.** Il Paracalcitolo mostra un chiaro effetto protettivo sulle cellule endoteliali umane cresciute in un ambiente "ostile" simile all'ambiente in cui può essere l'endotelio del paziente uremico.

## 14 PO

**HEPARANASE-1 NELLA TRANSIZIONE EPITELIO-MESENCHIMA INDOTTA DA FGF-2**

Masola V.<sup>1</sup>, Lupo A.<sup>3</sup>, Onisto M.<sup>1</sup>, Brunati A.M.<sup>2</sup>, Tibaldi E.<sup>2</sup>, Gambaro G.<sup>4</sup>  
<sup>1</sup>Dip. Scienze Biomediche Sperimentali; <sup>2</sup>Dip. Chimica Biologica, Università di Padova, Padova; <sup>3</sup>Dip. di Medicina, Sezione di Nefrologia, Università di Verona, Verona; <sup>4</sup>Div. Di Nefrologia e Dialisi, Ospedale universitario Columbus-Gemelli, Facoltà di Medicina, Roma

**Introduzione.** La transizione epitelio-mesenchima (EMT) è un fenomeno profondamente correlato con la fibrosi tubulointerstiziale e il rischio di ESRD. FGF-2 provoca EMT nelle epiteliali del tubulo prossimale (PTECs) e la sua interazione recettoriale è regolata da proteoglicani-eparan solfato, come i sindecani. L'eparanase-1 (HPSE) sembra avere un ruolo nella patogenesi delle malattie proteinuriche e si è osservato che esiste una relazione fra eparanase-1, sindecano-1 e FGF-2. HPSE sembra giocare un ruolo anche nella patologia delle PTECs. Un nostro recente studio in PTECs ha evidenziato che HPSE regola inversamente il sindecano-1, il quale può essere sia un inibitore dell'FGF-2, quando ancorato sulla membrana plasmatica, che un attivatore quando rilasciato in forma solubile. L'ipotesi indagata in questo studio è stata che HPSE è coinvolta in EMT.

**Metodi.** Abbiamo analizzato l'espressione di SMA, vimentina, fibronectina, MMP9, HPSE e sindecano-1 nella linea cellulare HK2 wt e stabilmente silenziata per HPSE, dopo stimolazione con FGF-2 mediante real-time PCR e IF. Abbiamo poi valutato l'attività di HPSE con ELISA, l'attività di MMP9 con zimografia e l'attivazione di AKT con WB.

**Risultati.** Si conferma che FGF-2 induce EMT, come dimostrato dall'aumento di espressione di SMA, vimentina, fibronectina e MMP9 e aumento di motilità cellulare. Ciò non si verifica nelle cellule HPSE-silenziate e in parte perché queste cellule sovra-esprimono sindecano-1. FGF-2 induce EMT in PTECs wt attraverso la via PI3K/AKT mentre nelle cellule silenziata FGF-2 produce solo

una transitoria fosforilazione di AKT rendendole resistenti alla EMT. Inoltre FGF-2 attiva in PTECs un segnale autocrino che sostiene il proprio effetto attraverso vari meccanismi: 1) esso riduce l'espressione di sindecano-1; 2) aumenta l'espressione e l'attività di heparanase-1 e MMP9; 3) MMP9 taglia il sindecano-1 e i frammenti solubili che si generano possono essere convertiti dall'eparanase-1 in potenti attivatori di FGF-2.

**Conclusioni.** Eparanase-1 è necessaria a FGF-2 per produrre EMT nelle cellule tubulari. FGF-2 instaura un segnale autocrino per sostenere il proprio effetto. Eparanase-1 partecipa a questo fenomeno. Pertanto, elevati livelli di eparanase-1 a livello tubulare causano una riduzione dell'eparan solfato e del sindecano-1 creando un ambiente che favorisce lo sviluppo di EMT indotta da FGF-2.

## 15 PO

**AUMENTO DELL'ESPRESSIONE E DEL SIGNALING INTRACELLULARE DEL TOLL-LIKE RECEPTOR 4 (TLR4) NEL MUSCOLO DEI PAZIENTI CON INSUFFICIENZA RENALE CRONICA (CKD)**

Mannucci I.<sup>1</sup>, Bonanni A.<sup>1</sup>, Verzola D.<sup>1</sup>, Sofia A.<sup>1</sup>, Saffioti S.<sup>1</sup>, Gianetta E.<sup>2</sup>, D'Amato E.<sup>1</sup>, Cademartori V.<sup>1</sup>, Gramagna P.<sup>1</sup>, Parodi E.<sup>1</sup>, Garibotto G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Cardionefrologico, Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino, Genova; <sup>2</sup>Dipartimento di Chirurgia, Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino, Genova

**Introduzione.** I toll-like receptors (TLRs) partecipano all'immunità innata e alla sintesi di citochine in diversi tessuti, tra cui il muscolo scheletrico. L'infiammazione e il danno muscolare osservati in pazienti con CKD si associano ad aumento di mortalità e morbidità. Non è chiaro se un'alterata risposta dei TLRs possa determinare questi processi.

