

V SESSIONE COMUNICAZIONI - IMMUNOLOGIA - PATOLOGIA - CRESCITA CELLULARE

SALA MIGONE

Lunedì, 8 Ottobre 2007 - ore 10.00-11.00

LA TERAPIA CON ANTAGONISTI DEL RECETTORE DELL'ANGIOTENSINA II RIDUCE IL DANNO RENALE IN CORSO DI GLOMERULONEFRITE MESANGIOPROLIFERATIVA SPERIMENTALE

Villa L, Boor P, Konieczny A, Kunter U, Van Roeyen C, Eitner F, Scholl T, Ostendorf T, Floege J
Dipartimento di Nefrologia, Policlinico Universitario di Aquisgrana, Aachen, Germania

Introduzione. L'azione renoprotettiva dei farmaci antagonisti del recettore dell'angiotensina II (ARA) è conosciuta per le patologie renali associate ad ipertensione e proteinuria ma la loro efficacia e il loro meccanismo d'azione sono poco noti nelle glomerulopatie non-ipertensive con proteinuria di modesta entità.

Scopi. Confrontare l'effetto di una terapia con differenti dosaggi di ARA con quello di un trattamento antipertensivo convenzionale in ratti affetti da glomerulonefrite mesangioproliferativa anti-Thy1.1.

Materiali e metodi. Al giorno 4 dopo l'induzione della nefrite i ratti sono stati randomizzati in 4 gruppi basandosi su livelli simili di proteinuria: ratti non trattati (CT, gruppo controllo, n=12), trattati con basse dosi di ARA (telmisartan, 0.1 mg/kg/die, gruppo LT, n=12), con alte dosi di ARA (10 mg/kg/die, gruppo HT, n=12) e con terapia antipertensiva "convenzionale" (idrocortisone 8 mg/kg/die+idralazina 32 mg/kg/die, gruppo HCT+H, n=12). I ratti sono stati sacrificati al giorno 9 e 14.

Gruppo	CT		LT		HT		HCT+H	
	9	14	9	14	9	14	9	14
Proteinuria (mg/24h)	110±33	62±14	113±20	67±13	77±17 ^{a,b}	54±15	71±18 ^{a,b}	56±16
n°mitosi								
endoteliali/SG	6.2±1.5	7.0±2.9	5.8±3.5	3.8±1.8 ^a	6.2±2.6	2.3±1.6 ^a	4.8±2.6	2.0±1.4 ^a
αSMA (%) G		13±6		12±4		8±2 ^a		8±3
αSMA (%) I	1.9±0.2	2.0±0.3	2.1±0.5	2.0±0.5	2.3±0.6	1.5±0.2 ^{a,b}	2.6±0.6 ^a	1.8±0.4
SR (%) G		26±7		10±3 ^a		10±4 ^a		17±9 ^a
SR (%) I		9.0±3.0		3.7±0.8 ^a		3.4±1.1 ^a		5.9±3.0 ^a
Coll IV (%) I		8.6±2.3		10.0±2.6		6.4±1.3 ^{b,c}		9.8±2.0

SG=sezione glomerulare; %=area positiva; αSMA=alpha-smooth-muscle-actin; SR=sirius red; G=glomerulare; I=interstiziale; a=p<0.05 vs CT, b=vs LT, c=vs HCT+H

Risultati. Se confrontato con i gruppi CT e LT, rimasti comunque normotesi, il trattamento con HT e HCT+H ha ulteriormente ridotto del 15-20% la pressione arteriosa. La terapia con LT, HT e HCT+H ha ridotto la proliferazione delle cellule endoteliali glomerulari (giorno 14). Solo il trattamento con HT ha migliorato il danno a carico dei podociti, valutato contando le cel-

(segue)

LE CEMOCHINE ANGIOSTATICHE CXCL4 E CXCL4L1 MOSTRANO UNA DIFFERENTE ESPRESSIONE ED UNA DIFFERENTE REGOLAZIONE DELLA SECREZIONE: IMPLICAZIONI NELL' ANGIOGENESI RENALE E NEL CARCINOMA RENALE A CELLULE CHIARE

