

IV SESSIONE COMUNICAZIONI - NEFROLOGIA CLINICA

SALA AMERIO

Lunedì, 8 Ottobre 2007 - ore 10.00-11.00

ANTICORPI ANTI-FIBROBLASTI NELLA FIBROSI RETROPERITONEALE IDIOPATICA

Vaglio A¹, Palmisano A¹, Gatti R², Orlandini G², Corradi D³, Maestri R³, Ferretti S⁴, Raschi E⁵, Meroni PL⁵, Buzio C¹, Ronda N¹¹Dipartimento di Clinica Medica e Nefrologia, ²Dipartimento di Anatomia ed Istologia, ³Dipartimento di Anatomia Patologica, Università di Parma, Parma; ⁴Divisione di Urologia, Ospedale Maggiore di Parma, Parma; ⁵Istituto Auxologico Italiano, Università di Milano, Milano

Introduzione. La fibrosi retroperitoneale idiopatica (FRI) è un raro disordine caratterizzato da un'infiammazione fibro-infiammatoria del retroperitoneo che spesso coinvolge gli ureteri e può comportare insufficienza renale acuta; la sua patogenesi è probabilmente su base autoimmune. Auto-anticorpi che reagiscono con i fibroblasti (anticorpi anti-fibroblasti, AFA) sono stati rilevati nel siero di pazienti con scleroderma e sono in grado di indurre attivazione fibroblastica *in vitro*.

Scopi. In questo studio abbiamo valutato la prevalenza degli AFA nei pazienti con FRI, la loro interazione dinamica con i fibroblasti ed i loro effetti sulle funzioni proinfiammatorie dei fibroblasti.

Materiali e metodi. Per indagare la prevalenza degli AFA, abbiamo testato i sieri di 23 pazienti consecutivi con FRI al fine di valutare la loro capacità di legame con fibroblasti umani cutanei e polmonari mediante un cell-based ELISA. In seguito sono state coniugate con fluoresceina le IgG purificate dai sieri di pazienti AFA-positivi ed AFA-negativi, di controlli sani e miscele di IgG normali. L'interazione delle IgG con fibroblasti in coltura, isolati dal tessuto retroperitoneale di pazienti con FRI e soggetti di controllo e dalla cute di donatori sani, veniva visualizzata in microscopia confocale real-time. La capacità di tali IgG di stimolare la produzione di IL-6 da parte dei fibroblasti veniva valutata con uno specifico ELISA. Un'analisi immunostochimica per la vimentina e l' α -actina muscolo liscio veniva condotta sul tessuto retroperitoneale di pazienti con FRI e soggetti di controllo.

Risultati. Gli AFA erano positivi in 7/23 (30.4%) pazienti. Le IgG ottenute da pazienti AFA-positivi si legavano ai fibroblasti in coltura e venivano internalizzate con un pattern citoplasmatico di tipo fibrillare; al contrario, le IgG di soggetti AFA-negativi o controlli aderivano semplicemente alla membrana cellulare dei fibroblasti senza essere internalizzate. I fibroblasti retroperitoneali isolati dai pazienti con FRI o dai controlli, così come i fibroblasti normali cutanei, mostravano un analogo pattern di internalizzazione, così dimostrando che l'anomalia era legata alle IgG patologiche e non ai fibroblasti. Le IgG ottenute da pazienti AFA-positivi, al contrario di quelle ottenute dai pazienti AFA-negativi o dai controlli, erano in grado di indurre una produzione dose-dipendente di IL-6. L'analisi immunostochimica del tessuto retroperitoneale mostrava che la maggior parte degli elementi fibroblastici vimentina-positivi erano anche positivi per l' α -actina muscolo liscio, a testimonianza di un fenotipo fibroblastico attivato.

Conclusioni. Gli AFA sono presenti in una frazione di pazienti con FRI, vengono attivamente internalizzati dai fibroblasti e possono rappresentare uno stimolo che conduce al fenotipo attivato dei fibroblasti osservato nella FRI. Gli AFA possono pertanto rappresentare un nuovo meccanismo patogenetico che contribuisce allo sviluppo della FRI.

1

gr/die all'ultima osservazione - Gruppo 2: da un valore basale di 2.0 gr/die a 1.2 gr/die durante il follow-up e 0.9 gr/die all'ultima osservazione. Gli effetti collaterali importanti (diabete, infezioni, sintomi gastrointestinali, ipertensione, anemia e leucopenia) sono stati più frequenti nei pazienti che hanno ricevuto anche l'azatioprina (26 pazienti vs. 13).

