

RICERCA 2010:
BANDO SCADUTO IL 6 NOVEMBRE 2011

Vincitori dott. Bassi di Padova e prof.ssa Favari di Parma (progetti pubblicati su ICARO 63, Maggio 2011, resoconto primo anno pubblicati su ICARO 66, Maggio 2012)

Dr. Nicola Bassi
Policlinico Universitario di Padova,
Dep. di Medicina,
Div. di Reumatology,
via Giustiniani, 2
35128 Padova
nicola.bassi@unipd.it

Relazione finale

Anticorpi anti-pentrassina 3 (PTX3) nella modulazione della glomerulonefrite nel modello murino di lupus NZB/NZWFI. Trattamento della glomerulonefrite in topi NZB/NZWFI

Bassi N¹, Luisetto R², Ghirardello A¹, Gatto M¹, Zen M¹, Bettio S¹, Nalotto L¹, Mantovani A³, Shoenfeld Y⁴, Iaccarino L¹, Doria A¹.

¹ Dipartimento di Medicina DIMED, Divisione di Reumatologia, Università di Padova, Italia;

² Divisione di Chirurgia Sperimentale, Università di Padova, Italia;

³ Istituto di Ricerca Farmacologica "Mario Negri", Università di Milano, Italia;

⁴ Department of Medicine B, Center for Autoimmune Diseases, Sheba Medical Center, Tel-Hashomer, Sackler Faculty of Medicine, Tel-Aviv University, Israel.

Introduzione

La pentrassina 3 (PTX3) è stata osservata nel tessuto interstiziale renale dei pazienti con glomerulonefrite lupica. Anticorpi anti-PTX3 sono stati recentemente descritti nel lupus eritematoso sistemico (LES), dove si trovano a livelli significativamente più bassi nei pazienti con glomerulonefrite rispetto a quelli senza l'impegno renale.

Scopo

Lo scopo del progetto era valutare se gli anti-PTX3 potessero avere un ruolo protettivo e/o terapeutico nei confronti della glomerulonefrite lupica.

Materiali e metodi

Disegno sperimentale

Dieci topi NZB/NZWFI, un modello murino che sviluppa spontaneamente una glomerulonefrite simile a quella lupica dell'uomo a 5-7 mesi d'età, sono stati iniettati 3 volte con PTX3/allume (gruppo 1), 10 sono stati iniettati 3 volte con allume/PBS (gruppo 2), e altri 10 sono stati iniettati 3 volte con PBS (gruppo 3), come controllo. Tutte le iniezioni sono state effettuate intraderma sulle zampe posteriori a partire da 11 settimane di età, a 3 settimane di distanza l'una dall'altra.

Le urine sono state raccolte settimanalmente per misurare i livelli di proteinuria, al fine di monitorare nel tempo la comparsa e la progressione della glomerulonefrite, mediante i multistix reagent.

Il sangue è stato prelevato dalla vena caudale, mensilmente, prima di ogni iniezione e dopo

l'ultima iniezione, fino alla morte naturale dei topi, momento in cui sono stati prelevati da ciascuno sangue e organi. Dal siero ottenuto dal sangue si sono valutati i livelli circolanti di anti-PTX3, anti-nDNA e anti-C1q mediante tecniche ELISA home-made standardizzate. Brevemente, le piastre sono state coartate con l'antigene diluito in PBS (5µg/ml), i sieri diluiti 1:100 in 3% albumina sierica bovina (BSA) in PBS, le IgG identificate con anti-mouse IgG in 1% BSA/PBS.

I reni sono stati utilizzati per effettuare analisi istologiche in ematossilina/eosina e la tricromia di Masson per valutare il grado di danno renale.

Analisi statistica

La differenza tra le medie dei livelli circolanti di anticorpi è stata calcolata mediante ANOVA, con il metodo di Bonferroni. Il tasso di sopravvivenza e di comparsa di livelli critici di proteinuria (>300 mg/dl) sono state calcolate con la formula di Kaplan-Meier con il metodo di Mantel-Cox. Per l'analisi statistica è stato utilizzato software PASW 18.

