

### 298 PO DIAGNOSI ECOCARDIOGRAFICA PRECOCE IN NEFROLOGIA: TRE CASI CLINICI IN I.R.C., EMODIALISI E TRAPIANTO

Di Lullo L., Floccari F., Adesse R., Comegna C., Iannacci G.R., Vitale M., Cecilia A., Polito P.  
Nefrologia e Dialisi, Ospedale S.Giovanni Ev., Tivoli (RM)

**Introduzione.** La patologia cardiovascolare è di frequente riscontro nei pazienti affetti da I.R.C. in fase pre-dialitica e dialitica, nonché nei pazienti trapiantati. L'ecocardiografia rappresenta una tecnica non invasiva per lo studio della funzionalità cardiovascolare e permette di effettuare valutazioni anatomiche e funzionali.

**Pazienti e Metodi.** Il primo caso clinico riguarda un paziente emodializzato di 55 anni con grave iperPTH secondario affetto da Stenosi Mitralica severa. Il paziente presentava, all'ecocardiogramma, un'area mitralica di 0.7 cm<sup>2</sup> con calcificazioni diffuse dell'annulus e dei lembi valvolari mitralici. Dopo la prima valutazione in ambiente nefrologico, il paziente è stato inviato al cardiocirurgo. Il secondo era un paziente maschio di 45 aa affetto da IRC di grado severo (Rene policistico) ed ipertensione arteriosa in trattamento con doxazosina e calcio-antagonisti. Il paziente lamentava dispnea ingravescente da 4 mesi, precedentemente alla prima visita nefrologica. L'ecocardiogramma, eseguito in ambiente nefrologico, ha evidenziato un'insufficienza aortica di grado moderato - severo (Volume rigurgitante: 50 mL, Vena contracta: 0.5 cm). Il terzo era un paziente maschio di 55 anni, sottoposto a trapianto renale, giunto alla nostra osservazione con versamento pericardico di grado severo. Il paziente presentava ipotensione e dispnea e l'esame ecocardiografico evidenziava un versamento circolatorio con scollamento massimo di 2.5 cm.

**Risultati.** La diagnosi ecocardiografica precoce eseguita in ambiente nefrologico ha consentito, in questi casi, un'Early referral ai colleghi cardiocirurghi con conseguenti ottimi outcome in termini di prognosi cardiovascolare. I primi due pazienti sono stati sottoposti ad intervento cardiocirurgico di sostituzione valvolare, mentre il terzo è stato sottoposto a pericardiocentesi.

**Conclusioni.** La diagnosi ecocardiografica precoce, eseguita in ambiente nefrologico, può comportare un deciso miglioramento dell'outcome cardiovascolare nei nostri pazienti. Non possiamo e non dobbiamo sostituirci ai colleghi cardiologi ma possiamo lavorare per un'Early referral. Molti nefrologi si occupano da anni di ecografia nefrologica e potrebbe essere di indubbia utilità imparare le basi dell'ecocardiografia dopo adeguato periodo di formazione. I nostri 4 anni di esperienza in questo campo ci hanno indicato che un esame ecocardiografico precoce può comportare outcome clinici migliori nei pazienti nefropatici.

### 299 PO VERSAMENTO PERICARDICO NELL'INSUFFICIENZA RENALE ACUTA

Panicali L.<sup>1</sup>, Monti M.<sup>1</sup>, Grammatico F.<sup>1</sup>, Dalmastrì V.<sup>1</sup>, Campieri C.<sup>1</sup>, Stefoni S.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Nefrologia e Dialisi, Ospedale Maggiore, Bologna; <sup>2</sup>Nefrologia, Dialisi, Policlinico S. Orsola, Bologna

M.B uomo di anni 78, in anamnesi ipertensione arteriosa e dislipidemia. Ricoverato per congestione polmonare e fibrillazione atriale, all'ingresso in ospedale la funzione renale era normale, creatininemia 0.9 mg/dL.

Il paziente risponde alla terapia diuretica con risoluzione del quadro congestizio. In quinta giornata riscontro di insufficienza renale grave (urea 221 mg/dL, creatininemia 7 mg/dL) e contrazione della diuresi.

Il paziente è sottoposto, in un periodo di tempo di 24 giorni, a nove dialisi con tecnica bicarbonato standard della durata media di 210 minuti.

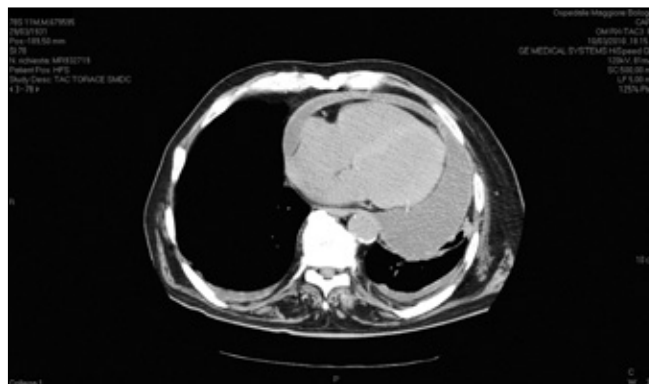
La comparsa della diuresi avviene dopo 26 giorni con recupero completo della funzione renale, non emergono dagli esami eseguiti dati utili per la diagnosi (test immunologici negativi, ecografia renale nella norma se pur presente corpo aggettante in vescica ma non ostruente), riferito utilizzo di FANS.

Durante il periodo di insufficienza renale comparsa di versamento pericardico che a un'indagine TC, (eseguita in 26esima giornata di ricovero) viene definito di marcata entità (spessore massimo 5.6 cm, si allega immagine). Il paziente è sottoposto a pericardiocentesi esplorativa per verificare l'eziologia del versamento, gli esami colturali e citologici risultano negativi.

In seguito non sono state eseguite ulteriori pericardiocentesi ma si è assistito, con la ripresa della diuresi e della capacità depurativa del rene, alla risoluzione anche del versamento pericardico.

In letteratura è ben documentato che in circa il 13% dei pazienti uremici cronici è possibile riscontrare un versamento pericardico, meno frequente, 2%, è il riscontro di versamento pericardico in corso di insufficienza renale acuta.

Nel caso in cui il nostro paziente non avesse recuperato la funzione renale sarebbero state sufficienti dialisi giornaliere per la risoluzione del versamento pericardico.



### 300 PO IN DIALYZED PATIENTS, HDL SCAVENGER ACTIVITY IS INDEPENDENT OF THEIR PLASMA LEVELS

Baragetti I.<sup>1</sup>, Uboldi P.<sup>2</sup>, Buzzi L.<sup>1</sup>, Garlaschelli K.<sup>3</sup>, Ferrario F.<sup>1</sup>, Terraneo V.<sup>1</sup>, Norata G.D.<sup>2</sup>, Catapano A.L.<sup>2</sup>, Pozzi C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nephrology and Dialysis, Hospital Bassini, Cinisello Balsamo (MI); <sup>2</sup>Department of Pharmacological Sciences, University of Studies of Milan, Milano; <sup>3</sup>Center for the Study of Atherosclerosis, Hospital Bassini, Cinisello Balsamo (MI)

**Introduction.** High density lipoproteins (HDL) promote cholesterol efflux (ChEf) from cells to the liver, playing a key role in cholesterol removal. HDL cellular ChEf is mediated by cellular B-1 (SR-B1) and ATP-binding cassette-A1 (ABCA-1) membrane scavenger receptors. Low HDL plasma levels are a cardiovascular risk factor in patients with kidney dysfunction. Aim of this study was to address HDL plasma levels and function in dialysis patients (DP).

**Materials and Methods.** 19 DP (6 M, 13 F) were studied and 10 healthy subjects age and sex matched, were enrolled. Plasma samples were collected from all subjects. ChEf potential was tested with both macrophages and hepatoma cells addressing either SR-B1 or ABCA-1. These cells were filled in with cholesterol and tested with serum HDL of both DP and controls in the medium.

**Results.** HDL plasma levels were lower in DP than in controls (44±9 mg/dL vs 62±9 mg/dL, p<0.001). There was no difference between SR-B1 and ABCA-1 mediated ChEf controls and DP (23.8% vs 23.6%, p=n.s.; 15.8 vs 14.4 % p=n.s.; respectively). Controls SR-B1 mediated ChEf is significantly directly correlated with HDL plasma levels (r<sup>2</sup>=0.41 p<0.01). This correlation is lost in DP. Comparing ChEf potential in DP serum before and after the dialysis, SR-B1 mediated ChEf was increased up to 26.1% post-dialysis and returned to basal levels prior to the next dialysis. As post-dialysis HDL plasma levels are increased too, we focused the next analysis on the direct effect of HDL themselves on ChEf. In DP, ultracentrifugated post-dialysis. HDL tested with macrophages was more effective in promoting SR-B1 mediated ChEf, independently of HDL plasma levels.

**Conclusions.** In DP, HDL ChEf is preserved, in spite of their lower plasma levels, but the relationship between HDL plasma levels and the efficiency of cholesterol scavenger function is lost. Dialysis improves HDL activity independently of HDL plasma levels. We can suggest that uremic toxins alter cellular receptor function independently of HDL plasma levels.

## RICERCA DI BASE E TRASLAZIONALE

### 301 CO LB\*\* L'ACIDO MICOFENOLICO INIBISCE LA FOSFORILAZIONE DI NF-KB E JNKs E CAUSA UNA RIDUZIONE DEL RILASCIO DI IL-8 IN CELLULE RENALI TUBULARI PROSSIMALI UMANE TRATTATE CON H2O2

Andreucci M.<sup>1</sup>, Faga T.<sup>1</sup>, Lucisano G.<sup>1</sup>, Uccello F.<sup>2</sup>, Pisani A.<sup>2</sup>, Memoli B.<sup>2</sup>, Sabbatini M.<sup>2</sup>, Fuiano G.<sup>1</sup>, Michael A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cattedra di Nefrologia, Università "Magna Graecia", Catanzaro

<sup>2</sup>Cattedra di Nefrologia, Università "Federico II", Napoli

**Introduzione.** Il danno da ischemia-riperfusion è un evento comune nel trapianto di rene e può influenzarne la sopravvivenza a lungo termine. Lo stress ossidativo potrebbe giocare un ruolo cruciale poiché le specie reattive dell'ossigeno (ROS) che si formano durante la riperfusion causano un danno cellulare diretto oltre che l'attivazione di vie del segnale intracellulari proinfiammatorie.