**Metodi.** Abbiamo esaminato il ruolo dei TLRs (TLR2, TLR3, TLR4) nel determinare infiammazione nel muscolo scheletrico, studiando l'espressione dei TLRs (RT-PCR ed immunostochimica), il loro segnale intracellulare (p-65, IL-6, TNF- $\alpha$ ) (RT-PCR ed immunostochimica) e l'espressione di (p)-c-jun (phosphorylated c-jun N-terminal kinase) e di (p)-Akt (immunostochimica) nelle biopsie muscolari (retto dell'addome) ottenute da 29 pazienti con CKD stadio V durante il posizionamento di catetere per dialisi peritoneale e da 12 controlli durante intervento di ernia addominale.

**Risultati.** I pazienti con CKD mostravano un aumento di espressione genica e contenuto proteico di TLR4 e un aumento del segnale di NF- $\kappa$ B, rappresentato da aumentata espressione di p-65 (subunità attiva di NF- $\kappa$ B) (+56%, p<0.03) e del gene di IL-6, NF- $\kappa$ B regolato (+76%, p<0.05). L'espressione tissutale di pJNK, mediatore di stress infiammatorio e di morte cellulare, era incrementata di 6-7 volte e associata ad un aumento di 2 volte del suo effettore a valle, p-c-Jun (p<0.03). L'espressione di p-Akt (indice del segnale intracellulare di insulina e IGF-1) era ridotta del 50%~ rispetto ai controlli (p<0.001), mentre quella della miostatina (mediatore del catabolismo muscolare) era aumentata del 60% (p<0.05).

**Conclusioni.** Nei pazienti con CKD in fase pre-dialitica, il muscolo scheletrico attraverso i TLRs riconosce molecole che stimolano la risposta trascrizionale di IL-6. L'elevata espressione di TLR4 potrebbe contribuire al danno muscolare, tramite la down-regolazione della fosforilazione di Akt (inibizione segnale insulinico/anabolico) e l'up-regolazione della miostatina (alterata rigenerazione muscolare).

## 16 PO

**RUOLO DEL TESSUTO ADIPOSO NEL MECCANISMO DI TRANSIZIONE EPITELIO-MESENCHIMALE INDOTTO SUL TUBULO RENALE DAI FARMACI IMMUNOSOPPRESSORI**

Perri A., Lofaro D., Gigliotti P., Leone F., Papalia T., Bonfiglio R.  
 UOC Nefrologia, Ospedale "Annunziata", Cosenza

È noto che gli inibitori delle calcineurine (ICN), comunemente utilizzati nel trapianto renale, sono implicati nello sviluppo di fibrosi renale. Sebbene si conosca parte dei meccanismi attraverso i quali gli ICN inducono transdifferenziazione epitelio-mesenchimale (EMT) a livello del tubulo renale, poco è conosciuto circa gli effetti sommativi del grasso agli effetti profibrotici dei farmaci immunosoppressori (IS). TGF- $\beta$  è un fattore profibrotico coinvolto nell'induzione della EMT in vari sistemi cellulari. Abbiamo già dimostrato, in studi in vitro su cellule tubulari renali umane, HK2, che il trattamento cronico con nerve growth factor (NGF), una neurotrofina secreta anche dal tessuto adiposo, determina un aumento dell'espressione di TGF- $\beta$  Smad-mediato e di ILK (integrin-linked-kinase) con riduzione dell'E-Cadherin. Inoltre NGF è un fattore indipendentemente associato al peggioramento della proteinuria e nei soggetti in sovrappeso la sopravvivenza del graft è più bassa rispetto ai pazienti normopeso. Scopo del seguente lavoro è stato quello di valutare se il mezzo condizionato ottenuto da colture cellulari primarie di adipociti umani "normalweight" (NW) e "overweight" (OW) da solo o in combinazione con IS (Ciclosporina A e Tacrolimus-10nM/Rapamicina20-100nM) può essere coinvolto nell'EMT IS-indotta. I nostri risultati dimostrano che il CM già dopo 48 ore induce migrazione (Migration test) delle HK2 e che soprattutto il trattamento con CMOW ne determina una modificazione del fenotipo con allungamento cellulare. Dopo 48 ore il trattamento con IS determina un aumento dell'espressione di uno dei markers di EMT,  $\alpha$ SMA, evidenziato dai

