

NEFROLOGIA DI BASE

Immunologia - Patologia - Crescita Cellulare

CO

EFFETTO DELLE CELLULE MESENCHIMALI SULL'ATROFIA TUBULARE IN UN MODELLO SPERIMENTALE DI OSTRUZIONE URETERALE MONOLATERALE NEL RATTO

Bedino G¹, Rampino T¹, Gregorini M¹, Piotti G¹, Bosio F¹, Esposito P¹, Gabanti E¹, Corradetti V¹, Valsania T¹, Rocca C¹, Pattonieri EF¹, Mugione A¹, Frassoni F², Dal Canton A¹

¹ Unità di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Università e Fondazione Irccs Policlinico San Matteo, Pavia; ² Dipartimento di Ematologia, Ospedale San Martino, Genova (Italia)

L'ostruzione ureterale monolaterale (OUM) nel ratto è un modello sperimentale di infiammazione tubulo-interstiziale e fibrosi renale, dove l'attivazione di citochine infiammatorie svolge un ruolo patogenetico nella induzione dell'apoptosi delle cellule tubulari ed atrofia tubulare. Le cellule stromali mesenchimali (MSC) sono cellule multipotenti con proprietà immunomodulanti e rigenerative, capaci di migrare nei tessuti danneggiati e contribuire alla riparazione. I meccanismi attraverso cui inducono tale effetto però non sono ancora completamente chiari. Lo scopo dello studio è stato valutare gli effetti della infusione di MSC in un modello sperimentale di ostruzione ureterale monolaterale nel ratto e comprendere i meccanismi alla base dei loro effetti. Ratti Sprague-Dawley (SD) transgenici per EGFP (enhanced green fluorescence protein) erano usati come donatori di MSC. OUM era eseguita in ratti Sprague Dawley wild-type. Due gruppi di ratti erano studiati. Gruppo A: 6 ratti erano sottoposti alla legatura monolaterale dell'uretere al giorno 0; Gruppo B: 6 ratti erano sottoposti alla legatura monolaterale dell'uretere e ricevevano MSC 3×10^6 al giorno 0 nella vena della coda. Gli animali erano sacrificati al giorno 6 ed il rene ostruito ed il controlaterale erano rimossi per lo studio morfologico. La creatinina sierica era misurata ai giorni 0, 3 e 6. Il diametro massimo tubulare era misurato sulle sezioni di rene legato e rene controlaterale in tutti i ratti. L'apoptosi delle cellule tubulari era valutata mediante tecnica TUNEL. I risultati sono espressi come media e DS. MSC miglioravano la funzione renale (giorno 3: A 0.73 ± 0.06 ; B 0.61 ± 0.04 mg/dl, $p < 0.05$). Il diametro massimo tubulare era significativamente inferiore nei reni controlaterali rispetto ai reni ostruiti nei ratti del gruppo A (controlaterale: 25.54 ± 6.1 ; ostruito: 81.29 ± 54.3 mcm, $p < 0.0001$) e nei ratti del gruppo B (controlaterale: 20.2 ± 10.3 ; ostruito: 48.9 ± 29.13 mcm, $p < 0.0001$). I diametri massimi tubulari nei reni ostruiti del gruppo B (trattati con MSC), erano significativamente inferiori rispetto ai reni ostruiti del gruppo A (B: 48.9 ± 29.13 ; A: 81.29 ± 54.3 mcm, $p < 0.0001$). Nel gruppo B il numero di cellule tubulari apoptotiche era minore rispetto al gruppo A (numero di cellule per hpf A = 1.12 ± 0.15 , B = 0.38 ± 0.07 , $p < 0.01$). Il nostro studio dimostra che l'infusione di MSC attenua significativamente il danno renale acuto nella OUM. MSC inibendo l'apoptosi delle cellule tubulari riducono l'atrofia tubulare.

	Controlli sani (N=69)	IgAN (N=292)	P
% HAA	30.1 (24.4-37.3)	44.3 (34.7-54.0)	<0.001
GdIgA1 (U/ml)	48.7 (32.35-70.4)	135.1 (87.1-204.4)	<0.001
AOPP	32.0 (18.9-74.8)	93.6 (62.3-127.1)	<0.001
Gruppi SH	7.0 (4.9-9.3)	4.6 (3.1-6.4)	0.001

La sensibilità e la specificità dei test di laboratorio è stata valutata mediante analisi di ROC (outcome: riduzione della CrCl del 30%); la %HAA è risultata predittiva di outcome sfavorevole (AUC: 0.67).

La %HAA è risultata significativamente associata al declino della funzionalità renale (slope della CrCl -0.3 ml/min/mese, $p = 0.02$); %HAA, AOPP e gruppi SH sono risultati significativamente associati ai livelli di proteinuria al momento della raccolta del campione ($p = 0.05, 0.01, 0.02$ rispettivamente).

I pazienti con AOPP positivi (valore superiore al 90° centile della popolazione sana) presentavano una curva di decadimento della funzionalità renale significativamente peggiore rispetto a quelli con AOPP negativi (CrCl slope -5.8 ± 8 vs 1.0 ± 9 ml/min/mese, $p = 0.01$).

I pazienti con %HAA e AOPP negativi presentavano uno slope significativamente migliore rispetto a quelli con %HAA e/o AOPP positivi (CrCl slope -2.7 ± 9 vs -5.6 ± 8 ml/min/mese, $p < 0.001$).

Questi dati suggeriscono che una attivazione dello stress ossidativi possa aggravare la patogenicità di IgA ad aberrante glicosilazione nella IgAN.

CO

PRODOTTI DELLO STRESS OSSIDATIVO E IGA AD ALTERATA GLICOSILAZIONE IN PAZIENTI CON NEFROPATIA A DEPOSITI DI IGA

Camilla R¹, Suzuki H², Daprà V¹, Loiacono E¹, Peruzzi L¹, Amore A¹, Ghiggeri G³, Scolari F⁴, Gharavi A⁵, Appel J⁵, Novak J⁶, Julian B⁶, Coppo R¹

¹ Nefrologia Dialisi e Trapianto Ospedale Regina Margherita Torino; ² Dipartimenti di Microbiologia e Medicina, University of Alabama at Birmingham, Alabama, Usa; ³ Laboratorio di Nefrologia, Ospedale Giannina Gaslini, Genova; ⁴ Nefrologia e Dialisi Ospedale di Montichiari, Brescia; ⁵ Dipartimento di Medicina, Columbia University, New York, Usa; ⁶ Dipartimenti di Microbiologia e Medicina, University of Alabama at Birmingham, Alabama, Usa

Le IgA ad alterata glicosilazione (galactose-deficient IgA1- Gd-IgA1) sono considerate un marker di nefropatia a depositi di IgA (IgAN) e si ritiene giochino un ruolo nella patogenesi di questa nefropatia. Recentemente è stata dimostrata un'umentata presenza di prodotti dello stress ossidativo (advanced oxidation protein products, AOPP) nel siero di pazienti con IgAN, soprattutto nei casi con progressiva perdita della funzionalità renale. Gli AOPP sono prodotti insolubili, resistenti alla proteolisi, generati in presenza di stress ossidativo associato all'attivazione dei monociti, al rilascio della mieloperossidasi e alla produzione di specie reattive dell'ossigeno. Gli AOPP circolanti possono a loro volta peggiorare l'ambiente di stress ossidativo.