Lassagni L¹, Iazzeri E¹, Mazzinghi B¹, Sagrinati C¹, Ronconi E¹, Ballerini L¹, Netti GS², Gesualdo L², Romagnani P¹

¹ Centro di Eccellenza DENOthe, Dipartimento di Fisopatologia Clinica, Sezione di Nefrologia, Università degli Studi di Firenze, Firenze; ² Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Foggia, Foggia

Introduzione. Il PF-4/CXCL4 è una chemochina nota per le sue funzioni angiostatiche, antitumorali ed immunoregolatorie. Recentemente, è stata identificata una variante non allelica del CXCL4 denominata CXCL4L1. CXCL4 e CXCL4L1 mostrano una divergenza aminoacidica del 38% nella regione della sequenza segnale. Tuttavia, l'espressione di queste due chemochine nel rene non è nota ed un eventuale loro distinto contributo alla regolazione dell'angiogenesi in condizioni fisiologiche e nelle neoplasie renali non è mai stato valutato.

Scopi. Scopo del lavoro è stato valutare l'espressione di CXCL4 e CXCL4L1 in numerosi tipi cellulari di origine renale e verificare se le differenze nella sequenza segnale di CXCL4 e CXCL4L1 potessero determinare una diversa regolazione della loro secrezione. Inoltre, abbiamo valutato la loro espressione in campioni di tessuto renale normale e di tumori renali a cellule chiare.

Materiali e metodi. L'espressione dell'RNA di CXCL4 e CXCL4L1 è stata valutata mediante RT-PCR quantitativa in colture primarie di cellule mesangiali, podociti, cellule endoteliali capillari, cellule muscolari lisce vascolari, linfociti, monociti e piastirine. La localizzazione subcellulare e la regolazione della secrezione è stata studiata utilizzando linee HEK-293 transfettate stabilmente e tecniche di microscopia confocale, Western blot ed ELISA. Infine l'espressione dell'RNA di CXCL4 e CXCL4L1 è stata valutata in 30 carcinomi renali a cellule chiare e nelle loro controparti normali.

Risultati. In tutti i tipi cellulari analizzati l'espressione dell'RNA di CXCL4 è risultata prevalente rispetto a quella del CXCL4L1 con la sola eccezione delle cellule muscolari lisce. A livello renale i tipi cellulari che esprimono il CXCL4 e il CXCL4L1 sono risultati essere principalmente le cellule endoteliali e le cellule glomerulari epiteliali.

Utilizzando dei transfettanti stabili esprimenti il CXCL4 o il CXCL4L1 abbiamo dimostrato che le due chemochine mostrano una distinta modalità di secrezione. Infatti, mentre il CXCL4 è racchiuso in granuli secretori e rilasciato solo in risposta all'attivazione della protein chinasi C, il CXCL4L1 è continuamente secreto. Infatti, i linfociti, che esprimono quasi esclusivamente CXCL4, rilasciano la chemochina solo a seguito dell'attivazione della protein chinasi C; le cellule muscolari lisce invece, che esprimono principalmente il CXCL4L1, rilasciano CXCL4L1 nel surnatante in maniera continua. Infine, l'analisi dei carcinomi renali ha consentito di osservare una selettiva, forte up-regolazione dell'espressione del CXCL4L1 rispetto alle controparti normali.

Conclusioni. CXCL4 e CXCL4L1 hanno una diversa localizzazione intracellulare e sono secreti in modo differenzialmente regolato, suggerendo un loro ruolo distinto in processi infiammatori o omeostatici. L'aumentata espressione del CXCL4L1 nei campioni di tumore renale a cellule chiare suggerisce inoltre un importante ruolo nei processi di tumorigenesi e di angiogenesi.