**Materiali e Metodi.** Abbiamo utilizzato una nota linea cellulare tubulare renale prossimale umana chiamata HK-2. Le cellule HK-2 sono state incubate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mM), a determinati intervalli, fino a 2 ore (h) dopo pretrattamento con (o senza) diverse concentrazioni di acido micofenolico (MPA). Abbiamo anche utilizzato estratti di reni di ratti Sprague Dawley (SD) trattati per 4 giorni con micofenolato mofetil (MMF) e quindi successivamente sottoposti a ischemia (per 30') seguita da riperfusion (per 5' o 24h). I lisati cellulari e tissutali (di rene) così

ottenuti sono stati utilizzati per *SDS-Page Western Blotting*. La sopravvivenza cellulare è stata analizzata con la metodica *MTT assay*.

**Risultati.** Le cellule HK-2 sottoposte a stress ossidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentavano un aumento della fosforilazione (attivazione) delle chinasi JNKs e del fattore di trascrizione NF-κB (in Ser 276) che in letteratura sono stati associati entrambi a infiammazione. Inoltre dopo l'incubazione delle cellule HK-2 con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> anche la produzione (determinata dal suo rilascio nel mezzo di coltura cellulare analizzato con ELISA) di interleuchina-8 (IL-8) era aumentata. La preincubazione delle cellule HK-2 con MPA provocava invece una ridotta fosforilazione sia di JNKs che di NF-κB e riduceva il rilascio di IL-8 delle cellule HK-2 incubate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. MPA infine era in grado di ridurre la fosforilazione delle chinasi p38, ERK1/2, Akt/PKB e del fattore di trascrizione CREB. Nei ratti SD sottoposti a ischemia-riperfusion fu osservato un aumento della fosforilazione sia di JNKs che di NF-κB (in Ser 276), che era invece ridotta nei reni di ratti trattati con il MMF.

**Conclusioni.** Questi risultati suggeriscono che MPA può inibire la risposta infiammatoria a livello renale inibendo l'attivazione proinfiammatoria sia *in vivo* (nel rene di ratto) che *in vitro* (nelle cellule HK-2 sottoposte a stress ossidativo).

### 302 CO\*

#### TIPPING THE TREGS/TEFF BALANCE DURING TRANSPLANTATION IS CRITICAL TO PROLONG SURVIVAL AND PROMOTE TOLERANCE-A NEW ATG/CTLA4-IG-BASED APPROACH

D'Addio F.<sup>1</sup>, Vergani A.<sup>1</sup>, Petrelli A.<sup>1</sup>, Williams J.<sup>2</sup>, Staudacher C.<sup>3</sup>, Sayegh M.H.<sup>4</sup>, Fiorina P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Trapianti, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano, Italy; <sup>2</sup>Genzyme Corporation, Cambridge, USA; <sup>3</sup>Chirurgia Trapianti, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano, Italy; <sup>4</sup>Transplant Research Center, Childrens Hospital, Boston, USA

**Introduzione.** The fate of the alloimmune response is dependent on the balance between alloreactive effector/memory (Teff) and regulatory T cells (Tregs) *in vivo*. Our group has previously demonstrated that low dose ATG can expand Tregs *ex vivo*. Clinical trials with B7 blockade (Belatacept) in transplant recipients are underway. The goal of this study is to develop a rational pre-clinical strategy to achieve long-term allograft survival in a stringent skin transplant model by limiting T cell alloreactivity and expanding Tregs *in vivo*.

**Methods.** C57BL/6 (B6) recipients of fully MHC-mismatched BALB/c skin allografts were treated either as follows: induction with murine ATG (iATG:0.5mg on d 0,4); CTLA4-Ig (0.5 mg d 0, 0.25 mg d 2,4,6,8,10); prolonged low dose ATG (pATG:0.1 mg 2x/week).

**Results.** iATG alone led to moderate prolongation of graft survival in spite of complete depletion of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (MST=15.5 vs. 9 d, p<0.0004). Interestingly, pATG alone prolonged graft survival slightly. Flow cytometric analysis on day 7 confirmed that pATG depleted T cells partially but preserved Tregs. Combination of iATG with pATG or CTLA4-Ig (MST=28 d, p<0.0005 and 36 d, p<0.003, respectively) further enhanced graft survival as compared to iATG alone. Intriguingly, animals treated with iATG plus CTLA4-Ig and pATG (stopped on day 90) demonstrated the best allograft survival (MST=115 days). This survival benefit was due to preservation of Tregs by low dose ATG and limitation of Teff by CTLA4-Ig, overall resulting in increased Tregs:Teff ratios over time until rejection occurred. The essential role of Tregs was confirmed after abrogating the graft-prolonging effects of this regimen by depleting Tregs.

**Conclusions.** Combination of prolonged low dose ATG and CTLA4-Ig is a very effective strategy to promote engraftment in a stringent skin transplant model by tipping the balance towards regulation and may provide the rationale for development of a novel clinical protocol in humans.

### 303 CO\*

#### NEUTROPHIL GELATINASE-ASSOCIATED LIPOCALIN (NGAL) CORRELA IN VIVO CON LA SEVERITÀ DEL CANCRO RENALE

Bolignano D.<sup>2</sup>, Lacquaniti A.<sup>1</sup>, Coppolino G.<sup>1</sup>, Fazio M.R.<sup>1</sup>, Donato V.<sup>1</sup>, Bono C.<sup>1</sup>, Buemi M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cattedra di Nefrologia, Policlinico Universitario, Messina; <sup>2</sup>Cnr ibim, Ospedali Riuniti, Reggio Calabria

**Introduzione.** L'incidenza e la prevalenza del cancro renale sono stabilmente in aumento. La diagnosi precoce e l'efficacia terapeutica sono ancora insoddisfacenti così come le attuali conoscenze fisiopatologiche sono poco più che primordiali. Se da un lato studi contraddittori suggeriscono il fumo di sigaretta, l'obesità ed alcuni assetti genetici come fattori di rischio maggiori, dall'altro sempre più evidenze sostengono l'ipotesi che fattori endogeni quali ormoni, citochine e *stress-proteins* giochino un ruolo chiave nella genesi e progressione di questa neoplasia. Il presente studio ha voluto per la prima volta valutare, attraverso un'analisi *in vivo*, il possibile rapporto tra NGAL e cancro renale. NGAL è una proteina tubulare da stress già conosciuta in nefrologia per le sue eccezionali capacità di predire precocemente la comparsa di AKI in pazienti a rischio nonché la progressione della CKD nel medio termine. Studi recenti hanno peraltro già evidenziato che NGAL, grazie alle sue capacità di chelare il ferro, rappresenta un basilare fattore di crescita per neoplasie ovariche, gastrointestinali e tiroidee.

**Metodi.** L'espressione di NGAL è stata valutata tramite tecniche immunostochi-

miche in 27 esemplari di tumori renali [17 carcinomi a cellule chiare (CCCs), 5 carcinomi papillari, 2 carcinomi uroteliali, 2 oncocitomi e 1 CCC con differenziazione sarcomatoide]. L'intensità di staining (IS) è stata graduata come (0) negativa, (1) debole, (2) moderata, (3) forte. L'area di positività allo staining (ASP) è stata stabilita come percentuale di cellule neoplastiche positive secondo i valori: 0 (≤10%), 1 (11-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%), 4 (>75%). Uno score di densità di distribuzione (ID) è stato infine generato per ogni campione moltiplicando i valori di IS e di ASP.

**Risultati.** NGAL è risultata espressa in 25/27 campioni di tumore renale e persino in un campione di metastasi peritoneale primitiva da CCC, con vari ID scores. L'espressione si concentrava particolarmente nel citoplasma e su tutta la membrana plasmatica. Le IS di NGAL risultavano inoltre fortemente correlate al grado di severità di neoplasia (*Fuhrman classification*; R:0.475, p<0.001), così come le ASP (R:0.512, p<0.001) e soprattutto gli ID scores (R:0.612, p<0.001). Solo 2 CCCs a basso grado non sembravano esprimere NGAL.

**Conclusioni.** Il presente studio mostra per la prima volta che NGAL, similmente a quanto osservato in altre neoplasie, potrebbe essere coinvolta in maniera chiave anche nella fisiopatologia del cancro renale. In particolare, indipendentemente dall'istotipo, l'espressione di NGAL correla fortemente con la severità istologica della neoplasia e persino le cellule metastatiche conservano la capacità di produrre questa proteina. Studi futuri sono attesi per chiarire le potenziali applicazioni di NGAL nella diagnosi, prognosi e valutazione clinica di pazienti affetti da neoplasie renali.

### 304 CO

#### LE CELLULE MESENCHIMALI STROMALI (MSC) SONO PIÙ EFFICACI DELL'ACE-INIBITORE NEL RIDURRE IL DANNO TUBULOINTERSTIZIALE IN UN MODELLO SPERIMENTALE DI OSTRUZIONE URETERALE MONOLATERALE NEL RATTO

Bedino G., Rampino T., Gregorini M., Piotti G., Gabanti E., Bosio F., Balenzano C.T., Rocca C., Valsania T., Dal Canton A.

Unità di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Università e Fondaz. Irccs Policlinico San Matteo, Pavia

**Introduzione.** Gli ACE-inibitori sono considerati attualmente i farmaci più efficaci nel ridurre il danno tubulo-interstiziale in un modello di ostruzione ureterale monolaterale (UUO). Recentemente abbiamo dimostrato che cellule mesenchimali stromali (MSC) in UUO riducono i livelli di angiotensina II e la fibrosi tubulo-interstiziale, pertanto lo scopo del nostro studio è stato confrontare gli effetti di MSC in monoterapia con quelli di ACE-inibitori e della terapia combinata ACE-inibitori + MSC in UUO.