Risultati

Livelli degli autoanticorpi circolanti

Solo il gruppo trattato con la PTX3 ha sviluppato anticorpi anti-PTX3 a partire dalla 14^a settimana d'età, cioè dopo una sola iniezione (gruppo 1 vs. gruppo 2 vs. gruppo 3: week 14: 0.828±0.14 vs. 0.056±0.07 vs. 0.108±0.07; week 17: 0.954±0.14 vs. 0.079±0.10 vs. 0.091±0.03; week 22: 0.578±0.023 vs. 0.017±0.01 vs. 0.048±0.04; week 28: 0.481±0.35 vs. 0.042±0.05 vs. 0.107±0.09, p<0.001 per tutti) (Figura 1A). Invece, gli anti-dsDNA sono stati sviluppati da tutti i topi ma a livelli significativamente più elevati nei due gruppi di controllo rispetto a quelli dei topi vaccinati con la PTX3 (gruppo 1 vs. gruppo 2 vs. gruppo 3: week 14: 0.142±0.06 vs. 0.134±0.04 vs. 0.167±0.08, p=n.s.; week 17: 0.147±0.17 vs. 0.198±0.12 vs. 0.194±0.14, p<0.0001; week 22: 0.198±0.11 vs. 0.322±0.21 vs. 0.323±0.19, p<0.0001; week 28: 0.352±0.29 vs. 0.553±0.46 vs. 0.549±0.84, p=0.024; w35: 0.389±0.34 vs. 0.600±0.58 vs. 0.598±0.49, p=0.007, rispettivamente) (Figura 1B).

Anche gli anti-C1q sono stati sviluppati da tutti i gruppi e, anche se non sempre significativamente, sono risultati più elevati nei due gruppi di controllo rispetto a quelli dei topi vaccinati con la PTX3 (gruppo 1 vs. gruppo 2 vs. gruppo 3: week 14: 0.188±0.05 vs. 0.154±0.09 vs. 0.189±0.08, p=n.s.; week 17: 0.344±0.04 vs. 0.340±0.07 vs. 0.170±0.09, p=0.028; week 22: 0.505±0.14 vs. 0.523±0.12 vs. 0.323±0.12, p=0.001; week 28: 0.629±0.09 vs. 0.650±0.14 vs. 0.654±0.11, p=n.s.; w35: 1.208±0.58 vs. 1.185±0.42 vs. 0.856±0.23, p=n.s., rispettivamente) (Figura 1C).

Proteinuria, insorgenza di livelli critici di proteinuria, tassi di sopravvivenza

I livelli di proteinuria, anche se non significativamente, sono sempre risultati minori nel gruppo 1 rispetto ai 2 gruppi di controllo (Figura 2A). Anche l'insorgenza di valori critici di proteinuria (>300 mg/dl) è risultata significativamente ritardata nel gruppo 1 rispetto ai 2 gruppi di controllo (p=0.024) (Figura 2B).

Il tasso di sopravvivenza è risultato significativamente maggiore nel gruppo 1 rispetto ai 2 gruppi di controllo (p=0.008) (Figura 2C).

Analisi istologiche

L'analisi istologica ha evidenziato che tutti i topi presentano esteso danno a livello del tessuto renale, che è minore nei topi immunizzati con la PTX3 rispetto ai topi degli altri due

gruppi (Figura 3). Infatti, i reni dei topi del gruppo 1 presentavano obliterazioni capillari e adesioni capsulari dei glomeruli, ipercellularità sia a livello glomerulare che a livello mesangiale, con ispessimento della matrice e fibrosi a livello della capsula di Bowman. Inoltre, si possono trovare infiltrati infiammatori plasmocitici e degenerazione dell'epitelio tubulare con copri ialini PAS-positivi e glomeruli scleroialini.

Invece, nei reni del gruppo 2 sono state evidenziate maggiori obliterazioni capillari a livello dei glomeruli, ipercellularità sia mesangiale che endocapillare con ispessimento della matrice e deposizione di linfoplasmociti attorno alle medie arterie. Inoltre, l'epitelio di Bowman presentava adesioni floculo-capsulari caratterizzate da ipercellularità e fibrosi, infiltrati infiammatori, degenerazione con corpi ialini PAS-positivi dell'epitelio tubulare e glomeruli sclero-ialini.

Infine, i reni dei topi del gruppo 3 presentavano estese adesioni glomerulari e capsulari, estesa ipercellularità a livello della capsula di Bowman, endocapillare e mesangiale. Inoltre si sono rinvenuti anche infiltrati linfo-monocitici con corpi di Russel e materiale ialino.