2

lule positive per WT1 e desmina (-64% vs CT, giorno 9), e ha ridotto l'attivazione delle cellule mesangiali (espressione di αSMA, -38% vs CT, giorno 14). Al giorno 14 HT ha ridotto sia la deposizione glomerulare che interstiziale di matrice (colorazione con SR), specie quella di collagene IV interstiziale. Al giorno 9 solo ratti trattati con HT hanno conservato l'espressione tubulare di E-caderina (+100% vs CT) mostrando anche una riduzione dell'espressione interstiziale di vimentina (-32% vs CT), effetto riconducibile ad una ridotta transizione epitelio-mesenchimale. Al giorno 14, anche il trattamento con HCT+H e LT ha ridotto la sclerosi glomerulare e interstiziale ma senza alcun effetto sui rimanenti parametri.

Conclusioni. La terapia con elevate dosi di telmisartan, pur intrapresa nella fase di massima intensità della nefrite, migliora il danno glomerulare e tubulo-interstiziale più efficacemente che HCT+H. Anche a dosaggio non-ipertensivo telmisartan ha ridotto in modo rilevante la deposizione di matrice a livello glomerulare e tubulo-interstiziale.

CELLULE STAMINALI RESIDENTI RENALI: STUDIO COMPARATIVO CON APPROCCIO GENOMICO

De Benedictis L¹, Ursi M¹, Loverre A¹, Petruzzelli V², Capobianco C¹, Verrietti R¹, Zaza G¹, Pontrelli P³, Gesualdo L³, Carella M⁴, Grandaliano G¹, Schena FP¹

¹Unità di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Dipartimento dell'Emergenza e dei Trapianti di Organo, Università di Bari, Bari; ²Apulia Biotech, Valenzano, Bari; ³Unità di Nefrologia e Dialisi, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Foggia, Foggia; ⁴Unità di Genetica Medica, Casa Sollievo della Sofferenza, S. Giovanni Rotondo, Foggia

Introduzione. La crescente attenzione dimostrata dalla comunità scientifica verso la biologia delle cellule staminali (CS) sembra focalizzarsi sempre più sulle CS adulte (CSA). Le CSA, solitamente alloggiate in nicchie all'interno degli organi adulti, costituiscono riserve dormienti di potenziale rigenerativo. Il rene, organo fisiologicamente soggetto ad un elevato "turn-over" cellulare, è sede di CSA residenti (CSR), isolate sia dal tubulo/interstizio che dalla capsula del Bowman.

Scopi. Confrontare, con un approccio genomico, le popolazioni attualmente note di CSR e compararle con popolazioni di controllo, quali le cellule mature dell'epitelio tubulare renale (RPTEC) e le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo (CSM), al fine di definire possibili ruoli funzionali per le CSR e di identificare sia profili di espressione tipici di queste cellule che profili comuni con altre cellule staminali e con cellule mature.

Materiali e metodi. CSR con capacità proliferativa, clonogenica e multi-differenziativa sono state isolate sia dai glomeruli sia dai tubuli della parte normale di 3 reni con carcinoma renale. L'RNA totale ottenuto da CSR, CSM e RPTEC è stato ibridato su microarray HG-U133A (Affymetrix). Tre algoritmi statistici (ANOVA, Kruskal-Wallis test e distinction calculation) e la stima del false discovery rate (FDR) sono stati applicati per l'individuazione dei geni maggiormente discriminanti mediante il software R-project 2.0.1. Inoltre, il software Ingenuity Pathways Analysis è stato utilizzato per la definizione di network funzionali.

Risultati. L'analisi bioinformatica degli array ci ha permesso di identificare 2134 probe set genici (1742 geni) che discriminano i 4 tipi cellulari (p<0,0001, FDR<5%), sebbene le CSR tubulari e glomerulari presentino un profilo di espressione sovrapponibile (p=0,70, FDR=90%). Grazie allo hierarchical clustering ed alla principal component analysis, abbiamo identificato 149 probe set up-regolati (Cluster F) e 71 down-regolati (Cluster B) nelle CSR rispetto agli altri tipi cellulari. Inoltre 607 probe set (Cluster C e D) hanno discriminato i 3 cito-tipi staminali dalle RPTEC, indicando un possibile ruolo per questi geni nella "staminalità". In aggiunta il Cluster A (535 probe set) ed il Cluster E (771 probe set) hanno discriminato le CSM dalle altre linee cellulari. L'analisi delle pathway effettuata utilizzando i cluster significativi ha discriminato le CSR dalle altre popolazioni cellulari, evidenziando vari geni implicati nella crescita/proliferazione cellulare (i.e., HGS, HBEGF) e nella risposta immunitaria (i.e., TAP1, PSME2, IIF). I geni inclusi nei Cluster C e D sono invece rientrati in network di "commitment" cellulare (i.e., NOTCH2, JAG1) e di degradazione della matrice extra-cellulare (i.e., MMP19, ADAM12).

