

IV SESSIONE POSTER
IMMUNOLOGIA PATOLOGIA CELLULARE
Lunedì, 8 Ottobre 2007 - ore 14.30-15.30

DIFFERENTE APOPTOSI IN COLTURE DI CELLULE PARATIROIIDEE DI PAZIENTI CON IPERPARATIROIDISMO SECONDARIO E TERZIARIO

Lusenti T¹, Rustichelli R¹, Borgatti P¹, Farnetti E², Nicoli D², Pattacini L², Casali B²
¹U.O. di Nefrologia e Dialisi, Azienda Ospedaliera "S. Maria Nuova", Reggio Emilia;
²Biologia Molecolare, Azienda Ospedaliera "S. Maria Nuova", Reggio Emilia

Introduzione. È ben noto che il fenomeno dell'apoptosi di cellule paratiroidee può essere variamente indotto *in vitro* da soluzioni contenenti elevate concentrazioni di calcitriolo, comunemente impiegate allo scopo di ridurre i livelli serici di paratormone (PTH) nei pazienti uremici affetti da iperparatiroidismo (IPT) secondario.

Scopi. Scopo di questo studio è stato quello di valutare la risposta apoptotica in colture cellulari di ghiandole paratiroidee, ottenute al momento della paratiroidectomia (PTX), in uremici emodializzati con IPT secondario ed in pazienti con IPT terziario persistente dopo trapianto renale, esposte a differenti concentrazioni di calcio e fosfato.

Materiale e metodi. Il tessuto paratiroideo è stato prelevato in sala operatoria all'atto della PTX e mantenuto in ghiaccio fino al momento della fissazione, in 6 pazienti emodializzati con IPT secondario ed in 3 pazienti con IPT terziario persistente dopo trapianto renale. I tessuti sono poi stati sezionati e sottoposti a digestione con collagenasi tipo II (Sigma-Aldrich) e successivamente mantenuti per 4 ore a 37 °C. I frammenti ghiandolari sono stati poi filtrati e risospesi in RPMI ed in FBS al 5%. Per valutare l'induzione di apoptosi all'esposizione a calcio e fosfato le cellule paratiroidee sono state coltivate su vetrino ed esposte separatamente a soluzioni contenenti 0,5, 1,3 ed 1,7 mM di calcio e a 0,5, e 2,0 mM di fosfato. Dopo 24 e 48 h nelle colture cellulari è stato valutato il grado di apoptosi al microscopio ottico (MO). Le cellule sono quindi state fissate in paraformaldeide, permeabilizzate con una soluzione allo 0,1% di Triton e marcate mediante "in situ cell death detection kit". Dopo altre 2 ore l'induzione di apoptosi è stata valutata con microscopio a fluorescenza (FM) mediante TUNEL test (Tt).

Risultati. L'osservazione al MO ed il Tt hanno evidenziato che le cellule di paratiroide coltivate da ghiandole di pazienti dializzati con IPT secondario hanno manifestato apoptosi dopo 24 ore dall'esposizione ad una concentrazione di calcio pari a 1,7 mM. Negli stessi pazienti concentrazioni di calcio inferiori e trattamento con fosfato non sono state in grado di indurre apoptosi. Viceversa le cellule paratiroidee coltivate da ghiandole dei pazienti con IPT terziario persistente dopo trapianto renale non sono risultate sensibili all'induzione di apoptosi anche dopo 48 ore di esposizione a soluzioni contenenti calcio e fosfato a tutte le concentrazioni.

Conclusioni. Questo studio mostrando l'assenza di apoptosi anche dopo prolungata esposizione a soluzioni con elevata concentrazione di calcio nelle colture cellulari di pazienti con IPT terziario persistente dopo trapianto renale, suggerisce, rispetto ai pazienti con IPT secondario, la perdita *in vitro* dell'inibizione funzionale calcio-indotta in cellule paratiroidee con IPT divenuto autonomo.

1

LIVELLI DI PTX 3 IN PAZIENTI CON INSUFFICIENZA RENALE CRONICA (IRC)

Malaponte G¹, Cristina M², Gagliano I², Caruso A², Fatuzzo P², Rapisarda F², Castellino P²

¹Istituto di Patologia Generale, Università di Catania, Catania; ²Dipartimento di Medicina Interna, Università di Catania, Catania

Introduzione. In pazienti con IRC sono stati riportati aumenti significativi di varie proteine della fase acuta della flogosi, quali citochine e Proteina C Reattiva (PCR). Quest'ultima, in particolare, sembra avere un importante ruolo prognostico sulla morbilità e sulla mortalità di pazienti in dialisi ed un ruolo patogenetico nella evoluzione della aterosclerosi. La PCR fa parte di una classe di effettori della fase acuta, le pentraxine "short". In anni recenti sono state descritte altre macro molecole proteiche appartenenti alla classe delle pentraxine con struttura pentamerica simile alla PCR ma di peso molecolare maggiore per la presenza di catene laterali lineari di varia struttura: le "long" pentraxine. Di esse, la più studiata è la PTX 3 che sembra avere un ruolo patogenetico significativo in pazienti ad elevato rischio cardiovascolare. Le sue modificazioni in corso di insufficienza renale sono poco note.

Scopi. Il presente studio è stato disegnato per valutare i livelli circolanti, la sintesi delle pentraxine "long" in pazienti con IRC e la loro correlazione con altri indicatori della flogosi.

Pazienti e metodi. Abbiamo analizzato campioni di sangue e monociti di 43 pazienti in emodialisi, valutati prima e dopo la seduta dialitica, 45 pazienti con IRC stadio 2-3 e 25 volontari sani. Abbiamo valutato in ELISA i livelli plasmatici di PTX3, TNF- α , IL-1- α e IL-6. Abbiamo valutato inoltre il rilascio di citochine dai monociti, in condizioni basali e dopo stimolazione con lipopolisaccaridi.

Risultati. I livelli plasmatici di PTX3, TNF- α , IL-1- α e IL-6 erano aumentati in HD, pre e post dialisi, e IRC rispetto ai controlli * $(p<0,01)$ e post-vs-pre dialisi $\S(p<0,01)$

	Controlli	IRC	HD Pre dialisi	HD post dialisi
CRP mg/dl	0.9 ± 0.3	5.33 ± 7.5 *	7.75 ± 6.53 *	-
Fibrinogeno g/dl	272 ± 45	418 ± 96 *	491 ± 124 *	-
TNF α pg/ml	7.1 ± 1.9	8.93 ± 2.4	12.7 ± 4.9 *	17.05 ± 7.6 * \S
IL-1 α pg/dl	7.4 ± 1.5	9.21 ± 2.4	17.1 ± 5.07 *	23.07 ± 3.72 * \S
IL-6 pg/ml	1.8 ± 0.9	3.6 ± 2.01	7.2 ± 0.6 *	9.57 ± 2.94 *
PTX 3 ng/ml	1.03 ± 0.4	2.34 ± 1.2 *	3.03 ± 1.81 *	4.82 ± 2.63 *

Il rilascio da parte dei monociti in condizioni basali e dopo stimolazione con LPS di PTX3, TNF- α , IL-1- α e IL-6 era aumentato in HD, pre e post dialisi vs IRC e, in condizioni basali vs Controlli ($p<0,01$). Nei pazienti con PTX 3 >2 ng/ml i livelli di PTX3 correlavano con TNF α e IL 1 α ($p<0,01$) ma non con CRP e IL 6.

Conclusioni. I dati indicano la PTX 3 come un nuovo marker di infiammazione, essa risulta aumentata in pazienti con IRC ed in trattamento dialitico, ed aumenta ulteriormente in risposta alla singola seduta dialitica. L' aumento dei livelli circolanti è ascrivibile ad una aumentata sintesi monocitaria basale. PTX 3 correla con TNF α e IL-1 α ma non con IL-6 e CRP, confermando quindi anche in pazienti uremici una via di stimolazione e di regolazione indipendente dalla CRP.