**Materiali e Metodi.** Ratti Sprague-Dawley (SD) transgenici per EGFP erano usati come donatori di MSC. UUO era eseguita in 5 gruppi di ratti SD *wild-type*. A: 8 ratti con UUO al g 0; B: 8 ratti con UUO ricevevano MSC 3x10<sup>6</sup> al g 0 nella vena della coda. C: 8 ratti con UUO ricevevano lisinopril dal g 0 al 7. D: 8 ratti con UUO ricevevano MSC al g 0 e lisinopril dal g 0 al 7. E: 8 ratti erano *sham* operati. Gli animali erano sacrificati al g 7 ed i reni erano rimossi per gli studi istomorfologici. Il diametro massimo tubulare (DT) era misurato sulle sezioni di rene legato. L'espressione di ED1, PCNA interstiziale erano studiati mediante immunostochimica. I risultati sono espressi come media e DS.

**Risultati.** DT era inferiore nei reni dei ratti del gruppo B (µm 48.96±29.13), C (65.21±40.21), D (61.79±43.02) rispetto al gruppo A (81.29±54.3) (p<0.01). Il trattamento con MSC risultava più efficace della terapia con ACE-inibitore e combinata (p<0.01). Il numero di monociti era minore nel gruppo B (19.3±5.2) e D (27.8±12.3) rispetto ad A (43.2±10.3) e C (49.7±14.8) (p<0.05); comunque le MSC erano più efficaci in monoterapia. Le cellule PCNA positive erano inferiori nei ratti del gruppo B e D rispetto ad A e C (p<0.01).

**Conclusioni.** Il trattamento con MSC è risultato più efficace del trattamento con ACE-inibitori nel ridurre il danno tubulo interstiziale in UUO. L'uso di una terapia combinata riduce gli effetti di MSC.

### 305 CO

#### IL DIABETE MELLITO (DM) RIDUCE LA SOPRAVVIVENZA DEI PAZIENTI (PZ) CON CARCINOMA RENALE (CR): RUOLO DELLA TUBERINA E DI OGG1

Simone S.<sup>1</sup>, Cariello M.<sup>1</sup>, Lucarelli G.<sup>2</sup>, Vavallo A.<sup>2</sup>, Rutigliano M.<sup>2</sup>, Battaglia M.<sup>2</sup>, Schena F.P.<sup>1</sup>, Pertosa G.<sup>1</sup>, Ditunno P.<sup>1</sup>, Grandaliano G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Università A. Moro, Bari; <sup>2</sup>Urologia e Trapianti di rene, Università A. Moro, Bari

**Introduzione.** Recentemente, è stata dimostrata un'aumentata incidenza di CR in soggetti con DM. Tuttavia i meccanismi alla base di questa associazione non sono noti. Il DM è associato ad un'elevata produzione di specie reattive dell'ossigeno, che determinano un danno del DNA. La DNA glicosilasi OGG1, deputata alla riparazione del danno, ha un ruolo chiave nella carcinogenesi renale. Inoltre, il DM induce la fosforilazione della tuberina, un gene oncosoppressore, che predispone al CR. Pertanto, si è ricercata: 1) l'influenza del DM sulla progressione del CR; 2) il ruolo di OGG1 e della tuberina in questo processo.

**Materiali e Metodi.** Sono stati arruolati 462 pz (276 M, 186 F, età media 59.8 anni, di cui 76 con DM, 11 tipo I e 65 tipo II) sottoposti a nefrectomia radicale/

parziale per CR e seguiti per una mediana di 43 mesi. Sono state analizzate le caratteristiche patologiche del tumore, la recidiva di CR e la sopravvivenza dei pz. L'analisi statistica è stata eseguita usando il metodo di Kaplan-Meier, l'analisi multivariata di Cox e il modello di regressione logistica. L'espressione proteica di OGG1 e fosfo-tuberina su porzioni di tessuto renale di pz sottoposti a nefrectomia è stata valutata mediante western blotting. L'espressione genica di OGG1 è stata studiata in *real time* PCR.

**Risultati.** I pz con DM presentano un aumento significativo della fosforilazione della tuberina ed una riduzione dell'espressione genica e proteica di OGG1 rispetto ai pz senza DM. La sopravvivenza globale e CR-correlata è risultata significativamente ridotta nei pz con DM rispetto ai pz non diabetici ( $p < 0.001$ ). La comparsa di recidiva è statisticamente più elevata nei pz con DM rispetto ai pz senza DM (rispettivamente 60.5% e 14%;  $p < 0.05$ ). In un modello di analisi multivariata, lo stadio (HR:2.01  $p = 0.01$ ), la dimensione del tumore (HR:1.09  $p = 0.02$ ) e soprattutto il diabete (HR:4.90  $p < 0.001$ ) sono risultati fattori predittivi indipendenti di mortalità CR-correlata.

**Conclusioni.** I pz con CR e DM hanno un'alterazione dell'espressione di OGG1 e fosfo-tuberina che si associa ad una ridotta sopravvivenza e ad un aumentato rischio di recidiva.

### 306 POD\*

#### LA BONE MORPHOGENETIC PROTEIN (BMP)-2 INDUCE UN FENOTIPO PRO-FIBROTICO NELLE CELLULE PROGENITRICI RENALI ADULTE (ARPC) MEDIANTE L'ATTIVAZIONE DI NOX4

Cosola C., Simone S., Sallustio F., Loverre A., Corcelli M., Grandaliano G., Schena F.P., Pertosa G.

Deto-Sez. di Nefrologia Dialisi e Trapianti, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari

**Introduzione.** Le ARPC, isolate da rene umano adulto, potrebbero contribuire ai processi rigenerativi dopo danno renale acuto. Le BMP regolano i processi di differenziamento, modeling e rigenerazione. Recentemente, il nostro gruppo ha dimostrato che le ARPC producono BMP-2 in risposta a stimoli infiammatori, tuttavia il ruolo di questo fattore di crescita 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.

**Metodi.** Le ARPC sono state isolate mediante *magnetic cell sorting*. I marker di differenziazione in senso miofibroblastico  $\alpha$ -SMA, collagene-I e fibronectina sono stati valutati con immunoblotting nelle ARPC e nelle cellule tubulari prossimali (HK-2) dopo stimolo con BMP-2. La produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è stata valutata con 2',7' diclorodidrossifluoresceina. L'attività enzimatica dell'NADPH ossidasi è stata studiata con chemiluminescenza. La Nox4 (isoforma renale dell'NADPH ossidasi) è stata studiata con immunoblotting.

**Risultati.** Le ARPC, *in vitro*, esprimono i recettori per le BMP (ALK-2, ALK-3, ALK-6). La BMP-2 (30 ng/mL) si è dimostrata in grado di aumentare la produzione dei ROS [basale  $36.2 \pm 15.3$  Unità Arbitrarie (UA); BMP-2 15'  $65.5 \pm 17.8$  UA,  $p = 0.03$ ], l'attività dell'NADPH ossidasi (basale  $86.5 \pm 38.2$  UA; BMP-2 15'  $212 \pm 75.4$  UA,  $p = 0.01$ ) e l'espressione proteica di Nox4 (basale  $0.3 \pm 0.2$  UA; BMP-2 5'  $1 \pm 0.6$  UA,  $p = 0.03$ ) nelle ARPC. L'incubazione per 5 giorni con BMP-2 induce l'espressione proteica di  $\alpha$ -SMA (basale  $0.3 \pm 0.1$  UA; BMP-2  $0.8 \pm 0.2$  UA,  $p = 0.02$ ), collagene-I ( $2.4 \pm 0.6$  fold change vs basale,  $p = 0.03$ ) e fibronectina ( $1.4 \pm 0.1$  fold change vs basale,  $p = 0.04$ ) nelle ARPCs, ma non nelle HK-2. Lo stimolo ossidativo  $H_2O_2$  (200  $\mu$ M) induce l'espressione proteica di  $\alpha$ -SMA nelle ARPCs (basale  $1.0 \pm 0.2$  UA;  $H_2O_2$   $2.6 \pm 0.8$  UA;  $p = 0.03$ ), mentre l'anti-ossidante N-acetil-cisteina (NAC) inibisce l'espressione di  $\alpha$ -SMA indotta da BMP-2 (BMP-2  $2.2 \pm 0.6$ ; BMP-2+NAC  $1.3 \pm 0.4$  fold change;  $p = 0.04$ ).

**Conclusioni.** La BMP-2 può indurre la trasformazione delle ARPC in un fenotipo miofibroblastico mediante l'attivazione di Nox4.

### 307 POD

#### NEUTROPHIL GELATINASE ASSOCIATED LIPOCALIN (NGAL) LEVELS IN PAZIENTI CON MALATTIA DI CROHN TRATTATI CON INFILIXIMAB

Bolignano D.<sup>2</sup>, Della Torre A.<sup>1</sup>, Costantino G.<sup>1</sup>, Lacquaniti A.<sup>1</sup>, Coppolino G.<sup>1</sup>, Buemi M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cattedra di Nefrologia, Policlinico Universitario, Messina; <sup>2</sup>Cnr ibim, Ospedali Riuniti, Reggio Calabria

**Introduzione.** Pazienti affetti da malattia di Crohn (CD) sono spesso predisposti a sviluppare nefropatie tubulari e glomerulopatie, probabilmente a causa di una disregolazione sistemica del network immunologico e citokinico. Inoltre, similmente alle glomerulonefriti, anche la CD non si avvale ad oggi di un marcatore sensibile e precoce di risposta alle diverse terapie disponibili.

NGAL è una piccola proteina da stress precocemente rilasciata dal tubulo sofferente già conosciuta in nefrologia poiché in grado di predire la comparsa di AKI o la progressione di nefropatie instabili. Nel presente studio abbiamo per la prima volta voluto analizzare NGAL in un piccolo gruppo di pazienti affetti da CD senza apparenti segni di danno renale. I livelli di NGAL sono stati inoltre valutati prima e dopo un bolo dell'agente biologico Infliximab (anti-TNF).

**Materiali e Metodi.** 6 pazienti con CD sono stati trattati con 5 mg per kg di Infliximab in singola infusione intravenosa. L'attività di malattia veniva stabilita attraverso l'indice di attività CDAI. Parametri ematochimici renali ed extra-renali sono stati valutati insieme a NGAL. Quest'ultima veniva dosata nelle urine prima dell'inizio del bolo (basale) e 24 ore dopo la fine dell'infusione con tecnica ELISA.