Scopo del lavoro è stato misurare i livelli sierici di AOPP e di Gd-IgA1 in due coorti di pazienti con IgAN provenienti dall'Italia e dagli USA, indagando una eventuale loro intercorrelazione ed una possibile correlazione con attività clinica e progressione della IgAN.

AOPP e Gd-IgA1 sono stati ricercati nei sieri di 292 pazienti con IgAN e di 69 controlli sani. Le Gd-IgA1 sono state valutate con metodica ELISA con *Helix aspersa* (HAA) ed espresse come percentuale delle proteine Gd-IgA1 standard del mieloma (%HAA) o come valore assoluto (Unità/ml). Gli AOPP sono stati misurati con metodo spettrofotometrico e calibrati con soluzioni di clorammina T. Il potenziale ossido-riduttivo dell'albumina sierica è stato determinato nei sieri di 60 pazienti titolando i gruppi SH liberi delle proteine (espressi come concentrazione per albumina), utilizzando due nuove cianine iodoacetamindici (C3NIASO3 e C5NIASO3). I dati di funzionalità renale (CrCl una volta l'anno durante il follow-up) erano disponibili per 85 pazienti.

I livelli di HAA%, Gd-IgA1 e AOPP sono risultati significativamente aumentati nei pazienti con IgAN rispetto ai controlli, mentre il titolo di gruppi SH è risultato significativamente ridotto (vedi tabella).

(segue)

CO

LA BONE MORPHOGENETIC PROTEIN (BMP)-2 È UP-REGOLATA IN CORSO DI INFIAMMAZIONE ED È IN GRADO DI ORIENTARE LE CELLULE PROGENITRICI RENALI VERSO UN FENOTIPO PRO-FIBROTICO

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

Unità di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Dipartimento dell'emergenza e dei Trapianti di Organi, Università degli Studi di Bari

Introduzione. Una linea di cellule progenitrici CD133+, recentemente isolata nel rene umano adulto, si è dimostrata capace di contribuire ai processi riparativi che caratterizzano la ripresa funzionale del rene dopo necrosi tubulare acuta. Tale evento patologico è caratterizzato da estesi fenomeni infiammatori. Le BMP sono coinvolte nei processi di differenziamento, modelling e rigenerazione. L'azione protettiva della BMP-7 in corso di danno tubulare acuto è ben nota, mentre resta incerto il ruolo di altre BMP, come la BMP-2, nei processi rigenerativi tubulari e, in particolare, la relazione esistente tra BMP-2, infiammazione e cellule progenitrici renali.

Scopi. Valutare l'espressione della BMP-2 e dei suoi recettori da parte delle cellule progenitrici renali in condizioni basali e dopo stimolo infiammatorio e definire gli effetti di tale sistema sul loro fenotipo.

Materiali e metodi. L'espressione di BMP-2 ed ALK-2 nelle cellule CD133+ è stata valutata *in vivo* mediante microscopia confocale su porzioni apparentemente normali di reni umani affetti da carcinoma. Le cellule progenitrici renali CD133+ sono state isolate mediante "magnetic cell sorting". Su tali cellule è stata valutata, in condizioni basali e dopo stimolo con citochine pro-infiammatorie, l'espressione genica (RT-PCR) e proteica (ELISA/Western Blotting) della BMP-2 e dei suoi recettori. L'espressione proteica dell' α -SMA è stata valutata come marker di differenziazione in senso miofibroblastico. La produzione intracellulare dei ROS in risposta alla BMP-2 è stata valutata mediante fluorescenza con 2',7' diclorodidrossifluoresceina (DCF).

Risultati. La BMP-2 è normalmente espressa nel rene normale adulto. Le cellule progenitrici rappresentano la principale fonte di tale citochina nel rene ed esprimono il suo recettore ALK-2. *In vitro* lo stimolo infiammatorio con TNF- α (200 U/ml) aumenta significativamente l'espressione genica (fold change 1.7 vs basale, $p < 0.03$) e la secrezione (basale 48h 65.1 ± 0.6 pg/ml; TNF- α 48h 152.5 ± 19.8 pg/ml, $p = 0.002$) di BMP-2 da parte delle cellule progenitrici. Queste cellule esprimono i recettori della BMP-2 (ALK-2, ALK-3, ALK-6), indicando la loro potenziale responsività alla stessa. Infatti, l'incubazione delle cellule progenitrici con la BMP-2 (30 ng/ml) aumenta in maniera significativa la produzione dei ROS (basale 36.2 ± 15.3 UA; BMP-2 15' 65.5 ± 17.8 UA, $p = 0.05$) ed

(segue)

induce l'espressione di α -SMA (basale 5 giorni 0.3 ± 0.1 UA; BMP-2 5 giorni 0.8 ± 0.2 UA, $p=0.02$), dimostrando la capacità della BMP-2 di orientare le cellule progenitrici in senso miofibroblastico e, quindi, pro-fibrotico. L'impiego di uno stimolo ossidativo, quale H_2O_2 (200 μ M), è in grado di indurre l'espressione di α -SMA nelle cellule progenitrici. Al contrario, l'uso dell'anti-ossidante N-acetil-cisteina riduce significativamente l'espressione proteica dell' α -SMA indotta dalla BMP-2.

Conclusioni. Il milieu infiammatorio, spesso presente in corso di danno renale acuto, può indurre un aumento dell'espressione e secrezione di BMP-2 da parte delle cellule progenitrici renali. La BMP-2 a sua volta è in grado, attraverso un'aumentata generazione intracellulare di ROS, di orientare tali cellule verso un fenotipo pro-fibrotico.

ChemR23+ a livello tubulo-interstiziale in corso di nefrite lupica, non riscontrabili nelle biopsie di reni normali. Mediante microscopia confocale, abbiamo inoltre rilevato che la CHE era associata a cellule endoteliali linfatiche, identificate mediante lo specifico marcatore Podoplanina. Infine, in esperimenti di migrazione trans-endoteliale, l'esposizione di CD plasmacitoidi a surnatanti di RPTEC, induceva una significativa migrazione delle CD, che poteva essere soppressa mediante blocco recettoriale con anticorpo anti-ChemR23.

In conclusione, le cellule epiteliali renali producono *in vitro* e *in vivo* la CHE, un potente fattore chemiotattico per le CD plasmacitoidi. La produzione epiteliale di CHE in corso di nefrite lupica e nei pazienti con rigetto acuto si associa ad un infiltrato di CD plasmacitoidi ChemR23+. Questi dati suggeriscono che la CHE prodotta localmente a livello renale potrebbe giocare un ruolo rilevante nella patogenesi del reclutamento delle CD plasmacitoidi a livello tubulo-interstiziale, favorendo la presentazione di auto-antigeni renali e la progressione del danno tubulo interstiziale.

