

mg/ml, 2.8 vs 0.9% at 50 mg/ml and 3.9 vs 1.9% at 100 mg/ml, respectively; for apoptosis 45.6 vs. 36.9% at 20 mg/ml, 52.0 vs 40.0% at 50 mg/ml and 57.8 vs 46.8% at 100 mg/ml, respectively; $P < 0.05$ at each concentration).

Conclusion. At angiographic concentrations, iodixanol induces fewer cytotoxic effects on cultured tubular cells than iohexol and iopamidol. Our data may provide useful information to explain the cellular mechanisms of CIN.

21 PO

IDROCARBURI, NEFROTOSSICITÀ E NGAL: EVIDENZE DALLE CELLULE IN CULTURA

Lacquaniti A.¹, Medici M.A.², Donato V.¹, Fazio M.R.¹, Lucisano S.¹, Cernaro V.¹, Lupica R.¹, Buemi M.¹

¹Dip. Med. Int, Univ. Di Messina, UTSI e Tec Dialitiche, Messina; ²Dip. Scienze Biologiche, Univ. Di Messina, Messina

Introduzione. Milioni di lavoratori sono esposti agli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) ed è noto come il rene sia un bersaglio di questi composti tossici. Utilizzando un modello di cellule tumorali renali in coltura, l'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare se l'esposizione di tali cellule al fenolo, metabolita degli IPA e catabolizzato in vivo esclusivamente a livello renale, determini una sintesi cellulare di NGAL.

Materiali e Metodi. La linea cellulare A498, derivata da un carcinoma renale, è stata mantenuta in coltura a 37° C. Dopo 24 ore di coltura, le cellule sono state divise in tre gruppi in base al trattamento con fenolo a diversa concentrazione: 0.2 mM (gruppo A), 1.2 mM (gruppo B) e 6.4 mM (gruppo C). Le cellule non trattate con fenolo sono state considerate gruppo di controllo (CONTR). La localizzazione intracellulare dell'NGAL è stata valutata mediante immunofluorescenza previa preparazione delle cellule e incubazione con anticorpo anti-NGAL coniugato con perossidasi. La sintesi di NGAL da parte delle cellule in ciascun gruppo è stata anche valutata mediante il suo dosaggio mediante tecnica ELISA nel medium della coltura.

Risultati. L'immunofluorescenza chiaramente dimostra come la linea cellulare renale A498 dopo trattamento con fenolo sintetizza ed esprime NGAL. Inoltre, dal dosaggio della lipocalina nel medium colturale, abbiamo messo in evidenza come tale sintesi sia direttamente correlata con la concentrazione di fenolo utilizzata. In particolare NGAL CONTR:40 ng/ml, NGAL gruppo A:89 ng/ml, NGAL gruppo B:104 ng/ml, NGAL gruppo C:184 ng/ml con differenze statisticamente significative tra ciascun gruppo ($p < 0.001$).

Conclusioni. Gli idrocarburi e i loro metaboliti attivi, quali il fenolo, determinano un danno a carico delle cellule tubulari renali ed il dosaggio di NGAL permette in modo assoluto di diagnosticare questa condizione. Ciò è stato chiaramente dimostrato da questo studio in vitro ove gli elevati livelli di NGAL nel medium colturale, direttamente correlati alla dose di fenolo utilizzato, e la netta positività all'immunofluorescenza rispetto al controllo indicano la sofferenza da parte della cellula renale esposta all'idrocarburo.

22 PO

UN ELEVATO APPORTO DI SODIO AUMENTA IL RIASSORBIMENTO DI HCO₃-NELL'ANSA DI HENLE ATTIVANDO IL CONTROTRASPORTO Na⁺/H⁺ NHE1 E IL CONTROTRASPORTO Cl⁻/ HCO₃- AE2αβ

Petrazzuolo O., Scanni R., Damiano S., Mainolfi C., Liguoro M., Trepiccione F., Zaccchia M., Capasso G.
Cattedra di Nefrologia, Seconda Università degli Studi di Napoli, Napoli

È noto che l'assunzione di sodio influenza il meccanismo di acidificazione tubulare renale. Nella porzione midollare del tratto ascendente dell'ansa di Henle (mTAL) il riassorbimento del bicarbonato (JHCO₃-) avviene grazie al controtrasporto basolaterale Cl⁻/ HCO₃- (AE2αβ) e risulta dipendente dal controtrasporto apicale Na⁺/H⁺ (NHE3) ed in misura minore dalla pompa protonica (H⁺-ATPasi). L'espressione dell'NHE3 è controllata dal cofattore NHERF1. Lo scopo di questo studio è valutare gli effetti di una dieta ad alto contenuto di sodio (0.28 M di NaCl per 14 giorni aggiunti nell'acqua da bere) su: 1. il JHCO₃- nell'ansa di Henle; 2. i livelli di mRNA e l'espressione proteica dei trasportatori coinvolti nel bilancio acido-base nel mTAL. Ratti adulti sottoposti a dieta ipersodica (HSD) sviluppano ipertensione al dodicesimo giorno e mostrano una riduzione del 24% del GFR. Il JHCO₃- è stato misurato tramite micropuntura in vivo perfondendo le anse a partire dalla porzione terminale del tubulo contorto prossimale al primo tratto del tubulo contorto distale alla velocità di perfusione di 40 nL/min. In presenza di 13, 24 e 38 mM di HCO₃- nel perfusato è stato riscontrato un incremento del JHCO₃- nei ratti HSD ($n = 22$, $p < 0.05$) rispetto al gruppo di controllo sottoposto ad una dieta con normale contenuto di sodio (NSD). A livello molecolare, l'abbondanza dell'mRNA e delle proteine è stata quantificata rispettivamente mediante Real Time PCR e Western Blot a partire da mTAL isolati da reni trattati con collagenasi. Per l'NHE3, NHERF1, b1 H⁺-ATPasi e a4 H⁺-ATPasi non sono state riscontrate variazioni nei livelli di mRNA e di espressione proteica rispetto al gruppo NSD. Invece dati di Western Blot evidenziano un aumento significativo dell'AE2αβ ($p < 0.05$) e dell'NHE1 ($p < 0.001$) nei ratti HSD rispetto agli NSD. I dati indica-

no che a livello del mTAL, una dieta ipersodica determina una up-regulation dell'NHE1 che interagendo con l'NHE3 luminale aumenta l'ingresso di HCO₃- nella cellula mentre l'attivazione dell'AE2αβ ne favorisce l'uscita attraverso la membrana basolaterale.

IMMUNOLOGIA - CRESCITA CELLULARE - MODELLI SPERIMENTALI

23 CO

MIR-148B MODULA L'ESPRESSIONE DEL GENE CORE 1, β 1,3-GALACTOSILTRANSFERASI 1 SPIEGANDO L'ALTERATA GLICOSILAZIONE DELLE IGA1 NELLA IGA NEFROPATIA

Serino G.^{1,2}, Sallustio F.^{1,2}, Cox S.N.^{1,2}, Pesce F.¹, Schena F.P.^{1,2}

¹Dipartimento dell'Emergenza e dei Trapianti d'Organo, Università degli Studi di Bari, Bari; ²Consorzio C.A.R.S.O., Valenzano (BA)

La IgA Nefropatia (IgAN) è la principale forma di glomerulonefrite primitiva caratterizzata da un'anomala glicosilazione a livello della regione di cerniera (hinge region) della molecola di IgA1. La causa di questa anomalia nella IgAN è poco conosciuta, anche se è noto un importante coinvolgimento dell'enzima core 1, β1,3-galattosiltransferasi 1 (C1GALT1). Ad oggi, il ruolo dei microRNA (miRNA) nella patogenesi della IgAN non è ancora noto. In questo studio, mediante il profilo di espressione dei miRNA sull'intero trascrittoma dei linfociti circolanti (PBMC), abbiamo identificato 37 miRNA differenzialmente espressi in 7 pazienti IgAN rispetto a 7 soggetti sani. Tra questi, il miR-148b, up-regolato nei pazienti con IgAN, aveva come target computazionale i geni C1GALT1, INVS e PTEN, down-regolati nei pazienti IgAN. I livelli di espressione del C1GALT1 nei pazienti IgAN erano significativamente ridotti e correlavano inversamente con i livelli di espressione del miR-148b. Questa relazione tra miR-148b e C1GALT1 è stata confermata biologicamente mediante esperimenti di trasfezione ex vivo. L'inibizione del miR-148b nei PBMC di pazienti IgAN portava ad un incremento dei livelli di C1GALT1, sia di mRNA sia di prodotto proteico, simile a quello osservato nei soggetti sani. Inoltre, i livelli di espressione del miR-148b in 50 pazienti IgAN e in 50 soggetti sani correlavano direttamente con i livelli plasmatici delle IgA1 deglicosilate. In conclusione, i nostri dati, per la prima volta, dimostrano un importante ruolo dei miRNA nella patogenesi della IgAN e identificano il C1GALT1 come target biologico del miR-148b, trovato maggiormente espresso nei pazienti IgAN. In particolare, la deregolazione del miR-148b potrebbe spiegare l'alterata glicosilazione delle IgA1 e quindi fornire un potenziale target farmacologico per nuovi approcci terapeutici nella IgAN.

24 CO

ALFA ENOLASI: UN NUOVO ANTIGENE PODOCITARIO NELLA NEFROPATIA MEMBRANOSA

Murtas C.^{1,2}, Carnevali M.L.², Bruschi M.¹, Candiano G.¹, Argentiero L.², Magnano A.², Allegri L.², Ghiggeri G.M.¹

¹U.O. Nefrologia, Dialisi e Trapianto e Laboratorio di Fisiopatologia dell'Uremia, Istituto G. Gaslini, Genova; ²Dipartimento di Clinica Medica, Nefrologia e Scienze della Prevenzione, Università degli Studi, Parma

Introduzione. I recenti sviluppi tecnologici nel campo della proteomica e della laser dissezione tissutale hanno portato all'identificazione di tre auto-antigeni podocitari implicati nella patogenesi della nefropatia membranosa (NM). Essi sono il recettore della fosfolipasi A2, l'aldoso reductasi e la superossido-dismutasi 2. È verosimile che anche altri antigeni siano coinvolti.