dati in Western Blotting (WB). Dopo 48 ore il trattamento combinato CM più IS aumenta la migrazione cellulare e aumenta l'espressione di  $\alpha$  SMA rispetto al trattamento con soli IS. Infine, i dati in immunofluorescenza evidenziano che il trattamento CM più IS induce un aumento della localizzazione nucleare di  $\alpha$  SMA. In conclusione, i risultati del nostro lavoro confermano che nelle HK2 gli IS inducono EMT e dimostrano che i mezzi condizionati NW ed OW inducono già da soli EMT, meccanismo che risulta amplificato dal trattamento combinato CM più IS. Infine, dai nostri risultati si può ipotizzare che NGF, presente in maggiore quantità nel CMOW, possa rappresentare un potenziale mediatore implicato nell'up regolazione di  $\alpha$  SMA.

#### 17 PO

##### RUOLO DEL TESSUTO ADIPOSO NEGLI EFFETTI NEFROTOSICI INDOTTI DAI FARMACI IMMUNOSOPPRESSORI SUL TUBULO RENALE

Gigliotti P., Perri A., Leone F., Palapia T., Lofaro D., Bonfiglio R.  
UOC Nefrologia, Ospedale "Annunziata", Cosenza

Nostrì studi recenti hanno riportato che in pazienti trapiantati in sovrappeso, la sopravvivenza del graft è piú bassa rispetto ai pazienti normopeso. Sebbene si conoscano i meccanismi con cui gli immunosoppressori (IS) inducono fibrosi tubulare, poco è conosciuto circa gli effetti sommativi del grasso agli effetti nefrotossici degli IS. In precedenti lavori abbiamo giú mostrato su biopsie renali un aumento dell'espressione di nerve growth factor (NGF) (neurotrofina secreta dal tessuto adiposo) e dei suoi recettori TrkA e p75 in glomerulonefriti proteinuriche e che in soggetti trapiantati NGF è un fattore indipendentemente associato al peggioramento della proteinuria. Scopo del seguente lavoro è stato quello di studiare in vitro, su una linea cellulare di cellule tubulari renali umane (HK2), gli effetti del mezzo condizionato ottenuto da colture cellulari primarie di adipociti umani "normalweight" (NW) e "overweight" (OW) da solo o in combinazione con IS (Ciclosporina A e Tacrolimus 1-10nM/Rapamicina 20-100nM), sulla vitalità cellulare (MTT assay) e sulla modulazione dell'espressione di NGF e dei suoi recettori. I nostri risultati hanno dimostrato che il trattamento delle HK2 con ICN riduceva la vitalità delle HK2 rispetto al controllo (c) in maniera dose e tempo dipendente ( $p < 0.05$ ) e induceva un incremento dell'espressione proteica di NGF di TrkA e p75, con un rapporto di 2:1. Il trattamento con CM, in particolare CMOW, da solo o in combinazione con IS riduceva la vitalità cellulare soprattutto dopo 48 ore. I dati in WB hanno evidenziato che dopo 48 ore l'espressione di NGF aumentava, particolarmente con CM-NW+ICN 10nM. TrkA e p75 risultavano co-espressi in tutti i trattamenti mantenendo sempre un rapporto di 2:1; il trattamento CMOW+IS determinava una minore espressione di NGF vs CM-OW e CM-NW e induceva coespressione di TrkA e p75 con rapporto di 1:2. Dopo 96 ore l'espressione di NGF risultava invariata rispetto al controllo tranne che nelle cellule trattate con CM-NM/CM-OW piú ciclosporina A 10nM in cui aumentava l'espressione di NGF. Infine, dopo 96 ore il trattamento CM-OW piú Rapamicina determinava un significativo decremento dell'espressione di NGF e dei suoi recettori. In conclusione i nostri dati dimostrano una riduzione della vitalità cellulare dopo trattamento con ICN e non con Rapa. Il co-trattamento con ICN+CMOW accentua il danno tubulare. L'aumentata espressione di NGF e del recettore p75, soprattutto dopo trattamento con CMOW suggerisce il ruolo pro-apoptotico della neurotrofina.