CO

RECLUTAMENTO DELLE CELLULE DENDRITICHE PLASMACITOIDI NELLE NEFROPATIE: STUDIO DELL'ASSE CHEMERIN/CHEMR23 IN CELLULE TUBULARI RENALI

De Palma G¹, Castellano G¹, Del Prete A², Fiore N¹, Sozzani S³, Grandaliano G¹, Schena FP¹
¹ U.O.C. di Nefrologia, Dialisi e Trapianti, Dipartimento dell'emergenza e dei Trapianti di Organi, Università degli Studi, Policlinico, Bari; ² Dipartimento di Biochimica Medica, Biologia Medica e Fisica Medica, Università degli Studi, Policlinico, Bari & Irccs Istituto Clinico Humanitas, Rozzano; ³ Sezione di Patologia Generale ed Immunologia, Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università degli Studi, Brescia

La cellula tubulare renale svolge un ruolo fondamentale nella progressione del danno renale a livello tubulo interstiziale. Le cellule dendritiche (CD), le più potenti cellule presentanti l'antigene, sono state recentemente descritte *in vivo* in pazienti affetti da glomerulonefriti autoimmuni o in corso di rigetto di rene trapiantato. Ad oggi non sono ancora conosciuti i fattori che regolano il reclutamento delle CD a livello renale, in particolare modo delle CD plasmacitoidi, fondamentali per l'induzione di una risposta autoimmune. Recenti studi hanno identificato nella Chemerin (CHE) un naturale ligando chemoattrattore per ChemR23, un recettore espresso dalle CD plasmacitoidi. L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di ricercare la presenza a livello renale di questo fattore chemiotattico per le CD plasmacitoidi.

Lo studio dell'espressione genica della CHE è stato effettuato con real-time RT-PCR su cellule epiteliali renali (RPTEC) stimolate con citochine proinfiammatorie. Attraverso sandwich ELISA abbiamo valutato la presenza di CHE sui surnatanti di RPTEC in coltura. Mediante immunostochimica ed immunofluorescenza abbiamo ricercato la CHE ed il recettore ChemR23 su sezioni biotiche di pazienti affetti da nefrite lupica e da rigetto acuto.

Le RPTEC presentavano una significativa espressione del gene per la CHE dopo 48 h di coltura *in vitro*. La stimolazione con TNF- α e IFN- γ determinava una diminuzione dell'espressione di mRNA per CHE rispetto al basale (TNF- α riduzione media del $58 \pm 0,12\%$ $p < 0,05$, IFN- γ $67 \pm 0,03\%$ $p < 0,05$). Analisi effettuate sui surnatanti cellulari dimostravano che le RPTEC presentavano una rilevante produzione di CHE in condizioni basali; tale produzione di CHE era significativamente diminuita a seguito di trattamento con TNF- α ed IFN- γ (basale 25.7 ± 2 ng/ml; TNF- α 7 ± 3 ng/ml; IFN- γ 10.9 ± 2 ng/ml; $< 0,05$).

Lo studio immunostochimico dimostrava sulle biopsie renali una chiara presenza di CHE nelle cellule renali tubulari di pazienti affetti da nefrite lupica ed in corso di rigetto acuto in pazienti trapiantati. Di notevole interesse è stato il riscontro di CD plasmacitoidi

(segue)

NA

È POSSIBILE UN APPROCCIO EBM ALLA FIBROSI RETROPERITONEALE? UNA REVISIONE SISTEMATICA

Deagostini MC¹, Consiglio V¹, Manente E¹, Ragni F¹, Arena V², Pelosi E², Porpiglia F¹, Piccoli GB¹

¹ Università di Medicina San Luigi, Orbassano (Torino); ² Irmet, Torino

Introduzione. La fibrosi retroperitoneale è una malattia rara caratterizzata dalla presenza di una reazione fibrosa attorno all'aorta addominale ed alle arterie iliache, spesso estesa in sede retroperitoneale; come accade per molte malattie rare, a coinvolgimento poliorganico, la sua gestione è "a cavallo" tra differenti specialità, nefrologia, urologia, medicina d'urgenza, reumatologia, e la definizione clinica non è univoca. Dove la letteratura è frammentata, un approccio "evidence based (EBM)" è cruciale, almeno per conoscere i limiti delle terapie.

Scopo di questo lavoro è una revisione della letteratura sulla fibrosi retroperitoneale, con attenzione alle definizioni cliniche ed all'approccio terapeutico.

Materiali. Ricerca: Medline (OVID) 2000-2008 termini MESH e "free terms" sulla fibrosi retroperitoneale; limiti: "human, english". Gli articoli sono stati classificati in: Case reports (1 o 2 casi); reviews; commenti; case series (≥ 3 casi); altro (fibrosi retroperitoneale nel contesto di studi su altre malattie); non rilevanti. L'estrazione dei dati e la selezione degli articoli è stata condotta in doppio.

Risultati. La prima ricerca (MESH) ha individuato 399 articoli, la seconda ulteriori 204, a riprova della incompleta indicizzazione, suggestiva di definizioni non univoche.

Studi emersi dalla prima ricerca: 222 case reports, 26 review; 63 case series, 13 commenti, 75: altro. Seconda ricerca: 17 case reports, 56 altro e 131 non rilevanti.

Nei 63 case series il numero dei pazienti andava da 3 a 73; la maggior parte degli studi era retrospettiva; 6 riguardavano la terapia medica (2 tamoxifene, 2 soli steroidi, 1 micofenolato, e 1 sulla terapia immunosoppressiva), 4 la terapia chirurgica e 10 studi trattavano la loro associazione. Le definizioni di remissione clinica, successo e insuccesso della terapia erano differenti, anche per l'assenza di marcatori sicuri di attività della malattia. Analogamente, il follow-up differiva nei diversi studi, con ricadute sulla valutazione degli effetti a lungo termine e delle recidive. Probabilmente in relazione ad un bias di pubblicazione, i risultati erano soddisfacenti con i differenti approcci. La mancanza di nomenclatura comune rende pressoché impossibile la loro combinazione.

Conclusioni. Una definizione dell'attività della malattia e dei target terapeutici è un prerequisito per un approccio EBM alla fibrosi retroperitoneale.