Materiali e Metodi. Dai glomeruli di affetti da NM idiopatica, isolati tramite microdissezione laser, sono stati eluiti gli anticorpi depositati. Questi sono stati caratterizzati, riscontrando la presenza di anticorpi anti alfa enolasi (AE). È stata, quindi, appurata l'espressione dell'AE a livello glomerulare e la sua co-localizzazione con le IgG4 depositate mediante immunofluorescenza e microscopia confocale. Attraverso l'immuno-elettronmicroscopia è stata verificata la presenza dell'antigene negli immunodepositi. Il siero di 29 pazienti, raccolto al momento della biopsia renale, è stato utilizzato per titolare gli anti-AE circolanti, tramite metodica "dot-blot". Il titolo è stato correlato con alcuni parametri clinici tramite il test di Spearman.

Risultati. Anticorpi anti-AE sono eluibili dai glomeruli dei pazienti. AE co-localizza con le IgG4 depositate ed è presente negli immunodepositi elettron densi. Circa il 25% dei pazienti presenta un alto titolo IgG4 anti-AE al momento della diagnosi, prima dell'inizio di ogni terapia specifica. Tali livelli correlano con la creatininemia ma non con la proteinuria.

Conclusioni. AE è un antigene podocitario implicato nella patogenesi della NM idiopatica. Esso presenta caratteristiche di espressione e di co-localizzazione analoghe agli altri tre antigeni già descritti. Vista la nota associazione degli anticorpi anti-AE con altre patologie autoimmuni, successivi studi dovranno approfondire il ruolo della AE nella patogenesi della NM. Suggestiva è la correlazione con il valore di creatininemia all'esordio. Sarà però necessario verificare

la correlazione del titolo anticorpale con l'outcome clinico in popolazioni di pazienti più numerose.

25 CO

L'ATTIVAZIONE DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO (C) INDUCE LA TRANSIZIONE ENDOTELIO-MESENCHIMALE (ENDMT) IN UN MODELLO DI DANNO DA ISCHEMIA-RIPERFUSIONE (I/R)

Curci C.¹, Castellano G.¹, Loverre A.¹, Stasi A.¹, Cariello M.¹, Simone S.¹, Dittono P.¹, Lucarelli G.¹, Battaglia M.¹, Crovace A.¹, Staffieri F.¹, Gesualdo L.¹, Schena F.P.¹, Grandaliano G.²

¹DETO, Università di Bari, Bari; ²Dip. di Scienze Biomediche, Università di Foggia, Foggia

Nel danno da I/R le cellule endoteliali (EC) rappresentano un importante target del sistema del C. Ad oggi, è poco noto il coinvolgimento delle EC nei processi di fibrosi renale. In un modello sperimentale di I/R, 10 maiali sono stati sottoposti a 30 min di I renale calda e a 24 h di R. A 5 maiali prima della R è stato somministrato C1-inibitore ricombinante umano. Dopo la R si osservavano un'intensa riduzione della densità dei capillari peritubulari, evidenziati con il marcatore endoteliale CD31 (t24h 1.2±0.41 vs t0 2.4±0.8, p=0.03) e un significativo aumento dell'espressione del marcatore miofibroblastico α -SMA (t24h 5.19±1.75 vs t0 0.58±0.13 p=0.04) a livello interstiziale. Studi in microscopia confocale dimostravano nell'interstizio la presenza di cellule CD31+/FSP1+ (t24h 18.9±4.4 vs t0 8.2±3.0 p=0.04), indicative della trans-differenziazione delle EC verso un fenotipo mio-fibroblastico. Inoltre, nel rene ischemico dei maiali controllo, le EC mostravano una significativa attivazione di Akt che co-localizzava con i depositi di C. In vitro, la stimolazione delle EAhy926 con C3a induceva una significativa diminuzione dell'espressione del VWF (C3a 4.6±0.8 vs basale 7.3±0.6 area fraction, p=0.04), un aumento dell'espressione di α -SMA (C3a 0.9±0.1 vs ctr 0.3±0.1 pixel ratio, p=0.003) ed un'aumentata fosforilazione di Akt. L'aumento di α -SMA indotto dal C3a era significativamente ridotto in presenza di un inibitore di Akt (Akt inhibitor IV 0.6±0.1 vs 0.3±0.1 pixel ratio, p=0.03). Dopo 24 h di R nei maiali trattati con C1-inibitore, si osservava nell'interstizio una significativa riduzione delle cellule CD31+/FSP1+ (7.7±1.1, p=0.03), assenza di α -SMA, una normale densità dei capillari peritubulari ed una significativa riduzione della fosforilazione di Akt rispetto ai maiali non trattati. In questo studio dimostriamo per la prima volta che l'attivazione del C può indurre EndMT in seguito a I/R. L'inibizione di Akt potrebbe rappresentare un importante target terapeutico in grado di migliorare il danno acuto indotto da I/R e rallentare la progressione della fibrosi renale.

26 CO

UN NUOVO MODELLO DI RENE MULTICISTICO: TOPI KNOCK OUT PER DICER

Iervolino A.^{1,2}, Trepiccione F.¹, Frezzetti D.², Roberto L.², Scarfò M.², De Felice M.², Di Lauro R.³, Capasso G.¹

¹Cattedra di Nefrologia, Seconda Università degli Studi di Napoli, Napoli; ²Bio-gem S.c.a.r.l., Ariano Irpino (AV); ³Stazione Zoologica "Anton Dohrn", Napoli

Introduzione. I microRNA costituiscono una classe di RNA di piccole dimensioni non codificanti, implicati nella regolazione post-trascrizionale. Studi riguardanti i miRNA sono focalizzati sulla proteina ribonucleasica Dicer1, enzima indispensabile per la loro sintesi. Il knock-out costitutivo di Dicer provoca la morte dei topi nei primi stadi dello sviluppo embrionale. Dicer, inoltre, è essenziale per lo sviluppo ed il mantenimento della funzionalità di molti organi. La delezione dell'espressione di Dicer nel rene determina un fenotipo multicistico. Scopo del nostro studio è indagare il ruolo di Dicer nella citogenesi.

Materiali e Metodi. È stato creato un modello murino ko per Dicer a livello tiroideo e renale incrociando tra loro topi DicerFlox, con sequenza codificante per il sito catalitico dell'enzima, fiancheggiata da due siti LoxP e topi Pax8Cre/+, in cui un allele del fattore trascrizionale Pax8 è stato sostituito con il gene della ricombinasi Cre, così da ottenere topi DicerFlox/FloxPax8Cre/+. Questi topi sono stati caratterizzati con metodiche di immunostochimica ed immunoblotting.

Risultati. A livello tiroideo, l'inattivazione omozigotica di Dicer genera anomalie morfologiche e funzionali. I topi DicerFlox/FloxPax8Cre/+ presentano ritardo dello sviluppo e della crescita. Sebbene le dimensioni dei reni siano ridotte rispetto ai topi controllo, il rapporto percentuale rispetto al peso corporeo dell'animale è nella norma, dimostrando che la mutazione indotta non provoca alterazioni nell'organogenesi renale. Il 20% dei nati sopravvive fino a 12 settimane. Alla settima settimana di vita sono visibili cisti renali multiple, associate ad un difetto di concentrazione delle urine e proteinuria. Solo alcune delle cisti originano dai dotti collettori. A livello renale si osserva un marcato incremento della proliferazione cellulare (positività per Ki67). Cellule in divisione mitotica si osservano lungo il contorno delle cisti e in nuclei di aggregati cellulari epiteliali.

Conclusioni. Nel nostro modello di topi ko per Dicer si evidenzia un fenotipo multicistico, in accordo con altri modelli di alterata espressione renale di Dicer. Il nostro studio ha evidenziato inoltre un fenotipo poliurico associato ad una riduzione dell'espressione dell'AQP2. Tuttavia dati di immunostochimica dimostrano che non tutte le cisti originano dal dotto collettore e che Dicer può giocare un

ruolo fondamentale nella regolazione del turn-over cellulare. Studi futuri saranno incentrati sull'identificazione dei meccanismi alla base della citogenesi.

27 PO

OLMESARTAN E STRESS OSSIDATIVO NEI PAZIENTI IPERTESI. SUPPORTO MECCANICISTICO ALLE EVIDENZE DERIVATE DA TRIALS CLINICI

Calò L.A.¹, Dal Maso L.¹, Pagnin E.¹, Fusaro M.², Caielli P.¹

¹Medicina Clinica e Sperimentale, Clinica Medica 4, Università di Padova, Padova; ²CNR Sezione Aging, Istituto di Neuroscienze, Padova

Introduzione. Il ruolo dello stress ossidativo (OxSt) nella fisiopatologia dell'ipertensione arteriosa e del danno d'organo è ampiamente riconosciuto. In questo studio, utilizzando un approccio biologico molecolare, riportiamo in cellule mononucleate di pazienti ipertesi essenziali l'effetto dell'olmesartan, bloccante dei recettori AT1 dell'Angiotensina II, sull'espressione proteica di proteine chiave nel signaling dello OxSt e del rimodellamento vascolare, p22phox, eme ossigenasi (HO)-1 e stato di fosforilazione di ERK1/2 e sul livello plasmatico delle LDL ossidate (oxLDL).

Pazienti e Metodi. 20 ipertesi essenziali non trattati e non fumatori afferenti al Centro per l'Ipertensione Arteriosa di Padova (range di pressione arteriosa: 142-156/94-98 mmHg) sono stati trattati con olmesartan medoxomil (20 mg al giorno per 6 mesi). Campioni di sangue sono stati raccolti all'inizio dello studio, a 3 e a 6 mesi per la valutazione dell'espressione proteica di p22phox and HO-1, dello stato di fosforilazione di ERK1/2 (western blot) e del livello plasmatico delle oxLDL (ELISA).