**Risultati.** Al basale, i pazienti con CD mostravano livelli di NGAL marcatamente incrementati rispetto ai controlli [210.5 (88.3-1100.0) vs.  $7.6 \pm 4.4$  ng/mL;  $p = 0.001$ ]. La somministrazione di Infliximab induceva in tutti i soggetti una drammatica riduzione dei livelli di NGAL fino ad un valore medio di 80.1 (38.6-400.2) ng/mL ( $p = 0.006$ ) con un tasso di riduzione medio del 62.1%. La riduzione era indipendente dalla durata dell'infusione.

**Conclusioni.** Altri studi hanno già svelato in passato che la valutazione di NGAL può essere utile nel monitoraggio della risposta ad alcune terapie, per es. ACE-inibitori, sartanici ed immunoglobuline e.v. in soggetti con glomerulopatie primitive. Il presente studio estende per la prima volta a pazienti con CD il potenziale ruolo diagnostico di NGAL, suggerendo un potenziale coinvolgimento fisiopatologico di questo fattore negli adattamenti renali e sistemici al CD.

### 308 POD

#### IL CALCIOMIMETICO R-568 E IL SUO ENANTIOMERO S-568 STIMOLANO LA PRODUZIONE ENDOTELIALE DI OSSIDO NITRICO

Sirilli V.<sup>1</sup>, Bonomini M.<sup>1</sup>, Giardinelli A.<sup>2</sup>, Morabito C.<sup>3</sup>, Di Cesare M.<sup>1</sup>, Di Pietro N.<sup>2</sup>, Formoso G.<sup>4</sup>, Amoroso L.<sup>1</sup>, Mariggio M.A.<sup>3</sup>, Pandolfi A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dip. Medicina e Scienze Invecchiamento, Università "G. D'Annunzio", Chieti; <sup>2</sup>Scienze Biomediche, Cesi, Fondazione G. D'Annunzio, Università "G. D'Annunzio", Chieti; <sup>3</sup>Scienze Mediche di Base e Applicate, Cesi, Università "G. D'Annunzio", Chieti; <sup>4</sup>Cesi, Fondazione "G. D'Annunzio", Chieti

**Introduzione.** I calciomimetici, una nuova opportunità terapeutica per il trattamento dell'iperparatiroidismo secondario nei pazienti con malattia renale cronica, agiscono legandosi in maniera stereospecifica al recettore sensibile al calcio (CaSR). Il CaSR, oltre ad essere localizzato negli organi coinvolti nell'omeostasi calcica, è stato recentemente evidenziato anche in cellule endoteliali umane, suggerendo un possibile nuovo ruolo dei calciomimetici nella biologia vascolare.

**Metodi.** Scopo del nostro studio è quello di evidenziare la presenza di CaSR su cellule endoteliali umane in coltura (PCR ed analisi Western Blot) e valutare i potenziali effetti del calciomimetico R-568 e del suo enantiomero S-568 sulla modulazione dei livelli di  $Ca^{2+}$  intracellulare (FURA-2AM). Un secondo scopo consiste nel quantificare il possibile incremento di produzione di ossido nitrico (ON, DAF-2DA) mediato dall'attivazione dell'enzima ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS, analisi immunoblotting).

**Risultati.** Il CaSR è stato localizzato a livello citosolico e di membrana nelle cellule endoteliali umane. Nel nostro modello cellulare, sia R-568 che S-568 hanno indotto un aumento statisticamente significativo dei livelli intracellulari di  $Ca^{2+}$  e del rilascio di ON.

**Conclusioni.** I nostri dati suggeriscono un effetto diretto dei calciomimetici R-568 e S-568 su CaSR con aumento della produzione di ON, supportando un potenziale ruolo terapeutico nell'ambito vascolare di questa classe di farmaci.

### 309 POD

#### IL RUOLO DEL POLIMORFISMO DI CCR5 IN PAZIENTI AFFETTI DA PERIAORTITE CRONICA

Palmisano A.<sup>1</sup>, Alberici F.<sup>1</sup>, Boiardi L.<sup>2</sup>, Casali B.<sup>3</sup>, Nicoli D.<sup>3</sup>, Moroni G.<sup>4</sup>, Gallelli B.<sup>4</sup>, Martorana D.<sup>5</sup>, Buzio C.<sup>1</sup>, Vaglio A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinica Medica e Nefrologia, Università di Parma, Parma; <sup>2</sup>Reumatologia, Azienda Ospedaliera di Reggio Emilia, Reggio Emilia; <sup>3</sup>Biologia Molecolare, Azienda Ospedaliera di Reggio Emilia, Reggio Emilia; <sup>4</sup>Nefrologia, Policlinico di Milano, Milano; <sup>5</sup>Genetica Molecolare, Università di Parma, Parma

**Introduzione.** La periaortite cronica (PC) è una malattia rara caratterizzata da un tessuto fibroinfiammatorio periaortico che spesso ostruisce gli ureteri causando IRA. La PC, prima ritenuta complicanza di malattia aterosclerotica, è attualmente considerata una malattia infiammatoria che include forme aneurismatiche (fibrosi retroperitoneale perianeurismatica, FRP) e non (fibrosi retroperitoneale idiopatica, FRI).

CCR5 è recettore per diverse citochine e contribuisce al reclutamento delle cellule infiammatorie nei tessuti. Il gene CCR5 ha un polimorfismo (delezione) (CCR5<sup>Δ32</sup>) associato ad autoimmunità. Obiettivo dello studio è valutare se questo polimorfismo conferisce suscettibilità alla PC.

**Metodi.** Abbiamo arruolato 100 pazienti consecutivi affetti da PC e 180 controlli sani appaiati per età e sesso. Il DNA è stato isolato dal sangue periferico e la genotipizzazione eseguita mediante un saggio di discriminazione allelica basato su PCR.

**Risultati.** Ottantadue pazienti presentavano FRI e 18 FRP. CCR5<sup>Δ32</sup> era significativamente più frequente nei pazienti con PC e FRP che nei controlli (rispettivamente  $p_{\text{corr}} = 0.03$ , OR2.8 [95%IC1.2-6.4] e  $p_{\text{corr}} = 0.0002$ , OR10.0 [95%IC3.7-27.3]); non differenze significative tra pazienti con FRI e controlli. Abbiamo valutato l'associazione del polimorfismo con PC, FRI e FRP stratificando i gruppi sulla base di presenza/assenza di malattia aterosclerotica conclamata (e.g. cardiopatia ischemica, ictus, arteriopatia obliterante arti inferiori): la frequenza del po-

limorfismo si mostrava significativamente aumentata nel gruppo di pazienti con PC e FRP senza malattia aterosclerotica rispetto ai controlli sani [rispettivamente 16.4% vs 5.6%,  $p=0.012$ , OR3.3 [95%CI1.4-8.1] e 66.7% vs 5.6%,  $p=0.00001$ , OR 34.0 [95%CI7.4-156.3]].

**Conclusioni.** Il polimorfismo CCR5<sup>Δ32</sup> conferisce suscettibilità alla PC, in particolare nelle forme perianeurismatiche. Questa associazione è indipendente dalla presenza di malattia aterosclerotica.

### 310 POD NERVE GROWTH FACTOR (NGF) AND NGF-RECEPTOR EXPRESSION IN HUMAN PODOCYTE CELL LINE

Carito V.<sup>1</sup>, Caroleo C.<sup>1</sup>, Russo A.<sup>1</sup>, Mancuso D.<sup>2</sup>, Greco R.<sup>2</sup>, Papalia T.<sup>2</sup>, Bonfiglio R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Farmacobiologia, Facoltà di Farmacia, Unical, Rende (CS); <sup>2</sup>Nefrologia, Dialisi e Trapianto, AO "Annunziata", Cosenza

**Introduction.** Podocytes are highly specialized cells establishing the selective permeability of the glomerular filtration barrier. This structural integrity is also supported by several factors (cytokines, adhesion molecules and growth factors). Among these, the Nerve Growth Factor (NGF), a neurotrophin involved in development, survival and function of nervous cells, could play an important role. NGF induces its biological effects through the activation of the high affinity tyrosine kinase A receptor (TrkA) and the low-affinity NGF-R (p75). The expression of NGF and NGF-R in the human kidney and their levels are altered in a wide spectrum of renal disorders. The aim of the study was to characterize NGF/NGF-R system in undifferentiated and differentiated podocytes. For this purpose a conditionally human podocyte cell line maintained either in a proliferative and differentiated state was used.

**Methods.** The human podocyte cell line, obtained from human kidney specimen and transfected with the tsSV40 gene construct, was cultured either at 33°C or shifted to 37°C, where cells adopt the phenotype of differentiated podocytes. In both conditions cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with Fetal Bovine Serum, Penicillin/Streptomycin and Insulin-Transferrin-Selenium. NGF and NGF-Rs expression was evaluated with RT-PCR, Western Blotting (WB), Immunofluorescence (IF) and Transmission Electron Microscopy (TEM).

**Results.** Podocytes constitutively express NGF, TrkA and p75 mRNAs, in both permissive and non permissive conditions. Analysis of protein levels by WB, further confirmed via IF and TEM, revealed the presence of both NGF-R, TrkA and p75. In particular TEM showed positive NGF-R staining and revealed that undifferentiated podocytes express p75 to the cell surface, in the perinuclear region and on the nuclear membrane while TrkA was localized only to the cell surface. Differentiated podocytes express p75 on the cell surface, in the cytosol, in the nucleus and on the nuclear membrane. Similarly, TrkA was detected onto the cell surface, in the nucleus and in the cytosol.

**Conclusions.** Our findings show that human podocytes constitutively express mRNA for NGF and NGF-R. NGF-Rs are expressed in various areas of the cell with the nucleus above all.

A suggestive role of NGF could be hypothesized in maturation, structural changes and functional activity of human podocytes.

### 311 PO MTOR INHIBITION MODULATES THE BIOLOGIC PHENOTYPE OF CD24<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> RENAL MULTIPOTENT PROGENITORS (RMP)

Netti G.S., Roca L., Praticchizzo C., Pertosa A.M., Cormio L., Carrieri G., Ranieri E., Gesualdo L.