Conclusioni

Il danno renale causato dalla glomerulonefrite che ha portato alla morte è stato riscontrato in tutti i topi. Ma il trattamento con la PTX3 induce la produzione di anti-PTX3, determinando un ritardo nell'insorgenza della glomerulonefrite e un maggiore tasso di sopravvivenza. Inoltre, anche i livelli circolanti degli anticorpi anti-dsDNA e anti-C1q, che sono patogenetici, sono comparsi in ritardo e a livelli sempre più bassi nei topi vaccinati rispetto a quelli di controllo. Questi dati, quindi, vanno a confermare l'ipotesi che gli anti-PTX3 svolgano effettivamente un ruolo protettivo contro la glomerulo nefrite lupica, come abbiamo già riscontrato nell'uomo (Bassi N, et al. Ann Rheum Dis 2010;69:1704-1710).

Obiettivi futuri

Analisi istologiche in microscopia elettronica sui reni al fine di valutare la presenza di depositi di PTX3, C1q e immunocomplessi. Infine, verrà fatta una real time-PCR al fine di terminare l'espressione genica di PTX3 a livello renale.

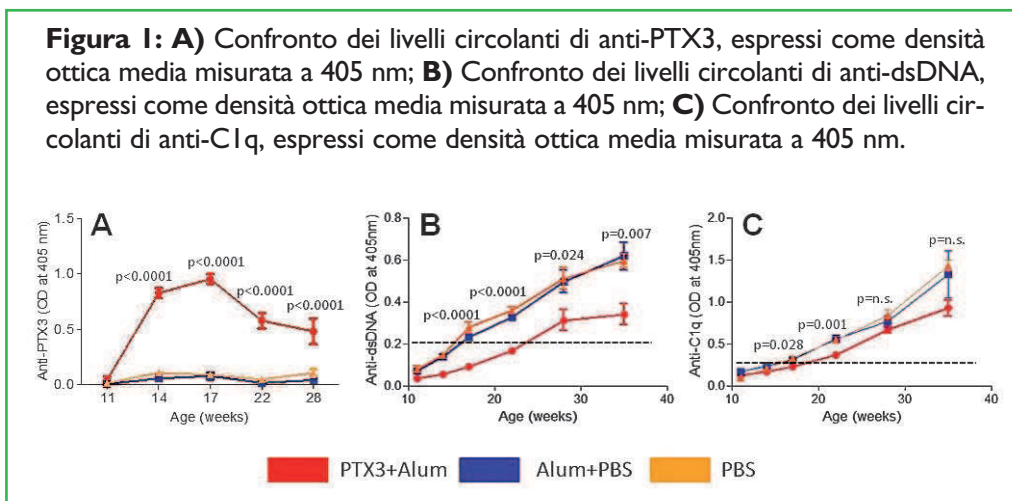


Figura 2: **A)** Confronto dei livelli medi di proteinuria, espressi in mg/dl; **B)** Curve dell'insorgenza di valori critici di proteinuria (>300 mg/dl), determinata con la formula di Kaplan-Meier; **C)** Curve del tasso di sopravvivenza, calcolato mediante la formula di Kaplan-Meier.