Risultati. Olmesartan normalizzava la pressione arteriosa fin dal terzo mese (149±4.7/94.88±1.9 mmHg vs 137.89±2.08/88.44±2.0 a 3 mesi e vs 135.44±2.18/85.78±1.2 a 6 mesi, ANOVA: p<0.001). L'espressione proteica di p22phox era ridotta a 3 mesi (7.10±2.61 vs 9.32±2.43 d.u., p<0.001) e calava ulteriormente a 6 mesi (4.55±1.26 d.u., p<0.001). L'espressione proteica di HO-1 aumentava a 3 mesi (10.87±1.92 vs 7.70±0.71 d.u., p=0.001) e rimaneva elevata (11.11±1.89 d.u., p=0.001) a 6 mesi. ERK1/2 fosforilate si riducevano a 3 mesi (3.94±1.44 vs 5.62±1.11 d.u., p=0.001) e calavano ulteriormente a 6 mesi (1.94±0.87, p<0.001). oxLDL plasmatiche calavano significativamente a 3 e a 6 mesi.

Conclusioni. Questi risultati dimostrano che olmesartan inibisce lo OxSt. Dato il coinvolgimento di OxSt e del suo signaling nell'aterogenesi e nel danno d'organo e le evidenze disponibili degli effetti vasoprotettivi antiinfiammatori ed aterosclerotici derivati da trials clinici con olmesartan come EUFOPIA, VIOS, MORE e OLIVUS, i risultati del nostro studio forniscono un razionale meccanicistico per il potenziale antiinfiammatorio ed antiremodeling di olmesartan che nel lungo termine si può manifestare con gli effetti antiaterosclerotici ed antiremodeling riportati dai trials clinici.

28 PO

ATTIVAZIONE DELL'IMMUNITÀ INNATA NELLA PORPORA DI SCHOENLEIN-HENOCH CON E SENZA INTERESSAMENTO RENALE: AUMENTO DELL'ESPRESSIONE DEI TOLL-LIKE RECEPTORS NEI LINFOMONOCITI CIRCOLANTI

Camilla R.¹, Loiacono E.¹, Daprà V.¹, Morando L.¹, Conrieri M.², Bianciotto M.², Bosetti F.M.², Gallo R.¹, Peruzzi L.¹, Amore A.¹, Coppo R.¹

¹Nefrologia, Dialisi, Trapianto; ²Pediatria d'Urgenza, Osp. Regina Margherita, Torino

Introduzione. I toll-like receptors (TLRs), fondamentali regolatori dell'immunità innata, attivano potenti fattori pro-infiammatori come il fattore nucleare κ B (NF- κ B) e il fattore regolante l'interferone (IRF). Abbiamo recentemente descritto (Clin Exp Immunol 2009, 159: 73-81) un'attivazione dei TLR4 nei linfomonociti circolanti (PBMC) dei pazienti con nefropatia a depositi di IgA primitiva (p-IgAN), suggerendo un ruolo dell'immunità mucosa innata. La porpora di Schoenlein-Henoch (SH) con interessamento renale può presentarsi con quadro istologico indistinguibile da quello della p-IgAN. Abbiamo studiato i TLRs nei PBMC di pazienti con SH, ricercando eventuali differenze tra i casi con o senza nefrite.

Materiali e Metodi. TLR2, -4 e -9 sono stati indagati nei PBMC di 28 bambini con SH (età media 7.6±2.2, range 4-13 anni) all'esordio clinico (porpora palpabile e sintomatologia gastroenterica o artralgie), 15 senza anomalie urinarie e 13 con ematuria, di cui 9 con proteinuria >250 mg/die e in 3 gruppi di controllo: 15 bambini con p-IgAN, 27 bambini con sindrome nefrosica (SN) e 40 controlli sani (CS). I TLRs sono stati studiati in citofluorimetria (FACS), espressi come intensità media di fluorescenza (MIF) e in real time PCR (Taqman), normalizzando i valori sul gene Abelson.

Risultati. I pazienti con SH mostravano, rispetto ai CS, un'aumentata espressione dei TLR2 (4.22±1.51 versus 3.05±0.66 MIF, p=0.02), TLR4 (2.28±0.71 versus 1.71±0.44 MIF, p=0.02) e TLR 9 (2.91±2.01 versus 0.73±43, MIF p=0.005). Non c'erano differenze tra i pazienti con o senza interessamento renale. I pazienti con SH mostravano, rispetto a quelli con p-IgAN, livelli più alti di mRNA per TLR9 e TLR4 (TLR9: 2.9±12.01 versus 0.91±0.64, p=0.01; TLR4: 2.94±2.35 versus 1.64±1.27, p=0.004). Non sono state rilevate differenze di espressione dei TLR2, -4 e -9 nei pazienti con SN rispetto ai CS.

Conclusioni. Questo studio mostra per la prima volta un'attivazione dei TLRs in

corso di SH, suggerendo un ruolo dell'immunità innata simile a quello riscontrato nell'IgAN primitiva.

29 PO

DIFFERENTE MODULAZIONE DELL'ATTIVAZIONE DELLE CELLULE T REGOLATORIE NELLA NEFROPATIA A DEPOSITI DI IgA PRIMITIVA ED IN QUELLA ASSOCIATA A PORPORA DI SCHOENLEIN-HENOCH: UN FATTORE CHE PUÒ INFLUENZARE L'OUTCOME CLINICO?

Loiacono E.¹, Camilla R.¹, Daprà V.¹, Morando L.¹, Peruzzi L.¹, Conrieri M.², Bianciotto M.², Bosetti F.M.², Gallo R.¹, Amore A.¹, Coppo R.¹

¹Nefrologia, Dialisi, Trapianto; ²Pediatria d'Urgenza, Osp. Regina Margherita, Torino

Introduzione. La nefropatia a depositi di IgA primitiva (p-IgAN) e quella associata a porpora di Schoenlein-Henoch (SH-IgAN) possono presentare quadri istologici indistinguibili, ma differente decorso clinico. Questa dissociazione è particolarmente evidente nei bambini, dove la SH-IgAN, anche istologicamente attiva, entra spesso in remissione, mentre molti bambini con p-IgAN evolvono più o meno lentamente in forme croniche. In entrambe le malattie si ipotizza che una perdita di regolazione dell'immunità innata determini incapacità ad eliminare l'antigene a livello mucoso e/o alterata sintesi delle IgA. L'immunità innata e in particolare i toll-like receptors (TLRs) modulano le cellule T regolatorie (Treg), fondamentali nel controllare la risposta a infezioni e reazioni immuni. Scopo di questo studio è stato ricercare possibili rapporti fra l'espressione di TLRs e di markers dei Treg in PBMC di bambini con p-IgAN e SH-IgAN con andamento clinico differente.

Materiali e Metodi. Abbiamo studiato 21 bambini con SH-IgAN (12 M e 9 F; età media 7.9±2.3 anni; 10 con nefrite, 11 senza interessamento renale) e 13 bambini con p-IgAN (10 M, 3 F; età media 10.7±3.9 anni). L'espressione dei TLR2, 4 e 9 è stata studiata in citofluorimetria (FACS); la real time PCR (Taqman) è stata utilizzata per quantificare l'mRNA codificante per TLRs e Foxp3 (forkhead box p3, marker espresso dalla popolazione Treg), normalizzando i risultati sul gene Abelson (Abl).

Risultati. Abbiamo osservato una correlazione inversa tra l'mRNA codificante per TLR4 e per foxp3 nei pazienti con p-IgAN (r: -0.35, p<0.05), mentre nei casi di SH-IgAN le espressioni di mRNA TLR4 e Foxp3 erano direttamente correlate (r:0.46, p<0.05).

Conclusioni. Nell'IgAN primitiva l'aumento dell'espressione di TLR4 in PBMC e la diminuzione di Treg potrebbero determinare uno stato infiammatorio e la cronicizzazione della malattia; nell'IgAN secondaria a SH un'aumentata espressione dei Treg potrebbe contrastare l'attivazione dell'immunità innata, favorendo la risoluzione della nefrite.

30 PO

INCONTINENTIA PIGMENTI (sindrome di NEMO) E LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO: RUOLO DI NFkB IN UNA NUOVA ASSOCIAZIONE

Vigotti F.N.¹, Consiglio V.¹, Scognamiglio S.¹, Ferraresi M.¹, Fassio F.¹, Restagno G.², Naretto C.², Russo A.², Piccoli G.B.¹

¹Nefrologia, AOU San Luigi, Orbassano (TO); ²CMID Piemonte, Torino

Introduzione. L'incontinenza Pigmenti (IP) è una malattia multisistemica X-linked legata alla mutazione del gene NEMO (NFkB Essential Modulator), caratterizzata da manifestazioni cutanee, neurologiche, da immunodepressione e poliabortività, essendo generalmente letale in utero nei maschi. Inoltre IP è stata recentemente correlata anche a patologie legate ad una disregolazione del sistema immunitario, sia in senso immunodeficitario che autoimmune.

Caso Clinico. Paziente di 35 anni, con presenza di crisi convulsive infantili, anomalie della pigmentazione cutanea, infezioni ricorrenti, ipodontia ed agnesia parziale del corpo calloso. Familiarità per poliabortività. Diagnosi di LES a 24 anni, ad interessamento prevalentemente sierositico-artritico ed ematologico, trattato con steroidi e tentativi con immunosoppressori (con gravi effetti collaterali, specie di natura infettiva). Dal punto di vista nefrologico presenza di insufficienza renale lieve ed infezioni urinarie recidivanti. Nel sospetto di una associazione del LES con una forma genetica, la paziente è stata sottoposta a consulenza genetica, con il sospetto di IP. L'indagine genetica ha confermato la mutazione del gene NEMO.

Discussione. L'interesse per IP è legato al deficit di uno dei sistemi chiave della risposta immune (NFkB) Questo è, a nostra conoscenza, il primo caso di un'associazione tra NEMO e LES. Le due patologie condividono una serie di aspetti, tra i quali prevalenza nel sesso femminile, alterazioni cutanee e poliabortività, che possono fuorviare una corretta diagnosi. Teoricamente la mancata modulazione di NFkB dovuta alle mutazioni di NEMO può costituire un fattore trigger per LES o altre patologie autoimmuni, sia mediante flogosi protratta legata all'immunodepressione, sia attraverso la carenza di un effetto modulante "in negativo", ancora in parte non chiaro, sulla risposta immune. Questa associazione, che conferma il ruolo centrale del complesso NFkB nelle malattie autoimmuni, si allinea ai recenti studi che pongono interrogativi in merito ad una inibizione farmacologica cronica di tale sistema.