Research Centre BioAgroMed, University of Foggia, Foggia

**Introduction.** Recent studies have described a population of Renal Multipotent Progenitors (RMP) in adult human kidneys at the urinary pole of the Bowman capsule, which are CD24 and CD133 positive and are able to repair injured renal tissue of SCID mice with glycerol-induced acute tubular necrosis (ATN) and adriamycin-induced nephropathy. mTOR inhibitors (Rapamycin) may affect the RMP biology both *in vivo* and *in vitro* via the modulation of HIF1 $\alpha$ /VHL pathway, which regulates downstream the CXCR4 and SDF-1 genes, both required for therapeutic homing of RMP *in vivo*. In this study we aimed to assess the effects of mTOR inhibition on the RMP phenotype proliferation, viability and chemotaxis.

**Materials and Methods.** RMP cell lines were isolated from normal kidneys of 30 pts undergoing nephrectomy for renal carcinoma. Cells were cultured with and without Rapamycin (5 ng/mL; 20 ng/mL) and characterized by flow cytometry. Then, cell proliferation, cell viability and chemokinesis were assessed.

**Results.** At first passage after isolation, flow cytometric analysis showed that the cell pool was CD24<sup>+</sup> (60.0%) and CD133<sup>+</sup> (25.4%), while only 20.6% of pool cells co-expressed both markers. Cell proliferation induced downregulation of these markers. After immunomagnetic enrichment CD133<sup>+</sup> cells were doubled (25.4% vs 54.8%), while CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> cell significantly increased (13.7% vs 21.6%). Rapamycin treatment at different concentrations increased CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> cell population (17.8% vs 55.5% at 5 ng/mL vs 49.3% at 20 ng/mL), while it decreased RMP proliferation (-34.3% at 5 ng/mL and -43.3% at 20 ng/mL after 120h). Moreover Rapamycin treatment did not affect cell viability (89.6% vs 91.0% vs

92.5%), while it did not protect from apoptosis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2mM pre-treatment for 18h (86.3% vs 87.1% vs 75.9%). Finally Rapamycin inhibited RMP chemokinesis (-37.6% at 5 ng/mL and -47.4% at 20 ng/mL after 24h).

**Conclusions.** These data suggest that in basal conditions Rapamycin treatment inhibits RMP proliferation and chemokines, while it does not affect RMP phenotype and viability, thus providing useful information about RMP biology in the attempt to develop new therapies for acute and chronic renal injury.

### 312 PO INVOLVEMENT OF CYCLIN-DEPENDENT KINASES IN AQP2 TRAFFICKING

Tamma G.<sup>1</sup>, Lasorsa D.<sup>1</sup>, Trimpert C.<sup>2</sup>, Mastrofrancesco L.<sup>1</sup>, Svelto M.<sup>1</sup>, Deen P.M.T.<sup>2</sup>, Valenti G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of General and Environmental Physiology, University of Bari Aldo Moro, Bari, Italy; <sup>2</sup>Department of Physiology, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands

**Introduction.** Kidney water reabsorption is regulated by the hormone vasopressin (AVP), which exerts its action on aquaporin-2 (AQP2) expressed in renal collecting duct. AVP binds to V2 receptors (V2R) resulting in an elevation of cAMP and activation of protein kinase A (PKA), which phosphorylates AQP2 at serine 256 (S256), inducing its redistribution to the plasma membrane. Mutations in V2R gene cause Nephrogenic Diabetes Insipidus (NDI), a renal disease characterized by severe water loss due to the insensitivity to vasopressin. Besides S256, S261 and S269 phosphorylation is dependent on AVP action, though the role and the kinases phosphorylating these residues are still unknown. Bioinformatical analysis suggest that S261 may be a substrate for cyclin-dependent kinases, (cdk), cdk1 and cdk5, which is further investigated here.

**Materials and Methods.** MDCK cells stably transfected with hAQP2 were used as experimental model. The effect of roscovitine, a cdk1 and cdk5-specific inhibitor, on AQP2 was evaluated by immunoblotting and immunofluorescence.

**Results.** Immunohistochemistry revealed that cdk1 and cdk5 are both expressed in AQP2 expressing cells rat kidney. In MDCK-AQP2 cells, roscovitine increased S256 and decreased S261 phosphorylation, and induced translocation of AQP2 to the apical membrane. No change in S269 phosphorylation was detected. Similar results were obtained in rat kidney slices. To investigate the signalling pathway responsible for AQP2 relocation under roscovitine treatment, PKA activity was evaluated by FRET. Compared with non treated cells, roscovitine treatment caused an increase in PKA activity

**Conclusions.** Altogether, our data indicate that cdk1 and 5 are functionally involved in AQP2 trafficking. Moreover, our data indicate that pharmacological inhibition of cyclin kinases may form a useful therapeutic avenue to treat NDI patients with V2R mutations, because our data show that cdk1/5 inhibition bypasses the need for the presence of the V2R in activating AQP2 trafficking to the plasma membrane.

### 313 PO ATTIVAZIONE DELL'IMMUNITÀ INNATA (TOLL-LIKE RECEPTORS) NELLA SINDROME DI SCHOENLEIN-HENOCH

Camilla R., Daprà V., Loiacono E., Peruzzi L., Amore A., Coppo R.

Nefrologia, Dialisi, Trapianto, H.R. Margherita, Torino

**Introduzione.** I Toll-Like Receptors (TLR) sono recettori di membrana o intracitoplasmatici mediatori della risposta immune innata e attivanti l'attività T linfocitaria. Il nostro gruppo ha dimostrato (*Clin Exp Immunol* 2009, **159**: 73-81) una sovra-regolazione del TLR4 nei linfonociti periferici dei pazienti (pz) con nefropatia a depositi di IgA (IgAN), suggerendo un ruolo dell'immunità innata nella patogenesi della malattia. La sindrome di Schoenlein-Henoch (SH) è considerata da molti una forma sistemica di IgAN con impronta vasculitica. Abbiamo indagato se anche nella SH fosse presente un'attivazione dell'immunità innata mediata dai TLR.

**Materiali e Metodi.** Abbiamo studiato 15 pz (8 maschi, età 7.4±1.8) con SH all'esordio, di cui 7 con interessamento renale (tutti con ematuria, 4 con proteinuria dosabile), prima dell'inizio del trattamento. È stata quantificata l'espressione del TLR 3, 4 e 9 nei linfonociti periferici sia come mRNA (in *real-time PCR* Taqman, normalizzando i risultati per il gene *Abelson*), sia come espressione recettoriale in citofluorimetria (intensità media di fluorescenza, MFI). Abbiamo poi indagato lo switch da proteasoma a immunoproteasoma (risultato attivato nei pz con IgAN e correlato con l'espressione dei TLR) studiando i rapporti tra le subunità LMP2/ $\beta$ 1, MECL1/ $\beta$ 2, LMP7/ $\beta$ 5 in *real-time PCR*.

**Risultati.** Abbiamo osservato una significativa sovra-regolazione dei TLR4 (mRNA 3.84±2.88U vs 1.46±1.43 U nei soggetti sani,  $p=0.0001$ , MFI: 2.39±0.75 U vs 1.60±0.44U,  $p<0.0001$ ) e, con minore evidenza significativa, anche dei TLR9 (mRNA 3.07±2.02U vs 1.41±1.59U,  $p=0.0125$ ; MFI 1.39±0.20 U vs 1.57±0.26U,  $p=ns$ ), mentre i TLR3 non erano modificati rispetto ai controlli. Non si è osservato, a differenza di quanto riportato nelle IgAN, switch da proteasoma a immunoproteasoma.

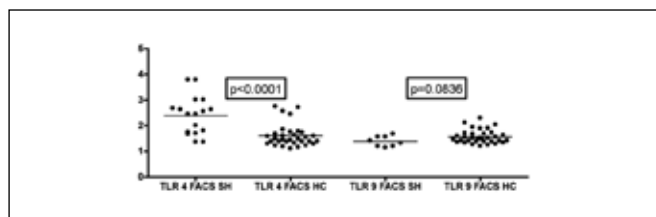
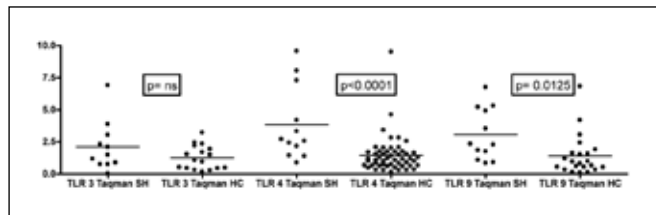
L'espressione del TLR4, sia mRNA che recettore di superficie, è quindi risultata significativamente aumentata rispetto alla popolazione sana di controllo. Il fenomeno era rilevabile sia nelle forme di SH con interessamento renale sia in quelle

esclusivamente extra-renali.

**Conclusioni.** Nella sindrome di Schoenlein-Henoch come nella IgAN è rilevabile un'attivazione della immunità innata con sovra-espressione dei TLR, prevalentemente TLR4, nei linfomonociti periferici.

TLR:

	Healthy Controls	SH	p
TLR 3 Taqman	1.27 ± 0.93	2.12 ± 1.95	ns
TLR 4 Taqman	1.46 ± 1.43	3.84 ± 2.88	0.0001
TLR 9 Taqman	1.41 ± 1.59	3.07 ± 2.02	0.0125
TLR 4 FACS	1.60 ± 0.44	2.39 ± 0.75	<0.0001
TLR 9 FACS	1.57 ± 0.26	1.39 ± 0.20	0.0836



### 314 PO TREG E TH17 NELLA NEFROPATIA A DEPOSITI DI IgA

Camilla R.<sup>1</sup>, Daprà V.<sup>1</sup>, Loiacono E.<sup>1</sup>, Peruzzi L.<sup>1</sup>, Rollino C.<sup>2</sup>, Beltrame G.<sup>2</sup>, Ferro M.<sup>2</sup>, Amore A.<sup>1</sup>, Coppo R.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Nefrologia, Dialisi, Trapianto, H. R. Margherita, Torino; <sup>2</sup>Nefrol., H. G. Bosco, Torino

**Introduzione.** La nefropatia a depositi di IgA (IgAN) è caratterizzata da difettosa regolazione del sistema immunitario, con risposta anomala agli antigeni di mucosa. Abbiamo descritto nei linfomonociti periferici (PBMC) di questi pazienti (pz) un aumento dell'espressione del *Toll-like receptor-4* (TLR4) correlato ai livelli di proteinuria. Lavori recenti si sono concentrati sull'equilibrio tra le cellule T produttrici di interleukina-17 (TH17) e le cellule T regolatorie (Treg) in malattie immunomediate. Scopo dello studio era indagare l'equilibrio Treg/TH17 in pz con IgAN, cercando le correlazioni con i TLR come marker di immunità innata.