NA

ESPRESSIONE GLOMERULARE SELETTIVA DELLA ISOFORMA ED-B DELLA FIBRONECTINA (FN) NELLA NEFRITE LUPICAGiuliani A¹, Stoppacciaro A², Menè P³¹ Uoc Nefrologia, Azienda Ospedaliera Sant'Andrea, Roma; ² Dipartimento di Medicina Sperimentale, "Sapienza" Università di Roma; ³ Uoc e Cattedra Nefrologia, Azienda Ospedaliera Sant'Andrea - "Sapienza" Università di Roma

La FN è una proteina della matrice extracellulare presente in diverse isoforme risultanti da eventi di splicing alternativo dell'mRNA in 3 regioni (ED-A, ED-B, IIICS). Nei tessuti dell'adulto ED-B è normalmente poco espressa, mentre ED-A è presente soprattutto in alcuni endoteli e in cellule muscolari lisce. Al contrario sia ED-A sia ED-B sono espresse ad alti livelli nei tessuti fetali e tumorali. In questo studio abbiamo indagato, con tecniche di immunostochimica, la distribuzione glomerulare delle isoforme della FN usando tre anticorpi monoclonali specifici per la FN totale (IST4), ED-A (IST9) ed ED-B (IST8). Lo studio è stato condotto su un totale di 31 campioni istologici: 7 controlli sani e 24 biopsie in soggetti con glomerulonefriti (GNF). Il gruppo delle GNF includeva 9 nefriti lupiche (LN), 3 nefropatie ad IgA (IgAN), 3 membranoproliferative (MPGN), 3 membranose (MGN), 3 glomerulosclerosi focali e segmentali (GSFS) e 3 extracapillari (RPGN). IST4 ed ED-A (IST9) avevano entrambe una distribuzione prevalente nella matrice del mesangio (71±8% del totale dei glomeruli esaminati, media±SE). IST9 mostrava inoltre una diffusa positività nel citoplasma delle cellule mesangiali. Questo tipo di distribuzione si confermava in tutti i campioni presi in esame, indipendentemente dalla diagnosi istologica. ED-B (IST8) risultava positiva soltanto nella matrice mesangiale e nelle membrane di 7 LN (68±3%) e 3 MPGN (75±6%, p<0.01 vs. IgAN, MGN, GSFS, RPGN). Il dato potrebbe dipendere dal diverso ambiente di citochine influenzante in maniera diversa lo splicing dell'mRNA della FN. Le diverse isoforme hanno infatti probabilmente un ruolo nella modulazione della risposta immune, poiché studi *in vitro* hanno dimostrato che l'adesione e la diffusione delle cellule sembrano essere maggiori in presenza dell'isoforma ED-B.

PO

RUOLO DELL'IMMUNITÀ NATURALE NELLE GLOMERULONEFRITI (GN) RAPIDAMENTE PROGRESSIVE (RP): ESPRESSIONE DELLE MOLECOLE NKG2D E MICMiglia I¹, Stoppacciaro A², Menè P³¹ Uoc Nefrologia, Azienda Ospedaliera Sant'Andrea, Roma; ² Dipartimento di Medicina Sperimentale, "Sapienza" Università di Roma; ³ Uoc e Cattedra di Nefrologia, Azienda Ospedaliera Sant'Andrea - "Sapienza" Università di Roma

NKG2D è un recettore lectinico attivante di tipo C espresso dai linfociti T NK e CD8+ $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ -TCR, che riconosce diversi tipi di ligandi, fra cui molecole MHC I non convenzionali, come MIC.

Abbiamo analizzato l'espressione di NKG2D, MIC-A e MIC-B in 6 biopsie renali di pazienti affetti da GN extracapillari RP, comparandola con 13 casi di GN mesangiale proliferativa ad IgA (GNiGA) e 6 casi di GN membranoproliferativa (GNMP), nell'ipotesi che l'attivazione di recettori "lectin-like" in linfociti T NK possa essere un evento chiave nei processi vasculitici alla base delle GNRP. L'immunoperossidasi eseguita su sezioni di corticale ha evidenziato una forte positività per NKG2D a livello dell'area interstiziale periglomerulare (23.7±7.5 cellule positive/hpf vs 1.1±0.02 cellule glomerulari, p<0.01). Fra i potenziali ligandi, MIC-B interstiziale è risultato il più espresso (10.5±3.8 cellule/hpf vs MIC-A 7.9±2.7, p<0.05). Nelle GNiGA una moderata immunoreattività per NKG2D è stata osservata a livello dell'infiltrato interstiziale (4.5±2.4 cellule/hpf), mentre nella GNMP non si è riscontrata alcuna positività. Fra i ligandi, solo MIC-B è stato riscontrato in tutte le tre forme istologiche (GNRP 10.5±3.8, IgA 2.4±0.6, GNMP 3.5±1.7 p<0.05 vs MIC-A). In nessun caso è stato documentato un evidente pattern glomerulare per NKG2D. Questa interazione fra NKG2D e MIC-B suggerisce in questi studi preliminari un ruolo dell'immunità naturale nella infiammazione interstiziale e periglomerulare nelle GNRP, con un peso minore nella GNiGA e GNMP. Lo sviluppo delle semilune appare indipendente dalla presenza intraglomerulare di cellule NKG2D/MIC-B+.

CO

COMPLEMENT (C) ACTIVATION CONTRIBUTES TO MICROVASCULAR THROMBOSIS IN SHIGA TOXIN-ASSOCIATED HUSLocatelli M¹, Morigi M¹, Galbusera M¹, Gastoldi S¹, Pagani C¹, Buelli S¹, Pezzotta A¹, Rottoli D¹, Noris M¹, Remuzzi G¹, Zoja C¹¹ Mario Negri Institute, Bergamo, Italy

Shiga toxin (Stx)-producing *E. coli* causes the epidemic form of hemolytic uremic syndrome (HUS), a disorder of thrombocytopenia, microangiopathic hemolytic anemia and acute renal failure with platelet thrombi occluding the renal microcirculation. Stx was found to induce thrombus formation on human microvascular endothelial cells (HMEC-1) through upregulation of P-selectin, a protein acting as C3b binding protein. Here, we investigated whether C played a role in platelet deposition in response to Stx *in vitro* and *in vivo* studies. Confluent HMEC-1 were incubated with Stx1 or Stx2 (50pM) before perfusion in a parallel plate flow chamber (60 dyn/cm², 3min) with 50% human serum (HS), as a source of complement. C3 deposition on Stx1-treated cells increased in respect to untreated cells (25324±8500 vs 3796±1156 pixels², p<0.01) suggesting that Stx-activated HMEC-1 could bind and activate C. In Stx1-treated cells exposed to a double-perfusion with 50%HS and whole blood, massive C3 deposits and platelet thrombi (Stx1:13837±531 vs untreated:3063±483 pixels², p<0.01) were limited by soluble C inhibitor (sCR1) addition. Stx2 shared the same effects as Stx1. P-selectin blockade on Stx-treated cells caused significant decrease in C3 and platelet deposition. A murine model of HUS induced by Stx2/LPS showed thrombocytopenia (6-48h), renal failure, focal glomerular endothelial swelling and platelet clumps in the capillary loops. Glomerular P-selectin upregulation preceded abnormal C3 deposits. Treatment with blocking P-selectin Ab reduced abnormal C3 deposits. When Stx2/LPS was injected into Bf-/- mice the reduction (43%, 24h) in platelet count was limited as compared to WT (69%) and intraglomerular platelet accumulation was prevented. Renal function was also protected in these mice. These findings indicate that Stx, by altering endothelial cell phenotype, allows complement deposition through the alternative pathway, thereby amplifying microvascular thrombotic in Stx-HUS.