31 PO

COINVOLGIMENTO DELL'IMMUNITÀ INNATA E DELL'ASSE CX3CR1-FKN NEL PROMUOVERE L'EMATURIA MACROSCOPICA IN PAZIENTI AFFETTI DA IGA NEFROPATIA

Cox S.N.¹, Sallustio F.^{1,2}, Serino G.^{1,2}, Loverre A.¹, Pesce F.¹, Ancona N.³, Stifanelli P.³, Schena F.P.^{1,2}

¹Dip. Dell'Emergenza e Trapianti di Organi, Università di Bari, Bari; ²C.A.R.S.O. Consortium, Valenzano, Bari; ³ISSIA, CNR, Bari

Le manifestazioni più caratteristiche della IgA nefropatia (IgAN) sono gli episodi ricorrenti di ematuria macroscopica (EM) in concomitanza di infezioni delle mucose e possono rappresentare i fattori scatenanti la malattia. La tecnologia microarray è stata adottata per chiarire il legame tra l'attacco antigenico a livello mucosale e l'episodio di EM valutando la differenza di espressione genica totale nei linfomonociti periferici (PBMC) di 3 pazienti durante ed in assenza dell'episodio di EM. 246 geni erano differenzialmente espressi e appartenenti a pathway quali l'interferone, presentazione dell'antigene, e immunoproteasoma. L'espressione genica di geni rappresentativi è stata confermata con la RT-PCR su altri 12 pazienti. In particolare, l'espressione genica e proteica di un recettore che caratterizza le cellule citotossiche ed implicate nel danno vascolare CX3CR1 era significativamente aumentata durante l'episodio di EM. In vitro, lo stimolo antigenico con la Con A induceva un aumento significativo dose dipendente del recettore e un'attivazione della pathway dell'interferone (STAT1); questa iperattività si riscontrava solo nei PBMC di 12 pazienti IgAN. L'iperattività dei PBMC era comune a tutti i pazienti IgAN a prescindere se il loro decorso clinico era caratterizzato da episodi ricorrenti di EM (rEM) o da microematuria persistente (MP). Fractalkine (FKN), il ligando del CX3CR1, promuove l'adesione e l'extravasazione di cellule mononucleari CX3CR1+ creando danno vascolare. L'espressione glomerulare del FKN è stata valutata con l'immunoistochimica su 10 pazienti con rEM e su 10 pazienti con MP e 5 controlli dimostrando un aumento significativo dell'FKN solamente nel primo gruppo suggerendo una maggiore predisposizione al danno glomerulare. La microscopia confocale ha inoltre dimostrato che l'espressione del FKN era localizzata nell'endotelio e nei podociti. Nell'insieme, i nostri dati suggeriscono un'iperattività nel processamento dell'antigene nell'IgAN e l'aumento del FKN a livello glomerulare suggerisce un possibile coinvolgimento dell'asse CX3CR1-FKN nell'EM.

32 PO

LA BETA2-MICROGLOBULINA AUMENTA L'ESPRESSIONE DI FOSFATIDILSERINA NEGLI ERITROCITI UMANI

Sirolli V.¹, Pavone B.², Felaco P.¹, Amoroso L.¹, Forli F.², Urbani A.³, Bonomini M.¹

¹Dipartimento di Medicina e Scienze dell'Invecchiamento; ²Scienze Biomediche, Università "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara, Pescara

Introduzione. L'esposizione dell'aminofosfolipide fosfatidilserina (PS) sulla superficie esterna della membrana dei globuli rossi può avere importanti conseguenze fisiopatologiche, con particolare riguardo ai processi di fagocitosi, emostasi ed interazioni cellulari. Un significativo incremento di PS negli eritrociti è stato riscontrato nei pazienti in trattamento emodialitico cronico. È stato dimostrato che il plasma uremico induce tale alterazione, ma la precisa causa è sconosciuta.

Materiali e Metodi. Al fine di identificare il composto uremico responsabile dell'esternalizzazione eritrocitaria della PS, abbiamo frazionato con metodiche cromatografiche l'ultrafiltrato ottenuto durante trattamento di emodiafiltrazione ed esaminato mediante citofluorimetria l'effetto delle frazioni ottenute sull'esposizione di PS su globuli rossi umani. Per confermare gli effetti della beta2-microglobulina ed esaminare l'influenza della glicazione della proteina (così come avviene in corso di uremia) sull'esposizione eritrocitaria di PS, i globuli rossi di soggetti normali sono stati incubati con isoforme di beta2-microglobulina con differenti stati di glicazione: beta2-microglobulina ricombinante (nessun sito di glicazione all'analisi di massa), beta2-microglobulina commerciale (8 siti di glicazione) o con beta2-microglobulina ricombinante glicata in vitro (multipli siti di glicazione).

Risultati. La frazione identificata con elettroforesi monodimensionale e spettrometria di massa è risultata essere la beta2-microglobulina. Elevati livelli di beta2-microglobulina (corrispondenti ai livelli plasmatici raggiunti nei pazienti in dialisi) fanno aumentare significativamente la capacità di esternalizzare la PS sulla superficie eritrocitaria. Tale effetto è risultato accentuato dalla glicazione della beta2-microglobulina.

Conclusioni. La beta2-microglobulina è una tossina uremica che rappresenta una componente chiave dell'amiloidosi associata alla dialisi. Il nostro studio aggiunge ulteriore evidenza circa le importanti conseguenze fisiopatologiche dell'accumulo di beta2-microglobulina nei pazienti uremici cronici.

33 PO

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE STAMINALI TUMORALI NEL CARCINOMA RENALE A CELLULE CHIARE

Galleggiante V.¹, Sallustio F.², Rutigliano M.¹, Costantino V.², Ditunno P.¹, Selvaggi F.P.¹, Schena F.P.², Battaglia M.¹
 DETO – ¹Sezione di Urologia, Andrologia e Trapianto di Rene; ²Sezione di Nefrologia Medica e Trapianto di Rene, Università di Bari, Bari

Le cellule staminali tumorali (CST) costituiscono una popolazione di cellule indifferenziate ritenute responsabili dell'iniziazione, del mantenimento e della diffusione del tumore. Le CST hanno un potenziale illimitato di proliferazione, la capacità di auto-rinnovarsi e generare una progenie di cellule differenziate, che costituiscono la popolazione più importante del tumore. Il presente studio si pone l'obiettivo di determinare se le cellule staminali/progenitrici adulte renali (ARPC) isolate da tessuto neoplastico proveniente da pazienti con diagnosi di carcinoma renale a cellule chiare (ccRCC) manifestino caratteristiche tipiche delle CST e di studiare in cosa si differenziano rispetto alle cellule staminali normali (CSN) presenti nel rene sano e il loro potenziale ruolo nella carcinogenesi. Sono state isolate, da tessuto renale sano e tumorale, cellule positive per i marker tipici delle cellule staminali renali (CD133+/24+). Solo una piccola parte di cellule staminali renali tumorali è risultata NCAM positiva. L'analisi quantitativa dei marker, attraverso un array proteico di 16 diversi marker di cellule staminali multipotenti, ha confermato la staminalità delle cellule CD133+/24+ isolate dal tumore ed ha inoltre evidenziato una maggiore espressione delle proteine Nanog, Oct3/4, SOX2, SOX17, Oct2 e Snail, rispetto alle CSN dello stesso paziente. In conclusione dai primi dati del nostro studio emerge che nel tessuto proveniente dal carcinoma renale a cellule chiare sono presenti cellule progenitrici/staminali CD133+CD24+ NCAM-1, CD10- e VEGFR-/KDR-. Tali cellule sembrano essere più indifferenziate rispetto alle ARPC sane in quanto esprimono maggiormente marcatori tipici delle cellule staminali embrionali. Ulteriori studi sono necessari per individuare specifici marcatori e le caratteristiche proprie delle CST renali. L'individuazione delle CST nel carcinoma renale e la ricerca dei relativi marcatori può essere utile per l'ottimizzazione delle strategie terapeutiche e per le informazioni predittive e prognostiche nei pazienti affetti da ccRCC.

34 PO

FIBROSI TUBULO-INTERSTIZIALE: RUOLO PROTETTIVO NEI CONFRONTI DEL CANCRO?

Cernaro V., Medici M.A., Lupica R., Lorenzano G., Lacquaniti A., Lucisano S., Donato V., Fazio M.R., Buemi M.
 Cattedra di Nefrologia, Dipartimento di Medicina Interna, Università di Messina, Messina

Prefazione. La fibrosi tubulo-interstiziale rappresenta la via finale comune di tutte le condizioni patologiche che esitano in insufficienza renale cronica. In essa giocano un ruolo fattori come TGF- β 1 (Transforming Growth Factor β 1) e NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin), mediando quest'ultimo gli effetti dell'attivazione del recettore per l'EGF (Epidermal Growth Factor). Nel presente lavoro abbiamo voluto studiare il comportamento di tali mediatori in un modello sperimentale di cellule epiteliali tubulari renali suine appartenenti alla linea LLC-PK1.

Materiali e Metodi. Abbiamo utilizzato cellule LLC-PK1 coltivate in vitro per valutare gli effetti dell'aggiunta di TGF- β 1 al medium di coltura in termini di formazione di noduli di fibrosi, evidenziati mediante tecniche di immunocisto-chimica utilizzando anticorpi diretti contro fibronectina e collagene I. Abbiamo inoltre impiegato l'immunofluorescenza combinata con la microscopia confocale per valutare la presenza di NGAL.

Risultati. Nelle colture addizionate con TGF- β 1 abbiamo osservato, rispetto ai controlli, un importante incremento di tessuto fibrotico associato ad aumento dell'immunopositività per NGAL e successiva riduzione degli indici di proliferazione cellulare, documentata usando anticorpi anti-Ki67 e anti-PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen).