3

LIVELLI PLASMATICI DI CITOCINE INFIAMMATORIE IN PAZIENTI CON LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO ED INTERESSAMENTO RENALE

Masala A, Faedda R, Gallo P, Pileri PV, Sini A, Piras S, Mannoni D, Maninchedda P, Alagna G, Rovasio P, Loi MR, Barra A, Alagna S
 Istituto di Patologia Speciale Medica, Università di Sassari, Sassari

Numerosi studi indicano che le citochine pro-infiammatorie svolgono un ruolo di rilievo nella patogenesi delle lesioni riscontrabili in numerose patologie autoimmuni. Questo riscontro ha portato allo sviluppo ed all'introduzione nella pratica clinica di farmaci capaci di antagonizzarne gli effetti, farmaci oggi impiegati nella terapia di numerose malattie quali l'artrite reumatoide, il LES, la spondilite anchilosante. Nel presente studio abbiamo valutato i livelli di alcune citochine in un gruppo di pazienti affette da LES con e senza compromissione renale. Sono state studiate 32 pazienti di età compresa tra i 21 ed i 43 anni. Le pazienti sono state divise in due gruppi: gruppo A, n=21 comprendente pazienti senza compromissione renale e gruppo B n=11 comprendente pazienti affette da glomerulonefrite mesangiale (n=7), mesangio-proliferativa (n=1), membrano proliferativa (n=3). Tutte le pazienti praticavano terapia con prednisone, 5-25 mg/die. Le pazienti del gruppo B erano state trattate con cicli mensili di ciclofosfamide, alla dose di 15mg/Kg di peso corporeo per 6-8 mesi tutte erano in remissione clinica al momento dello studio. Per controllo sono state utilizzate 10 pazienti di età sovrapponibile (gruppoC). I livelli di interleuchina 1 β (IL1), interleuchina 6 (IL6) e TNF α sono stati misurati con metodiche specifiche di immunochemiluminescenza e riportati in pg/ml. L'analisi statistica dei dati è stata eseguita con il test del t di Student. Tutti i valori sono riportati come medie \pm D.S.

	Gruppo C n=10	Gruppo A n=21	Gruppo B n=11
IL 1 pg/ml	0.35 \pm 0.20	0.97 \pm 0.64 *	0.88 \pm 0.67 *
IL 6 pg/ml	1.78 \pm 0.50	6.69 \pm 2.97 *	3.39 \pm 1.46 ***
TNF- pg/ml	3.89 \pm 1.54	7.10 \pm 4.39 *	6.01 \pm 2.64 *

* = $p<0,01$ vs Gruppo C ; ** $p<0,01$ vs Gruppo A

I dati del presente studio confermano che le pazienti affette da LES presentano livelli di interleuchine significativamente superiori rispetto ai soggetti normali. Non esistevano differenze significative tra i pazienti con compromissione renale e non per quanto riguarda i livelli di IL 1 e TNF α mentre i livelli di IL 6 misurati nel Gruppo B erano significativamente inferiori rispetto a quelli misurati nel Gruppo A. I dati ottenuti permettono di confermare il ruolo di rilievo svolto dalle citochine studiate nel LES. Indicano inoltre che la terapia immunosoppressiva con prednisone, pur portando ad una remissione clinica, non è in grado di normalizzare i livelli di interleuchine in questi pazienti. Inoltre, la terapia con ciclofosfamide è risultata in grado di ridurre in maniera significativa i soli livelli di IL 6 rispetto alle pazienti trattate con solo prednisone.

2

ALFA-ACTINA DEL MUSCOLO LISCIO, UN MARKER IMMUNOISTOCHEMICO NELLA GLOMERULONEFRITE MESANGIOPAPILLARE

Stoppacciaro A¹, Scabbia L², Fofi C², Menè P²
¹Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia, Università degli Studi "La Sapienza", Roma; ²U.O.C. Nefrologia, Azienda Ospedaliera Sant'Andrea, Università degli Studi "La Sapienza", Roma

Introduzione. Recenti osservazioni condotte nei nostri laboratori mediante immunofluorescenza delle cellule glomerulari e tubulari su biopsie renali hanno consentito una caratterizzazione della proliferazione cellulare e dell'infiltrato leucocitario in varie forme di glomerulonefriti (GNF) e vasculiti.

Scopo. Confrontare l'espressione di markers fenotipici di transdifferenziazione miofibroblastica in GNF umane a prevalente impronta proliferativa intracapillare.

Pazienti e metodi. Abbiamo studiato 63 biopsie renali consecutive con tecniche di immunoperoxidasi per la isoforma α dell'actina del muscolo liscio (alfa-SMA), marker espresso a livello mesangiale in GNF sperimentali da antisero anti-Thy-1.1 e da cellule mesangiali umane in coltura attivate da fattori di crescita come platelet-derived growth factor-BB o transforming growth factor- β 1; parallelamente sono stati esaminati Ki-67, marker di proliferazione, e CD68, proteina lisosomiale dei macrofagi.

Risultati. In 17 casi di GNF mesangiale proliferativa (MP, 3 IgA classe Lee 2, 10 IgA Lee 3-4, 4 non-IgA) alfa-SMA era negativa o solo focalmente positiva (12.3 \pm 1.4 cellule/sezione glomerulare), mentre appariva significativamente presente con un pattern diffuso e distribuzione tipicamente lobulare a livello mesangiale/endoteliale in 5 casi di GNF mesangiocapillare tipo 1 a depositi subendoteliali (MC1) HCV-positivi e negativi (20.7 \pm 1.4, $p<0,05$ vs. MP). In tutti i 5 pazienti era presente marcata infiltrazione macrofagica (21.0 \pm 4), ipocomplementemia C4 e crioglobulinemia dosabile. Alfa-SMA colocalizzava estensivamente con Ki-67, un marker di proliferazione cellulare (0.5 \pm 0.2 vs. 9.0 \pm 1.2, MP/MC1, $p<0,01$). Glomerulopatie non proliferative come glomerulosclerosi focale e segmentale (n=6) e membranosa stadio 2-4 (n=10) risultavano sostanzialmente negative per alfa-SMA e Ki-67.

Conclusioni. È quindi verosimile che α -SMA non rappresenti un correlato della "attivazione" mesangiale in tutte le GNF proliferative intracapillari, ma piuttosto un indicatore di trasformazione fenotipica in presenza di coinvolgimento endoteliale, con potenziale rilevanza diagnostica istopatologica.

4

COME COMPARE LA PROTEINURIA NELLA NEFRITE A DEPOSITI IgA? SEGNALE DALLE CELLULE MESANGIALI ATTIVATE DA IgA AD ALTERATA GLICOSILAZIONE RIDUCONO L'ESPRESSIONE DELLA NEFRINA NEI PODOCITI UMANI

Balegno S¹, Fontana V², Amore A¹, Mancuso D¹, Peruzzi L¹, Ricotti M¹, Manniello D¹, Camussi G², Coppo R¹
¹S.C. di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Ospedale Regina Margherita, Torino; ²Istituto di Nefrologia, Università di Torino, Torino

Introduzione. La presenza in circolo e la deposizione a livello mesangiale di IgA1 ad alterata glicosilazione - deficitarie di acido sialico e di galattosio- è ritenuto il punto chiave della patogenesi della nefropatia a depositi IgA (IgAN). È stato dimostrato da noi e da numerosi altri gruppi che IgA desialilate e degalattosilate (IgA deSia/deGal) reagiscono con le cellule mesangiali (CM) e stimolano la sintesi di mediatori dell'infiammazione e della sclerosi. La proteinuria è uno dei fattori di rischio più rilevanti per la progressione dell'IgAN verso la sclerosi renale, ma i meccanismi che danno inizio alle modificazioni della permeabilità glomerulare in questa nefropatia sono ancora del tutto sconosciuti.

Scopi. Lo studio è stato finalizzato alla ricerca di fattori che condizionano lo sviluppo della proteinuria in corso di IgAN, ricercando messaggi biologicamente attivi sui podociti innescati dal contatto di IgA ad alterata glicosilazione con le CM.

Materiali e metodi. Le CM umane sono state incubate con IgA deSia/deGal ottenute *in vitro* trattando IgA native polimeriche con glicosidasi selettive (neuraminidasi e galattosidasi) e con glicoforimi di IgA isolate dai sieri di pazienti con IgAN (cromatografia su agarosio legato a lectina Jacalin). Dopo 24 ore di incubazione il supernatante contenente IgA è stato rimosso ed eliminato, le CM sono state lavate e coltivate su terreno standard completo per altre 12 o 24 ore. Il surnatante di coltura è stato poi raccolto e incubato per 6, 12, e 24 ore con podociti umani (linee di podociti differenziati ottenuti da culture primarie mediante infezione con Adeno5/SV40 virus; J Virol 1997). L'espressione di nefrina sui podociti umani è stata rilevata mediante immunofluorescenza (mAb anti-dominio extracellulare clone 48E11 10µg/ml) e quantificata utilizzando Windows MicroImage ver. 3.4 CASTI Imaging e mediante citometria a flusso (FACS). Analogamente è stata quantificata 'alfa actina muscolare liscia (ASMA) marcata con falloidina.

Risultati. La tabella riassume i risultati ottenuti:

	IF Quantificazione (IF q)	Intensità media di fluorescenza (mFI) FACS	% di cellule positive FACS
Podociti di controllo non trattati	97±8	49.8	10%
Podociti + mezzo di coltura di CM pre-attivate da IgA native polimeriche (plgA)	130±8	28.6	73%
Podociti + mezzo di coltura di CM pre-attivate con deSia/deGal plgA	66±23	18.3	42%

Una riduzione di espressione della nefrina è stata osservata anche quando i podociti venivano messi in coltura con il surnatante di coltura di CM pre-attivate con glicoforimi di IgA isolate dai sieri di pazienti con IgAN (28 ± 4 mFI). L'intensità di colorazione con falloidina per ASMA è risultata fortemente inibita parallelamente all'espressione di nefrina (da 50.9 ± 14 a 14.4 ± 5 IF q).