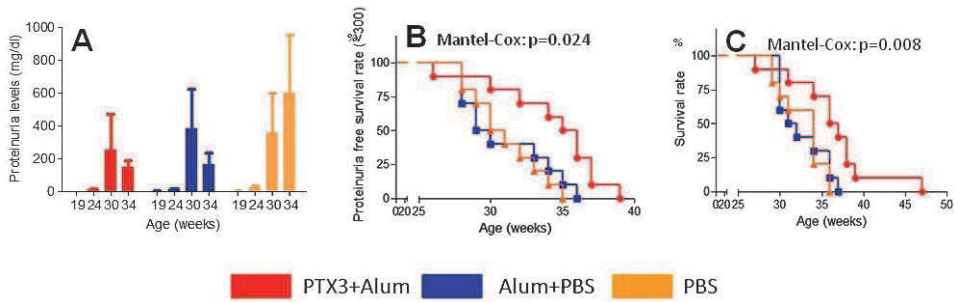
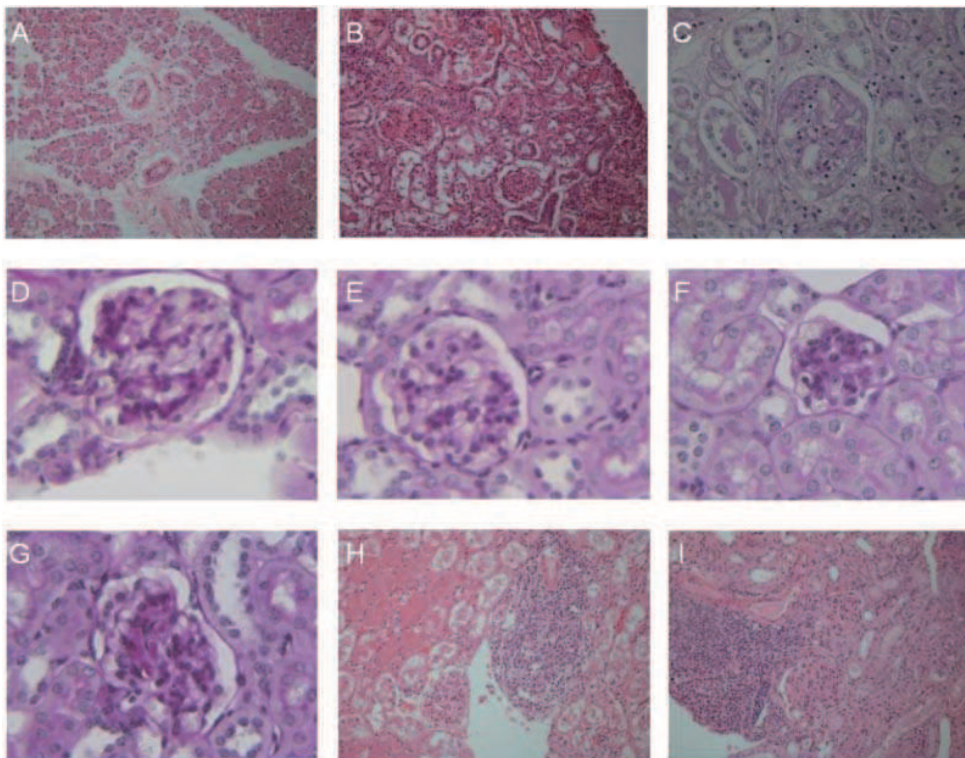


Figura 3: Confronto di sezioni renali di topi appartenenti al gruppo 1 (A, B, C); al gruppo 2 (D, E, F); al gruppo 3 (G, H, I).



**RICERCA 2010:
BANDO SCADUTO IL 6 NOVEMBRE 2011****Vincitori dott. Bassi di Padova e prof.ssa Favari di Parma (progetti pubblicati su ICARO 63, Maggio 2011, resoconto primo anno pubblicati su ICARO 66, Maggio 2012)**

Elda Favari, Ph.D.
Department of Pharmacological and Biological Sciences
and Applied Chemistries, University of Parma, Italy
Faculty of Pharmacy, Parco Area delle Scienze 27/A
43124 Parma
Tel./Fax. +39 0521 905040
elda.favari@unipr.it

Relazione finale**Lupus Eritematoso Sistemico ed aterosclerosi accelerata:
lipoproteine disfunzionali e proteina C reattiva, al crocevia
tra infiammazione e dislipidemia, come possibili markers
di rischio, mediatori di danno e targets terapeutici**

Si è concluso all'inizio di questo anno 2013 lo studio "Lupus Eritematoso Sistemico ed aterosclerosi accelerata: lipoproteine disfunzionali e proteina C reattiva, al crocevia tra infiammazione e dislipidemia, come possibili markers di rischio, mediatori di danno e targets terapeutici", che riguardava i meccanismi dell'aterosclerosi accelerata che si associa al LES e che ne rappresenta uno dei principali problemi clinici. Lo scopo del progetto di ricerca era da una parte verificare l'ipotesi che le lipoproteine HDL, comunemente note come "colesterolo buono", circolanti nei pazienti con LES siano alterate e dall'altra individuare i meccanismi molecolari alla base di tale alterazione, allo scopo di individuare nuove strategie terapeutiche.