Conclusioni. I risultati ottenuti dimostrano che TGF- β 1 e NGAL svolgono un ruolo chiave nella fibrosi. Studi su modelli sperimentali analoghi a quello da noi utilizzato potrebbero evidenziare l'eventuale capacità di questi ed altri mediatori di indirizzare la progressione e l'esito di un processo infiammatorio cronico verso la fibrosi piuttosto che verso la trasformazione tumorale o viceversa. La nostra ipotesi è che la cicatrizzazione costituisca un prodotto dell'evoluzione alternativo alla rigenerazione osservata negli organismi più semplici, determinatosi per proteggere le specie più evolute dallo sviluppo del cancro, che sappiamo essere favorito dall'elevata attività proliferativa dei tessuti sede di flogosi cronica. La perdita di funzione dell'organo secondaria alla fibrosi sarebbe quindi il prezzo da pagare per garantire una maggiore sopravvivenza individuale e della specie.

35 PO

PENTRAXINA 3 (PTX3) E FIBROSI: STUDIO IMMUNOISTOCHEMICO SU BIOPSIE RENALI IN PAZIENTI CON LES

Tineo M.C.¹, Del Prete D.¹, Angelo L.¹, Ceol M.¹, Bassi N.², Ghirardello A.², Comacchio A.¹, Valente M.³, Mantovani A.², D'Angelo A.¹, Doria A.²
¹Dip. Sc. Med. e Chir. Cl. Nefrologica; ²Cl. Reumatologica Università di Padova, Padova; ³Dip. Diag. Med. e Ter. Spec. Anatomia Patologica Università di Padova, Padova

Introduzione. La nefrite lupica rappresenta il più frequente coinvolgimento d'organo nel LES portando ad insufficienza renale terminale. PTX3 è una molecola coinvolta nella fase acuta dell'infiammazione in quanto lega C1q e partecipa alla clearance delle cellule apoptotiche.

Scopo. Esplorare la presenza intrarenale di PTX3 e la sua correlazione con la fibrosi renale.

Metodi. 20 pazienti con nefrite lupica sono stati biopsiati a scopo diagnostico. È stata eseguita immunocistochemica indiretta con anticorpi umani (Ab) antiPTX3. La quantificazione di PTX3 e fibrosi (tricromica di Masson) è stata ottenuta con l'analisi morfometrica utilizzando il Software Image Pro-Plus. La tecnica ELISA è stata applicata utilizzando un substrato ricombinante di PTX3 sui campioni sierici raccolti. Come parametri clinici sono stati considerati la proteinuria e la creatinemia al momento della biopsia.

Risultati. Il nostro studio ha rilevato: 1) una correlazione indiretta tra Ab sierici antiPTX3 e fibrosi ($r=0.54$; $p<0.03$); 2) una correlazione diretta tra deposizione di PTX3 e fibrosi ($r=0.56$; $p<0.05$); 3) una correlazione diretta tra deposizione di PTX3 e creatinemia ($r=0.63$; $p<0.028$); 4) una correlazione diretta tra fibrosi e creatinemia ($r=0.69$; $p<0.009$); 5) una correlazione indiretta tra Ab sierici antiPTX3 e deposizione di C1q; 6) una correlazione diretta tra depositi di PTX3 e C1q sebbene non significativa.

Conclusioni. Lo studio evidenzia un coinvolgimento di PTX3 nella nefrite lupica. La correlazione diretta tra depositi PTX3, fibrosi e funzione renale e la correlazione indiretta tra Ab antiPTX3 e fibrosi suggerisce un possibile ruolo della PTX3 nel danno renale, inoltre evidenzia un effetto protettivo degli Ab sierici antiPTX3. Studi successivi saranno necessari per comprendere meglio la relazione tra PTX3 e C1q, sebbene i nostri risultati preliminari sembrano suggerire la possibilità che gli Ab antiPTX3 possano competere con C1q nel legare PTX3.

36 PO

TARGETING IL21/IL21R PATHWAY AS A NOVEL STRATEGY TO PROLONG GRAFT SURVIVAL IN ALLOGENIC ISLET TRANSPLANTATION

Petrelli A., Carvello M., Di Fenza R., D'Addio F., Markmann F.J., Secchi A., Fiorina P.

Transplant Unit, Ospedale San Raffaele di Milano, Milano, Italy; Transplant Surgery, Massachusetts General Hospital (MGH), Harvard Medical School, Boston, USA

Background. Interleukin-21 (IL21) orchestrates immune response but its role in islet allograft rejection and tolerance is unknown. Therefore, we aim to study the role of IL21/IL21R pathway in a murine model of allogeneic islet transplantation.

Methods. IL21 levels and IL21R expression were determined in vitro and in vivo during allostimulation. We then targeted the IL21/IL21R pathway in C57BL/6 mice by using a murine IL21 receptor Fc fusion protein (mIL21R.Fc) alone or in combination with CTLA4-Ig or by genetical deletion of IL21R. mIL21R.Fc effect on the immune system were studied both in vivo and in vitro. In vitro Treg generation and potency were performed.

Results. IL21R is constitutively expressed on T and B cells both at baseline and in vitro/in vivo during allostimulation. IL21 levels in vivo significantly increase during acute rejection (IL21 baseline=20.7 12.9 vs d14=149.9 31.5, pg/mL, $p<0.0001$). IL21/IL21R targeting with mIL21R.Fc resulted in a prolongation of islet allograft survival compared to controls (MST: mIL21R.Fc=19 vs untreated=14 days, $p=0.01$) and combo treatment with CTLA4-Ig led to graft tolerance (tolerance at 100 days: mIL21R.Fc+CTLA4-Ig 100 vs CTLA4-Ig=60%, $p=0.01$). Prolongation of islet graft survival was confirmed in IL21R-/- mice. Mechanistic data suggest a reduced activation of CD4+ and CD8+ T eff cells and a dramatic increase of peripheral Tregs (CD4+CD25+FoxP3+: treated=15.0 0.9 vs untreated=11.3 0.7, $p=0.01$) 14 days after transplantation. Histology revealed a reduction of T cell infiltration and an increased number of FoxP3+ cells (FoxP3/CD3: mIL21R.Fc=0.6 0.1 vs untreated=0.2 0.05, $p=0.03$). In vitro iTreg generation and potency (T eff. CFSE dilution: no drug=19.1 0.5, mIL21=27.7 0.9 and mIL21R.Fc=16.1 0.3%, no drug vs all, $p<0.05$) were reduced in presence of mIL21 while increased with the addition of mIL21R.Fc.

Conclusion. IL21 is an anti-tolerogenic cytokine and targeting IL21/IL21R pathway could be considered in islet transplantation.

37 PO

L'ATTIVAZIONE DELLA CASCATA COAGULATIVA MODULA LA RISPOSTA TH1/TH2 INDOTTA DALLE CELLULE DENDRITICHE (CD) NELLA RITARDATA RIPRESA FUNZIONALE DEL GRAFT (DGF)Pontrelli P.¹, Verrienti R.¹, Tataranni T.¹, Loverre A.¹, Stallone G.², Schena F.P.¹, Gesualdo L.¹, Grandaliano G.²¹DETO, Sez. di Nefrologia, Univ. di Bari, Bari; ²Dip. di Scienze Biomediche, Univ. di Foggia, Foggia

Introduzione. L'attivazione della coagulazione è un evento patogenetico chiave del danno renale da ischemia-riperfusion che caratterizza la DGF. La trombina, il principale enzima nella cascata coagulativa, potrebbe modulare la risposta immunitaria interagendo con il proprio recettore (PAR1). Scopo del presente lavoro è valutare se le CD infiltranti il rene nei pazienti con DGF esprimono il PAR1 e definire gli effetti dell'attivazione di questo recettore sulla modulazione della risposta Th1/Th2.

Risultati e Metodi. Nelle biopsie con DGF (n=6) il PAR1 era espresso solo dalle CD mieloidi. Le CD immature di derivazione monocitica esprimevano il PAR-1 e la maturazione con cocktail di citochine ne manteneva l'espressione (monociti=32.1±12.4; CD immature=73.8±14.4; CD mature=73.5±10.4 MFI; p=0.03). L'attivazione del PAR1 da parte della trombina nelle CD, causava un aumento dell'espressione genica dell'IL12 ed una riduzione del mRNA dell'IL10 (p=0.03). Sia l'ELISPOT (celluleT+CD 1.0±0.2; celluleT+CD+trombina 4.2±2.0% di cellule T IFN γ +, p=0.04) sia l'ELISA per l'IFN γ (celluleT+CD 217±9; celluleT+CD+SEB 490±7; celluleT+CD+SEB+trombina: 543±5 pg/mL; p<0.001 vs celluleT+CD; p<0.05 vs celluleT+CD+SEB) confermavano l'abilità delle CD trattate con trombina di aumentare la produzione di IFN γ da parte delle cellule T. Inoltre le cellule T incubate con le CD trattate con trombina mostravano una riduzione nell'espressione genica di GATA3 (celluleT+CD: 0.42±0.1; celluleT+mCD+SEB+trombina: 0.18±0.09 unità arbitrarie; p=0.01), un fattore nucleare specificamente espresso dalle cellule Th2, ed un aumento, sebbene non significativo, di T-bet, un fattore specifico delle cellule Th1 (celluleT+mCD: 0.35±0.1; celluleT+mCD+SEB+trombina: 0.46±0.2 unità arbitrarie; p=ns).

Conclusioni. I nostri dati dimostrano che: 1. le CD infiltranti il graft in corso di DGF esprimono il PAR-1; 2. l'attivazione del PAR-1 sulle CD induce in vitro una risposta Th1. Questa osservazione suggerisce un legame patogenetico tra l'attivazione della cascata coagulativa legata all'ischemia-riperfusion del graft e i meccanismi immunologici alla base del rigetto acuto.

38 PO

RUOLO DEI LINFOCITI T REGOLATORI NELLA NEFRITE LUPICAGiannakakis K.¹, Gigante A.², Onetti Muda A.³, Cianci R.², Amoroso A.², Margiotta D.⁴, Pugliese F.¹, Afeltra A.⁴¹Anatomia Patologica "Sapienza" Università, Roma; ²Medicina Clinica, "Sapienza" Università, Roma; ³Anatomia Patologica Università Campus Biomedico, Roma; ⁴Medicina Clinica, Università Campus Biomedico, Roma

Introduzione. I linfociti T regolatori (Treg) svolgono importanti proprietà nell'omeostasi immunitaria e nella prevenzione di malattie autoimmuni. Il loro marker funzionale più importante è la proteina Foxp3. Il LES rappresenta il prototipo di malattia sistemica con perdita dei meccanismi di controllo della tolleranza immunitaria e frequente interessamento renale. Scopo del nostro studio è stato quello di indagare sulla quantità di linfociti T FOXP3+ negli infiltrati infiammatori delle principali classi di nefrite lupica, confrontandola con quanto osservato in corso di vasculiti pauci-immuni, nefriti tubulointerstiziali e nefroangiosclerosi.