Conclusioni. L'espressione della nefrina nei podociti coltivati è modulata negativamente dai messaggi inviati dalle cellule mesangiali attivate dalle IgA ad alterata glicosilazione. Questa influenza viene proposta come meccanismo coinvolto nella patogenesi della proteinuria nell'IgAN.

(segue)

5

IgA1 AD ALTERATA GLICOSILAZIONE ATTIVANO TRASCRIZIONE E TRASLAZIONE DEL GENE GREMLIN IN CELLULE MESANGIALI IN CULTURA: NUOVE CONOSCENZE SUI MECCANISMI DI PROGRESSIONE DELLA NEFROPATIA A DEPOSITI IgA

Amore A¹, Mitola S², Manniello D¹, Balegno S¹, Mancuso D¹, Camilla R¹, Presta M², Coppo R¹
¹Nefrologia Dialisi Trapianto, Ospedale Regina Margherita, Torino; ²Cattedra di Patologia, Università di Brescia, Brescia

Introduzione. Le IgA ad alterata glicosilazione giocano un ruolo chiave nella patogenesi della glomerulonefrite a depositi IgA (IgAN). Abbiamo recentemente dimostrato che le IgA ad alterata glicosilazione, sia preparate *in vitro* che isolate da pazienti con IgAN, modulano la proliferazione/apoptosi delle cellule mesangiali (CM) in coltura e stimolano la sintesi di mediatori sclerogenici. Il TGFβ è considerato il maggior responsabile della progressione delle nefropatie verso la sclerosi. Il suo effettore finale è il CTGF, la cui attività è modulata da proteine inibitrici appartenenti alla famiglia di BMP e da antagonisti di BMP, come Gremlin. È stato recentemente dimostrato che CM esposte a stimoli sclerogeni, quali elevate concentrazioni di glucosio, esprimono Gremlin.

Scopi. Scopo di questo lavoro è stato di valutare se le IgA ad alterata glicosilazione modulano la trascrizione e la traslazione del gene Gremlin, regolando così la produzione di collagene e la sclerosi.

Materiali e metodi. CM umane in coltura sono state incubate con IgA native polimeriche (plgA) o con IgA ad alterata glicosilazione, desialilate (IgA deSia) o degalattosilate (IgA deSia deGal), 50 µg/ml, sia preparate *in vitro* (mediante trattamento enzimatico con Neuraminidasi e Degalattosidasi) che isolate *in vivo* da pazienti con IgAN (mediante cromatografia di affinità su colonne di Jacalin), per 6-12-24 ore. È stata valutata la trascrizione e la traslazione del gene codificante per Gremlin, CTGF e collagene di tipo I. I livelli di mRNA, quantificati in densitometria, sono stati espressi come rapporto con RNAm del gene costitutivo GAPDH in unità relative (U Rel), dopo misurazione densitometrica. La sintesi di proteine è stata valutata in western blot, quantificata in densitometria ed espressa come rapporto con la proteina costitutiva actina.

Risultati. L'attività trascrizionale era rilevabile solo dopo 12 ore di incubazione delle CM con IgA ad alterata glicosilazione ottenute con trattamento enzimatico *in vitro*.

	Gremlin mRNA (U Rel)	Gremlin proteina (U Rel)	CTGF mRNA (U Rel)	CTGF proteina (U Rel)	Coll tipo I mRNA (U Rel)	Coll tipo I proteina (U Rel)
Basale	1	1	1	1	1	1
plgA	1.01±0.01	1.00±0.01	1.02±0.1	1.02±0.01	1.015±0.02	1.03±0.02
deSia IgA	1.25±0.12*	1.35±0.12*	1.72±0.2§	1.42±0.2*	1.13±0.2*	1.39±0.02*
deSia/deGal IgA	1.92±0.3§	2.15±0.3§	2.20±0.5§	1.89±0.22§	1.72±0.25§	1.97±0.21§

** P < 0.05; § P < 0.01

Simili risultati si ottenevano quando le CM venivano incubate con IgA ad alterata glicosilazione ottenute da pazienti affetti da IgAN.

Conclusioni. IgA ad alterata glicosilazione incubate con CM in coltura modulano la casca di eventi biologici innescati dal TGF-α, regolando non solo l'espressione del gene CTGF, ma anche l'espressione e la sintesi del gene Gremlin, molecola inibitoria che appartiene alla famiglia degli antagonisti delle BMP.

(segue)

6

EFFETTI DELLA SIMPATICTOMIA SULLA FIBROGENESI RENALE INDOTTA DA ANGIOTENSINA II NEL RATTO

Cabassi A¹, Cremaschi E¹, Ugotelli M¹, Cavalli S², Lagrasta C², Graiani G², Cantoni AM³, Montanari A⁴, Bacci ML⁵, Bernardini C⁵, Borghetti A¹, Fiaccadori E¹
¹Dipartimento di Clinica Medica e Nefrologia, Università degli Studi di Parma, Parma; ²Sezione di Anatomia Patologica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio; ³Dipartimento di Salute Animale; ⁴Dipartimento di Scienze Cliniche, ⁵Dipartimento DIMORFIPA, Università degli Studi di Bologna, Bologna

Introduzione. Il ruolo fibrogenico dell'Angiotensina II (Ang II) è chiaramente conosciuto in vari tessuti, compreso il parenchima renale; tuttavia l'importanza del sistema nervoso simpatico nella modulazione della fibrogenesi indotta dall' Ang II non è ancora ben definita. **Scopi.** Il nostro studio ha valutato gli effetti della simpaticotomia chimica (SP) sulla fibrogenesi renale indotta da Ang II. **Materiali e metodi.** Quattro gruppi concorrenti (n=8) di ratti maschi Sprague-Dawley sono stati studiati: 1) ratti controllo (CTR) infusi con veicolo; 2) ratti infusi con Ang II ad alti dosaggi (525 ng/kg/min), attraverso minipompe osmotiche per una durata di dodici giorni; 3) ratti infusi con Ang II e sottoposti a SP con 6-OH-dopamina (200 mg/kg), somministrata mediante iniezioni intraperitoneali a partire dal giorno precedente l'impianto della minipompa fino al dodicesimo giorno di infusione dell'Ang II (quattro dosi in totale, una ogni tre giorni); 4) ratti simpaticotomizzati solamente. L'efficacia della SP è stata verificata dal riscontro della riduzione dell'attività della Tirosina Idrossilasi (< 20% nei gruppi simpaticotomizzati). **Risultati.** I ratti infusi con Ang II presentavano livelli pressori elevati mentre non significative erano le differenze tra il gruppo CTR e il gruppo dei ratti solamente simpaticotomizzati. La SP ha attenuato il rialzo della pressione arteriosa mediata dalla Ang II e ha comportato una riduzione della fibrosi totale, della quantità di collagene di tipo III, dell'espressione del Transforming growth factorβ, (TGFβ) e di α-Smooth muscle actin (αSMA) soprattutto nell'area perivascolare. L'Ang II ha causato un aumento del collagene di tipo I rispetto al gruppo CTR; un ulteriore aumento si è osservato nei gruppi di ratti simpaticotomizzati, indipendentemente dal trattamento con Ang II. La SP ha inoltre indotto significative alterazioni strutturali (atrofia epiteliale e dilatazione tubulare) con espressione di αSMA nell'interstizio peritubulare e di TGF, a livello dell'orletto a spazzola. **Conclusioni.** I nostri risultati mostrano che il sistema adrenergico è coinvolto nella modulazione dell'effetto fibrogenico dell'Ang II con modificazioni nel contenuto di collagene totale ma anche nella qualità del collagene fibrillare.