Conclusioni. Il presente studio definisce per la prima volta un profilo genomico delle CSR e suggerisce una serie di meccanismi cellulari responsabili della loro capacità rigenerativa.

3

ALTERAZIONI DELLA PATHWAY JAK3/STAT5-STAT6 NEI LINFOCITI T CD8+ DEI PAZIENTI CON CARCINOMA RENALE (RCC)Cavalcanti E¹, Gigante M², Capobianco C¹, Mancini V³, Battaglia M³, Schena FP¹, Gesualdo L⁴, Ranieri E⁵,¹Sezione di Nefrologia, D.E.T.O., Università di Bari, Bari; ²Dipartimento di Chirurgia, Università di Foggia, Foggia; ³Sezione di Urologia, D.E.T.O., Università di Bari, Bari; ⁴Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Nefrologia, Università di Foggia, Foggia; ⁵Dipartimento di Scienze Biomediche Sezione di Patologia Clinica, Università di Foggia, Foggia

Introduzione. Il RCC esprime antigeni che possono essere riconosciuti dal sistema immune, in particolare dai linfociti T citotossici e determinare lo sviluppo di una risposta immune, di tipo cellulo-mediata ed antigene-specifica. L'eliminazione del tumore può non essere effettiva se i processi necessari per l'induzione di una risposta cellulo-mediata falliscono. L'attivazione della risposta immunitaria da parte delle cellule T dipende da segnali intracellulari attraverso i quali vengono prodotti una serie di fattori trascrizionali che regolano l'espressione di citochine, di chemochine coinvolte nella proliferazione, nel ciclo cellulare e nell'apoptosi. In particolare, i segnali di traduzione (JAK3) e i fattori di trascrizione (STAT5 e STAT6) regolano un ampio spettro di processi cellulari come la proliferazione e la differenziazione dei linfociti T. Una alterazione dell'espressione di detti segnali è associata allo sviluppo di malattie tumorali. In particolare, STAT6 controlla la risposta proliferativa delle cellule T indotta dalle citochine regolando l'espressione degli inibitori del ciclo cellulare (p27^{KIP1}) o di molecole in grado di inibire pRb (ID2), permettendo così la transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare.

Scopo. Scopo del nostro studio è stato quello di valutare alterazioni dei meccanismi con cui la pathway JAK3/STAT5-STAT6 controlla la proliferazione e lo stato di apoptosi nei linfociti T CD8⁺ di pazienti affetti da RCC.

Materiali e metodi. Abbiamo valutato dette alterazioni mediante stimolazioni *in vitro* con MLTC (Mixed Lymphocytes Tumor cell Culture), analisi confocale, Western Blot ed analisi citofluorimetrica per la lo studio della proliferazione e del ciclo cellulare.

Risultati. Dall'analisi dell'espressione genica sulle cellule linfocitarie CD8⁺ reattive al tumore mediante la metodica MLTC in condizioni autologhe ed allogene, abbiamo evidenziato una differente espressione genica dei linfociti T CD8⁺ attivati, in soggetti normali e con RCC. Abbiamo osservato differenze a livello di espressione di geni coinvolti nella proliferazione, nel ciclo cellulare e nell'apoptosi che portano ad un cambiamento fenotipico e funzionale dei linfociti T CD8⁺ responder. Tra i geni analizzati abbiamo preso in considerazione quelli coinvolti nella pathway JAK3/STAT5-STAT6. Mediante analisi confocale abbiamo confermato che STAT6 risulta ridotto nei CD8⁺ attivati di pazienti con RCC (40.2±8.6/HPF) rispetto ai CD8⁺ dei soggetti normali (60.8±0.8 /HPF) (57.3±6.8/HPF)