PO

ADMA (ASYMMETRIC DIMETHYLARGININE) E ATEROSCLEROSI: EFFETTO SU CELLULE ENDOTELIALI IN CULTURA

Migotto C, Esposito V, Grosjean F, Maggi N, Sileno G, Torreggiani M, Esposito C, Montagna F, Dal Canton A

Nefrologia, Irccs Policlinico San Matteo, Università di Pavia, Pavia

L'ossido nitrico (NO) prodotto a partire dalla L-arginina tramite l'ossido nitrico-sintasi (NOS) endoteliale, è un potente vasodilatatore endogeno che gioca un importante ruolo nella regolazione della pressione ed in generale nelle malattie cardiovascolari. In aggiunta NO inibisce l'aggregazione piastrinica, l'adesione dei leucociti all'endotelio vasale e la proliferazione delle cellule muscolari lisce. Tutti questi effetti rendono NO un fattore anti-aterosclerotico. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) è stata identificata come inibitore endogeno di NOS. ADMA è stata associata a diversi fattori di rischio cardiovascolare dall'ipertensione al diabete. Numerose evidenze hanno dimostrato che è un marker di danno endoteliale e costituisce un fattore di rischio per malattie vascolari. Infine è stato dimostrato che un aumento di ADMA è associato allo sviluppo di rigetto acuto dopo trapianto di rene. Abbiamo quindi ipotizzato che ADMA potrebbe alterare l'endotelio inducendo una maggiore adesione di cellule infiammatorie e una alterazione della neoangiogenesi.

Lo scopo del nostro studio è stato quindi quello di valutare l'effetto di ADMA su cellule endoteliali in cultura.

Cellule endoteliali umane derivate dal cordone ombelicale (Human Umbilical Endothelial Cells - HUVECs), e linee di cellule endoteliali umane (HEC), derivate da cute di donatori sani, sono state rispettivamente coltivate in M199 medium e RPMI medium. Entrambi i tipi cellulari sono stati incubati con differenti concentrazioni di ADMA (10 μ M, 50 μ M, 100 μ M) per 24 ore a 37°C. Al termine degli esperimenti condotti in triplicato abbiamo valutato la proliferazione cellulare mediante Coulter Counter, l'espressione di VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), iNOS (isoforma inducibile di NOS), e β -actina, utilizzato come gene controllo, mediante real-time PCR. Infine la sintesi di VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule), una molecola di adesione per i monociti di primaria importanza nelle prime fasi dell'aterosclerosi, è stata valutata mediante Western Blotting. L'adesione di monociti, prelevati da donatori sani e isolati mediante gradiente di centrifugazione tipo Ficoll-Hypaque ed incubati per 2 ore con cellule endoteliali alle diverse concentrazioni di ADMA, è stata valutata mediante conta delle cellule adese.

ADMA non modificava in maniera significativa la proliferazione delle cellule endoteliali in cultura (5 x 10⁴ ± 0.2 x 10³ vs 4.7 x 10⁴ ± 0.43 x 10³ cellule, p=NS) l'espressione di VEGF e iNOS delle cellule endoteliali non era significativamente variata da ADMA,

(segue)

anche a concentrazioni elevate, rispetto a quella delle cellule non trattate. Infine ADMA non modificava la adesione di monociti alle cellule endoteliali (170 ± 25 vs 162 ± 34 cellule/cm², p=NS), né la sintesi di VEGF.

ADMA è stato indicato come marker e fattore di rischio di danno endoteliale. È stato suggerito che l'aumento della sua concentrazione plasmatica è indice di una alterazione endoteliale che favorisce il processo aterosclerotico. Tuttavia i nostri risultati dimostrano che ADMA, in assenza di altri stimoli, non è in grado di alterare le cellule endoteliali in coltura. È possibile che ADMA sia in grado di alterare il fenotipo delle cellule endoteliali solo dopo esposizione ad altri stimoli.

nale durante l'ontogenesi dei linfociti B. L'analisi delle sequenze geniche mediante IGH Gene Clonality Assay ha evidenziato la presenza di picchi monoclonali (rispettivamente 109 bp, 139 bp, 145 bp, 260 bp e 325 bp) nei linfociti infiltranti il tessuto renale del paziente, dimostrandone in modo inequivocabile l'origine a partire da un'unica cellula B. Tali picchi monoclonali si osservavano anche nei linfociti B leucemici isolati dal sangue periferico, mentre erano assenti in aree di tessuto renale sano non infiltrato dello stesso paziente come anche nell'infiltrato infiammatorio di un paziente affetto da nefrite tubulo-interstiziale.

Conclusioni. Questo è il primo studio che dimostra la monoclonalità dell'infiltrato cellulare interstiziale in corso di coinvolgimento renale da parte della LLC-B. Questo nuovo metodo può rappresentare uno strumento chiave per caratterizzare l'infiltrato cellulare renale in corso di diverse neoplasie e per instaurare terapie mirate all'eradicazione della neoplasia e, conseguentemente, al trattamento della malattia renale.

PO

COINVOLGIMENTO RENALE IN CORSO DI LEUCEMIA LINFOIDE CRONICA A CELLULE B (LLC-B): NUOVI STRUMENTI DIAGNOSTICI PER LA CARATTERIZZAZIONE DELL'INFILTRATO CELLULARE TUBULO-INTERSTIZIALE

Netti GS¹, Gigante M¹, Di Palma AM², Bruno F², Varraso L², Praticchizzo C¹, Cerullo G¹, Latino A³, Bufo P⁴, Capalbo SF⁵, Infante B², Stallone G², Ranieri E², Gesualdo L²

¹ Dip. Scienze Biomediche, Sez. Patologia Clinica, Università di Foggia, Foggia; ² Dip. Scienze Biomediche, Sez. Nefrologia, Università di Foggia, Foggia; ³ U.O. Nefrologia e Dialisi, P.O. di Manfredonia, Foggia; ⁴ U.O. Anatomia Patologica a Direzione Universitaria, A.O.U. "Oo.Rr.", Foggia; ⁵ U.O. Ematologia a Direzione Ospedaliera, A.O.U. "Oo.Rr.", Foggia

Introduzione. La Leucemia Linfocite Cronica a cellule B (LLC-B) è un disordine linfoproliferativo cronico acquisito di natura monoclonale caratterizzato dall'espressione di piccoli linfociti apparentemente maturi che si accumulano nel sangue periferico, nel midollo osseo, negli organi linfatici e più raramente in sedi extralinfatiche. Il coinvolgimento renale in corso di LLC-B è un evento estremamente raro, si manifesta con una sindrome nefrosica ed è associato generalmente a glomerulonefrite membranosa o membranoproliferativa. Ad oggi però nessuno studio ha dimostrato la monoclonalità dell'infiltrato cellulare interstiziale.