Conclusioni. L'azatioprina aggiunta agli steroidi nei pazienti con IgAN non sembra in grado di favorire una migliore sopravvivenza renale, mentre potrebbe aumentare gli effetti collaterali severi.

STEROIDI E AZATIOPRINA VS SOLI STEROIDI NELLA NEFROPATIA IgA

Pozzi C¹, Andrulli S¹, Del Vecchio L¹, Pani A², Scaini P³, Fogazzi GB⁴, Vogt B⁵, De Cristoforo V⁶, Allegri L⁷, Locatelli F¹¹Nefrologia e Dialisi, Ospedale "A. Manzoni", Lecco; ²Nefrologia e Dialisi, Ospedale "G. Brotzu", Cagliari; ³Nefrologia e Dialisi, Spedali Civili, Brescia; ⁴Nefrologia e Dialisi, Ospedale Maggiore IRCCS, Milano; ⁵Nephrology and Hypertension, Inselspital, Berna, Svizzera; ⁶Nefrologia e Dialisi, Ospedale Civile, Sondrio; ⁷Nefrologia e Dialisi, Ospedale Maggiore, Parma

Introduzione e scopi. La Nefropatia IgA (IgAN) ogni anno conduce alla dialisi un grande numero di pazienti. In presenza di funzione renale normale, i corticosteroidi risultano efficaci nel ridurre la proteinuria ed il rischio di un peggioramento della funzione renale. Tuttavia, questo effetto, oltre che risultare scarso in alcuni pazienti, sembra ridursi nel tempo. Pertanto, abbiamo condotto uno studio randomizzato e prospettico, per valutare se l'aggiunta di una piccola dose di azatioprina agli steroidi è in grado di migliorare la sopravvivenza renale nel lungo termine.

Metodi. 251 pazienti con IgAN primitiva e proteinuria ≥ 1 gr/die sono stati arruolati da 28 Centri e divisi in 3 liste in accordo con il livello di funzione renale e con l'epoca della biopsia renale. Lista I (174 pz): creatinemia < 2 mg/dl e biopsia renale eseguita non più di un anno prima; lista II (33 pz): come la lista I, ma con la biopsia eseguita oltre un anno prima; lista III (44 pz): creatinemia ≥ 2 mg/dl, senza limiti di tempo per la biopsia renale. I pazienti sono stati randomizzati a ricevere steroidi (3 boli e.v. di metilprednisolone da 1 gr all'inizio dei mesi 1, 3 e 5, più prednisone 0.5 mg/kg a giorni alterni per 6 mesi; per la lista III 0.2 mg/kg a giorni alterni per altri 6 mesi) e azatioprina (1.5 mg/kg/die per 6 mesi; per la lista III 50 mg/die per altri 6 mesi) (Gruppo 1; 123 pz) oppure solo steroidi con lo stesso schema (Gruppo 2; 128 pz). L'endpoint primario era la progressione della malattia renale, stimato come aumento del 50% della creatinemia basale. Gli endpoint secondari erano l'andamento della proteinuria nel tempo e gli effetti collaterali.

Risultati. Le caratteristiche cliniche basali erano simili nei due gruppi. Dopo un follow-up mediato di 4.0 anni (range interquartile 2.7-5.5) la sopravvivenza renale a 5 anni è risultata 86.1% nel Gruppo 1 e 85.3% nel Gruppo 2 ($p=0.775$). La lista, all'analisi univariata, è risultata un fattore prognostico rilevante; sopravvivenza renale a 5 anni: 91.4% nella lista I, 81.8% nella lista II e 65.9% nella lista III ($p<0.001$); nelle singole liste il tipo di trattamento non ha influito sulla sopravvivenza renale: a 5 anni nella lista I sopravvivenza renale 90.7% nel gruppo 1 e 92% nel gruppo 2, nella lista II 81.3% nel Gruppo 1 e 82.4% nel Gruppo 2, nella lista III 70% nel Gruppo 1 e 62.5% nel Gruppo 2. La proteinuria mediana è diminuita significativamente in entrambi i gruppi ($p<0.001$) in modo simile (Gruppo 1: da un valore basale di 2.1 gr/die a 1.2 gr/die durante il follow-up e 0.8