Lo studio ha portato ad importanti risultati sulla disfunzione delle HDL nei pazienti con LES in riferimento ad una delle loro funzioni principali, cioè quella di facilitare il processo attraverso il quale il colesterolo in eccesso viene rimosso dalle arterie e veicolato al fegato per la sua eliminazione con la bile. Questo processo inizia con la fuoriuscita del colesterolo dai macrofagi (le principali cellule coinvolte nello sviluppo delle lesioni aterosclerotiche), che viene favorita appunto dalle HDL in base alle loro proprietà attraverso alcuni sistemi di trasporto. Ogni singolo siero ha dunque una certa capacità di "estrarre" il colesterolo dai macrofagi, rappresentata dalla sigla CEC (capacità di efflusso del colesterolo), che può essere misurata fornendo così una stima attendibile della funzionalità delle HDL e del grado di protezione cardiovascolare. Nei pazienti affetti da LES la CEC è ridotta in modo marcato e non correla con le concentrazioni circolanti delle HDL. Questo ha una prima conseguenza pratica poiché indica che nei pazienti con LES, a differenza della popolazione generale, la sola misurazione della concentrazione delle HDL nel sangue non è rappresentativa del grado di ateroprotezione.

Inoltre, le analisi dettagliate sui meccanismi cellulari attraverso i quali il colesterolo viene estratto dai macrofagi hanno dimostrato che nel LES vi è un disturbo funzionale delle HDL molto complesso, poiché queste lipoproteine, nonostante livelli ematici anche elevati, captano in modo ridotto il colesterolo da entrambi i trasportatori cellulari attivi chiamati ABCG1 e ABCA1. Poiché l'attivazione di tutti questi trasportatori è correlata con particolari funzioni del macrofago, che è una cellula del sistema immunitario e già attivata nel LES, il riscontro di anomalie di funzionamento delle HDL nell'interagire con tali proteine può avere interessanti implicazioni per la comprensione non solo dell'aterosclerosi accelerata, ma anche delle relazioni tra metabolismo del colesterolo e meccanismi autoimmuni nel LES. Così, come spesso accade nella ricerca scientifica, la conclusione di una fase è accompagnata dall'apertura di nuove prospettive e di nuove domande.

I dati ottenuti sono molto importanti anche sul piano pratico perché possono: i) aiutare a valutare accuratamente il rischio cardiovascolare nei pazienti con LES, ii) consentire di mettere in atto adeguate strategie preventive e iii) rappresentare la base per sviluppare terapie confezionate "su misura". Infatti, anche nella popolazione generale, l'abbassamento dei livelli ematici delle lipoproteine LDL, quelle che trasportano il "colesterolo cattivo", attraverso dieta, integratori o farmaci come le statine, pur essendo un caposaldo della prevenzione e della terapia dell'aterosclerosi e delle sue complicanze, non si è rivelata sufficiente a garantire una totale protezione. A maggior ragione questo si verifica nei pazienti con LES, che hanno un disturbo più complesso del metabolismo del colesterolo.

Il lavoro scientifico che è risultato da questo studio è stato pubblicato sulla rivista più prestigiosa tra quelle di argomento reumatologico, *Annals of the Rheumatic Diseases* (Ronda N, Favari E et al, Impaired serum cholesterol efflux capacity in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2013 Apr 5).

Dai sieri dei pazienti e dei controlli entrati nello studio sono anche state purificate le immunoglobuline, cioè gli anticorpi circolanti, allo scopo di verificare una loro interferenza diretta sul metabolismo cellulare del colesterolo. Dati preliminari indicano che gli anticorpi dei pazienti con LES potrebbero effettivamente favorire l'accumulo del colesterolo nei macrofagi. Quanto ai meccanismi che portano alla disfunzione delle lipoproteine, l'analisi della loro composizione e la ricerca della presenza nella loro complessa struttura di elementi quali la proteina C reattiva sono tuttora in corso.

Il gruppo di ricerca è estremamente grato al Gruppo Italiano per la lotta contro il LES per il finanziamento ricevuto, citato a pagina 6 dell'articolo scientifico sopraindicato, ed utilizzato per l'acquisto di materiali e reagenti per le colture cellulari, per il dosaggio e la purificazione delle lipoproteine e la misurazione della CEC. Quest'ultima in particolare, ha richiesto l'allestimento di tre linee cellulari diverse per l'analisi dell'attività dei vari trasportatori del colesterolo, l'utilizzo della tecnica di radio marcatura con isotopi radioattivi del colesterolo per la misurazione dell'efflusso cellulare. Sono stati inoltre acquistati i reagenti per la purificazione delle lipoproteine e delle immunoglobuline, e per il dosaggio del contenuto delle HDL in proteina C reattiva e altri elementi collegati all'attivazione immunologica, che sono ancora in corso.