7

STUDIO DELL'ESPRESSIONE DEL CANALE DEL CLORO CLC-5 IN BIOPSIE RENALI MICRODISSEZIONATE DI NEFROPATIE PROTEINURICHE E IN CELLULE RENALI IN CULTURA

Tiralongo E¹, Ceol M¹, Tosetto E¹, Mezzabotta F¹, Antonucci F², Anglani F¹, D'Angelo A¹, Del Prete D¹
¹Clinica Nefrologica, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Padova, Padova; ²UOC di Nefrologia e Dialisi, Ospedale di Feltre, Belluno

Introduzione. Studi condotti in animali knockout per il gene CLCN5 ed in pazienti con malattia di Dent, hanno fornito maggiori informazioni sui meccanismi che presiedono al riassorbimento tubulare dell'albumina. **Scopo.** Per comprendere la relazione esistente tra questo meccanismo e le malattie renali proteinuriche, abbiamo studiato l'espressione del gene CLCN5 in biopsie (bp) renali microdissezionate di pazienti con nefropatia da IgA e diabetica (diabete tipo 2). **Metodi.** Mediante Real-time PCR è stata analizzata l'espressione del gene CLCN5 in bp renali microdissezionate ottenute da pazienti con nefropatia da IgA (n° 10) e nefropatia diabetica (n° 9). Sono state prese come controllo bp (corticale) di reni normali (polo indenne da nefrectomia per tumore n° 9). Inoltre sono state analizzate cellule mesangiali (HMC), endoteliali (HuVEC), tubulari (HTC) e podociti (HP) umane in condizioni basali e le HMC anche in alto glucosio (30 mM a 24 e 48 h). Come gene housekeeping è stata usata la G3PDH. **Risultati.** 1) L'espressione di CLC-5 è stata osservata in tutte le biopsie analizzate sia a livello tubulo-interstiziale che a livello glomerulare, così come in tutti i tipi cellulari analizzati. 2) Non è emersa nessuna differenza significativa nell'espressione di CLC-5 nei due compartimenti analizzati [glomeruli (gl) e tubulo-interstizio(ti)] sia nelle bp diabetiche che nelle bp da nefropatia da IgA. 3) In entrambe le nefropatie i livelli di espressione di CLC-5 erano significativamente maggiori rispetto alle bp di controllo [gl IgA vs bp controllo p<0.006; gl diabetici vs bp controllo p<0.008; ti diabetici vs bp controllo p>0.001]. 4) Tra tutti i tipi cellulari analizzati, nelle HMC i livelli di espressione di CLC-5 sono risultati maggiori pur non raggiungendo la significatività statistica. 5) Il trattamento in alto glucosio a 24 e 48 ore delle HMC non ha evidenziato nessuna modificazione significativa nell'espressione di CLC-5. **Conclusioni.** Il nostro studio evidenzia per la prima volta la presenza del CLC-5 a livello glomerulare, e indica che tra le cellule glomerulari quelle mesangiali presentano livelli di espressione maggiori. Gli elevati livelli di espressione trovati in entrambe le nefropatie proteinuriche, suggeriscono un suo coinvolgimento. I risultati ottenuti nel modello *in vitro* escludono un ruolo determinante del glucosio nella up regolazione di CLC-5 nella glomerulopatia diabetica. Il riscontro di alti livelli di espressione di CLC-5 nei due compartimenti renali nelle nefropatie proteinuriche apre nuove prospettive di studio sul suo ruolo a livello glomerulare e induce a ipotizzare una correlazione funzionale tra proteinuria e espressione di CLC-5 tubulointerstiziale.

9

ESPRESSIONE DI TOLL-LIKE RECEPTOR-4 (TLR-4) RNAm NEI MONOCITI DI PAZIENTI CON IgAN

Amore A¹, Peruzzi L¹, Mancuso D¹, Balegno S¹, Manniello D¹, Camilla R¹, Lin X¹, Sepe V², Dal Canton A², Coppo R¹
¹S.C di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Ospedale Regina Margherita, Torino; ²Nefrologia, Università di Pavia, Pavia

Introduzione. I TLR sono regolatori della risposta immunitaria innata ed adattativa conservati nell'evoluzione, che si ritiene siano coinvolti nell'infiammazione renale. Questi recettori riconoscono pattern molecolari associati a batteri, virus e varie molecole leganti. Essi promuovono l'attivazione di leucociti e cellule renali intrinseche, stimolando l'espressione di geni dipendenti da fattori trascrizionali quali NF-kB. Il TLR-4 è considerato la componente critica del sistema dei recettori per LPS. **Scopi.** Scopo dello studio è stato indagare la risposta immunitaria innata nella nefropatia a depositi di IgA (IgAN), una malattia il cui rapporto con le infezioni delle mucose rimane ancora discusso e non definito. **Materiali e metodi.** Abbiamo studiato l'espressione dell'RNA messaggero codificante per il TLR-4 nei linfomonociti periferici di 37 soggetti (18 con bassa proteinuria < 0.5 g/die e 19 con proteinuria elevata compresa tra 0.5 e 6 g/die) e 30 controlli sani (HC). L'espressione dell'RNA codificante per il TLR-4 nei linfomonociti è stata misurata in real-time PCR (TaqMan PCR) e l'attivazione di NF-kB è stata indagata studiando l'attività di legame nucleare della subunità p50 di NF-kB mediante electrophoretic mobility super shift assay (EMSA). **Risultati.** I monociti sono risultati produrre il messaggio per TLR-4. I risultati della RT-PCR normalizzati per il gene costituzionale ABL (U Rel), i dati densitometrici dell'EMSA (OD) e la significatività delle differenze rispetto ai controlli sani sono riportati nella tabella.

	Proteinuria g/die	TLR-4 mRNA (U Rel)	p vs HC	NF-kB P50 OD	p vs HC
Controlli sani	0	1.04±0.32		104±25	
IgAN (18 pazienti)					
Bassa proteinuria <0.5 g/die	0.25±0.13	1.05±0.46	NS	160±30	< 0.02
IgAN (19 soggetti)					
Proteinuria elevata 0.5-6 g/die	1.84±1.17	1.57±1.04	< 0.05	159±113	< 0.02

Conclusioni. Una significativa correlazione lineare è stata osservata tra mRNA codificante per il TLR-4 e la traslocazione nucleare di NF-kB p50 (r2:0.41, P=0.023). In conclusione questo studio dimostra che i TLR-4 e il sistema di NF-kB sono attivati nei monociti dei pazienti con IgAN in fase proteinurica, suggerendo un coinvolgimento dell'immunità innata in questa nefropatia.

8

RUOLO DELL'ATTIVAZIONE DI C-JUN N-TERMINAL KINASE (JNK) NELL'APOPTOSI INDOTTA DAGLI ANDROGENI NELLE CELLULE TUBULARI DELL'UOMO

Verzola D, Procopio V, Gandolfo MT, Villaggio B, Famà A, Di Martino M, Lauria F, Tosetti F, Deferrari G, Garibotto G
 Divisione di Nefrologia, Dipartimento di Medicina Interna (Di.M.I.), Università di Genova, Genova

Introduzione. I meccanismi mediante i quali gli ormoni sessuali possono favorire la progressione dell'insufficienza renale cronica terminale non sono noti. Recentemente, abbiamo dimostrato che il testosterone (T), anche a concentrazioni fisiologiche, induce apoptosi delle cellule tubulari prossimali umane mediante l'attivazione della via estrinseca Fas/FasL dipendente (K1, 65: 1252-1261, 2004). **Scopo.** Valutare gli effetti del T sul suo recettore (AR) e il coinvolgimento a valle di JNK nell'apoptosi in cellule tubulari prossimali (HK-2). **Materiali e Metodi.** La localizzazione di AR è stata analizzata mediante Western Blot e analisi al microscopio confocale a scansione laser. L'attivazione di JNK è stata visualizzata mediante Western Blot e immunodeterminazione (anticorpo anti-JNK fosforilato). L'apoptosi è stata valutata mediante colorazione con annexina V-propidio ioduro e la valutazione di FasL, FADD e caspasi-8 mediante immunofluorescenza e Western Blot. **Risultati.** Le cellule sono state trattate con T (10 nmol/L) per diversi intervalli di tempo (t=0-60 min). In assenza di T (t=0), AR è localizzato prevalentemente nel citoplasma, mentre la presenza del suo ligando ne induce la traslocazione a livello nucleare già dopo 5-15 min (a questo tempo il segnale nucleare è al suo picco). Dopo 60 min dal trattamento, il segnale nucleare ritorna a livelli basali. Ciò indica che le cellule tubulari sono dotate di una sensibilità elevata e di una risposta rapida al T. Come passo successivo abbiamo valutato gli effetti del T sull'attivazione di JNK e i rapporti con l'apoptosi. A tale scopo le cellule sono state trattate con T per vari intervalli di tempo (a breve: 5-60 min e a lungo: 48 ore). Si è osservato che tale chinasi è attivata già dopo 15 minuti dal trattamento con il T e che tale condizione persiste fino a 48 ore. L'effetto di tale attivazione sull'apoptosi è stato valutato pre-trattando le cellule con SP600125 (10 μmol/L), un inibitore di JNK. Esso ha bloccato l'apoptosi indotta dal T (T 30±6%, T+SP 17±2%, p<0.01 vs T) come pure la maggiore espressione delle proteine FasL e FADD (-40, -30%, p<0.05). Il trattamento con SP600125 ha inibito anche l'espressione del frammento p10 della caspasi-8 (-30%, p<0.05). **Conclusioni.** Questi risultati indicano che il recettore del T è immediatamente regolato dagli androgeni *in vitro* e mettono in evidenza un meccanismo potenzialmente in grado di portare alla perdita della massa nefronica nell'uomo. Questi studi suggeriscono, inoltre, che JNK e il recettore per gli androgeni possono costituire nuovi target terapeutici nel trattamento della progressione del danno renale cronico.