(segue)

ANALISI DI MUTAZIONE DELLA REGIONE 5' UTR DEL GENE CLCN5 E DEI GENI OCRL1 E COLLECTRINA IN PAZIENTI CON MALATTIA DI DENT CLCN5 NEGATIVI

Tosetto E¹, Addis M², Caridi G³, Emma F⁴, Melis A², Vezzoli G⁵, Glorioso N⁶, Degortes S⁶, Soldati L⁷, Terranegra A⁷, Negrisolo S⁸, Ghiggeri GM³, D'Angelo A¹, Anglani F¹¹Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Clinica Nefrologica, Università di Padova, Padova; ²Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologia, Università di Cagliari, Cagliari; ³Istituto Pediatrico G. Gaslini, Genova; ⁴Divisione di Nefrologia e Dialisi, Ospedale Pediatrico Bambin Gesù, Roma; ⁵Divisione di Nefrologia, Dialisi e Iperensione, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano; ⁶Centro di Iperensione e Prevenzione Cardiovascolare, Sassari; ⁷Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Milano; ⁸Dipartimento di Pediatria, Università di Padova, Padova

Introduzione. La malattia di Dent (DD), tubulopatia prossimale X-linked, è causata da mutazioni del gene CLCN5 che codifica per il canale del cloro e antiporto Cl⁻/H⁺ CLC-5 (OMIM 300009). Mutazioni del gene OCRL1, solitamente responsabili della sindrome di Lowe sono state recentemente trovate in pazienti (pz) con DD (OMIM 300555). Ciò nonostante, il 25% circa dei pz con DD non presenta mutazioni né in CLCN5, né in OCRL1. I geni candidati CLCN4 e SLC9A6 sono stati indagati ma non è stata identificata alcuna mutazione. La recente scoperta che topi privi di collectrina, un nuovo mediatore del trasporto tubulare degli aminoacidi, sviluppano una tubulopatia prossimale simile, per alcuni aspetti a quella DD e Lowe, suggerisce un possibile coinvolgimento di collectrina nella DD. All'eterogeneità genetica si aggiunge inoltre la complessità strutturale, non ancora ben caratterizzata, delle regioni regolative poste al 5' del gene CLCN5 che potrebbe quindi celare delle mutazioni disease-causing nei pazienti con DD.

Scopi. Contribuire alla definizione dell'eterogeneità genetica della DD analizzando la regione 5' UTR di CLCN5 e i geni OCRL1 e collectrina.

Pazienti e metodi. Sono stati raccolti 48 pz con fenotipo suggestivo di DD, 24 dei quali non presentavano mutazioni a carico di CLCN5. Questi pz sono stati indagati per la presenza di mutazioni negli esoni non tradotti A, B e B1 di CLCN5 così come per la presenza di mutazioni nel gene collectrina. Cinque pz con i classici segni di DD (proteinuria a basso peso molecolare, ipercalcemia e nefrocalcinosi) sono stati analizzati per la presenza di mutazioni di OCRL1. L'analisi di mutazione è stata condotta mediante sequenziamento diretto dei prodotti di PCR.

Risultati. Sono state identificate 2 nuove mutazioni, L88X e E720D, rispettivamente negli esoni 5 e 19 del gene OCRL1. Le mutazioni non sono mai state identificate precedentemente nei pz con DD né nei pz con sindrome di Lowe. La mutazione non senso L88X, tuttavia, introduce una prematura terminazione della traduzione a livello del codone 88 producendo lo stesso effetto della mutazione frameshift Q70RfsX88 identificata da altri in un

(segue)

2

pz con DD. La mutazione missenso E720D segrega in 2 fratelli affetti che presentano anche la mutazione silente P568P del gene CLCN5. Non è stata identificata nessuna mutazione nel gene collectrina. Sebbene la regione del promotore del gene CLCN5 sia stata indagata, e nessuna mutazione sia stata finora riportata, abbiamo per la prima volta identificato una sostituzione nucleotidica, -480 G>A, nell'esone B1 di CLCN5, in un pz sardo. L'analisi RFLP condotta in una popolazione sarda costituita da 196 soggetti adulti sani [103 maschi (M) e 93 femmine (F)] ha rivelato che la sostituzione non è presente nei controlli. Un'ulteriore analisi di 124 campioni di DNA da sangue di cordone ombelicale (66 M e 58 F) ha confermato questo dato.