Caso Clinico. Un paziente di 79 anni affetto da LLC-B (Stadio RAI 0) è giunto alla nostra osservazione per insorgenza di sindrome nefrosica (proteinuria 7 g/die) e peggioramento della funzione renale (creatinina 2.6 mg/dl). Al momento del ricovero i livelli di emoglobina e la conta piastrinica erano nella norma, mentre non si osservavano linfadenomegalia o epatosplenomegalia. Gli esami ematochimici evidenziavano una marcata leucocitosi (WBC $24 \times 10^9/l$) con inversione della formula (neutrofili 8.8%, linfociti 80.2%), mentre l'analisi citofluorimetrica del sangue periferico mostrava una popolazione di linfociti leucemici CD5+ (95%) CD19+ (88%) CD20+ (83%) e CD23+ (67%).

Il paziente è stato sottoposto a biopsia renale e l'esame istologico ha evidenziato una glomerulonefrite membranoproliferativa tipo I con un marcato infiltrato interstiziale di elementi cellulari mononucleati con l'aspetto di linfociti. L'immunocistochemica condotta sul tessuto renale ha mostrato un infiltrato cellulare CD20+ e CD5+ (linfociti B), ma focalmente erano presenti anche cellule CD3+ (linfociti T).

Nel tentativo di dimostrarne in modo inequivocabile l'origine leucemica, i linfociti infiltranti sono stati isolati da sezioni congelate di tessuto renale del paziente mediante microdissezione laser ed il DNA estratto è stato analizzato mediante sequenziamento genico al fine di evidenziare i riarrangiamenti clonali dei geni codificanti per le catene pesanti delle immunoglobuline (Igh). Questi geni, infatti, sono riarrangiati in modo clo-

(segue)

CO

IL MIGLIORAMENTO DEL DANNO DA ISCHEMIA/RIPERFUSIONE INDOTTO DA ERITROPOIETINA NON È MEDIATO DAL RECLUTAMENTO DI CELLULE MIDOLLARI

Pertile E¹, Grosjean F¹, Castoldi F¹, Esposito C¹, Esposito V¹, Arra M¹, Serpieri N¹, Villa L¹, Mangione F¹, Maggi N¹, Migotto C¹, Dal Canton A¹

¹ Nefrologia, Irccs Policlinico San Matteo, Università di Pavia, Pavia

Il danno renale da ischemia/riperfusion (IR) è una delle principali cause di IRA in corso di trapianto di rene e di interventi di chirurgia vascolare, tuttavia i meccanismi di induzione e riparazione del danno non sono ancora chiari né è stata individuata una strategia efficace nel prevenire il danno renale. Numerosi studi hanno dimostrato che EPO può essere una valida terapia nel prevenire le alterazioni renali in diversi modelli sperimentali. Scopo del nostro studio è stato valutare l'effetto di EPO sul danno da IR nei ratti e in particolare il ruolo delle cellule del midollo osseo (BMC) nella riparazione del danno e il ruolo di EPO sul loro reclutamento. Ratti Sprague Dawley femmine di circa 300 g venivano irradiati in maniera letale e poi sottoposti a trapianto con cellule midollari (BMC) di ratti maschi in modo da poter identificare le cellule di derivazione midollare dalle cellule tessutali residenti. Dopo 4 settimane di ricostituzione veniva indotto un danno da IR clampando entrambe le arterie renali per 45 min. Gli animali nei gruppi di trattamento ricevevano un'iniezione di 5000 UI di EPO 30 minuti prima del danno. Dopo 2 o 4 settimane dal danno gli animali venivano sacrificati. Al sacrificio sono stati valutati il peso, la proteinuria e il filtrato glomerulare (VFG) mediante clearance della creatinina, campioni di tessuto renale sono stati raccolti per l'analisi istologica e molecolare. Abbiamo valutato la presenza di cellule con il cromosoma Y sia a livello del midollo osseo che a livello renale mediante ibridazione *in situ* (FISH). Abbiamo inoltre valutato l'apoptosi cellulare mediante TUNEL. VFG non è risultato significativamente differente tra ratti trattati e non 2 settimane dopo IR, tuttavia, 4 settimane dopo IR, EPO ha significativamente migliorato la funzione renale VFG (1.8 ± 0.2 vs 1.2 ± 0.14 ml/min, p<0.05, nel gruppo EPO e nel controllo rispettivamente). Abbiamo inoltre osservato che la clearance della creatinina è migliorata tra 2 e 4 settimane solo nel gruppo trattato con EPO (1.26 ± 0.3 vs 1.8 ± 0.2 ml/min). Nessuna differenza significativa tra ratti trattati e non è stata osservata in proteinuria, peso corporeo e livelli di emoglobina sia a 2 che a 4 settimane. Istologicamente abbiamo osservato solo un minimo infiltrato tubulo interstiziale, più marcato nei ratti non trattati. A livello midollare abbiamo riscontrato una totale sostituzione delle cellule del ricevente con cellule del donatore, ottenendo un numero di cellule Y positive paragonabile a quello ottenuto in un controllo maschio. L'analisi FISH eseguita su tessuto renale ha mostrato un basso livello di chimerismo, non statisticamente significativo nel confronto tra

(segue)

gruppi. L'analisi dell'apoptosi mediante TUNEL ha mostrato una riduzione dell'apoptosi tra 2 e 4 settimane dopo IR ma senza differenze tra trattati e non trattati. Il nostro studio ha quindi dimostrato che EPO migliora il GFR e il danno renale a 4 settimane dall'IR, tuttavia la riparazione non sembra avvenire ad opera di BMC o di cellule di derivazione midollare anche se non può essere escluso un loro coinvolgimento mediante l'espressione di citochine o fattori di crescita.

PO

GDNF NEL RENE ADULTO: STUDIO DI ESPRESSIONE GENICA NEL COMPARTO CORTICALE E PAPILLARE IN TESSUTO RENALE UMANO NORMALE E CON MUTAZIONE GDNF

Tiralongo E¹, Cristofaro R¹, Torregrossa R¹, Mezzabotta F¹, Del Prete D¹, Gambaro G², D'Angelo A¹, Anglani F¹

¹ Laboratorio di Istomorfologia e Biologia Molecolare del Rene, Clinica Nefrologica, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Padova; ² Divisione di Nefrologia e Dialisi, Università Cattolica, Roma

Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) è un noto fattore neurotrofico, appartenente alla superfamiglia del TGF beta. Sin dalla sua scoperta è diventato sempre più evidente il suo ruolo durante lo sviluppo, non solo del sistema parasimpatico, enterico e dei motoneuroni, ma anche e soprattutto del rene. Nello sviluppo renale GDNF è un fattore critico per la ramificazione dell'abbozzo ureterale e per la formazione del nefrone. Modelli animali eterozigoti per un allele nullo di GDNF mostrano agenesia renale e ipoplasia. Ulteriore evidenza dell'importanza di GDNF è data dalla formazione di abbozzi ureterali soprannumerari ed ectopici in presenza di mutazioni di geni che regolano nel tempo e nello spazio il livello di espressione di GDNF. Se quindi è ormai comprovato che l'alterata espressione di GDNF durante l'embriogenesi può essere causa di malformazioni renali, non è noto se GDNF possa avere una funzione nel rene adulto. In letteratura poche sono le informazioni a riguardo. Ad oggi risultano noti 3 diversi trascritti del gene GDNF (GDNF-001: [ENST00000326524](#); GDNF-002 [ENST00000381826](#); GDNF-201 ([ENST00000344622](#)), caratterizzati dalla presenza di 3 diverse terminazioni 5'-UTR, la cui espressione non è mai stata indagata a livello renale. Abbiamo dimostrato che un rene con midollare a spugna (MSK), una rara nefropatia malformativa dell'adulto, può essere associata a mutazioni di GDNF che verosimilmente durante la nefrogenesi, sono causa delle formazioni cistiche dei dotti precaliceali e della scorretta polarizzazione dei tubuli nefronici, portando così alla tipica disfunzione tubulare.