10

CARCINOMA RENALE A CELLULE CHIARE (RCC) E IMMUNITÀ: ANALISI MOLECOLARE DEL GENE JAK3 ED IDENTIFICAZIONE DI NUOVE MUTAZIONIDe Martino M¹, Gigante M², Cavalcanti E³, Carrieri G¹, Cormio L¹, Mancini V⁴, Battaglia M⁴, Gesualdo L², Ranieri E⁵¹Clinica Urologica e Centro Trapianti di Rene, Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Università degli Studi di Foggia, Foggia; ²Nefrologia Universitaria, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Foggia, Foggia; ³DETO-Divisione di Nefrologia, Università degli Studi di Bari, Bari; ⁴DETO-Divisione di Urologia Chirurgica, Università degli Studi di Bari, Bari; ⁵Patologia Clinica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Foggia, Foggia

Introduzione. Il carcinoma renale a cellule chiare (RCC) è un sottotipo istologico che sembra rispondere ad approcci immunoterapici. Si pensa che meccanismi immunomediati possano giocare un ruolo importante nel limitare la crescita tumorale e che le cellule T siano i principali effettori nel regolare la progressione tumorale *in situ*. La proteina JAK3 e la sua interazione con il recettore delle cellule T ha un ruolo chiave nell'attivazione della risposta linfocitaria antigene-specifica.

Scopo. Scopo di questo lavoro è stato valutare in pazienti con RCC la presenza di variazioni nucleotidiche del gene JAK3 che possano influenzare la suscettibilità alla malattia.

Pazienti e metodi. Una analisi di mutazione del gene JAK3 è stata effettuata su 100 pazienti Italiani con RCC e 100 donatori sani. Dopo consenso informato ed estrazione del DNA genomico, le indagini molecolari sono state realizzate mediante PCR e Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC). I prodotti di PCR con un profilo di eluizione aberrante sono stati riamplicati, purificati e sequenziati.

Risultati. Lo screening di mutazione ha permesso di individuare in 7 pazienti RCC 4 mutazioni missense in eterozigosi a livello della regione codificante del gene JAK3, assenti nella popolazione di controllo. Il primo paziente ha presentato un cambio nucleotidico a livello dell'esone 1 (c.37C>A), che determina una sostituzione aminoacidica (p.Q13K) nel dominio proteico FERM, fondamentale per il legame con i recettori delle citochine e per la regolazione catalitica. Il secondo paziente ha mostrato la mutazione c.2773C>A che causa il cambio aminoacidico p.R925S a livello del dominio chinasi, particolarmente conservato ed essenziale per la funzionalità proteica. Il terzo paziente è risultato eterozigote composto per due mutazioni missense: c.2029G>A e c.2164G>A. Entrambe le mutazioni causano una sostituzione aminoacidica (p.A677T e p.V722I) a livello del dominio pseudochinasi, importante per la regolazione dell'attività chinasi della proteina. La mutazione p.V722I è stata riscontrata in altri 4 pazienti RCC del presente studio e in un paziente affetto da Severe Combined Immunodeficiency (SCID), una rara sindrome ereditaria caratterizzata da linfopenia (Schumacher et al, Hum Genet 2000). Inoltre, sono state individuate 3 mutazioni silenti

(segue)

UNA NOS DI TIPO ENDOTELIALE FUNZIONALE È ESPRESSA NEGLI ERITROCITI UREMICI E PUÒ CONTRIBUIRE AL POOL DELL'OSSIDO NITRICO CIRCOLANTESirolli V¹, Pandolfi A^{2,3}, Di Pietro N^{2,3}, Giardinelli A^{2,3}, Di Silvestre S², Amoroso L¹, Di Tomo P^{2,3}, Bonomini M¹¹Dipartimento di Medicina e Scienze dell'Invecchiamento, Università G. D'Annunzio, Chieti-Pescara; ²Dipartimento di Biomorfologia, Università G. d'Annunzio, Chieti-Pescara; ³Fondazione "Università G. d'Annunzio", CE.S.I., Chieti-Pescara

Introduzione. L'ossido nitrico (ON) è un radicale libero gassoso che funge da vasodilatatore, inibisce l'infiammazione e ha effetti antiaggreganti sulle piastrine. La sintesi di ON nel torrente circolatorio è stata attribuita esclusivamente all'endotelio vascolare esprimente l'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS), un enzima che sintetizza ON attraverso la conversione di L-arginina in L-citrullina. I globuli rossi (GR) sono stati generalmente considerati come riduttori di ON a causa del loro contenuto di emoglobina. Tuttavia, recenti evidenze, suggeriscono che una proteina simile all'eNOS, attiva a funzionale, possa essere presente in GR umane, sebbene questa ipotesi sia ancora dibattuta. La biodisponibilità di ON è ridotta nei pazienti con uremia cronica e potrebbe avere conseguenze cardiovascolari e renali. Attualmente non è noto se i GR di pazienti uremici esprimono una proteina attiva simile all'eNOS, che potrebbe contribuire al pool circolante di ON.

Scopi. Nel presente studio abbiamo sviluppato un approccio metodologico specifico per determinare localizzazione ed eventuale attività dell'enzima NOS in eritrociti uremici.

Pazienti e metodi. I GR sono stati ottenuti da 8 pazienti affetti da uremia cronica. Dopo purificazione delle cellule rosse, la Real Time PCR ha identificato l'RNA codificante l'eNOS e la proteina eNOS è stata localizzata con immunofluorescenza confocale in ogni singolo GR isolato. Tale proteina è stata localizzata nella membrana plasmatica e nel citoplasma del globulo rosso.

Risultati. L'attività enzimatica della NOS eritrocitaria è stata determinata mediante la specifica conversione della 3H-arginina in 3H-citrullina: tale tecnica ha mostrato una attività funzionale di tipo eNOS per la proteina NOS eritrocitaria.

Conclusioni. I nostri risultati indicano che una proteina simile all'eNOS, funzionalmente attiva, è presente nei GR uremici. Gli eritrociti potrebbero pertanto contribuire al pool circolante di ON in pazienti affetti da uremia cronica, e nuove strategie indirizzate ad aumentare l'espressione e l'attività della ON sintasi dei GR potrebbero essere rilevanti per antagonizzare l'aterosclerosi in questi pazienti.

e 17 varianti nucleotidiche nella regione non codificante del gene JAK3.

Conclusioni. In questo studio abbiamo riportato per la prima volta uno screening di mutazione del gene JAK3 in pazienti con RCC. Sono state identificate 4 mutazioni missense in 7 diversi pazienti. Tre mutazioni (p.Q13K; p.A677T; p.R925S), descritte per la prima volta nel presente lavoro, sono localizzate in importanti domini funzionali, per cui è verosimile ipotizzare che possano compromettere la funzionalità della proteina JAK3 e la risposta immune dei pazienti RCC. Ulteriori indagini sono in corso al fine di valutare l'esatto ruolo funzionale delle mutazioni identificate.

LE CELLULE DENDRITICHE GENERATE CON IFN-alfa (IFN-α-CONDITIONED DC) STIMOLANO PREFERENZIALMENTE CELLULE Tc1 EFFETTRICI IN PAZIENTI CON CARCINOMA RENALE (RCC)Gigante M¹, Mandic M², Wesa AK², Cavalcanti E³, D'Ambrosio M¹, Ambrosi A¹, Schena FP³, Mancini V⁴, Battaglia M⁴, Gesualdo L⁵, Storkus WJ², Ranieri E⁶¹Dipartimento di Chirurgia, Università di Foggia, Foggia; ²Dipartimento di Dermatologia, Università di Pittsburgh, USA; ³D.E.T.O., Nefrologia, Università di Bari, Bari; ⁴DETO-Sezione di Urologia, Università di Bari, Bari; ⁵Dipartimento di Scienze Biomediche, Nefrologia, Università di Foggia, Foggia; ⁶Dipartimento di Scienze Biomediche, Patologia Clinica, Università di Foggia, Foggia

Introduzione. Le cellule dendritiche (DC) sono le più potenti cellule presentanti l'antigene e rappresentano importanti candidati per lo sviluppo di nuove strategie immunoterapiche nei pazienti con RCC, una neoplasia che si è dimostrata refrattaria a diverse modalità di trattamento, quali la chemio- e la radioterapia. Recenti studi nell'immunoterapia del cancro suggeriscono che l'IFN-α è un importante adiuvante per lo sviluppo di vaccini basati su DC con elevata efficacia clinica.

