

## Attività di ricerca

 Ultima redazione: 13 dicembre 2004

Versione stampabile

## Medicina in rete

Introduzione alle attività del  
dipartimentoLaboratorio Biologia  
Cellulare e XenotrapiantoLaboratorio Modelli  
Sperimentali di Malattie  
RenaliLaboratorio Immunologia e  
Genetica del Trapianto e  
Malattie Rare

Attività di ricerca

Pubblicazioni

Unità di Terapia Genica



Mappa del sito

**L' ACE-inibitore, anche se somministrato tardivamente, limita il danno renale in un modello di rigetto cronico**

Il rigetto cronico è una delle più importanti cause della perdita della funzionalità dell'organo trapiantato. Nonostante siano note le alterazioni funzionali e morfologiche associate al rigetto cronico, non se ne conoscono ancora i meccanismi patogenetici. È noto che l'inibizione del sistema renina-angiotensina (RAS) con farmaci che bloccano la sintesi o l'attività biologica dell'angiotensina in modelli sperimentali previene lo sviluppo di alterazioni croniche al rene in seguito ad un allotrapianto. Tuttavia non è stato finora valutato se questo approccio terapeutico sia efficace se iniziato quando i segni di nefropatia siano già evidenti. Nel presente studio abbiamo valutato l'effetto di un trattamento tardivo con un ACE-inibitore, il trandolapril, in un modello di trapianto allogenico di rene nel ratto. Gli animali sono stati trattati a partire da 7 fino a 13 mesi dopo il trapianto. Nonostante all'inizio del trattamento il rene trapiantato mostrasse segni di danno strutturale e una ridotta funzionalità, il trandolapril è stato in grado di riportare la funzione renale a valori basali pre-trapianto. Il trandolapril è stato anche in grado di bloccare la progressione del danno glomerulare, di ridurre l'espressione della chemochina MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) e l'infiltrazione dei linfociti T, anche se non ne ha modificato l'alloreattività contro gli antigeni del donatore. Questi risultati aprono nuove prospettive per la cura del danno renale causato dal rigetto cronico. La terapia combinata di ACE inibitori e basse dosi di immunosoppressori potrebbe costituire un efficace trattamento per arrestare la progressione del danno d'organo dovuto al rigetto cronico del trapianto allogenico.

**La deplezione di L-arginina nella preeclampsia induce la sintesi del monossido d'azoto a formare specie ossidanti**

La diminuzione della vasodilatazione indotta dal monossido d'azoto (NO) e l'eccessiva formazione di specie reattive dell'ossigeno potrebbero spiegare la scarsa perfusione placentare che si verifica nelle donne con preeclampsia, anche se il meccanismo biochimico coinvolto non è ancora noto. Con questo studio abbiamo verificato l'ipotesi che la ridotta attività dell'NO e l'aumento di stress ossidativo nella placenta di donne con preeclampsia siano legati ad una ridotta bio-disponibilità dell'aminoacido L-arginina, precursore dell'NO. Come già osservato in un nostro precedente studio, nella placenta di donne con preeclampsia sia l'attività che i livelli di espressione dell'enzima preposto alla sintesi di NO nell'endotelio (eNOS) sono risultati paragonabili ai valori presenti nelle placente di donne con gravidanza normale. Nei villi placentari, abbiamo osservato un significativo aumento sia della formazione di perossinitrito (valutato mediante esperimenti di immunoperoxidasi per nitrotirosina, marker di perossinitrito) sia di stress ossidativo (valutato mediante esperimenti di immunoperoxidasi per 4-idrossinonenale-lisina) solo nei campioni ottenuti da donne con preeclampsia. Mediante analisi con HPLC, abbiamo dimostrato che i livelli dell'aminoacido L-arginina, sia nel sangue ombelicale che nei villi placentari, sono diminuiti nelle donne con preeclampsia rispetto a quelle con gravidanza normale. Tale diminuzione non è dovuta ad un difetto del trasporto dell'aminoacido L-arginina nella placenta, poiché l'espressione genica dei suoi trasportatori CAT-1, 4F2hc e LAT-1 (valutata mediante esperimenti di real time RT-PCR) è risultata normale. Quindi abbiamo verificato se vi fosse un coinvolgimento dell'enzima arginasi II, responsabile della degradazione di L-arginina. I dati ottenuti hanno documentato che sia l'espressione genica (valutata mediante real time RT-PCR), che il contenuto proteico tissutale (valutato mediante esperimenti di immunoperoxidasi e di Western blot) della arginasi-II sono risultati significativamente più elevati nei villi delle placente di donne con preeclampsia rispetto a quelli osservati nelle placente di gravidie normali. Questi risultati forniscono una spiegazione biochimica del difetto a carico dell'attività dell'NO e del conseguente aumento di stress ossidativo nella placenta di donne con preeclampsia. È possibile che nella placenta normale un'adeguata concentrazione di L-arginina permetta all'enzima eNOS di produrre livelli di NO sufficienti ad assicurare una corretta formazione e perfusione della placenta. Al contrario, nelle donne con preeclampsia la diminuzione dei livelli di L-arginina nella placenta, dovuta ad un aumento della sua degradazione da parte dell'enzima arginasi II, indirizza la ec-NOS a formare perossinitrito, causando danno tissutale e scarsa perfusione placentare.