Scopo del presente lavoro è analizzare l'espressione di GDNF e delle sue isoforme in reni normali e confrontarla quindi con quella riscontrata nel rene di un paziente con MSK e con mutazione GDNF.

L'analisi dell'espressione di GDNF e dei suoi trascritti è stata eseguita mediante RT-PCR semiquantitativa a livello di corteccia (n° 4) e papilla (n° 4) di reni adulti normali ottenuti dal polo indenne di nefrectomie per tumore e di 2 campioni di papilla e 2 di corteccia ottenuti da polo indenne da nefrectomia per tumore fatta in un paziente con MSK e mutazione in eterozigosi IVS3+18G localizzata nella regione 5'UTR di GDNF.

(segue)

NA

EFFETTO DELLA LDL AFERESI SULLE CELLULE ENDOTELIALI PROGENITRICI CIRCOLANTI NELL'IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE

Ramunni A¹, Brescia P¹, Dambra P², Capuzzimati L², Ria R², Russi G³, Vacca A², Coratelli P¹
¹ Nefrologia I^A, Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Pubblica, Università di Bari, Bari; ² Medicina Interna, Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Università di Bari, Bari; ³ Centro Trasfusionale, Ospedale di S. Maria Nuova, Reggio Emilia

Introduzione. La LDL aferesi (LA) ha dimostrato di ridurre l'incidenza di eventi cardiovascolari in soggetti con ipercolesterolemia familiare (IF). Studi sperimentali suggeriscono che le cellule endoteliali progenitrici circolanti (EPC) possono riparare le lesioni vascolari causate dall'aterosclerosi. Scopo dello studio è stato verificare se la LA può incrementare la percentuale di EPC.

Metodi. In 15 pazienti con IF e in trattamento cronico con LA sono state determinate le percentuali di EPC prima e dopo la LA e confrontate con quelle di 15 controlli e 15 ipercolesterolemici trattati con statine.

Risultati. Un significativo incremento delle CD34+/KDR+ è stato riscontrato nei pazienti con IF 24 ore dopo la LA rispetto ai valori pre aferesi (0.00868±0.003 vs 0.01009±0.002%, p<0.005), mentre le percentuali di CD34+/KDR+/CD133+ sono rimaste sostanzialmente stabili. Una riduzione delle EPC è stata comunque osservata in entrambi i gruppi di pazienti rispetto ai controlli, in tutti i tempi di osservazione.

Conclusioni. La LA sembra stimolare nel breve termine la mobilitazione di CD34+/KDR+. Nei pazienti ipercolesterolemici è stata osservata una ridotta percentuale di EPC rispetto ai controlli.

Nel tessuto renale normale l'espressione di GDNF è risultata positiva in tutti i campioni analizzati senza alcuna differenza tra corticale e papillare, seppure in bassa quantità. Nel tessuto renale mutato i livelli di GDNF sono risultati significativamente più elevati sia in papilla che nella corticale. Per quanto riguarda le isoforme, GDNF-001 risulta presente in tutti i campioni analizzati. Abbiamo trovato un nuovo trascritto alternativo di questa isoforma presente in tutti i campioni, sebbene a livelli più bassi. Il trascritto GDNF-002 non è stato rilevato, mentre il trascritto GDNF-201 è risultato presente solo in un campione di papilla normale e a più bassi livelli nella papilla con mutazione GDNF.

Il nostro studio: 1) ha confermato la presenza di GDNF anche nel rene adulto; 2) ha portato all'identificazione di una nuova isoforma; 3) ha evidenziato che la mutazione causa una disregolazione dell'espressione di GDNF nel rene adulto il cui significato andrà approfondito.

PO

EFFETTO DEL SIROLIMUS SU CELLULE MESANGIALI UMANE IN CULTURA

Valentino R, Villa L, Esposito C, Grosjean F, Sileno G, Arra M, Serpieri N, Migotto C, Esposito V, Montagna F, Mangione F, Dal Canton A
Nefrologia, Irccs Policlinico San Matteo, Università di Pavia, Pavia

Abbiamo recentemente dimostrato che sirolimus è in grado di ridurre la sclerosi in un modello di nefrectomia 5/6 nel ratto. Tuttavia il trattamento con sirolimus è anche stato associato alla comparsa di proteinuria in trapiantati di rene. Poiché le cellule mesangiali (CM) hanno un ruolo centrale nella patogenesi della maggior parte delle nefropatie croniche che evolvono verso l'insufficienza renale, in questo studio abbiamo valutato l'effetto di sirolimus su cellule mesangiali umane in coltura.

Abbiamo utilizzato linee di CM umane (a passaggi precoci, non superiori al VI) coltivate in terreno di coltura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), F12 Nutrient Mixture e Fetal Calf Serum (FCS) al 20%. Le cellule sono state piantate su superfici rivestite da film di fibronectina per agevolare l'adesione cellulare. Prima di ogni esperimento le cellule sono state sincronizzate con FCS allo 0.1% per 12 ore e successivamente trattate con sirolimus (SRL) (1 ng/ml), Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), (2 ng/ml), sirolimus + PDGF, e con il dimetilsolfossido (DMSO), veicolo del sirolimus come controllo. La proliferazione è stata valutata mediante Coulter Counter. Per valutare la motilità cellulare le cellule sono state coltivate su membrane con pori di 8 µm rivestite di fibronectina e dopo 24 ore di trattamento sono state fissate con paraformaldeide (2%) permeabilizzate con Triton, colorate con ematossilina di Harris. Le cellule che attraversavano la membrana venivano contate al microscopio. Le variazioni del citoscheletro e della morfologia cellulare sono state valutate dopo il trattamento utilizzando falloidina coniugata con rodamina e un sistema di imaging. Infine abbiamo valutato dopo il trattamento l'espressione di αSMA utilizzando un anticorpo specifico coniugato con fluoresceina.