Materiali e Metodi. Sono state selezionate biopsie renali di 27 pazienti con nefrite lupica (LN III:3, IV:17, V:7), 3 con glomerulonefrite pauci-immune (P-GN), 6 con nefrite tubulointerstiziale acuta (TIN) e 2 con nefroangiosclerosi (NAS). L'indagine immunocitochimica è stata effettuata con anticorpi monoclonali anti CD3 e anti FOXP3, condotta separatamente su sezioni consecutive e successivamente digitalizzata mediante scanner Aperio CS. I vetrini digitali sono stati quindi utilizzati per calcolare il numero di cellule CD3+ e FOXP3+ per unità di area (mm²) e il rapporto FOXP3+/CD3+.

Risultati. In accordo con quanto osservato mediante morfologia classica i linfociti CD3+ erano significativamente più numerosi nelle TIN (5713/mm²) e nelle P-GN (5121/mm²) rispetto a LN-IV (3558/mm²), LN-III (2491/mm²), NAS (2379/mm²) e LN-V (2220/mm²). Abbiamo invece osservato una significativa riduzione del rapporto FOXP3+/CD3+ nei pazienti con LN-IV (1.6) e, anche se in misura minore, nella P-GN (3), rispetto a NAS (3.9), TIN (4) e LN-V (4.5).

Conclusioni. I risultati, anche se preliminari, suggeriscono che i Treg svolgono un ruolo importante nella patogenesi delle malattie autoimmuni, in particolare nelle fasi più attive della nefrite lupica come si osserva nella classe IV.

39 PO

IL TRATTAMENTO CON PIRIDOSSAMINA (PIR), PENTOSAN POLISOLFATO (PPS) ED ENALAPRIL (EN) RIDUCE LE ALTERAZIONI RENALI IN UN MODELLO MURINO DI NEFROPATIA DIABETICA (DN)Grosjean F.^{1,2}, Esposito V.^{1,2}, Zheng F.¹, Torreggiani M.², Vlassara H.¹, Striker G.E.¹¹Div. Exp. Diabetes and Aging, Dept. Geriatrics, Mount Sinai School of Medicine, New York, USA; ²Unità Nefrologia Dialisi Trapianto, Policlinico San Matteo, Università degli Studi Pavia, Pavia

Introduzione. I prodotti di avanzata glicosilazione (AGEs) sono ossidanti, proinfiammatori e sono implicati nello sviluppo della DN. La predisposizione genetica sembra avere un ruolo determinante nella DN in pazienti con diabete di tipo I (T1D). Abbiamo ipotizzato che la riduzione degli AGEs, dello stress ossidativo e dell'infiammazione grazie al trattamento con PIR e PPS potesse ridurre la progressione della DN in topi ROP Os+, predisposti allo sviluppo di danno renale a causa del background genetico.

Metodi. Topi resi diabetici con STZ sono stati trattati per 5 mesi secondo il seguente schema: EN (10 mg/kg/gg), EN+PIR (PIR 200 mg/kg/gg), EN+PPS (PPS 25 mg/kg/gg), EN+PIR+PPS o acqua (DB). Topi diabetici non trattati (DBNT) e topi non diabetici (NNDB) sono stati utilizzati come controllo.

Risultati. I topi DBNT evidenziavano una marcata glomerulosclerosi rispetto a topi NNDB. La glomerulosclerosi era ridotta da EN+PIR+PPS ed in minor misura da EN+PPS. I topi DBNT mostravano un incrementato rapporto albuminuria/creatininuria. qRT-PCR: l'espressione renale di TGF β 1, citochina profibrotica, era indotta nei topi DBNT ed era ridotta significativamente dal trattamento con EN+PIR+PPS. I reni dei topi trattati con EN+PIR, EN+PPS e EN+PIR+PPS mostravano una ridotta espressione di MCP1, citochina proinfiammatoria, rispetto ai topi DBNT. WB: l'espressione renale di AGER1, recettore per gli AGEs in grado di contrastarne gli effetti, e quella di SIRT1, coinvolto nella sopravvivenza cellulare in corso di stress ossidativo, erano ridotte nei topi DB. EN+PIR, EN+PPS, EN+PIR+PPS, ma non EN erano in grado di ripristinare l'espressione di AGER1. L'espressione di SIRT1 era incrementata da EN+PIR+PPS ed in minor misura da EN, EN+PIR, EN+PPS. Il trattamento con EN+PIR+PPS inoltre era più efficace nel ridurre le proteine ossidate nel tessuto renale rispetto ai topi DB.

Conclusioni. Il trattamento combinato con EN+PIR+PPS è efficace nel ridurre sia la glomerulosclerosi che la proteinuria in un modello di DN in T1D.

40 PO

REGOLAZIONE DEL PATHWAY CD40/SCD40 IN EMODIALISI

Esposito P., Gabantini E., Bianzina S., Rampino T., Dal Canton A.

U.O. Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Introduzione. Il sistema CD40/CD154 gioca un ruolo fondamentale nella modulazione della funzione dei linfociti T e B. La forma solubile del CD40 (sCD40), i cui livelli sono molto elevati nei pazienti in emodialisi (HD), inibisce l'interazione CD40/CD154 e potrebbe avere un ruolo nella genesi dell'immunodeficienza in HD. Abbiamo condotto il presente studio alla fine di chiarire i meccanismi di regolazione del pathway CD40/sCD40 in HD.

Pazienti e Metodi. I livelli sierici di sCD40 sono stati misurati in 14 HD (65.1±13.6 aa), in 7 uremici (UR, 68.8±8.5 aa) e in 8 soggetti sani (N, 47.9±11.5 aa). L'espressione del CD40 sulla superficie delle cellule B è stata analizzata con citofluorimetria con mAb anti-CD20 e anti-CD40. L'espressione genica è stata studiata tramite real-time PCR su linfociti B, usando primers per l'isoforma I del CD40, che codifica per la forma transmembrana della proteina e per l'isoforma II, derivante dallo splicing alternativo dell'isoforma I, codificante per l'sCD40. I risultati sono stati analizzati con metodo comparativo, normalizzandoli per l'espressione genica di GAPDH.

Risultati. I livelli sierici di sCD40 risultavano maggiori in HD rispetto a UR e N (1140±684.9 vs 141.5±64.3 e 29.2±14.7 pg/mL, P<0.05). Vi era una correlazione inversa tra livelli di sCD40 e filtrato glomerulare nel gruppo UR (r²=0.93; P=0.03). HD e UR presentavano un numero ridotto di cellule CD20+CD40+ rispetto a N (140.5±96.1 e 125.0±71.8 vs 301.3±107 cell/10.000 eventi, P<0.05). Le cellule B dei N mostravano una prevalenza di espressione dell'isoforma I (I/II: 2.1±0.1). In HD questo rapporto risultava ulteriormente incrementato (I/II: 3.8±0.4), a causa di una ridotta espressione dell'isoforma II del CD40 (N: 0.5±0.03 vs HD: 0.3±0.1), a fronte di un'espressione stabile di isoforma I (N: 1 vs HD: 1±0.2).

Conclusioni. I pazienti in HD presentano livelli sierici elevati di sCD40 associati a riduzione dell'espressione di membrana del CD40 e riduzione dell'espressione genica del sCD40. La nostra ipotesi è che, in corso di malattia renale, il CD40 di membrana sia clivato e secreto in circolo, dove si accumula per la progressiva riduzione della funzione renale. La conseguente elevazione dei livelli di sCD40 è probabilmente responsabile delle alterazioni di espressione genica del CD40.

41 PO

OSTEOPONTINA E RECETTORE SOLUBILE UROKINASICO DELL'ATTIVATORE DEL PLASMINOGENO: QUALE RUOLO NELLE MALATTIE AUTOIMMUNI E NELLE GLOMERULONEFRITI PRIMITIVE?

Quaglia M., Monti S., Lazzarich E., Menegotto A., Izzo C., Airoldi A., Dianzani S., Stratta P.
Nefrologia e Trapianto, AOU "Maggiore della Carità", Università "Amedeo Avogadro", Novara

Introduzione. L'osteopontina (OPN) ed il recettore solubile di tipo urokinasico dell'attivatore del plasminogeno (suPAR) stanno emergendo come markers di disfunzione endoteliale e danno d'organo in vari contesti, dalla sepsi alla malattia cardiovascolare, e alcuni studi ne indicano un ruolo anche nella patologia autoimmune.

Pazienti e Metodi. È stata eseguita la determinazione dei livelli di OPN e suPAR su un totale di n=197 pazienti, dei quali n=154 affetti da malattie autoimmuni (n=101 LES; n=18 Sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi primitiva; n=21 vasculiti; n=11 altre malattie autoimmuni) e n=46 affetti da glomerulonefriti primitive. Scopo del lavoro è stato analizzare le correlazioni tra i livelli dei due marcatori e le caratteristiche clinico-laboratoristiche di queste popolazioni, con particolare riferimento al quadro nefrologico e al grado di attività immunologica.

Risultati. OPN: è emersa una correlazione inversa tra livelli elevati di OPN (p=0.012) e clearance creatinica (p<0.001), ma non proteinuria (p=0.106). I livelli di OPN appaiono associati a quelli di PCR (p=0.01), VES (p=0.009) e ANA (p=0.036) ma non ad altri markers di autoimmunità (anti-dsDNA, ANCA). OPN sembra inoltre correlata positivamente all'anemia (p=0.0006) e inversamente a manifestazioni immunologiche cutanee e osteoarticolari. suPAR: appare correlato al coinvolgimento renale (p=0.001), anche considerando separatamente la clearance creatinica (p<0.0001) e la proteinuria (p=0.003). I livelli di suPAR appaiono associati a quelli di ferritina (p=0.004) e p-ANCA (p=0.049) ma non a VES e PCR. suPAR sembrerebbe associato a manifestazioni cliniche di tipo cardio-polmonare (p=0.01).