Conclusioni. I nostri risultati 1) confermano che nei pz con DD sono presenti mutazioni del gene OCRL1, e che prematuri codoni di stop clusterizzano nell'esone 5, diversamente da quello che succede nella Lowe; 2) indicano che il gene collectrina probabilmente non è coinvolto nella DD e, 3) suggeriscono che la sostituzione nucleotidica -480 G>A è una nuova mutazione disease-causing del gene CLCN5.

STUDIO RANDOMIZZATO CONTROLLATO SUL RUOLO ANTIEMORRAGICO DELLA DESMOPRESSINA NELLA BIOPSIA RENALE PERCUTANEA ECOGUIDATA

Bonifati C, Manno C, Campobasso N, Schena FP

Sezione di Nefrologia, Dipartimento dell'Emergenza e dei Trapianti d'Organo, Università di Bari, Bari

Introduzione. La biopsia renale percutanea riveste un ruolo essenziale nella diagnostica nefrologica. Nonostante un affinamento della tecnica di esecuzione mediante aghi semi-automatici o automatici e migliore visualizzazione dell'imaging ecografica, il rischio di complicanze emorragiche resta frequente. L'incidenza di ematomi al controllo sistematico ecografico è circa un terzo di tutte le procedure; non sono stati ancora evidenziati specifici fattori predittivi che possano predire lo sviluppo di complicanze emorragiche post-biottiche.

Scopi. Nel nostro studio abbiamo valutato l'effetto della DDAVP (1-deamino-8-D-arginina vasopressina) sull'incidenza di complicanze emorragiche e la validità del tempo di chiusura *in vitro* (CT) determinato con il sistema PFA 100™ (Dade-Behring, Marburg, Germany) come metodica di studio dell'emostasi primaria nei pazienti sottoposti a biopsia renale.

Pazienti e metodi. Lo studio randomizzato controllato è stato eseguito in doppio cieco su 140 pazienti, con funzione renale (ClCr>60ml/min) e parametri coagulativi (PT, PTT e tempo di lvy) nella norma. I 69 pazienti del gruppo sperimentale (S) sono stati trattati un'ora prima della biopsia renale con 0,3 mcg/kg di DDAVP s.c., i 71 pazienti del gruppo controllo (C) con placebo. Nel corso del follow-up post-biottico sono stati monitorati i segni clinici (pressione arteriosa, frequenza cardiaca, dolore al fianco e macroematuria) e biochimici (emacromo e funzionalità renale), controllo sistematico ecografico a 24 ore e nei giorni successivi. Uno studio ancillare è stato effettuato in 43 pazienti, prima e dopo somministrazione di DDAVP o placebo, valutando il tempo di chiusura (CT) con PFA-100™ [collagene/adrenalina(CEPI-CT)], fattore VIII (FVIII:C), fattore vonWillebrand Ag (vWF:Ag), fattore correlato alla Ristocetina (vWF:RCo).

Risultati. Nel gruppo S si evidenziava una riduzione significativa della formazione degli ematomi rispetto al gruppo controllo (13% vs 34%; p=0.004) a parità del numero di affondamenti eseguiti. Lo studio della coagulazione evidenziava variazioni statisticamente significative solo nel gruppo S:

	pre-DDAVP	post-DDAVP	p
CEPI-CT (sec)	129.3 ± 36.8	93.6 ± 31.5	0.004
F VIII:C (IU/dl)	104.0 ± 40.2	215.7 ± 105.3	0.0001
vWF:Ag (IU/dl)	138.3 ± 68.3	199.3 ± 72.9	0.0001
vWF:RCo (%)	139.0 ± 70.8	214.9 ± 81.8	0.0002

3

(segue)

In questo gruppo, inoltre, si è riscontrata una correlazione significativa inversa (R:0.56; p<0.0004) tra CT e livelli del complesso FVIII/vWF.

Conclusioni. La somministrazione di DDAVP per via sottocutanea, nella fase di preparazione alla biopsia renale, riduce significativamente l'incidenza degli ematomi post-biottici. Inoltre, i risultati dello studio ancillare suggeriscono che il tempo di chiusura *in vitro* e la sua sensibilità alle variazioni del complesso F VIII/vWF endogeno prodotte dalla vasopressina potrebbero essere uno strumento utile nella valutazione pre-biottica del rischio emorragico.

4