

**XII SESSIONE POSTER**  
**FISIOLOGIA E BIOLOGIA CELLULARE**  
**Martedì, 9 Ottobre 2007 - ore 14.30-15.30**

**I RAPPORTI CLORO-BICARBONATO E SID-BICARBONATO A DIVERSI LIVELLI DI EMOGLOBINA**

Mercieri A<sup>1</sup>, Mercieri M<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Divisione di Medicina Interna e Pronto Soccorso, Ospedale Bolognini, Seriate, Bergamo; <sup>2</sup>UOC Rianimazione e Terapia Intensiva, Ospedale S. Andrea, Università La Sapienza, Roma

**Introduzione.** Le concentrazioni di cloro e bicarbonato manifestano una relazione inversa sia in condizioni di acidosi che in caso di alcalosi. Questo comportamento è almeno in parte da attribuirsi allo shift dei cloruri nei globuli rossi. Tuttavia, in accordo con l'approccio quantitativo di Stewart all'equilibrio acido-base, appare ragionevole attendersi una più stretta relazione tra differenza di ioni forti (SID=strong ion difference) e concentrazione di bicarbonato piuttosto che tra le relative concentrazioni di cloro e di bicarbonato. Il nostro scopo è verificare che, riducendosi i livelli di emoglobina (Hb), il SID mantiene la caratteristica di variabile indipendente in relazione al bicarbonato mentre la concentrazione di cloro diventa sempre meno correlata con quella del bicarbonato.

**Metodi.** Abbiamo selezionato retrospettivamente 200 pazienti sottoposti ad emogasanalisi e misurazione degli elettroliti plasmatici su un singolo campione ematico prelevato al momento del ricovero. Il SID è stato calcolato con l'equazione di Stewart modificata da Figge. Abbiamo quindi suddiviso i pazienti in 3 gruppi: gruppo A con livelli di Hb compresi tra 12 e 15 gr/dl (n=49), gruppo B con livelli di Hb tra 9 e 12 gr/dl (n=103) e gruppo C con valori di Hb inferiori a 9 gr/dl (n=41). Abbiamo quindi calcolato il coefficiente di Pearson tra SID e concentrazione di bicarbonato e tra concentrazioni di cloro e bicarbonato nei 3 gruppi.

**Risultati.** Esiste una forte correlazione tra SID e bicarbonato anche a livelli di Hb inferiori a 9 gr/dl (Tabella I). Il coefficiente di Pearson per la correlazione tra cloro e bicarbonato evidenzia una moderata ma significativa correlazione nei gruppi A e B; tale correlazione viene completamente persa nel gruppo C.

**Conclusioni.** Tali risultati confermano ulteriormente la teoria di Stewart: il SID mantiene il ruolo di variabile indipendente nei rapporti con il bicarbonato anche a bassi livelli di emoglobina mentre il cloro perde questa relazione a livelli di Hb inferiori a 9 gr/dl.

Gruppi	Hb(gr/dl)	SID-HCO3		p	Cl95		p	Cl 95	
		n	r/r <sup>2</sup>		r/r <sup>2</sup>	r/r <sup>2</sup>			
A	12-15	49	0.743/0.552	0.001	0.53-0.92	-0.572/0.327	0.001	-0.66/-0.36	
B	9-12	103	0.837/0.7	0.001	0.71-0.92	-0.565/0.319	0.001	-0.63/-0.34	
C	<9	41	0.8/0.651	0.001	0.49-0.81	-0.311/0.097	ns		

1

**ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA IN PBMC DI PAZIENTI CON DISFUNZIONE RENALE: CORRELAZIONE CON L'INFIAMMAZIONE ED IL RISCHIO CARDIOVASCOLARE**

Norata GD<sup>1,3</sup>, Buccicini G<sup>2</sup>, Tibolla G<sup>1</sup>, Garlaschelli K<sup>3</sup>, Piloni GB<sup>1</sup>, Raselli S<sup>3</sup>, Grigore L<sup>3</sup>, Stucchi A<sup>2</sup>, Vettoretti S<sup>2</sup>, Baragetti P<sup>2</sup>, Catapano AL<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano, Milano; <sup>2</sup>U.O. Nefrologia e Dialisi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milano; <sup>3</sup>Centro per lo Studio dell'Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milano

**Introduzione e scopo.** Anche se i processi infiammatori ed il rischio cardiovascolare risultano essere fortemente aumentati in pazienti con malattie renali croniche (CKD), i meccanismi molecolari responsabili di questi effetti sono ancora poco noti. Per chiarire questi effetti abbiamo valutato il profilo di espressione genica in cellule mononucleate circolanti (PBMC) di pazienti CKD utilizzando un approccio con cDNA microarray.