Conclusioni. Sia OPN che suPAR appaiono associati al grado di insufficienza renale e a vari indici di flogosi e attività immunologica (PCR, VES e ANA per OPN; ferritina e p-ANCA per suPAR) in una popolazione di pazienti affetti da malattie autoimmuni e glomerulonefriti primitive. Inoltre correlerebbero con una particolare "impronta" clinica delle manifestazioni extrarenali nelle malattie autoimmuni. Ulteriori studi sono necessari per valutarne l'efficacia nel predire lo sviluppo di insufficienza renale sia nelle malattie autoimmuni che nelle glomerulonefriti primitive.

42 PO

PROTEOMIC PROFILE OF PLASMA PROTEINS ELUTED FROM COUPLED PLASMA FILTRATION-ADSORPTION (CPFA) SORBENT RESIN CARTRIDGES IN A SWINE MODEL OF SEPSIS

Netti G.S.¹, Praticchizzo C.¹, Palermo C.¹, Di Palma A.M.¹, Nardiello D.¹, Grandaliano G.¹, Crovace A.², Centonze D.¹, Gesualdo L.²

¹BioAgroMed Research Center, Univ. of Foggia, Foggia; ²DETO, Univ. of Bari, Bari

Background. CPFA was developed as an adsorptive hemopurification method aiming at the removal of circulating soluble mediators potentially involved in the pathogenesis of sepsis. Efficient analytic methods for profiling the plasma proteins trapped in sorbent resin cartridges are highly desirable to elucidate the pathophysiology of sepsis and to develop new filters for CPFA. In this work a dedicated proteomic approach was proposed for the analysis of proteins trapped in CPFA cartridges used for treatment of septic pigs.

Methods. Six anesthetized, mechanically ventilated, and instrumented pigs, were randomized to receive either LPS 300 mcg/kg (n=3) or saline solution (n=3). After 3h the animals were treated with CPFA 140 mL for 6h. Proteins entrapped in CPFA cartridges were extracted, separated, profiled by 2-DE, digested, analyzed by nanoHPLC-ESI-MS/MS and identified using the search program Mascot-Matrix Science. Both septic and sham-treated pigs were killed after 9h and renal specimens were collected for histology.

Results. The image analysis revealed that 2-DE spots obtained from CPFA cartridges of septic pigs were more abundant than controls (156 vs 120). Preliminary data of 2-DE spot protein identification by nanoHPLC-ESI-IT-MS revealed that septic pigs showed more abundant levels of immunoglobulins as compared with control pigs, while there was a decreased expression of Albumins, Transferrin and Fetuin A. According to the clinical finding of a well-established inflammatory status with renal impairment, histological examination of renal specimens from septic pigs revealed tubular injury, interstitial edema and mononuclear cell infiltrate at glomerular level, than were absent in controls.

Conclusions. In this work a powerful method for proteomic analysis of proteins trapped into adsorbent resin cartridges used for CPFA has been developed. Preliminary data of 2-DE spot protein identification show a classical acute phase response in septic pigs, but further studies will be performed to better depict the protein profile associated with sepsis development and, possibly, to improve the outcome of severe sepsis.

43 PO

TOPI KNOCK-OUT PER CHOP HANNO UN'AUMENTATA SUSCETTIBILITÀ AL DANNO RENALE INDOTTO DA LPS

Esposito V.^{1,2}, Grosjean F.^{1,2}, Striker G.E.¹, Vlassara H.¹, Zheng F.¹

¹Division of Experimental Diabetes and Aging, Department of Geriatrics, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA; ²Unità di Nefrologia Dialisi e Trapianto, Policlinico San Matteo, Università di Pavia, Pavia

Introduzione. I meccanismi alla base del danno renale indotto da LPS (lipopolisaccaride) sono molteplici e non ancora completamente delucidati. Il ruolo del reticolo endoplasmatico (RE) in corso di danno renale acuto ha recentemente suscitato un notevole interesse. Studi preliminari hanno mostrato che LPS somministrato a topi C57B6 (WT) induceva un'aumentata espressione C/EBP homologous protein (CHOP), fattore di trascrizione indotto in corso di stress del RE. Abbiamo investigato il ruolo di CHOP in un modello di danno renale indotto da LPS.

Metodi. Topi WT e CHOP^{-/-} sono stati trattati con 10 µg/g di LPS i.p. e sacrificati dopo 24 ore. La funzione renale è stata valutata mediante il dosaggio dell'azoto ureico nel plasma (BUN) e la proteinuria è stata valutata come rapporto tra albuminuria e creatinuria (ACR). Glomeruli isolati da topi WT e CHOP^{-/-} sono stati utilizzati per gli studi ex-vivo e per ottenere colture primarie di podociti.

Risultati. Il trattamento con LPS induceva un incremento di ACR e BUN che era superiore nei topi CHOP^{-/-} rispetto ai topi WT (p<0.05). I topi CHOP^{-/-} mostravano valori di TNF alfa sierico più elevati (p<0.05). I reni dei topi trattati con LPS mostravano la presenza di un infiltrato interstiziale e glomerulare costituito da neutrofili che era maggiore nei topi CHOP^{-/-} (p<0.0005). I reni dei topi CHOP^{-/-} trattati con LPS mostravano un numero maggiore di cellule apoptotiche, una maggiore espressione di geni pro infiammatori come MIP2, CXCL1 ed IL6 rispetto ai topi WT. LPS induceva una maggiore espressione di MIP2 e CXCL1 nei glomeruli e podociti CHOP^{-/-}. I reni dei topi CHOP^{-/-} mostravano maggiore degradazione di Ikb indotta da LPS e non vi erano differenze nella fosforilazione di P38 e JNK rispetto ai WT. LPS invece induceva una aumentata fosforilazione di P38 nei glomeruli e nei podociti ottenuti dai topi CHOP^{-/-}; in questi ultimi era aumentata la fosforilazione di Ikb.

Conclusioni. I topi CHOP^{-/-} sono più suscettibili al danno renale acuto indotto da LPS mostrando una maggiore risposta infiammatoria locale e sistemica, verosimilmente mediata da NFκB. CHOP sembra giocare un ruolo fondamentale nel modulare il danno renale acuto indotto da LPS.

44 PO

ESTERI DELL'ACIDO IALURONICO E BUTIRRICO PROTEGGONO CELLULE MESANGIALI IN UN MODELLO DI DANNO ISCHEMICO IN VITRO

Bianchi F.¹, La Manna G.², Olivi E.¹, Ventura C.¹, Stefoni S.²

Lab. di Biologia Molecolare e Ingegneria delle Cellule Staminali, Unità di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Ospedale S. Orsola, Università di Bologna, Bologna

Introduzione. L'Insufficienza Renale Acuta (IRA) è un rapido declino della funzionalità renale caratterizzato da necrosi tubulare acuta, ma anche da proliferazione delle cellule mesangiali (MC) e da un aumento della deposizione di matrice, che rappresentano elementi di gravità e progressione verso il danno. Recentemente abbiamo dimostrato, in un modello animale di IRA, una migliore ripresa della funzionalità renale iniettando cellule staminali mesenchimali pretrattate con esteri di acido ialuronico e Butirrico (HB) rispetto a cellule non trattate. In questo studio abbiamo valutato se HB possa proteggere le MC dal danno da stress ossidativo, una delle principali cause di IRA.

Metodi. MC di ratto sono state pretrattate con HB (1 g/L) o cresciute in terreno di coltura per 24 h, prima di aggiungere H2O2 50µM per 6-16-24-48 h per indurre una stress ossidativo. La proliferazione è stata valutata mediante analisi del ciclo cellulare, l'espressione genica con Real Time PCR, apoptosi e necrosi tramite analisi dell'attività della caspasi 3 e del rilascio della lattato deidrogenasi. Lo studio delle vie di trasduzione coinvolte (Akt and p38) è stato effettuato con Western Blot.

Risultati. A 24 h, il 35% di cellule trattate con H2O2 è in fase G2/S, rispetto al 10% del controllo e al 23% di quelle pretrattate con HB. La minore proliferazione è associata ad un calo della fosforilazione di Akt. HB induce un aumento significativo di MMP-9, coinvolto nella degradazione della matrice, ad ogni tempo considerato, e una riduzione dell'espressione del Collagene-1 a 24h, rispetto alle MC non pretrattate. Il trattamento con H2O2 causa necrosi, che è fortemente inibita da HB. A 16 h l'attività della caspasi 3 è alta solo nelle MC pretrattate, indicando che in questo caso le cellule muoiono per apoptosi, come confermato dalla fosforilazione di P38, prevenendo l'infiammazione associata alla necrosi.

Conclusioni. In questo studio abbiamo evidenziato come HB protegga le MC dal danno indotto dallo stress ossidativo, suggerendo il suo potenziale impiego come primo aiuto per la rigenerazione del danno renale, che potrebbe essere seguito da un successivo trapianto di cellule staminali.

45 PO

CARDIAC ACTIVITY MODIFICATION UREMIA-RELATED: A RABBIT MODEL

Ferramosca E.¹, Rivolta L.², Pisoni L.³, Corsi C.³, Joechler M.¹, Rizzetto R.³, Dalpozzo B.³, Bellei E.³, Grandi E.³, Severi S.³, Santoro A.¹
¹Policlinico S.Orsola-Malpighi, Bologna; ²Università di Milano Bicocca, Milano; ³Università degli Studi di Bologna, Bologna

Introduzione. In patients with end-stage renal failure, cardiovascular complications are a relevant problem, and cardiac death is the main cause of death in this population patients. Besides the increased arrhythmic events, a larger dispersion in the QT interval duration has also been described. The reasons explaining these alterations in the ventricular repolarization are still poorly understood. Therefore, the investigation of the cellular mechanisms underlying the electrocardiographic and hemodynamic alterations is of great interest.