Scopo. Data la percepita necessità di aumentare l'attività delle cellule effettrici anti-tumorali Tc1 (Tipo 1 CD8+ T) come endpoint terapeutico e la conosciuta capacità delle popolazioni di DC di promuovere risposte immuni Tc1, abbiamo eseguito studi preliminari per definire una preparazione ottimale di DC con tali caratteristiche. Sono state paragonate due differenti preparazioni di DC derivate da monociti utilizzando IFN-alfa (IFN-DC e α-DC-1) con le DC convenzionali (mDC) "mature" con il classico cocktail di citochine IL-1α/IL-6/TNF-α/PGE₂, per la loro capacità di promuovere risposte autologhe di tipo Tc1 in pazienti RCC e donatori sani. Inoltre abbiamo valutato l'effetto che le differenti preparazioni di DC esercitano sulla popolazione delle cellule T regolatorie (Treg), note in quanto esercitano una potente down-regolazione della risposta immune antitumorale.

Metodi. Mediante saggi di stimolazione *in vitro* (IVS), sono state indotte risposte di linfociti T tumore-specifiche con conseguente loro attivazione e proliferazione. Pertanto, tali cellule linfocitarie sono state caratterizzate nel tempo, al giorno 0 e al giorno 14 mediante analisi citofluorimetrica e saggi di Elispat per IFN-α.

Risultati. Abbiamo dimostrato che le "IFN-α conditioned DC" esprimono livelli più alti di molecole di attivazione/costimolazione HLA-DR, CD83, CD40, CD86 e CD80 rispetto alle DC classiche. Inoltre le "IFN-α-conditioned DC" promuovono efficacemente una più forte risposta T cellulare di tipo Tc1 rispetto alle DC convenzionali. Inoltre le DC generate secondo il metodo classico esercitano una maggiore espansione delle Treg (CD4+ CD25+ Foxp3+) rispetto alle "IFN-α-conditioned DC".

Questi dati enfatizzano un importante ruolo dell'IFN-α nel modulare le funzioni immunologiche delle DC verso un tipo polarizzato DC1 in grado di promuovere una risposta immune T-cellulo-mediata ed antigene-specifica di tipo Th1/ Tc1.

Conclusioni. L'insieme di questi risultati preliminari suggerisce che "IFN-α-conditioned DC" possono avere potenzialità particolari per lo sviluppo di una nuova strategia immunoterapica in pazienti RCC dove le cellule effettrici tumore-specifiche Tc1 potrebbero essere non funzionali, anergiche e apoptotiche.

LA LISINA (L) PROMUOVE L'APOPTOSI DELLE CELLULE TUBULARI. IMPLICAZIONI NELLA PATOGENESI DEL DANNO RENALE CRONICO DEI PAZIENTI CON INTOLLERANZA ALLE PROTEINE E LISINURIA (LPI)

Famà A¹, Verzola D¹, Villaggio B¹, Procopio V¹, Di Rocco M², Cappelli V¹, Sofia A¹, Garibotto G¹

¹Divisione di Nefrologia, Dipartimento di Medicina Interna (Di.M.I.), Università degli Studi di Genova, Genova; ²Il Divisione Pediatria, Istituto G. Gaslini, Genova

Introduzione. La LPI è una malattia rara, causata da un difetto congenito del trasporto di aminoacidi cationici a livello della membrana basolaterale delle cellule epiteliali di intestino e rene. La LPI, che si manifesta attraverso aminoaciduria selettiva, è caratterizzata clinicamente da malnutrizione, iperammoniemia, anomalie ematologiche e malattia cronica polmonare e renale. Non si conoscono i meccanismi con i quali elevate concentrazioni di L inducono il danno renale. Nell'animale, l'infusione di L può causare necrosi tubulare acuta. Tuttavia, i meccanismi con i quali gli elevati livelli urinari e clearance di L, osservati in corso di LPI, possono favorire il danno renale cronico, sono ancora sconosciuti.

Scopo. Valutare gli effetti della L su necrosi e apoptosi di cellule tubulari umane in coltura ed i meccanismi correlati.

Materiale e metodi. Cellule tubulari umane (HK-2) erano cresciute fino a sub-confluenza in un normale terreno di coltura e, successivamente deprivate di siero e fattori di crescita, erano trattate con concentrazioni di L che simulano la concentrazione urinaria di L nella LPI (1 mM-10 mM) per 48 ore. L'apoptosi era valutata mediante colorazione con annessina V-propidio ioduro, le proteine coinvolte nell'apoptosi (Bax/Bcl-2) mediante Western blot, e le variazioni di potenziale di membrana mitocondriale mediante colorazione con Mitocapture. La vitalità cellulare era valutata mediante MTT e rilascio di LDH.

Risultati. Effetti pro-apoptotici non erano osservati a concentrazioni di L nel range alto della norma (1 mM), mentre l'apoptosi aumentava del 30% (+30% vs i controlli p<0.01) a concentrazioni di L 10 mM (concentrazione che si osserva comunemente nelle urine di pazienti con LPI). A queste concentrazioni la L non aveva effetto citotossico. L'inibizione delle Caspasi -9 (Z-LEHD-FMK) e -3 (DEVD-CHO) (50 µM), ma non della Caspasi -8 (Z-IEDT-FMK), impediva la comparsa dell'apoptosi indotta dalla L. Il 95% delle cellule di controllo avevano mitocondri intatti, mentre solo il 65% delle cellule tubulari presentavano condizione se trattate con L 10 mM (p<0.05). Le espressioni di Bax e di Apaf-1 (mediatore della via mitocondriale) erano chiaramente up-regolate (+30-50%, p<0.05). La Bcl-2 era down-regolata (-50%; p<0.01).

Conclusioni. Questi risultati indicano che la L ha un effetto pro-apoptotico dose-dipendente sulle cellule tubulari prossimali. Gli effetti della L comprendono l'attivazione della via intrinseca recettore indipendente. Questo meccanismo può essere alla base della perdita di cellule renali e alla progressione del danno renale cronico che si osserva nei pazienti con LPI.

14

CONCENTRAZIONE PLASMATICA DELLE CELLULE PROGENITRICI ENDOTELIALI IN PAZIENTI CON LES TRATTATI CON ALTE DOSI DI IMMUNOGLOBULINE UMANE PER VIA ENDOVENOSA

Campo S, Coppolino G, Sturiale A, Bolignano D, Giacobbe MS, Buemi M
Dipartimento di Medicina Interna, Cattedra di Nefrologia, Università di Messina, Messina

Introduzione. La terapia endovenosa con immunoglobuline umane ad alte dosi è stata impiegata efficacemente nel trattamento sostitutivo dei deficit anticorpali e nella terapia di numerose patologie infiammatorie ed autoimmunitarie, come la sindrome di Guillain-Barré, la porpora trombocitopenica idiopatica, le neuropatie autoimmuni ed il lupus eritematoso sistemico. I meccanismi d'azione delle immunoglobuline non sono ancora noti.

Il lupus eritematoso sistemico è una patologia sistemica infiammatoria cronica di probabile eziologia autoimmune. Le cellule endoteliali sono attivamente coinvolte nella risposta infiammatoria ed autoimmune; esse originano da cellule progenitrici mobilizzate dal midollo osseo (EPCs), presenti nel torrente circolatorio, che si localizzano nelle sedi di infiammazione ed angiogenesi.

Scopo dello studio. Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare la concentrazione di EPC in pazienti con LES prima e dopo una singola somministrazione endovenosa di immunoglobuline.

Pazienti e metodi. I livelli di EPC sono stati dosati in campioni di sangue di 25 pazienti (età media 42±6.7) affetti da LES, diagnosticato secondo i criteri dell'American College of Rheumatology, prima e dopo la somministrazione endovenosa di immunoglobuline (400 mg/Kg). La marcatura e l'analisi sono state eseguite secondo le linee guida ISHAGE (International Society of Hemotherapy and Graft Engineering). Le EPC sono state identificate in base all'espressione di antigeni di superficie (CD34, CD133, VEGFR2) mediante tripla marcatura e contate con tecnica PROCOUNT™ (BD Biosciences), una metodica di citometria a flusso multiparametrica eseguita con citometro FACSort (BD Biosciences). Sono state calcolate le medie e le deviazioni standard per tutte le variabili. Il livello di EPC circolanti è stato calcolato come numero di cellule per microlitro. L'analisi statistica della varianza dei gruppi è stata eseguita mediante 1-way ANOVA seguita da Fisher Test per comparare i valori della varianza ai diversi tempi di osservazione.

Risultati. Il numero di cellule CD34+ risultava aumentato dopo somministrazione di IVIG (p<0.05). Al contrario, il trattamento con immunoglobuline determinava una marcata riduzione del numero di EPC rispetto ai livelli basali (p<0.01).

Conclusioni. I nostri risultati suggeriscono che l'effetto positivo delle immunoglobuline osservato nei pazienti con LES potrebbe dipendere da una riduzione del numero di cellule endoteliali secondario ad una ridotta mobilizzazione di precursori dal midollo e ad una down regulation dell'espressione di molecole coinvolte nell'origine e nella progressione del processo infiammatorio.