#### 18 PO

##### NEURONI E PODOCITI: IL BDNF

Lupica R.<sup>1</sup>, Mastroeni C.<sup>2</sup>, Maggio R.<sup>2</sup>, Lacquaniti A.<sup>1</sup>, Lucisano S.<sup>1</sup>, Donato V.<sup>1</sup>, Cernaro V.<sup>1</sup>, Fazio M.R.<sup>1</sup>, Lorenzano G.<sup>1</sup>, Quartarone A.<sup>2</sup>, Buemi M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Interna UOC di UTSI e Policlinico universitario G. Martino, Messina; <sup>2</sup>UOC Neurologia e Malattie Neuromuscolari Policlinico Universitario G. Martino, Messina

**Prefazione.** I podociti sono componenti strutturali della barriera di filtrazione glomerulare. La letteratura recente ne ha messo in risalto l'attività funzionale che molto si avvicina a quella di cellule neuronali, per il riscontro di vescicole contenenti neurotrasmettitori come il GABA, il glutammato e i loro recettori. Topi resi knockout per questi mostravano anomalie nello sviluppo del sistema nervoso centrale, dei podociti e della barriera filtrante e comparsa di proteinuria. Scopo del nostro studio è stato dimostrare la funzione a livello podocitario di una nuova neurotrofina: il Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) avvalendoci della tecnica di stimolazioni magnetiche transcraniche ripetitive (rTMS) a basso voltaggio, che in maniera non invasiva migliora la plasticità e l'elasticità dei circuiti neurali stimolando il rilascio di BDNF.

**Materiali e Metodi.** Una popolazione di 20 soggetti sani 10 femmine e 10 maschi di età compresa tra i 20 e i 30 anni è stata sottoposta a rTMS per 5 giorni consecutivi. Il dosaggio del BDNF urinario e plasmatico è stato effettuato tramite ELISA-kit (PROMEGA) prima dell'inizio della procedura dopo la 1° e dopo la 5° seduta di rTMS. Agli stessi tempi è stato calcolato il rapporto tra albuminuria e creatinuria (A/Cr) nello spot di urine del mattino.

**Risultati.** I valori di BDNF urinario aumentavano in maniera statisticamente significativa ( $P=0.03$ ) passando da  $86 \pm 26$  pg/mL a  $141.8 \pm 40$  pg/mL dopo la

1° TMS e arrivavano a valori di  $258 \pm 158$  pg/mL dopo la 5° TMS ( $P=0.01$ ); la concentrazione di BDNF plasmatico aumentava significativamente ( $P=0.01$ ) da  $1460 \pm 207$  pg/mL a  $1980 \pm 334$  pg/mL dopo la 5° TMS e contemporaneamente si registravano modifiche del rapporto albuminuria creatinuria (A/Cr) pur mantenendosi nel range della norma.

**Conclusioni.** Ad oggi la tecnica delle rTMS ha dimostrato l'aumento del BDNF nel tessuto cerebrale; il riscontro del suo aumento a livello urinario e plasmatico insieme alle modificazioni nella proteinuria lascerebbe pensare a un suo ruolo a livello podocitario dove si è giú dimostrata la presenza di altri neurotrasmettitori e nelle sindromi proteinuriche.

#### 19 PO

##### BDNF E PROTEINURIA: CORRELAZIONI TRA CELLULA NEURONALE E PODOCITA

Fazio M.R.<sup>1</sup>, Lucisano S.<sup>1</sup>, Fisichella L.<sup>2</sup>, Lacquaniti A.<sup>1</sup>, Donato V.<sup>1</sup>, Lupica R.<sup>1</sup>, Cernaro V.<sup>1</sup>, Costa C.<sup>2</sup>, Mazzeo A.T.<sup>2</sup>, Buemi M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Medicina Interna, Università di Messina, UTSI e Tecniche dialitiche, Messina; <sup>2</sup>UOC Nefrologia e Malattie Neuromuscolari, Policlinico Universitario G. Martino, Messina

**Introduzione.** Il BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) è una proteina del Sistema Nervoso Centrale (SNC) implicata nella differenziazione e nella crescita della cellula neuronale. Diversi studi hanno messo in evidenza numerose analogie tra la cellula neuronale e quella podocitaria. I podociti possiedono siti per il segnale glutaminergico, per cui segnali simil-neuronali possono contribuire alla funzione glomerulare. L'obiettivo del presente studio è valutare il BDNF in risposta a diversi anestetici generali, in pz sottoposti a interventi di neurochirurgia, correlandolo alla comparsa di proteinuria.