**Metodi.** Per i profili di espressione genica sono stati valutati i pazienti inclusi nello studio NephroPLC (uno studio volto a valutare la progressione delle malattie cardiovascolari in pazienti CKD non in dialisi). L'analisi cDNA microarray è stata effettuata in mRNA estratto da PBMC di 8 pazienti e confrontato con RNA di 8 soggetti sani di sesso ed età confrontabili. Brevemente il cDNA è stato ibridizzato su "Dual Chip Human Inflammation slides" e analizzato mediante "Silverquant detection". I geni risultati essere up o down regolati sono stati investigati in dettaglio mediante real time PCR quantitativa (Q-PCR) in 40 pazienti CKD e 40 soggetti sani e correlati con le caratteristiche cliniche e antropometriche.

**Risultati.** Tra i 300 geni correlati con la risposta infiammatoria presenti sul microarray, più di 50 sono risultati essere up-regolati in pazienti CKD tra cui TNF alfa, IL6, IL8, Cox-2, MMP-9, CSF-1, VEGF, BCLx, BCL-2 e caspase 9 mentre tra i down-regolati sono stati osservati cathepsin B, cathepsin D e caspase 8. L'analisi Q-PCR ha confermato un aumento dell'espressione di TNF alfa, MMP-9, Cox-2, TLR-4, CD40, MCP-1, CD40 ligand e ADAMTS-1. Quando i dati sono stati analizzati secondo lo stadio di CKD, l'espressione dei geni infiammatori è risultata maggiore negli stadi 2 e 3.

**Conclusioni.** Il profilo di espressione genica dei PBMC ha mostrato che diversi geni coinvolti nel rimodellamento vascolare, nell'attivazione endoteliale e nella risposta infiammatoria sono indotti in pazienti CKD, principalmente negli stadi 2 e 3. Il nostro studio inoltre ha permesso di identificare nuovi bersagli farmacologici la cui modulazione potrebbe essere utile nel ridurre il rischio cardiovascolare e la risposta infiammatoria nelle fasi iniziali della disfunzione renale.

3

**REALIZZAZIONE DI UN SISTEMA ESPERTO PER LA DIAGNOSI DELLE ALTERAZIONI DELL'EQUILIBRIO ACIDO-BASE**

Barracca A<sup>1</sup>, Patricelli P<sup>2</sup>, Melis W<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Terapia Intensiva Nefrologica, Dipartimento Patologia Renale, Azienda Ospedaliera G. Brotzu, Cagliari; <sup>2</sup>Servizio Dialisi Policlinico S. Elena, Quartu S. Elena, Cagliari; <sup>3</sup>Information Technology Expert

**Introduzione.** Nella pratica clinica i disturbi dell'equilibrio acido-base sono condizioni di frequente riscontro. Essi richiedono molta esperienza clinica e conoscenze fisiopatologiche appropriate. La pratica clinica condiziona però l'esperienza del medico. Il nefrologo infatti conosce molto bene i quadri di acidosi metabolica, ma ha meno dimestichezza con le alterazioni respiratorie acute o croniche. Al contrario il Rianimatore ha molta esperienza con queste alterazioni ed ha una minore conoscenza dei disturbi metabolici.

**Scopi.** Scopo del nostro lavoro è stato quello di elaborare un programma da usare su Pocket PC capace, partendo da pH, PCO<sub>2</sub> e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, di proporre al medico una diagnosi accurata che potesse indicare sia il disturbo principale che, eventualmente, quello secondario ed i compensi messi in atto dall'organismo.