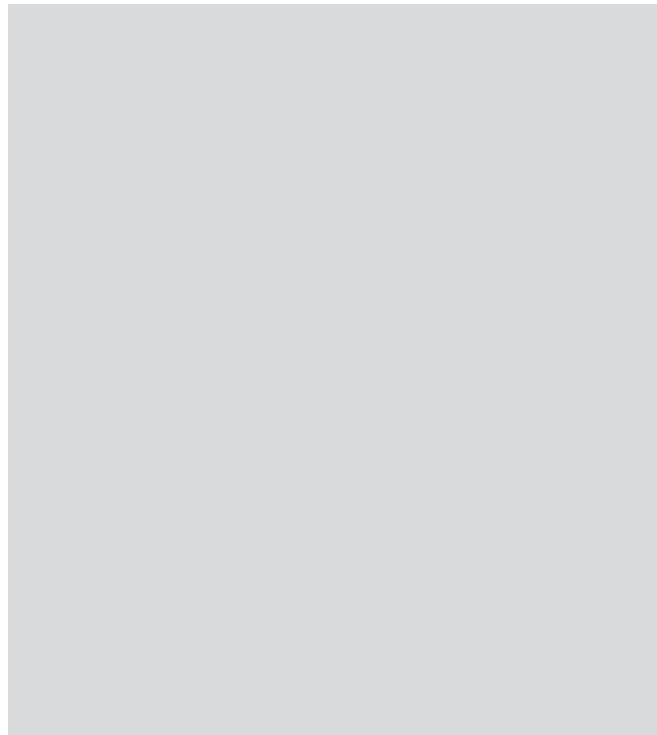
**Materiali e Metodi.** Sono stati isolati i PBMC di 28 pz con IgAN (età mediana 39,6, range IQ 19,1-65,0 anni), 82% maschi, e-GFR 92,6±46,5 ml/min, proteinuria mediana 0,2 g/die (0,10-0,40) e di 10 soggetti sani di controllo (HC). È stata misurata in *real-time PCR* secondo Taqman l'espressione dell'mRNA codificante per i geni regolatori dei Treg (Foxp3), per i fattori legati ai TH17 (IL-17 e *retinoid orphan nuclear receptor* RORc), e per TFG-β1, che modula la differenziazione dei TH17. L'mRNA codificante per i TLR 2, 3 e 4 è stato normalizzato sul gene Abelson. I risultati sono espressi in unità relative.

**Risultati.** I livelli trascrizionali di Foxp3 erano significativamente ridotti nei pz con IgAN rispetto ai controlli (0,82±0,30 vs 1,05±0,37, p=0,041), mentre quelli di IL-17 e del suo fattore di regolazione RORc erano moderatamente, ma non significativamente, aumentati (IL-17 1,17±1,07 vs 1,05±0,41 in HC, RORc 1,25±0,85 vs 1,14±0,71 in HC).

È stata trovata una correlazione significativa tra i livelli di mRNA codificante per IL-17 e RORc (p<0,0001). I livelli trascrizionali di TFG-β1 erano simili nei controlli e nei pz con IgAN e risultavano direttamente correlati con quelli di RORc (p=0,0015) e IL-17 (p=0,031). I livelli di mRNA codificante per RORc erano inversamente correlati con l'e-GFR (p=0,06). Una correlazione inversa è stata trovata fra l'espressione di Foxp3 mRNA e del TLR4 (p=0,022).

**Conclusioni.** È ipotizzabile che nei pz con IgAN vi sia un difetto funzionale dei Treg, che pare correlato ai segni di iperattività dell'immunità innata. Il TGF-β1 in questi pz sembra favorire l'espansione delle cellule TH17.

### 315 PO RITIRATO



### 316 PO ESPRESSIONE DIFFERENZIALE DEI PROFILI PROTEICI RENALI NEL RATTO DIABETICO

Castoldi G.<sup>1</sup>, Galbusera C.<sup>2</sup>, Bombardi C.<sup>1</sup>, Di Gioia C.<sup>2</sup>, Corradi B.<sup>1</sup>, Zerbini G.<sup>3</sup>, Brambilla P.<sup>2</sup>, Magni F.<sup>2</sup>, Galli Kienle M.<sup>2</sup>, Stella A.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Clinica Nefrologica, Az. Osp. San Gerardo, DIMEP Univ. Milano-Bicocca, Monza; <sup>2</sup>Dip. Medicina Sperimentale., Univ. Milano-Bicocca, Monza; <sup>3</sup>Unità Complicanze del Diabete, Div. Scienze Met. e Cardiovasc., Ist. San Raffaele, Milano

**Introduzione.** Il rene rappresenta uno dei principali organi bersaglio del diabete. Lo scopo di questo lavoro è valutare l'espressione differenziale dei profili proteici renali nel ratto diabetico.

**Metodi.** A 16 ratti SD è stato indotto diabete (streptozotocina 75 mg/kg i.p.). Due giorni dopo lo sviluppo di diabete a 6 ratti si somministrava insulina per normalizzare la glicemia. A 6 ratti SD (gruppo controllo) si somministrava soluzione tampone. La pressione arteriosa sistolica (*tail cuff*) è stata misurata ogni 30 giorni, la glicemia e la proteinuria ogni 15 giorni. Dopo tre mesi i ratti sono stati sacrificati e sono stati prelevati i reni.

È stata effettuata un'analisi proteomica comparativa multipla sui reni dei 3 gruppi di ratti studiati. Le proteine estratte dal tessuto renale sono state separate mediante 2-D PAGE e sono state analizzate le immagini dei gel dei 3 gruppi. L'analisi si è focalizzata solo sulle proteine che presentavano una risposta tutto/nulla, cioè che venivano indotte o inibite nel diabete e venivano riportate alla situazione di controllo nel ratto diabetico trattato con insulina. Dai gel sono stati prelevati gli spot differenzialmente espressi, che venivano sottoposti a digestione enzimatica, analizzati in spettrometria di massa MALDI-TOF - Reflex IV (Bruker-Daltonik), identificati mediante tecnica *Peptide-Mass Fingerprinting*, e analizzati con il software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) per la costruzione di *pathway* metabolici e *network* di interazione biologica.

**Risultati.** I ratti diabetici presentavano valori di glicemia e proteinuria significativamente aumentati rispetto ai ratti controllo e ai ratti diabetici trattati con insulina. L'analisi proteomica del tessuto renale ha mostrato che lo sviluppo della malattia ha inibito, nei ratti diabetici, l'espressione di 20 proteine che erano invece presenti nei ratti controllo e nei ratti diabetici trattati con insulina. Al contrario, nei reni dei ratti diabetici erano presenti 9 proteine che non erano espresse nei reni dei ratti controllo e dei ratti diabetici trattati con insulina. Le proteine sono state analizzate con il software IPA e classificate in due *network*: *Energy Production, Nucleic Acid Metabolism, Small Molecule Biochemistry* e *Gene Expression, Cellular Growth and Proliferation*.

Proteine assenti nel rene del ratto diabetico		Proteine presenti nel rene del ratto diabetico	
MMSA_RAT	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	MTA1_RAT	Metastasis-associated protein MTA1
SCOT1_RAT	Succinyl-CoA:3-ketoadic-coenzyme A transferase 1	IRK5_RAT	G-protein-activated inward rectifier K <sup>+</sup> channel
DHE3_RAT	Glutamate dehydrogenase 1	ENO4_RAT	Alpha-enolase
ENO4_RAT	Alpha-enolase	VIME_RAT	Vimentin
ODO2_RAT	Dihydrodipicolylsine-residue succinyltransferase	NIT1_RAT	Nitric oxide synthase homolog 1
AGT2_RAT	Alanine-glyoxylate aminotransferase 2	MTA1_RAT	Metastasis-associated protein MTA2
THL1_RAT	Acetyl-CoA acetyltransferase	GRPE1_RAT	GrpE protein homolog 1
ATPB_RAT	ATP synthase subunit beta	TBB2A_RAT	Tubulin beta-2A chain (fragment)
HOHD2_RAT	Halo dehalogenase-like hydro domain 2	BAF_RAT	Barrier-to-autointegration factor
TPIS_RAT	Triosephosphate isomerase		
GSTA6_RAT	Glutathione S-transferase A6		
FAHD1_RAT	Fumarylacetoacetate hydrolase domain protein 1		
PGRC1_RAT	Membrane-asso progesterone receptor 1		
CRYAB_RAT	Alpha crystallin B chain		
ATPA_RAT	ATP synthase subunit alpha		
G3P_RAT	Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase		
HSP7C_RAT	Heat shock cognate 71 kDa protein		
PDIA3_RAT	Protein disulfide-isomerase A3 precursor		
MUP_RAT	Major urinary protein precursor		
PEBP1_RAT	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1		

**Conclusioni.** La presenza di nefropatia diabetica modula l'espressione di differenti proteine implicate in ampi e complessi pathways coinvolti nei processi di crescita e proliferazione cellulare, che potrebbero avere un'importante ruolo nella progressione della nefropatia.

### 317 PO MECCANISMI INTRACELLULARI DELLA NEFROSSITÀ DA MEZZI DI CONTRASTO

Andreucci M.<sup>1</sup>, Fuiano G.<sup>1</sup>, Faga T.<sup>1</sup>, Bertucci B.<sup>2</sup>, Tamburrini O.<sup>2</sup>, Lucisano G.<sup>1</sup>, Michael A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cattedra di Nefrologia, Università "Magna Graecia", Catanzaro; <sup>2</sup>Cattedra di Radiologia, Università "Magna Graecia", Catanzaro

**Introduzione.** La nefropatia da mezzi di contrasto (mdc) è ancora un rilevante problema clinico. Tra le sue cause è stata ipotizzata una citotossicità (tubulare renale) diretta i cui meccanismi molecolari sono poco noti. In questo studio abbiamo dimostrato che i mdc causano l'attivazione di alcune molecole di vie del segnale (pathways) intracellulari coinvolte nella morte cellulare e nell'infiammazione.