**Materiali e Metodi.** Lo studio è stato condotto su 20 pazienti divisi in base alla procedura anestesiológica utilizzata: anestesia totalmente endovenosa (tipo A) e anestesia bilanciata endovenosa + inalatoria (tipo B). I farmaci anestetici utilizzati nel tipo A sono stati il Propofol e il Remifentanyl; nel tipo B in aggiunta è stato utilizzato il Sevoflurane. A tutti i pazienti sono stati eseguiti prima dell'intervento (T0), a 1 ora (T1), a 2 ore (T2) e a 24 ore (T3) dopo la fine dell'intervento, prelievi ematici ed urinari per il dosaggio di BDNF; è stata inoltre dosata la proteinuria.

**Risultati.** I risultati ottenuti hanno evidenziato al tempo T1, in entrambi i gruppi, incremento dei livelli plasmatici ed urinari di BDNF ( $p=0.002$ ) rispetto ai valori basali. Inoltre, i soggetti sottoposti ad anestesia di tipo A presentavano valori ematici ed urinari di BDNF significativamente superiori rispetto ai soggetti trattati con anestesia tipo B ( $p < 0.0001$ ). I valori di proteinuria correlavano in modo direttamente proporzionale con quelli del BDNF urinario ( $p=0.02$ ;  $r=0.43$ ).

**Conclusioni.** La somministrazione di anestetici determina per via neurogena uno stress importante a livello del podocita, cellula dotata di siti per il segnale glutaminergico. Tale attivazione ha un duplice effetto: da un lato causa alterazione funzionale del podocita con conseguente comparsa di proteinuria, dall'altro determina aumentata produzione di BDNF sia plasmatico che urinario.

#### 20 PO

##### RENAL INJURY AFTER LOW- OR ISO-OSMOLAR CONTRAST AGENT EXPOSURE: AN IN VITRO STUDY

Netti G.S.<sup>1</sup>, Praticchizzo C.<sup>1</sup>, Montemurro E.<sup>1</sup>, Grandaliano G.<sup>1</sup>, Ranieri E.<sup>1</sup>, Gesualdo L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>BioAgroMed Research Center, Univ. of Foggia, Foggia; <sup>2</sup>Chair of Nephrology, DETO, Univ. of Bari, Bari

**Introduction.** Contrast-induced nephropathy (CIN) represents the third highest cause of hospital-acquired acute renal failure. Iodixanol, a new generation iso-osmolar contrast medium, has proved to be safe, even when administered to high-risk patients. We aimed to determine whether the use of iso-osmolar iodixanol is less nephrotoxic than that of low-osmolar iohexol and iopamidol in an in vitro model.

**Materials and methods.** X-ray attenuation of iohexol, iopamidol and iodixanol was assessed at equimolar iodine concentrations. Human renal proximal tubular cells were incubated with equally attenuating solutions of CM for 24 hours at 37°C. Cytotoxicity was assessed by trypan blue testing, MTT assay and by flow cytometry (Annexin V-FITC/Propidium Iodide) to detect apoptosis and necrosis.

**Results.** Yielding the same x-ray attenuation, CM cytotoxicity was assessed at equimolar iodine concentrations. At trypan blue testing, there were more necrotic cells after incubation with 50, 100, 150 and 270 mg/ml of iohexol and iopamidol than after incubation with equal concentrations of iodixanol ( $P < 0.005$  among groups at each concentration). Iohexol and iodixanol at low iodine concentrations (20, 50 and 100 mg/ml) induced comparable inhibition of MTT conversion with a dose-dependent effect ( $53.6$  vs  $54.9\%$ ,  $44.0$  vs  $36.8\%$  and  $31.6$  vs  $43.1\%$  of undamaged control cells for iohexol and iodixanol, respectively;  $P=NS$ ), while iopamidol showed a marked cytotoxic effect, as compared with iodixanol ( $26.0$  vs  $54.9\%$ ,  $23.2$  vs  $36.8\%$  and  $22.5$  vs  $43.1\%$  of undamaged control cells for iohexol and iodixanol, respectively;  $P < 0.001$ ). Moreover, both iohexol and iopamidol induced more necrosis and apoptosis than iodixanol with a dose-dependent effect (iodixanol vs iopamidol: for necrosis  $1.9$  vs  $1.1\%$  at 20