(segue)

L'INFUSIONE DI CELLULE MESENCHIMALI STAMINALI MIGLIORA IL DECORSO DELLA GLOMERULONEFRITE SPERIMENTALE ANTI-THY1 DI RATTORampino T¹, Gregorini M¹, Marasà M¹, Bedino G¹, Piotti G¹, Balenzano CT¹, Roscini E¹, Frasson F², Ibatucci A², Corselli M², Sessarego N², Dal Canton A¹¹ Unità di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Università, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia;² Dipartimento di Ematologia, Centro di Cellule Staminali, Ospedale San Martino, Genova

Introduzione. Le cellule mesenchimali staminali (MSC) sono cellule pluripotenti che possono differenziarsi in cellule mature di vari tessuti. Inoltre, MSC possiedono la capacità di indurre immunotolleranza ed un'azione antiinfiammatoria. Queste proprietà fanno delle MSC un potenziale strumento terapeutico nelle malattie autoimmuni. La nefrite sperimentale anti-Thy1 è una glomerulonefrite indotta da un anticorpo, caratterizzata da mesangiolisi, infiltrazione glomerulare di monociti-macrofagi e proliferazione mesangiale.

Scopo. Valutare se l'infusione di MSC modifica il decorso della nefrite anti-Thy 1 e comprendere il meccanismo di un eventuale effetto terapeutico.

Metodi. Ratti Sprague-Dawley transgenici per enhanced green fluorescence protein (EGFP) sono stati usati come donatori di MSC, isolate dal midollo osseo e caratterizzate. La nefrite anti-Thy1 è stata indotta in ratti Sprague Dawley wild-type. Abbiamo studiato 4 gruppi. Gruppo A: 20 ratti erano iniettati con anti-Thy 1 Ab al giorno 0. Gruppo B: 20 ratti erano iniettati con anti Thy-1 Ab al giorno 0 ed erano trattati con MSC (3x10⁶) ev al giorno 3. Gruppo C: 20 ratti non nefritici erano trattati con MSC. Gruppo D: 20 ratti non nefritici ricevevano soluzione salina. I ratti erano sacrificati al giorno 7, 10, 14. Abbiamo valutato il danno glomerulare utilizzando uno score istologico compreso tra 0 e 4 in base all'estensione della mesangiolisi e/o del "ballooning" ed alla presenza di microaneurismi e/o semilune (0=nessun danno, 4=>75% dell'area glomerulare interessata da mesangiolisi e ballooning, o presenza di semilune/microaneurismi). Nei glomeruli, il numero di monociti (ED 1), la proliferazione (PCNA), il numero di cellule mesangiali attivate (alfa-SMA) erano valutati mediante immunohistochimica. Cellule EGFP-positive erano ricercate nel rene, fegato, milza, polmone. La proteinuria era misurata quotidianamente. I livelli sierici di IL-12, IL-6, TGF-β erano misurati nei giorni 0, 7, 14.

Risultati. Riportiamo i risultati come medie. MSC riducevano la proteinuria cumulativa in B (654 mg) vs A (1095 mg, p<0.05). Il numero di monociti glomerulo era minore in B che A nei giorni 7 [2.2 vs 4.6 p<0.001] e 14 [3.0 vs 4.3 p<0.001]. La % di glomeruli con score istologico 4 era maggiore in A che in B nei giorni 7 (49.6% vs 20.0%), 10 (49.1% vs 17.5%) e 14 (34.4% vs 11.1%) (p<0.001). Al contrario la % di glomeruli normali era maggiore in B che in A nei giorni 7 (46.6% vs 12.8%), 10 (38.5% vs 11.8%) e 14 (42.6% vs 22.4%) (p<0.005). In A il numero di cellule glomerulari positive per PCNA ed alfa-SMA era ridotto rispetto a B al giorno 14. Rare cellule EGFP-positive erano occasionalmente riscontrate nel polmone, milza, fegato e rene. L'infusione di MSC induceva una significativa riduzione dei livelli sierici di IL-6 [A=783.4 pg/ml, B=10.0 pg/ml; p<0.001], IL-12 [A=1084.0 pg/ml, B=596.0 pg/ml; p<0.001], TGF-beta [A=90.1 pg/ml, B=73.5 pg/ml; p<0.05].