**Materiali e Metodi.** Nel ragionamento clinico il punto di partenza nella valutazione dell'emogaz è il pH. Valori più bassi della norma indicano un'acidosi, più alti un'alcalosi. La valutazione della pressione della anidride carbonica (Pco<sub>2</sub>) e del bicarbonato (Hco<sub>3</sub><sup>-</sup>) consente poi di inquadrare l'acidosi o l'alcalosi nell'ambito dei disturbi respiratori e/o metabolici. Consideriamo perciò un paziente con pH = 7.34, Pco<sub>2</sub> = 50, Hco<sub>3</sub><sup>-</sup> = 26. Il medico farebbe correttamente diagnosi di acidosi respiratoria perché il pH è basso e la Pco<sub>2</sub> è elevata. Per calcolare il compenso metabolico si deve considerare che per ogni 10 mmHg di aumento della Pco<sub>2</sub>, nella acidosi respiratoria acuta l'Hco<sub>3</sub><sup>-</sup> aumenta di 1 mEq/l e che l'Hco<sub>3</sub><sup>-</sup> atteso è di 25 mEq/l. Poiché l'Hco<sub>3</sub><sup>-</sup> misurato è 26 si può concludere che il paziente ha un'acidosi respiratoria acuta con un'alcalosi metabolica associata. Trasformare questi ragionamenti in un programma informatico è molto complesso. Perciò noi abbiamo intrapreso una strada diversa partendo da alcuni concetti elaborati da Grogono e Severinghaus nel 1988, e riadattandoli. Abbiamo perciò costruito un algoritmo basato su dati bidimensionali contenenti le coordinate dei punti di 23 aree poligonali che caratterizzavano la mappa dei disturbi acido-base. Queste zone sono state costruite ponendo il set dei valori di Hco<sub>3</sub><sup>-</sup> nelle ordinate e quelli di Pco<sub>2</sub> nelle ascisse. Il programma valuta preliminarmente se i dati gaseologici del paziente concordano con l'equazione di Henderson-Hasselbalch ed usa una serie di aggettivi per caratterizzare la grandezza dei disturbi del paziente.

**Risultati.** Due esempi di diagnosi fornite dal nostro programma. Paziente con pH = 7.36, Pco<sub>2</sub> = 50, Hco<sub>3</sub><sup>-</sup> = 28: il disturbo principale è un'acidosi respiratoria moderata con minima alcalosi metabolica tipica di un disturbo respiratorio cronico. Paziente con pH = 7.31, Pco<sub>2</sub> = 30, Hco<sub>3</sub><sup>-</sup> = 15: il disturbo principale è una marcata acidosi metabolica con modesta alcalosi respiratoria tipica dei disturbi metabolici parzialmente compensati.

**Conclusioni.** Questo programma, da usare al letto del paziente, può aiutare il medico nella diagnosi di disturbi acido-base complessi.

2

**L'ERITROPOIETINA ED IL RECETTORE SMARRITO**

Sturiale A<sup>1</sup>, Campo S<sup>1</sup>, Crasci E<sup>1</sup>, Coppolino G<sup>1</sup>, Bolignano D<sup>1</sup>, Grasso G<sup>2</sup>, Buemi M<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Interna, Cattedra di Nefrologia, Università di Messina, Messina; <sup>2</sup>Dipartimento di Neurochirurgia, Università di Palermo, Palermo

**Introduzione.** Gli effetti biologici dell'eritropoietina sono mediati dal legame con il suo specifico recettore EpoR, proteina transmembrana il cui peso molecolare varia tra 56 e 57 kDa. Studi recenti hanno evidenziato che diverse cellule, oltre quelle progenitrici eritroidi del midollo osseo, esprimono tale recettore. Tra queste, cellule endoteliali vascolari, miocardiociti, neuroni, macrofagi e cellule tumorali.

**Scopi.** Recenti scoperte suggeriscono che gli anticorpi anti-EpoR disponibili in commercio non sono utilizzabili per l'individuazione immunocitochimica di tale recettore. Abbiamo quindi voluto valutare la specificità dei più comuni anticorpi anti recettore dell'Epo.

**Materiali e metodi.** Abbiamo testato i 3 tipi di anticorpi policlonali murini anti EpoR C-20, M-20 e H-194 e l'anticorpo murino monoclonale MAB 307. Lo studio è stato condotto su reni di ratti che esprimono EpoR e su cellule tubulari tumorali umane (769P) che non esprimono EpoR utilizzando Western Blotting (WB), immunofluorescenza ed immunocitochimica.

**Risultati.** Nella Western Blot, C-20 ed H-194 hanno riconosciuto diverse bande non specifiche con diversi pesi molecolari. M-20 ha individuato una proteina di 59 kDa compatibile con EpoR sul tessuto renale ed un'altra di 30 kDa nella linea cellulare 769P. MAB307 ha identificato una proteina di 59 kDa nel tessuto renale e nessuna banda nella linea cellulare. Analisi immunocitochimiche e l'immunofluorescenza condotta su tessuto renale ha mostrato pattern eterogenei e non specifici.

**Conclusioni.** I nostri dati dovrebbero suscitare grande cautela nell'interpretazione dei risultati delle analisi immunocitochimiche che utilizzano gli anticorpi attualmente disponibili. Sebbene la fluorescenza, utilizzando M-20 o MAB307, non è in grado di localizzare inequivocabilmente EpoR, essa potrebbe comunque essere utilizzata in associazione con la Western Blot per dimostrare se il tessuto esprime EpoR, anche se in piccole quantità.