Le cellule mesangiali presentavano un significativo incremento della crescita già a 48 ore che era ridotto significativamente dal trattamento con sirolimus [$4.8 \times 10^4 \pm 0.6 \times 10^3$ vs $3.2 \times 10^4 \pm 0.3 \times 10^3$ ($p < 0.01$)]. Sirolimus riduceva, anche se in maniera non statisticamente significativa, il numero di cellule mesangiali che migravano attraverso la membrana di coltura [$3.5 \times 10^2 \pm 0.6 \times 10^2$ vs $2.9 \times 10^2 \pm 0.9 \times 10^2$ ($p < 0.06$)]. Le cellule trattate con sirolimus e con sirolimus + PDGF presentavano un incremento significativo dell'area, del diametro massimo e del perimetro ($p < 0.01$). Infine il trattamento con sirolimus incrementava in maniera significativa il numero di cellule positive per αSMA rispetto al gruppo controllo (60% vs 30%, $p < 0.05$) mentre non si osservava nessuna differenza rispetto al gruppo SIR-PDGF.

(segue)

CO

NEFROPROTEZIONE INDIPENDENTE DALL'EFFETTO ANTI-IPERTENSIVO MEDIANTE ANTAGONISMO RECETTORIALE DELL'ANGIOTENSINA IN UN MODELLO SPERIMENTALE DI GLOMERULONEFRITE MESANGIO-PROLIFERATIVA

Villa L¹, Boor P², Konieczny A¹, Kunter U¹, Van Roeyen C¹, Denecke B³, Gan L³, Eitner F¹, Scholl T¹, Ostendorf T¹, Floege J¹

¹ Division of Nephrology, University Hospital RWTH Aachen, Aachen, Germany; ² Division of Nephrology, University Hospital RWTH Aachen, Aachen, Germany; Dept. of Clinical and Experimental Pharmacotherapy, Slovak Medical University, Bratislava, Slovakia; ³ IZKF "Biomat.", University Hospital RWTH Aachen, Aachen, Germany

Introduzione ed obiettivi. La glomerulonefrite mesangioproliferativa (GNMP) è la più comune al mondo e contribuisce in modo rilevante alla malattia renale cronica terminale. Lo studio esamina l'effetto di basse ed elevate dosi di telmisartan, antagonista recettoriale dell'angiotensina, in ratti affetti da una forma progressiva di GNMP anti-Thy1.1.

Metodi. Sulla base di un simile danno istologico, proteinuria e pressione arteriosa sistolica (SBP), ratti nefritici ed uninefrectomizzati erano randomizzati il giorno 28 a rimanere non trattati (CT, n=16) od a ricevere basse (0.1 mg/kg/die, LT, n=16) od alte dosi di telmisartan (10 mg/kg/die, HT, n=16) o farmaci "convenzionali" (idroclorotiazide+idralazina 8+32 mg/kg/die, HCT+H, n=12; atenololo 100 mg/kg/die, AT, n=11). I ratti erano sacrificati il giorno 131; il tessuto renale era raccolto per le analisi (immuno)istologiche (IHC), qPCR e cDNA arrays.

Risultati. I ratti erano ipertesi; HT, HCT+H e AT riducevano ugualmente la SBP. HT preveniva la perdita di clearance della creatinina (+67%) e riduceva la proteinuria (-51%) confrontato con CT (Tabella). HT migliorava la glomerulosclerosi (-75%), il danno tubulo-interstiziale (-63%), l'accumulo di matrice extracellulare valutato tramite IHC e qPCR, così come il danno podocitario (desmin), la transizione epitelio-mesenchimale (EMT) (vimentina:-63%, E-caderina:+71%) e l'infiltrazione di cellule infiammatorie (CD68:-69%). HT inibiva l'espressione genica di Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1) così come quella genica e proteica di Platelet Derived Growth Factor receptor-α e -β (PDGFR-α e -β). Lo studio con arrays mostrava che HT inibiva (4-fold) il gene Chemokine Receptor 6 (CCR6), esito confermato con qPCR.

I risultati del nostro studio dimostrano che sirolimus ha un marcato effetto sulla proliferazione e la morfologia delle cellule mesangiali. Le alterazioni cellulari indotte da sirolimus potrebbero spiegare alcuni degli effetti che si osservano nel corso del trattamento con questo immunosoppressore ed essere di ausilio per indirizzare meglio l'uso del farmaco.

	CT	LT	HT	HCT+H	AT
Cl. Crea. (ml/min)	1.52±0.37	1.98±0.51	2.54±0.82 ^a	1.84±0.61	1.45±0.90
Proteinuria (mg/24h)	156±93	156±76	76±36 ^a	120±93	154±93
Glomerulosclerosi (%)	64±23	50±20	16±8 ^a	47±22	71±23
Danno Tubulo-interstiziale (score)	1.9±1.5	1.6±1.1	0.7±0.8 ^a	1.3±1.2	2.0±1.7
Sirio Rosso (% area +)	21±8	15±4 ^a	10±2 ^a	17±5	18±5
Coll I (% area +)	18±9	12±6 ^a	8±5 ^a	10±5 ^a	16±11
mRNA Coll 1α1 (UR)	1.54±1.52	1.53±1.63	0.61±0.49 ^a	0.95±1.41	2.06±2.39
mRNA Coll 3α1 (UR)	1.68±1.89	1.43±1.20	0.52±0.42 ^a	0.78±0.87	2.07±2.32
Desmina (score)	2.4±1.5	1.3±1.5 ^a	0.2±0.4 ^a	1.3±1.3	2.7±1.3
Vimentina (score)	3.0±1.2	2.5±0.7	1.1±1.0 ^a	1.8±1.4 ^a	2.9±1.3
E-Caderina (score)	1.4±0.8	1.7±0.7	2.4±1.1 ^a	2.0±0.7	1.4±0.8
Cellule CD68 +	29±21	13±6 ^a	9±5 ^a	21±17	27±17
mRNA TGF-β1 (UR)	1.23±0.92	1.08±0.86	0.51±0.21 ^a	0.64±0.43	1.21±1.02
mRNA PDGFR-α (UR)	2.2±0.5	1.6±0.5	1.3±0.3 ^a	1.7±0.5	2.1±0.8
mRNA PDGFR-β (UR)	2.4±0.5	2.1±0.5	1.3±0.2 ^a	1.6±0.5	2.5±0.5
PDGFR-α (score)	2.2±0.5	1.6±0.5	1.3±0.3 ^a	1.7±0.5	2.1±0.8
PDGFR-β (score)	2.4±0.5	2.1±0.5	1.3±0.2 ^a	1.6±0.5	2.5±0.5

a: $p < 0.05$ vs CT. Coll 1α1: Collagene Tipo I Catena α, UR: Unità Relative

Conclusioni. HT migliorava il decorso della GNMP anti-Thy1.1 progressiva indipendentemente dall'effetto anti-ipertensivo e, di rilevanza clinica, quando il danno renale era già florido. HT diminuiva la proteinuria migliorando il danno podocitario e la fibrosi interstiziale mediante riduzione della EMT e dell'infiammazione. Lo studio identificava PDGFR-α, -β e CCR6 come nuovi mediatori chiave dell'effetto nefroprotettivo degli antagonisti recettoriali dell'angiotensina.