16

DIMOSTRAZIONE IN SITU DI IgA DEGALATTOSILATE E STUDIO DEI LORO RAPPORTI SPAZIALI CON IL C3 NEGLI IMMUNODEPOSITI DELLA NEFROPATIA DA IgA

Giannakakis K¹, Feriozzi S², Perez M³, Faraggiana T¹, Onetti Muda A¹

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università "La Sapienza", Roma; ²Nefrologia e Dialisi, ASL Viterbo, Viterbo; ³Dipartimento di Istopatologia, IDI IRCCS, Roma

Introduzione. La nefropatia da IgA (IgAN) è caratterizzata dalla presenza di immuno-depositi (ID) mesangiali di molecole IgA1. La causa e il meccanismo della deposizione delle IgA1 non sono completamente noti. Recentemente è stato riconosciuto un ruolo patogenetico all'alterata O-glicosilazione delle IgA1: nel siero di pazienti con IgAN è stato dimostrata la presenza di molecole di IgA1 con ridotte quantità di galattosio e/o acido sialico con conseguente esposizione della sottostante molecola di N acetilgalattosamina. Tale alterazione porterebbe ad un'elevata affinità per il mesangio con formazione di ID, attivazione del complemento e dei mediatori della flogosi (integrine, fattori trascrizionali etc.) e conseguenti lesioni glomerulari variabili da una minima espansione mesangiale fino a una grave proliferazione e necrosi.

Scopo. Lo scopo dello studio è stato di indagare la possibile presenza di molecole IgA1 con alterata galattosilazione negli ID; di valutare, inoltre il ruolo della loro presenza e del loro rapporto reciproco spaziale con il C3 nella patogenesi delle lesioni infiammatorie glomerulari.

Materiali e metodi. Lo studio è stato effettuato tramite l'utilizzo della microscopia confocale Laser di ultima generazione applicata su biopsie renali di 20 pazienti con IgAN istologicamente dimostrata, creatininemia ≤1.5 mg/dl con follow-up di 22.9±19.6 mesi.

Su sezioni biopiche criostatizzate, sono state valutate, mediante doppia fluorescenza indiretta, il grado di esposizione sulla superficie dei depositi di IgA e C3 (rIgA e rC3c) e l'intensità di colocalizzazione tra IgA e *Arachis Hypogaea* (Peanut), lectina quest'ultima con affinità specifica per le molecole di galattosio. Tutte le valutazioni ottenute dalle ricostruzioni tridimensionali sono state messe in correlazione con la gravità istopatologica dei casi espressa come *Indice Infiammatorio Glomerulare* (G.I.I.) derivato dalla somma della valutazione semiquantitativa di parametri glomerulari come la proliferazione cellulare, l'essudazione leucocitaria, la necrosi fibrinoide e le semiline.

Risultati. I risultati dimostrano la presenza di variabile quantità negli ID di molecole IgA1 ipoglicosilate (non leganti la lectina Peanut). Il loro grado di degalattosilazione era significativamente correlato con il G.I.I. (p<0.01) e con il rC3 (p=0.05) fattore quest'ultimo a sua volta in diretta correlazione con il G.I.I. (p=0.028); non vi era invece alcuna correlazione tra area totale dei depositi e G.I.I.

Conclusioni. I nostri dati dimostrano per la prima volta la presenza negli ID glomerulari della IgAN di variabile quantità di molecole IgA1 degalattosilate e la loro importanza sul tipo di organizzazione spaziale degli ID. Inoltre tale organizzazione espressa come rIgA/rC3c è decisiva nel determinare la risposta infiammatoria glomerulare nella IgAN.

15

DANNO GENOMICO IN CELLULE PROGENITRICI ENDOTELIALI DI PAZIENTI UREMICI IN TRATTAMENTO EMODIALITICO

Floccari F¹, Coppolino G², Costa C², Loddò S², Arena A², Bolignano D², Sturiale A², Polito P¹, Teti D², Buemi M²

¹UOC di Nefrologia, Ospedale di Tivoli, Tivoli, Roma; ²Dipartimento di Medicina Interna, Cattedra di Nefrologia, Università di Messina, Messina

Introduzione. Durante l'emodialisi l'endotelio è il primo organo a percepire e subire gli stimoli meccanici, come pressione e shear stress, e quelli immunologici. Le cellule endoteliali danneggiate (ECs) possono essere riparatate dalla migrazione di cellule della parete vascolare preesistenti o dal reclutamento di cellule staminali provenienti dal midollo osseo. Queste cellule divengono progenitrici endoteliali (EPCs) e circolano nel sangue verso il sito di danno vascolare. I pazienti con ESDR in trattamento emodialitico mostrano una riduzione nel numero e nella funzionalità di queste EPC sebbene le ragioni di questo fenomeno non siano note.

Scopi. L'obiettivo del nostro studio è quello di verificare il numero e, utilizzando la tecnica di COMET assay, l'eventuale danno genomico delle EPC ottenute da pazienti in dialisi in comparazione con quelle di volontari sani della stessa età.

Materiali e metodi. Abbiamo quantificato le EPCs in campioni di sangue ottenuti da 28 pazienti in emodialisi (HDF) per 3.5/4 ore 3 volte a settimana ed in 15 controlli. Campioni di sangue sono stati prelevati al momento dell'inizio della dialisi (T0) ed alla fine del trattamento (Tend). Le analisi sono state eseguite secondo le linee guida ISHAGE (International Society of Hemotherapy and Graft Engineering). Le EPCs sono state identificate e quantificate attraverso l'espressione di antigeni di superficie (CD34+, CD133+ e VEGFR2+) utilizzando un citofluorimetro a flusso. Abbiamo quindi stimato il danno genomico. Dopo isolamento delle cellule CD34+ con tecniche immunomagnetiche, campioni di sangue sono stati raccolti per testare il danno genomico utilizzando il COMET assay. Analisi statistiche della varianza tra gruppi sono state eseguite tramite ANOVA seguito da Fisher test.

Risultati. I nostri dati hanno mostrato un numero di EPC circolanti significativamente minore nei pazienti uremici rispetto al gruppo di controllo (p<0.01). Il COMET assay ha evidenziato livelli di danno genomico significativamente più elevate nelle EPCs ottenute da pazienti uremici che nei controlli (p<0.01). È stato riscontrato inoltre un più elevato danno genomico dopo trattamento emodialitico.

Conclusioni. Queste scoperte suggeriscono che l'uremia può rappresentare una potenziale fonte di danno, probabilmente attraverso l'azione ossidativa dei componenti del circuito extracorporeo o in risposta ad un'aumentata sensibilità al danno genomico. La disfunzione endoteliale nei pazienti con ESDR in emodialisi risultante da una riparazione vascolare difettosa che coinvolge la mobilizzazione dei progenitori endoteliali, il reclutamento e l'homing nel sito di danno vascolare, può rappresentare un determinante importante nell'aumentata mortalità di questa popolazione.

17

POTENZIALI APPLICAZIONI DELLE CELLULE STAMINALI NELLE PATOLOGIE RENALI: IMPIEGO DI MOLECOLE SINTETICHE PER IL DIFFERENZIAMENTO IN PROGENITORI RENALI

Bianchi F¹, La Manna G¹, Cantoni S², Cavallini C², Cappuccini ML¹, Persici E¹, Scolari MP¹, Perbellini A², Ventura C², Stefoni S¹

¹Cattedra di Nefrologia, Centro Trapianto di Rene, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Bologna; ²Laboratorio di Biologia Molecolare e Ingegneria delle Cellule Staminali, Istituto di Malattie dell'Apparato Cardiovascolare, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Bologna

Introduzione. Il trapianto renale rappresenta a tutt'oggi l'opzione terapeutica migliore per i pazienti con insufficienza renale cronica, ma con alcuni limiti fondamentali, quali la scarsità di organi disponibili, la necessità di immunosoppressione cronica e la durata limitata del trapianto. In tale contesto, le cellule staminali costituiscono una possibilità promettente per lo sviluppo di terapie riparative volte a rallentare la progressione del danno renale.

Scopi. Finalità dello studio è stata la messa a punto di un modello di differenziamento nefrogenico *in vitro*, ricorrendo all'impiego di nuove molecole sintetiche a logica differenziativa per promuovere il transdifferenziamento di cellule staminali in progenitori renali.

Metodi. In questo studio sono state utilizzate cellule staminali mesenchimali umane isolate da membrane fetali di placenta a termine; le cellule sono state coltivate in monostrato in terreno di coltura supplementato con il 10% di siero fetale bovino. I composti chimici impiegati per indurre il differenziamento sono stati monomeri di acido ialuronico con acido butirrico (HB) ed esteri misti di acido ialuronico, butirrico e retinico (HBR): il razionale che ha portato al ricorso a tali molecole si basa sulle rispettive attività di internalizzazione, mediata dal recettore CD44, dell'acido ialuronico, di apertura della cromatina da parte dell'acido butirrico e di potenziamento dell'espressione genica dell'acido retinico.