4

**IDENTIFICAZIONE E VALIDAZIONE DI POTENZIALI MARCATORI PER LA DIAGNOSI, IL MONITORAGGIO E IL TRATTAMENTO DEL CARCINOMA RENALE (RCC)**

Prattichizzo C<sup>1</sup>, Centra M<sup>1</sup>, Bortone G<sup>2</sup>, Rocchetti MT<sup>2</sup>, D'Amore R<sup>2</sup>, Papale M<sup>2</sup>, Balducci L<sup>3</sup>, Saldarelli M<sup>4</sup>, Mancini V<sup>4</sup>, Battaglia M<sup>4</sup>, Gesualdo L<sup>2</sup>, Ranieri E<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche, Patologia Clinica, Università degli Studi di Foggia, Foggia; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche, Nefrologia, Università degli Studi di Foggia, Foggia; <sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Università degli Studi di Foggia, Foggia; <sup>4</sup>Dipartimento di Emergenza e Trapianti di Organo (DETO), Urologia Chirurgica, Università degli Studi di Bari, Bari

**Introduzione.** Il carcinoma renale a cellule chiare (RCC) è la più comune neoplasia maligna del rene con circa 60.000 nuovi casi diagnosticati ogni anno. L'isolamento delle linee cellulari di carcinoma renale rappresenta un valido approccio sperimentale per l'identificazione di proteine o di antigeni coinvolti nella risposta immunitaria antitumorale nella neoplasia renale. Nello studio del profilo proteomico le colture cellulari primarie sono quindi un valido modello sperimentale per analizzare le differenze dell'espressione proteica associate alla carcinogenesi. Tale approccio consente di superare i problemi dell'eterogeneità tissutale e della contaminazione proteica da siero che compromette l'analisi del tessuto intero.

**Scopo.** Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare le proteine differenzialmente espresse tra linee cellulari tubulari primarie e linee cellulari tumorali, immunogeniche e non, che potrebbero rappresentare:

- "biomarker" utili per la diagnosi, il monitoraggio e il trattamento dei pazienti con RCC;
- potenziali antigeni RCC specifici, utilizzabili successivamente per lo sviluppo di una immunoterapia.

**Materiali e metodi.** Dal 2001 al 2006 sono stati raccolti campioni di tessuto tumorale e normale di 45 pazienti con carcinoma renale sottoposti a nefrectomia. Inoltre sono stati prelevate le urine pre- e post- intervento ed il siero di 15 pazienti con RCC. Le cellule tubulari sono state isolate da frammenti di rene normale (PTEC154) mentre quelle tumorali da frammenti patologici (Elthem, RCC1, RCC5). Le proteine sono state separate con 2DE (3-5 gel per campione). L'individuazione degli spot differenzialmente espressi tra le linee tumorali e la linea normale e tra la linea RCC immunogenica (Elthem) e quelle non immunogeniche (RCC1, RCC5) è stata eseguita mediante analisi di immagine utilizzando il software ImageMaster 2DE Platinum (GE Healthcare) ed il Profinder (Perkin Elmer). Gli spot sono stati tripsinizzati e analizzati con spettrometria di massa MALDI-TOF-MS.

**Risultati.** Dall'analisi comparativa delle linee cellulari primarie ottenuta con elettroforesi bidimensionale sono state identificate 22 proteine differenzialmente espresse nelle linee tumorali versus la linea normale, di cui 16 con elevati livelli di espressione e 6 con ridotti

(segue)

**POLIMORFISMO T/A-374 DEL RAGE E FUNZIONE RENALE IN PAZIENTI AFFETTI DA VARI STADI DI INSUFFICIENZA RENALE CRONICA (IRC)**

Baragetti I<sup>1</sup>, Tibolla GP<sup>2,3</sup>, Stucchi A<sup>1</sup>, Vettoretti S<sup>1</sup>, Raselli S<sup>2,3</sup>, Norata GD<sup>2,3</sup>, Buzzi L<sup>1</sup>, Catapano AL<sup>2,3</sup>, Buccianti G<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unità Operativa Nefrologia e Dialisi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Azienda Ospedaliera San Gerardo, Monza; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano, Milano; <sup>3</sup>Centro Aterosclerosi SISA, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milano

**Introduzione.** I pazienti affetti da IRC presentano elevati livelli ematici di prodotti di glicazione avanzata (AGEs). Gli AGEs inducono infiammazione tramite l'interazione con il loro recettore (RAGE), situato su cellule mesangiali e endoteliali e sui macrofagi. Il RAGE è presente in una forma transmembrana ed in una solubile: la solubile inibisce l'interazione tra AGEs e RAGE di membrana, ed è perciò protettiva. Il RAGE è codificato sul cromosoma 6 e la sostituzione di una timina con un'adenina in posizione -374 del promotore del gene produce un incremento preferenziale dell'espressione del RAGE di membrana e conseguente infiammazione. I livelli ematici di RAGE solubile si innalzano al calare del GFR. Tuttavia non si sa se l'incremento è dovuto ad una sua ridotta clearance o ad un aumento della sua espressione genica.