**Mutazioni nel Fattore H riducono l'affinità di legame alla componente C3b del complemento, all'eparina e alla superficie delle cellule endoteliali nella Sindrome Emolitica Uremica**

La Sindrome Emolitica Uremica (SEU) è una malattia caratterizzata da anemia emolitico-microangiopatica, trombocitopenia e danno renale acuto. Studi recenti hanno identificato una forma di SEU causata da mutazioni geniche nella regione C-terminale del Fattore H. Il nostro gruppo ha evidenziato l'impatto di tre mutazioni (E1172Stop, R1210C a R1215G, le ultime due identificate in tre pazienti provenienti da famiglie diverse) sulla funzione della proteina. Tutte tre le mutazioni causano un ridotto legame alla componente centrale del complemento C3b/C3d, all'eparina e alle cellule endoteliali. Questi difetti del Fattore H spiegano la progressione del danno delle cellule endoteliali del microcircolo nella SEU con componente genetica dovuta a mutazioni del Fattore H e suggeriscono un ruolo fisiologico del Fattore H nel proteggere l'integrità del tessuto durante la formazione di trombi.

**Sindrome Emolitica Uremica familiare associata a una mutazione nella proteina cofattore di membrana (MCP)**

Mutazioni nel Fattore H (HF1) sono state riportate in un numero elevato di casi di Sindrome Emolitica Uremica diarreica-negativa, non associata a verotossina (D-SEU). Tuttavia, la maggior parte dei pazienti non presenta mutazioni in HF1, nonostante ridotti livelli sierici di C3. Per questo motivo abbiamo studiato altre proteine regolatrici del complemento per verificare il loro possibile coinvolgimento nella patologia.

Abbiamo analizzato i geni codificanti per alcune di queste proteine: Fattore H related 5 (FHR-5), recettore del complemento di tipo 1 (CR1), proteina cofattore di membrana (MCP), utilizzando il metodo della PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) ed il sequenziamento diretto. L'analisi è stata eseguita in 25 pazienti affetti da D-SEU, selezionati dal nostro Registro Internazionale della SEU/PTT (Porpora Trombotica Trombocitopenica) Ricorrente e Familiare, sulla base di anomalie nel sistema del complemento e di assenza di mutazioni in HF1.

Lo studio ha evidenziato, in due pazienti con storia familiare di SEU, una mutazione nel gene codificante per MCP, una proteina di membrana che regola il complemento. La mutazione causa la sostituzione dei tre aminoacidi in posizione 233-235 e l'inserzione di un codone di stop prematuro; l'alterazione determina la perdita del dominio transmembrana della proteina con conseguente riduzione dell'espressione della stessa sulla superficie cellulare.