**Materiali e Metodi.** Abbiamo utilizzato cellule HK-2 (cHK-2), una linea cellulare tubulare renale prossimale umana, incubandole con due diversi tipi di mdc (75 mg l/ml), sodio diatrizoato (NaD; ionico) o iomeprolo (IOM; non ionico), per 2 ore (h). I mdc erano quindi rimossi e le cHK-2 poste in coltura fino a 22h. Ad alcuni intervalli le cHK-2 erano lisate; gli estratti proteici ottenuti erano utilizzati per SDS-Page Western Blotting. La sopravvivenza cellulare era analizzata con MTT assay.

**Risultati.** I mdc provocavano un aumento (più marcato con NaD) della fosforilazione (attivazione) delle chinasi "JNKs" e "p38" e della fosforilazione (in Ser276) del fattore di trascrizione NF-kB. L'incubazione delle cHK-2 per 2h con entrambi i mdc causava una riduzione della sopravvivenza cellulare (specie con NaD). La rimozione del mdc dopo 2h dall'incubazione provocava una ripresa della sopravvivenza cellulare entro 24h per le cHK-2 che erano state incubate con IOM ma non con NaD. Dopo la rimozione del mdc i livelli di fosforilazione di Akt e del fattore di trascrizione STAT3 (che è importante per la proliferazione cellulare) erano maggiori nelle cHK-2 incubate con IOM che in quelli rilevati nelle cHK-2 incubate con NaD a 5h e a 22h dopo la rimozione del mdc. La fosforilazione di JNKs e p38, che hanno un ruolo cruciale nella morte cellulare, era aumentata nelle cHK-2 incubate con NaD (maggiormente che con IOM). Anche la fosforilazione di NF-kB era incrementata nelle cHK-2 incubate con NaD rispetto a IOM. Poiché NF-kB, JNKs e p38 possono essere coinvolti nell'upregulation dell'interleuchina-8 (IL-8) abbiamo misurato il suo rilascio (mediante ELISA) a 22h dopo la rimozione del mdc nel mezzo di coltura cellulare: NaD causava un maggiore rilascio di IL-8 nelle cHK-2 incubate con NaD rispetto a IOM.

**Conclusioni.** Questi risultati dimostrano gli effetti dei mdc su alcuni importanti pathways intracellulari che possono aiutare a comprendere i meccanismi della loro citotossicità consentendo quindi lo sviluppo di strategie terapeutiche per poter prevenire la loro nefrotossicità.

### 318 PO INSULINO-RESISTENZA E INSUFFICIENZA RENALE CRONICA: IL RUOLO DI RETINOL BINDING PROTEIN 4

Piotti G., Gabanti E., Corradetti V., Bedino G., Bosio F., Pattonieri E.F., Carrara C., Gregorini M., Rampino T., Dal Canton A.

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

**Introduzione.** L'insulino-resistenza (IR) in corso di insufficienza renale è una condizione costante, responsabile di rischio cardio-vascolare aggiuntivo, ma con meccanismo ignoto. Recenti studi evidenziano che l'aumento di Retinol Binding Protein 4 circolante (RBP4) induce lo sviluppo di IR. Data l'escrezione renale, abbiamo investigato il ruolo di RBP4 nell'indurre IR in pazienti in dialisi (pz in HD).

**Metodi.** Abbiamo arruolato 16 pz in HD e 16 controlli, di 18-72 anni, senza diabete o IR, neoplasie, infezioni e malnutrizione, accoppiati per sesso, età e indice di massa corporea (BMI). Abbiamo raccolto anamnesi, dati biometrici, campioni ematici per esami umorali e per dosare RBP4 con ELISA. Inoltre da 6 coppie di soggetti abbiamo prelevato tessuto adiposo per quantificare mRNA di glut4 e rbp4 con RT-PCR.

**Risultati.** La glicemia era normale in tutti i soggetti; RBP4 maggiore nei pz in HD rispetto ai controlli [176.8+/-63.2 mg/dL e 39.2+/-17.4 mg/dL (p<0.0001)] così insulina [15.8+/-12.2 µU/mL vs 6.7+/-4.3 µU/mL (p=0.005)] e HOMA index [3.2+/-2.6 vs 1.4+/-1.0 (p=0.008)].

L'aumento di RBP4 nei pz in HD correlava con glicemia (p=0.04), colesterolo (p=0.04), trigliceridi (p=0.0004) e protidemia (p=0.005), e parzialmente con insulina (p=0.13), HOMA index (p=0.08) e albumina (p=0.07).

RBP4 era minore in pz in HD con diuresi residua rispetto agli anurici: 141.3+/-12.1 vs 193.4+/-16.1 (p=0.02).

L'espressione di mRNA di glut4 era minore nei pz in HD rispetto ai controlli in tutte le coppie eccetto per una, in cui il sano aveva insulina, HOMA index e RBP4 maggiore rispetto al paziente accoppiato in HD; inoltre l'espressione di mRNA di glut4 era inversamente correlata a età e BMI.

L'espressione di mRNA di rbp4 era inferiore nei pz in HD e nei controlli con il maggiore livello di RBP4, inoltre correlava con l'età e l'insulina.

**Conclusioni.** L'IR nei pz in HD sarebbe mediata da una ridotta espressione adiposa di glut4 e alti livelli sierici di RBP4, secondari a una ridotta escrezione più che a un'aumentata espressione tissutale.

### 319 PO EFFETTI DELL'H<sub>2</sub>S, IL TERZO GAS ENDOGENO CON PROPRIETÀ VASODILATRICI, SULL'ADESIONE MONOCITARIA A CELLULE ENDOTELIALI IN CULTURA

Sepe I.<sup>1</sup>, Lanza D.<sup>1</sup>, Raiola I.<sup>1</sup>, Capasso R.<sup>2</sup>, Ingrosso D.<sup>2</sup>, Perna A.F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nefrologia, Seconda Università degli Studi di Napoli, Napoli; <sup>2</sup>Biochimica "F. Cedrangolo", Seconda Università degli Studi di Napoli, Napoli

**Introduzione.** L'acido solfidrico, H<sub>2</sub>S, rappresenta il terzo gas endogeno, dopo ossido nitrico e monossido di carbonio, con proprietà modulatrici sul sistema cardiovascolare. L'H<sub>2</sub>S agisce infatti come vasodilatatore, e numerosi studi hanno messo in evidenza 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.** Monostrati di cellule endoteliali umane Eahy926 sono state incubate con una concentrazione 100 µM di NaHS (un donatore di H<sub>2</sub>S). È stata valutata la concentrazione delle molecole di adesione ICAM-1, VCAM-1 e della chemochina MCP-1 nel terreno di coltura; e l'espressione genica della cationina-γ-liasi (CSE), principale enzima produttore di H<sub>2</sub>S a livello endoteliale.

**Risultati.** Il trattamento con H<sub>2</sub>S è risultato in grado di prevenire significativamente l'adesione monocitaria indotta dal TNF-α. Il meccanismo molecolare di tale riduzione dipende dalla significativa diminuzione della concentrazione delle molecole di adesione ICAM-1, VCAM-1 e della chemochina MCP-1 nel terreno di coltura, conseguente al trattamento con H<sub>2</sub>S. Inoltre, l'espressione genica 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.

### 320 PO L'INIBIZIONE DELLA COX-2 RIDUCE LA DOWN-REGULATION DELLA GLICOPROTEINA P INDOTTA DALL'ALBUMINA NELLE CELLULE TUBULARI UMANE HK-2

Tramonti G., Romiti N., Chieli E.

Patologia Sperimentale, Patologia Generale, Pisa

**Introduzione.** La glicoproteina P (Pgp) è una proteina di membrana che trasporta sostanze quali farmaci, tossici, xenobiotici, dall'interno all'esterno delle cellule. Nel rene la Pgp è localizzata prevalentemente nel tubulo prossimale. In linee cellulari di neoplasie è stato riscontrato che l'espressione della Pgp è modulata dalla attività della COX-2. In tali linee cellulari fattori che stimolano l'attività della COX-2, ROS o citochine, inducono un aumento della espressione della Pgp. Nelle cellule HK-2 l'espressione della Pgp è risultata ridotta in presenza di albumina.

**Scopo.** Scopo dello studio era la valutazione della espressione della COX-2 nelle cellule tubulari HK-2. È stato inoltre studiato l'effetto di un inibitore della COX-2, celecoxib (CEL), sulla espressione della Pgp nelle cellule HK-2 in condizioni basali e dopo esposizione alla albumina.

**Materiali e Metodi.** L'espressione della COX-2 è stata valutata mediante Western Blot (WB). Per la Pgp sono state determinate l'espressione della proteina

mediante WB e l'espressione del gene ABCB1 mediante SQRT-PCR. Il CEL è stato impiegato a concentrazioni differenti (5-50  $\mu$ M) per 48-72 ore. L'albumina è stata aggiunta in coltura alla concentrazione di 15 mg/ml.

**Risultati.** Le cellule tubulari HK-2 esprimono la COX-2 come dimostrato dalla presenza della banda relativa dal WB. L'aggiunta di CEL (25  $\mu$ M) ha indotto una riduzione sia della espressione della Pgp, 41% dei controlli, che della espressione del gene di codifica ABCB1, 68%. In presenza di albumina l'espressione della Pgp è risultata ridotta, 49% rispetto ai controlli. Nelle cellule esposte all'albumina il CEL ha indotto un parziale ripristino dell'espressione della Pgp: 61%.

**Conclusioni.** I risultati di questo studio dimostrano che le cellule tubulari umane HK-2 esprimono costitutivamente la COX-2. CEL, un inibitore specifico della COX-2, riduce espressione e funzione della Pgp. CEL e albumina riducono l'espressione della Pgp. In presenza di CEL la riduzione della espressione della Pgp indotta dall'albumina risulta meno evidente. Quindi nelle cellule HK-2 l'inibizione della COX-2 contrasta l'effetto della albumina sulla Pgp probabilmente attraverso un *pathway alternativo*.