**Scopo** Studiare il polimorfismo T/A -374 del RAGE in pazienti affetti da vari gradi di IRC e correlarlo con il filtrato renale e con i livelli ematici di citochine proinfiammatorie (IL-6, IL-8 e MCP1).

**Materiali e metodi.** Sono stati studiati trasversalmente 88 pazienti (pz) (59 maschi: età media 69 ± 9.74 anni, 29 femmine: età media 65 ± 10.1 anni), di cui 30 diabetici e 57 con sindrome metabolica. Sono state escluse le patologie infiammatorie. I pz sono stati suddivisi in 4 stadi di IRC, in base al GFR stimato con l'MDRD e secondo le linee NFK/DOQI, raggruppando insieme i pz in 4° e 5° stadio (stadio 1°: 11 pz, 12.5%; stadio 2°: 15 pz, 17.05%; stadio 3°: 42 pz, 47.7%; stadio 4°-5°: 20 pz, 22.7%). Sono stati valutati il polimorfismo T/A -374 del RAGE, l'assetto marziale, l'anemia, il metabolismo calcio-fosforo, il profilo lipidico, la proteinuria, la PCR, IL-6, IL-8 e MCP-1.

**Risultati.** I pz presentavano un BMI di 29.9 ± 5.45 Kg/m<sup>2</sup>, PAM di 110 ± 67.58 mmHg, emoglobinemica di 13.1 ± 1.50 g/dl, calcemia di 2.4 ± 0.49 mmol/l, fosforemia di 1.1 ± 0.17 mmol/l, creatinemia di 1.7 ± 1.01 mg/dl (MDRD= 52.3 ± 33.12 ml/min), albumina di 4.2 ± 0.34 g/dl, PCR di 0.4 ± 0.64 mg/dl, IL6 di 6.45 ± 3.53 pg/ml, IL8 di 30.1 ± 17.66 pg/ml, MCP-1 di 161.2 ± 94.71 pg/ml. Il polimorfismo wild type era presente nel 33 % dei pz, gli eterozigoti per quello mutato erano il 45.4% dei pz e gli omozigoti il 21.6 %. Il polimorfismo mutato del RAGE (T/A e A/A) era più frequente nei pz con da IRC in stadio 3°-4° (Chi square= 12.34, p= 0.048) (Fig. 1). I pz con allele mutato avevano una creatinemia media più elevata rispetto ai pazienti con allele wild type

(segue)

ta espressione. L'espressione della heat shock protein 27 risultava aumentata nelle cellule tumorali rispetto alle cellule del tubulo prossimale normale come già descritto in letteratura.

Le proteine individuate sono in corso di analisi nel tessuto renale (normale versus patologico), nel siero e nelle urine (pre- e post- nefrectomia) di 15 pazienti RCC mediante Western Blot ed immunostochimica.

**Conclusioni.** L'individuazione di alterazioni dell'espressione proteica in linee cellulari tumorali renali potrebbe essere utile nella identificazione sia di antigeni tumorali, sia di marcatori tumorali potenzialmente vantaggiosi non solo per la terapia ma anche per la diagnosi precoce di RCC.

(1.8 ± 0.14 mg/dl vs 1.4 ± 0.14 mg/dl; p = 0.04, rispettivamente; MDRD: 58.4 ± 6.85 ml/min vs 49.4 ± 4.03 ml/min, rispettivamente). I pazienti portatori di allele mutato presentavano livelli sierici più elevati di MCP1 (wild type = 131.5 ± 12.46, Eterozigoti = 167.3 ± 21.17, omozigoti = 195.3 ± 22.52, rispettivamente), la differenza era statisticamente significativa nel confronto tra wild type e i mutati (A/T e A/A) presi globalmente (p= 0.03).

**Conclusioni.** Il polimorfismo mutato del RAGE è associato ad un GFR più basso e a livelli più elevati di MCP-1. Il polimorfismo mutato, incrementando l'espressione del RAGE di membrana, potrebbe indurre infiammazione e stress ossidativo ed accelerare la progressione dell'IRC.