Conclusioni. Il trattamento con MSC riduce il danno glomerulare nella nefrite anti-Thy 1. Gli effetti benefici di MSC non dipendono da una loro differenziazione e diretta partecipazione alla riparazione glomerulare, ma piuttosto da una immunomodulazione sistemica.

5

così come l'espressione di STAT5a/b è diminuita nei CD8⁺ attivati di pazienti con RCC rispetto (27±5.09 HPF) ai CD8⁺ dei soggetti normali (58±12.4, 35.2±8.1). Inoltre, l'analisi confocale ha evidenziato un aumento dell'espressione del p27KIP1 (60.5±2.15/HPF) ed una diminuzione del ID2 (28.7±4.3/HPF) nei CD8⁺ attivati di pazienti con RCC rispetto ai CD8⁺ dei soggetti normali.

Conclusioni. Pertanto, lo studio di alcuni geni chiave e delle loro pathway d'azione, potrebbe chiarire i meccanismi che inducono i linfociti T CD8⁺ in uno stato di anergia e/o apoptosi nei pazienti con RCC. Inoltre, agenti farmacologici in grado di agire sull'espressione di dette pathways potrebbe rappresentare un nuovo approccio terapeutico per il potenziamento della risposta antigene-specifica dei linfociti T CD8⁺.

4

IL CD44 MEDIA IL RECLUTAMENTO DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI AL TESSUTO RENALE DOPO DANNOBussolati B¹, Herrera MB¹, Bruno B¹, Stamenkovic I², Biancone L¹, Camussi G¹¹Dipartimento di Medicina Interna e Centro Interdipartimentale per le Biotecnologie, Torino; ²Division of Experimental Pathology, Université de Lausanne, Lausanne, Switzerland

Introduzione. È stato recentemente dimostrato che le cellule staminali mesenchimali (CSM) espanse *in vitro* sono in grado di migrare ai tessuti danneggiati quando somministrate per via sistemica. Tuttavia, i meccanismi che regolano la loro migrazione e il loro reclutamento non sono attualmente noti.

Scopi. Lo scopo di questo studio è stato di valutare il ruolo della molecola di adesione CD44 e del suo ligando, acido ialuronico, nel traffico delle CSM in un modello murino di insufficienza renale acuta indotta da glicerolo.

Materiali e metodi. Le CSM sono state inoculate in topo tre giorni dopo l'insorgenza del danno renale e la loro presenza nel tessuto renale è stata valutata mediante immunohistochimica per la proteina GFP, mediante analisi FISH e mediante microscopia elettronica per la ricerca di CSM marcate con particelle di ferro. Inoltre, le CSM sono state isolate dal rene danneggiato e caratterizzate mediante analisi citofluorimetrica. Per valutare il ruolo del CD44, sono state utilizzate CSM derivanti da topi CD44^{-/-} o "wild-type". Per controprova, cellule CD44^{-/-} sono state trasfettate con una forma del CD44 in grado di legare l'acido ialuronico o con una forma difettiva.

Risultati. Le CSM CD44⁺ inoculate in topi con insufficienza renale acuta hanno migrato al rene danneggiato, in cui aumentava l'espressione dell'acido ialuronico, e la loro presenza correlava con una ripresa morfologica e funzionale dell'organo. CSM CD44^{-/-}, al contrario, non erano in grado di localizzarsi nel rene, né contribuivano alla sua ripresa funzionale. Esperimenti di ricostituzione mediante trasfezione delle CSM CD44^{-/-} con il CD44 legante l'acido ialuronico, ma non con la forma inattiva, ripristinavano la loro migrazione al rene.

Conclusioni. Questi dati mostrano che l'interazione tra CD44 ed acido ialuronico è fondamentale nel mediare il reclutamento delle CSM al tessuto renale danneggiato e forniscono informazioni su di un possibile meccanismo generale che governa il traffico delle CSM.

6