### 321 PO IL CELECOXIB INIBISCE L'ESPRESSIONE DELLA GLICOPROTEINA P CON MECCANISMO COX-2 DIPENDENTE NELLE CELLULE TUBULARI UMANE HK-2

Tramonti G., Romiti N., Chieli E.  
Patologia Sperimentale, Patologia Generale, Pisa

**Introduzione.** La glicoproteina P (Pgp) è una proteina di membrana che trasporta diverse sostanze, quali farmaci, tossici, xenobiotici, dall'interno all'esterno delle cellule riducendone la concentrazione intracellulare. Nel rene la Pgp è localizzata prevalentemente nelle cellule del tubulo prossimale. In linee cellulari di neoplasie è stato dimostrato che l'espressione della Pgp è modulata dalla attività della COX-2. Infatti in tali linee cellulari fattori che stimolano l'attività della COX-2, quali ROS o citochine, inducono un aumento della espressione della Pgp.

**Scopo.** Scopo di questo studio era la valutazione della espressione della COX-2 nelle cellule tubulari umane HK-2 in coltura. È stato inoltre studiato nelle stesse cellule l'effetto di un inibitore della COX-2, celecoxib (CEL), sulla espressione della COX-2 e sulla espressione e funzione della Pgp.

**Materiale e Metodi.** L'espressione della COX-2 è stata valutata mediante Western Blot (WB). Per la Pgp sono state determinate l'espressione della proteina mediante WB, l'espressione del gene ABCB1 mediante SQRT-PCR e funzione di trasporto mediante il test della Calcein AM. Il CEL è stato impiegato a concentrazioni differenti (5-50  $\mu$ M) per 48-72 ore.

**Risultati.** Le cellule tubulari HK-2 esprimono la COX-2 come dimostrato dalla presenza della banda relativa con il WB. L'aggiunta di CEL (25  $\mu$ M) ha indotto una riduzione sia della espressione della Pgp, 41% dei controlli, che della espressione del gene di codifica ABCB1, 68% dei controlli. Il meccanismo di trasporto Pgp-mediato è risultato ridotto in quanto il test di accumulo intracellulare di Calceina AM ha dimostrato una ritenzione del probe del 264% rispetto ai controlli. Le cellule HK-2 in presenza di CEL sono risultate più sensibili alla ciclosporina A (-25.8% di vitalità rispetto ai controlli).

**Conclusioni.** I risultati di questo studio dimostrano che le cellule tubulari umane HK-2 esprimono costitutivamente la COX-2. L'espressione della Pgp è regolata dalla COX-2. CEL, un inibitore specifico della COX-2, riduce espressione e funzione della Pgp. Gli inibitori della COX-2 possono aumentare l'effetto citotossico tubulare di alcuni farmaci quali la ciclosporina A.

### 322 PO MISURAZIONE DELL'NGAL SIERICO ED URINARIO NELLA DIAGNOSI E NELLA VALUTAZIONE DEL DANNO PARENCHIMALE DELLE IVU IN ETÀ PEDIATRICA

Tummolo A., D'Addato O., Enfasi M., Aceto G., Di Bitonto G., Altomare M.A., Francioso G., Penza R.  
Nefrologia Pediatrica, Università degli Studi di Bari, Bari

**Introduzione.** L'NGAL (*Neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) è uno dei più promettenti biomarker di danno renale acuto. La sua valutazione in pazienti in età pediatrica risulta ancora scarsa, e ancor più, mancano evidenze sul ruolo di tale marker nella diagnosi e nella valutazione di danno parenchimale da infezioni delle vie urinarie (IVU), mancando evidenze circa i range di normalità di NGAL sierico e urinario. Lo studio ha l'obiettivo di testare i livelli di NGAL urinario e sierico per la diagnosi di IVU nonché di porre le basi per la valutazione dei livelli di normalità di tale biomarker anche in situazioni di danno subacuto o cronico.

**Materiale e Metodi.** È stato valutato un campione di 23 pazienti di età compresa tra 1 mese e 18 anni, con segni e sintomi di IVU, in cui sono stati dosati i livelli ematici ed urinari di NGAL con metodica ELISA. I pazienti sono stati quindi suddivisi in 2 sottogruppi: GRUPPO A (12), comprendente pazienti con un intervallo di tempo tra IVU e prelievo urinario/ematico  $\leq$  6 settimane e GRUPPO B (11), comprendente pazienti con intervallo di tempo tra IVU e prelievo  $>$  6 settimane e  $<$  1 anno. I due gruppi sono stati posti a confronto con un gruppo controllo (7).

**Risultati.** I livelli urinari di NGAL sono risultati significativamente più elevati sia

nel gruppo A che nel gruppo B rispetto ai controlli sani ( $p < 0.05$ ). Nel gruppo A si sono osservati inoltre valori più elevati anche rispetto a quelli del gruppo B con infezione pregressa ( $p < 0.05$ ). Di contro, i livelli sierici di NGAL non hanno mostrato differenze statisticamente significative nel confronto tra i vari gruppi.

**Conclusioni.** I risultati preliminari di questo studio pongono l'accento sul legame NGAL-infezione ed esplicitano clinicamente il già dimostrato ruolo antibatterico della proteina, la cui produzione e rilascio aumentano in corso di infezione batterica. Tali evidenze lascerebbero presupporre un utilizzo dell'NGAL urinario non solo come biomarker di danno renale acuto in situazioni di emergenza, ma anche come espressione di danno parenchimale nella IVU acuta da quantificare e monitorare nel tempo.

### 323 PO OXIDANT/ANTIOXIDANT STATUS IN DIFFERENT FORMS OF NEPHROPATHIES IN CHILDHOOD AUTOIMMUNE DISEASES

Tummolo A., D'Addato O., Di Bitonto G., Aceto G., Francioso G., Ciccarelli M., Penza R.  
Nefrologia Pediatrica, Università degli Studi di Bari, Bari

**Introduction and Objectives.** Oxidative damage is considered to have a role in the pathogenesis of various inflammatory and metabolic diseases. Recently, there has been growing evidence supporting the importance of oxidative stress, defined as increased production of reactive oxygen species (ROS) depending on an imbalance between oxidant and antioxidant systems in different forms of autoimmune diseases. In spite of several experimental studies on oxidative injury, oxidative stress has not been adequately evaluated in children and clinical investigations on this issue are scarce. The aim of this study was to assess the role of oxidative stress in the pathogenesis of different autoimmune diseases of childhood and to evaluate if any correlation between free radical activity and antioxidant status can be associated with clinical manifestations and with the active and recovery phases of the disease.

**Materials and Methods.** The level of reactive oxygen metabolites and the antioxidant capacity (respectively d-ROMs and BAP tests) were measured in 14 children (8 M, 6 F) with Systemic Lupus Erythematosus, Juvenile Arthritis, Rheumatic disease and Henoch-Schönlein purpura (mean age  $9.3 \pm 2.7$  years), with renal involvement (hematuria, proteinuria, nephrotic syndrome), both at the onset of the disease and at the remission period.

**Results.** Abnormal d-ROMs and/or BAP values were detected in the 85% and in 57% of patients respectively. Oxidant/antioxidant activities were found to be similar between active and remission stages, however significant differences were found in antioxidant parameters between patients with gastrointestinal and/or joint involvement and those only with skin involvement ( $p < 0.005$ ), significant differences were found too between patients with gastrointestinal and/or joint involvement and those only with renal involvement ( $p < 0.005$ ).

**Conclusions.** Increased oxidative stress may play an important role in the pathogenesis of autoimmune nephrologic diseases in children. There is a positive correlation between extension of disease and lower levels of antioxidant agents. Antioxidant therapeutic interventions to prevent the risks due to increased oxidant stress remain to be investigated.

### 324 NA MONITORAGGIO DEL TRAPIANTO RENALE (TX) CON ULTRASONOLOGIA CONVENZIONALE (CU) ED ELASTOGRAFIA (E). VARIAZIONE DI E IN RAPPORTO A CAMBIO TERAPIA (T)

Ravelli M.  
Diagnostica per Immagini, Istituto Clinico Città di Brescia, Brescia

**Introduzione.** Problema attuale del tx è il Rigetto cronico (RC) caratterizzato da fibrosi (F), atrofia e, talora, attivazione immunologica. La capacità di E di rilevare F ne suggerisce la possibile utilità, a fronte della recente segnalazione di possibile regressione di F. Presentiamo un caso clinico (studiato con US CU ed E), con variazione quantitativa di E, dopo modifica di T.

**Materiale e Metodi.** T.B, tx dal 1983; T: Ciclosporina (Cs). 7/06: creatinemia (cr) 1, 2; proteinuria (P) non significativa; CU: accentuata perfusione (AP), note tossicità, indice resistenza (RI) 0.65; E: score (ES) 3/2, istogramma (I) tipo A. 11/07: cr 1, 9; biopsia: RC con attività umorale (RCU). 9/08: cr 4, 8; inserito Tenckhoff; sostituita Cs con Myfortic (M). CU: invariato, ma RI 0,81.1/09: cr 4,6; P 2 gr/die; CU: AP, RI 0.89; E: ES 3/2, I tipo B. 5/09: cr 5, P invariata; CU: AP; RI 0.74; E: ES 3/2, I tipo C.

CU ed E sono state eseguite da un solo medico: CU si valutava secondo i parametri della letteratura. E si eseguiva con Logos Hitachi, sonda (s.) lineare multifrequenza (MF) o microconvex (mc) MF; CU con s. mc MF e con Technos Esaote, s. convex 3.5 MHz. E si eseguiva nei 3 settori del rene (S) con misura semiquantitativa, in ognuno, delle percentuali (pc) dei colori, calcolo della pc media di ciascuno e definizione ES secondo la scala del Gruppo di Studio Italiano. Si quantificavano poi i pattern E con software di quantificazione Esaote-Hitachi, ottenendo, con più indici, corrispondenti I, confrontabili. Si comparava CU con E ed E+CU con cr e P eseguite in contemporanea.

**Risultati.** Il confronto tra E mostra diversi I (con uguale ES). A 2 mesi da inizio M: calo F, calo Elasticità (EL), aumento colore intermedio (QI); a 7 mesi ulteriore calo