Le cellule sono state prima testate per verificare la presenza di marker mesenchimali e per accertarne la plasticità, tramite l'induzione del differenziamento osteogenico, adipogenico e condrogenico. Successivamente, sono state trattate con HB o HBR a diverse concentrazioni (1g/l, 1,5g/l, 2g/l e 3g/l) allo scopo di promuovere un transdifferenziamento in senso nefrogenico, verificato mediante un'analisi dell'espressione genica di alcuni marcatori molecolari specifici del mesenchima metanefrico quali Cadherin 11, CD24, RAR- α , steroyl-CoA desaturase 2, 14-3-3 β , Ewing sarcoma homolog. Ogni esperimento è stato replicato tre volte. Dopo estrazione dell'RNA e retrotrascrizione, il profilo di espressione di suddetti geni è stato analizzato con Real Time PCR.

Risultati e conclusioni. L'HBR, che aveva precedentemente evidenziato un'azione come agente differenziante in senso cardiomiogenico, ha confermato questa sua selettività, non mostrando risultati positivi in senso nefrogenico, mentre il trattamento con HB alla concentrazione di 1g/l ha indotto un aumento di espressione di tutti i marker in esame, indicando la possibilità di utilizzare un composto chimico per modificare l'espressione di geni nefro-specifici.

Nelle fasi successive della ricerca, l'efficacia di tali molecole *in vivo* sulla rigenerazione tissutale saranno esaminati mediante studi su modello animale murino con danno renale indotto. Risultati positivi potrebbero aprire la strada a nuovi approcci nella medicina rigenerativa in ambito di patologie renali.

18

RAPPORTO URINARIO EGF/MCP-1: UN MARKER DI PROGRESSIONE DEL DANNO RENALE NELLA NEFROPATIA DA IgA

Torres DD¹, Rossini M¹, Manno C¹, D'Altri C¹, Pontrelli P², Pesce F¹, Grandaliano G¹, Gesualdo L², Schena FP¹

¹Sezione di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Dipartimento dell'Emergenza e dei Trapianti d'Organo, Università di Bari, Bari; ²Unità di Nefrologia e Dialisi, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Foggia, Foggia

Introduzione. La produzione di citochine da parte delle cellule renali residenti ed infiltranti sembra svolgere un ruolo di primo piano nella progressione del danno renale nella glomerulonefrite cronica a depositi mesangiali di IgA (IgAN). Il nostro gruppo ha già dimostrato che l'escrezione urinaria di due di questi mediatori, EGF e MCP-1, correla significativamente con l'estensione del danno tissutale.

Scopo. Valutare prospetticamente il valore prognostico dell'escrezione renale dell'EGF e del MCP-1, espressi con il loro rapporto (EGF/MCP-1) rispetto ad altri fattori di rischio già conosciuti in una coorte di pazienti con IgAN.

Pazienti e metodi. Da gennaio 1995 a dicembre 2005 abbiamo valutato prospetticamente 132 pazienti consecutivi sottoposti a biopsia renale e con diagnosi di IgAN. Il rapporto urinario EGF/MCP-1, misurato al momento della biopsia renale con l'uso del "Renal Progression Kit" (Apulabiotech srl), è stato raggruppato in tertili. Come misura di outcome è stato considerato l'evento combinato raddoppio dei valori basali di creatinina sierica e/o end stage renal disease (ESRD). La sopravvivenza renale è stata stimata con il metodo di Kaplan-Meier per dati censurati. Il ruolo dei diversi fattori prognostici è stato esplorato con l'analisi multivariata secondo il metodo di Cox ed espresso come hazard ratio (HR) per dati aggiustati e non aggiustati, con intervalli di confidenza del 95% (IC). Il valore predittivo della creatinemia, della clearance della creatinina, della proteinuria delle 24 ore, del grado istologico e quello del rapporto EGF/MCP-1 sono stati valutati tramite l'area sotto la curva (AUC) delle rispettive curve ROC (Receiver Operating Characteristic).

Risultati. Si sono verificati in totale 23 eventi in un follow-up mediano di 48 (31-78) mesi. I pazienti con il tertile più basso di EGF/MCP-1 hanno mostrato una sopravvivenza del 57% a 5 anni e 22% a 10 anni di follow up. Invece i pazienti con il tertile più alto di EGF/MCP-1 hanno mostrato una sopravvivenza del 100% a 5 e 10 anni di follow-up (log-rank test, $p < 0.0001$). All'analisi multivariata soltanto il basso rapporto EGF/MCP-1 è risultato un fattore prognostico indipendente di un peggiore outcome (adjusted HR 0.95; IC 0.92-0.99; $p = 0.01$). L'AUC del rapporto EGF/MCP-1 da solo è risultata di 0.91 e attraverso il "visual plot" è stato possibile individuare un valore cut-off di tale rapporto (21.9) in grado di predire l'evento combinato con una sensibilità dell'80% ed una specificità del 90%.

Conclusioni. Questo studio prospettico condotto su una larga coorte omogenea di pazienti IgAN suggerisce che il rapporto EGF/MCP-1 può essere considerato un nuovo marker appropriato, sensibile e specifico nel predire l'outcome nei pazienti con IgAN.

20

RUOLO DEL C1Q E DELLE CELLULE PRESENTANTI L'ANTIGENE NELLA PROGRESSIONE DELLA NEFRITE LUPICA

Fiore N^{1,2}, Castellano G¹, Trouw LA², Schena FP¹, Daha MR², Van Kooten C²

¹Sezione di Nefrologia, DETO, Università di Bari, Bari; ²Department of Nephrology, LUMC, Leiden, The Netherlands

Introduzione. La nefrite lupica (NL) rappresenta la principale causa di mortalità fra i pazienti affetti dal Lupus Eritematoso Sistemico (LES), una patologia autoimmune multiorganica. Il complemento gioca un ruolo primario nella patogenesi della NL ed in particolare modo il C1q, mediante specifici legami con immuno-complessi ed anticorpi anti-C1q presenti nel glomerulo. Frequente è però il riscontro di depositi tubulo-interstiziali di C1q non associati ad immunocomplessi. Le principali fonti di C1q sono le cellule presentanti l'antigene (APC) quali macrofagi e cellule dendritiche come recentemente dimostrato da studi *in vitro*. Considerato il ruolo chiave giocato dall'infiltrato tubulo-interstiziale nella progressione del danno renale, scopo di questo studio è stato valutare la capacità delle APC murine di produrre C1q *in vitro* ed *in vivo* ed il loro coinvolgimento nel danno tubulo interstiziale nel modello murino di nefrite lupica con topi MRL/lpr.

Metodi. Cellule dendritiche murine sono state differenziate dal midollo osseo di 3 topi wild-type (C57/Black6), e la produzione di C1q studiata con metodica ELISA. I reni di topi MRL/lpr di diversa età (un mese $n=4$; 6 mesi $n=4$) sono stati analizzati mediante immunofluorescenza indiretta con anticorpi anti-C1q ed anti-MHCII. I reni provenienti da 2 topi sani MRL++ di 6 mesi, sono stati usati come controllo. L'intensità di fluorescenza è stata quantizzata con il software ImageJ (valori di intensità media di fluorescenza (MFI)).

Risultati. Le cellule dendritiche murine immature hanno mostrato una notevole capacità di produrre il C1q così come recentemente individuato nell'uomo (423 ± 240 ng/ml di C1q). Al contrario, l'attivazione delle dendritiche con LPS ha mostrato una notevole diminuzione delle capacità produttive con riduzione media del 60%. L'analisi dei reni dei topi affetti da nefrite lupica ha mostrato la presenza di numerose cellule MHC-II+ infiltranti il tubulo-interstizio. Tale infiltrato di APC-MHCII+ aumentava in maniera statisticamente significativa con il grado di severità della NL (MFI: NL 6 mesi 7790 ± 864 vs NL 1 mese 2584 ± 2309 , $P < 0.05$). Parallelamente si rilevava un'intensa positività per il C1q a livello tubulo-interstiziale che aumentava in maniera statisticamente significativa nei topi con NL severa di 6 mesi, rispetto ai topi con NL lieve di 1 mese (MFI: 21065 ± 5594 vs. 1012 ± 63 $P < 0.01$). Lo studio di co-localizzazione ha rivelato che il C1q co-localizzava con le APC-MHCII+, indicando la probabile produzione locale del C1q da parte delle APC a livello tubulo-interstiziale.

Conclusioni. Lo studio dimostra che le cellule dendritiche murine sono delle forti produttrici di C1q ed, insieme ai macrofagi, infiltrano significativamente il tubulo interstizio di reni affetti da LN. La presenza di APC-C1q+ nel tubulo-interstizio suggerisce che cellule dendritiche e macrofagi contribuiscono alla produzione in loco di C1q innescando la via classica ed il danno renale mediato dal complemento.

19