Materials and Methods. Here we present the set up of an animal model of uremic cardiomyopathy, the morphological and functional evaluation of its heart, and the electrophysiological properties at the single cell level. We set up a rabbit uremic model obtained by partial resection of renal parenchima. We verified that the model developed a uremic condition by monitoring the plasma level of urea, creatinine and K⁺. Echocardiographic evaluation of the morphology and hemodynamic parameters of the heart determined the onset of left ventricular hypertrophy. Finally, the action potential of ventricular cardiomyocytes obtained from the uremic rabbit was recorded through whole-cell patch clamp technique in current clamp mode and its duration at the 90% of repolarization (APD90) was assessed.

Results. In this model, the plasmatic levels of urea, creatinine and K⁺ increased 2.6 fold, 5 fold and 20%, respectively. Ecocardiographic measurements revealed that the thickness of the posterior wall increased from 3.3 cm up to 6 cm at the end of the diastolic phase and from 4 cm up to 7.2 cm at the end of the systolic phase, while the thickening of the intraventricular septum was 0.07 cm before the surgery and became 0.17 cm after the development of the uremic state. The mass of the left ventricle grew from 3.9 g to 7.7 g. Cardiomyocytes isolated from the left ventricle were paced at 2Hz while perfused with a solution with typical post-dialysis plasma electrolyte concentrations. We found that APD90 decreased by 26% compared to that measured on the same cardiomyocytes perfused with a solution mimicking the electrolyte concentrations in the uremic plasma.

Conclusion. The uremic rabbit here developed and characterized may represent a useful model for a deeper understanding of the cellular ionic mechanisms underlying uremia-associated cardiac function alterations and for the development of potential therapeutical strategies.

senza ed alla severità della stenosi renale, probabilmente come espressione di una sofferenza ischemica renale. La buona capacità diagnostica di questo biomarker nell'identificare una RAS severa potrebbe proporre NGAL come un utile e rapido strumento per identificare pazienti con CAD a rischio potenziale di vasculopatia renale.

47 CO

SINDROME METABOLICA E MICROALBUMINURIA PREDICONO L'END-POINT RENALE NELL'IPERTENSIONE ESSENZIALE: LO STUDIO MAGIC

Storace G.¹, Leoncini G.¹, Viazzi F.¹, Baratto E.¹, Bottaro C.¹, Vercelli M.², Deferrari G.¹, Pontremoli R.¹

¹Dipartimento di Cardionefrologia e Dipartimento di Medicina Interna, Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino, Genova; ²DISSAL Dipartimento Scienze della Salute, Università di Genova, Genova

Introduzione. Recenti studi hanno suggerito il ruolo della sindrome metabolica come predittore di malattia renale cronica. La microalbuminuria è associata sia alla presenza di sindrome metabolica sia a quella di malattia renale cronica.

Materiali e Metodi. Allo scopo di analizzare in maniera prospettica la relazione tra sindrome metabolica, microalbuminuria e malattia renale cronica nell'ipertensione essenziale sono stati analizzati 790 pazienti ipertesi non diabetici arruolati nello studio MAGIC (Microalbuminuria: A Genoa Investigation on Complications) tra il 1993 e il 1997 (età media 49±11 anni). La prima ospedalizzazione con diagnosi di malattia renale cronica è stata considerata l'end-point renale.

Risultati. Al basale, sindrome metabolica e microalbuminuria erano presenti in 146 (19%) e 60 (7.6%) pazienti, rispettivamente. Al termine di un follow-up di 11.6 anni (range interquartile 3.2 anni), il 16% dei pazienti con sindrome metabolica e il 9% dei pazienti senza sindrome metabolica (P=0.0087) aveva raggiunto l'end-point renale. L'incidenza dell'end-point aumentava progressivamente dai pazienti che non avevano né sindrome metabolica né microalbuminuria ai pazienti che avevano solo una delle condizioni ed era ancora maggiore in coloro che presentavano contemporaneamente sindrome metabolica e microalbuminuria. È stata messa in evidenza un'interazione significativa tra sindrome metabolica e microalbuminuria. I pazienti che presentavano sia sindrome metabolica che microalbuminuria al basale avevano un rischio di raggiungimento dell'end-point renale 5 volte maggiore rispetto ai pazienti che non avevano nessuna delle due condizioni (HR 5.46; IC 95%, 2.34-12.75). La correzione per possibili fattori confondenti aumentava ulteriormente il rischio.

Discussione. Sindrome metabolica e microalbuminuria sono risultate due predittori indipendenti e complementari dell'end-point renale nei pazienti non diabetici con ipertensione essenziale.

IPERTENSIONE - DIABETE

46 CO

ELEVATI LIVELLI URINARI DI NEUTROPHIL-GELATINASE ASSOCIATED LIPOCALIN (NGAL) IN PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIA CORONARICA RIFLETTONO LA PRESENZA DI STENOSI DELL'ARTERIA RENALE

Bolignano D.³, Zanolì L.¹, Rastelli S.^{1,3}, Marcantoni C.², Coppolino G.⁴, Lucisano G.⁴, Tamburino C.⁵, Battaglia E.⁶, Castellino P.¹

¹Divisione di Medicina Interna e Nefrologia, Università di Catania, Catania; ²Divisione di Nefrologia, Ospedale Cannizzaro, Catania; ³CNR-IBIM, Ospedali Riuniti Reggio Calabria, Reggio Calabria; ⁴Unità di Nefrologia e Dialisi, Università "Magna Graecia", Catanzaro; ⁵Cardiologia, Università di Catania, Catania; ⁶Ospedale "Pugliese-Ciacchio", Catanzaro

Introduzione. La stenosi dell'arteria renale (RAS) si associa frequentemente alla malattia coronarica (CAD) e la presenza di entrambe le patologie rappresenta una condizione che incrementa fortemente il rischio di eventi cardiovascolari e renali. Scopo del presente studio è stato quello di analizzare i livelli urinari di NGAL, un biomarker di danno renale acuto e cronico, in pazienti con CAD con e senza RAS.

Materiali e Metodi. Sono stati studiati 141 pazienti con CAD di varia severità (età: 64±10, eGFR: 84±15 mL/min). La presenza di RAS è stata valutata mediante arteriografia e la sua severità attribuita tramite uno specifico score in considerazione della percentuale di stenosi (0-9%, 10-50%, >50%). NGAL è stato quantificato nelle urine mediante chemiluminescenza.

Risultati. Collettivamente i pazienti con CAD mostravano elevati livelli urinari di NGAL (uNGAL) rispetto ai controlli sani (28.8 [9.9-82.9] vs 6.9 [3.3-12.5] ng/mL; p<0.0001). L'arteriografia rivelava la presenza di RAS di vario grado in 44 pazienti (31%). L'escrezione di uNGAL era più alta in questi soggetti paragonati a quelli senza RAS (72.1 [14.9-143.2] vs 22.9 [9.6-60.4] ng/mL; p=0.001) e correlava con il grado della stenosi (Spearman 0.304; p=0.0002). All'analisi ROC, uNGAL mostrava una buona capacità diagnostica nell'identificare una RAS di grado severo (>50%) tra tutti i pazienti con CAD (Migliore cut-off: 45.5 ng/mL, Sens. 100%, Spec. 65.6; AUC: 0.822).

Conclusioni. In pazienti con contemporaneo interessamento vascolare cardiaco e renale (CAD+RAS) l'incremento di uNGAL è strettamente correlato alla pre-

48 CO

VARIABILITÀ DELLA PRESSIONE ARTERIOSA "VISIT TO VISIT" E RISCHIO DI EVENTI CARDIOVASCOLARI NEI PAZIENTI CON MALATTIA RENALE CRONICA

Leonardis D., Mallamaci F., Tripepi G., Catalano F., Pisano A., Enia G., Postorino M., Zoccali C., a nome del gruppo di studio MAURO: Maimone I., Parisi R., Plutino D., Santoro O., Grandinetti F., Natale G., Chiarella S., Pinciaroli A., Audino A., Mannino M., Caridi G., Marino F., Parlono G., Pugliese A., Garozzo M., Caruso A., Fatuzzo P., Rapisarda F., Papalia T., Caglioti A., Reina A., D'Anello E., Bruzzese V., Fabiano F., Guido A., Gullo M., Fersini S., Pinna M., Campo S., Palma L., Tramontana D., Curti C.
 CNR-IBIM & UOC di Nefrologia e Dialisi, Reggio Calabria

La variabilità della pressione arteriosa (PA) nella dimensione del monitoraggio continuo è un consolidato predittore di alto rischio cardiovascolare. Recenti analisi in coorti di pazienti con ipertensione essenziale hanno dimostrato che, nella dimensione della pratica clinica routinaria, anche la variabilità pressoria delle misurazioni standard (office BP) in visite successive denota un alto rischio. Il problema non è stato mai esaminato nella malattia renale cronica (MRC). Noi abbiamo analizzato il rapporto tra variabilità della PA [espressa in termini di deviazione standard (DS)] in visite successive (da 2 a 7 misure, a intervalli di 6 mesi) e l'incidenza degli eventi cardiovascolari (CV) fatali e non fatali in una coorte di 792 pazienti con MRC di varia severità (eGFR MDRD175:29±15 mL/min/1.73 m²). All'osservazione longitudinale la PA era in media 131/76 mmHg e la variabilità individuale in termini di DS era pari a 11±5/7±3 mmHg (coefficiente di variazione: PA sistolica=8.4%, PA diastolica=9.2%). La DS della PA sistolica (PAS) era direttamente correlata ai corrispondenti valori medi di PAS (r=0.31, P<0.001) e strettamente associata al rischio di eventi CV progressivi [odds ratio (5 mmHg di aumento di DS della PAS): 1.33, IC al 95%: 1.15-1.54, P<0.001]. All'osservazione longitudinale (media: 31 mesi, range: 0.3-60 mesi), 104 pazienti hanno avuto eventi CV fatali e non fatali. In modelli univariati di Cox, il rischio di eventi CV correlava direttamente con la PAS media [rischio relativo (RR) (5 mmHg): 1.10, IC al 95%: 1.05-1.48, P<0.001] ed inversamente con la PAD media [RR (1 mmHg): 0.77, IC al 95%: 0.66-0.82, P<0.001]. La DS della PAS si associava in maniera altamente significativa al rischio di eventi CV [RR (5 mmHg di aumento): 1.34, IC al 95%: 1.10-1.2.37, P<0.001] mentre la DS della PAD non correlava con questo indicatore di risultato. In un modello di re-