I risultati dei precedenti studi condotti sul Fattore H indicano un'associazione tra anomalie in questa proteina e la D-SEU. La scoperta di una mutazione nell'MCP suggerisce che un'alterata regolazione dell'attivazione del complemento potrebbe avere un ruolo nella patogenesi delle forme genetiche di D-SEU. L'MCP potrebbe quindi rappresentare il secondo gene candidato per la malattia. La proteina è infatti altamente espressa nel rene e riveste un ruolo molto importante nel regolare l'attivazione del C3 nei glomeruli. La nostra interpretazione dei risultati è che una ridotta espressione di MCP, in risposta a stimoli che attivano il complemento, determina un'anormale deposizione del complemento sulle cellule endoteliali glomerulari, causando un danno della microcircolazione e del tessuto.



Introduzione alle attività del  
dipartimento

Laboratorio Biologia

Cellulare e Xenotraspianto

Laboratorio Modelli

Sperimentali di Malattie

Renali

Laboratorio Immunologia e

Genetica del Trapianto e

Malattie Rare

Attività di ricerca

Publicazioni

Unità di Terapia Genica



Mapa del sito

### La deplezione di L-arginina nella preeclampsia induce la sintesi del monossido d'azoto a formare specie ossidanti

La diminuzione della vasodilatazione indotta dal monossido d'azoto (NO) e l'eccessiva formazione di specie reattive dell'ossigeno potrebbero spiegare la scarsa perfusione placentare che si verifica nelle donne con preeclampsia, anche se il meccanismo biochimico coinvolto non è ancora noto. Con questo studio abbiamo verificato l'ipotesi che la ridotta attività dell'NO e l'aumento di stress ossidativo nella placenta di donne con preeclampsia siano legati ad una ridotta bio-disponibilità dell'aminoacido L-arginina, precursore dell'NO. Come già osservato in un nostro precedente studio, nella placenta di donne con preeclampsia sia l'attività che i livelli di espressione dell'enzima preposto alla sintesi di NO nell'endotelio (eNOS) sono risultati paragonabili ai valori presenti nelle placente di donne con gravidanza normale. Nei villi placentari, abbiamo osservato un significativo aumento sia della formazione di perossinitrito (valutato mediante esperimenti di immunoperossidasi per nitrotirosina, marker di perossinitrito) sia di stress ossidativo (valutato mediante esperimenti di immunoperossidasi per 4-idrossinonenale-lisina) solo nei campioni ottenuti da donne con preeclampsia. Mediante analisi con HPLC, abbiamo dimostrato che i livelli dell'aminoacido L-arginina, sia nel sangue ombelicale che nei villi placentari, sono diminuiti nelle donne con preeclampsia rispetto a quelle con gravidanza normale. Tale diminuzione non è dovuta ad un difetto del trasporto dell'aminoacido L-arginina nella placenta, poiché l'espressione genica dei suoi trasportatori CAT-1, 4F2hc e LAT-1 (valutata mediante esperimenti di real time RT-PCR) è risultata normale. Quindi abbiamo verificato se vi fosse un coinvolgimento dell'enzima arginasi II, responsabile della degradazione di L-arginina. I dati ottenuti hanno documentato che sia l'espressione genica (valutata mediante real time RT-PCR), che il contenuto proteico tissutale (valutato mediante esperimenti di immunoperossidasi e di Western blot) della arginasi-II sono risultati significativamente più elevati nei villi delle placente di donne con preeclampsia rispetto a quelli osservati nelle placente di gravide normali. Questi risultati forniscono una spiegazione biochimica del difetto a carico dell'attività dell'NO e del conseguente aumento di stress ossidativo nella placenta di donne con preeclampsia. E' possibile che nella placenta normale un'adeguata concentrazione di L-arginina permetta all'enzima eNOS di produrre livelli di NO sufficienti ad assicurare una corretta formazione e perfusione della placenta. Al contrario, nelle donne con preeclampsia la diminuzione dei livelli di L-arginina nella placenta, dovuta ad un aumento della sua degradazione da parte dell'enzima arginasi II, indirizza la ec-NOS a formare perossinitrito, causando danno tissutale e scarsa perfusione placentare.