

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA

**Dipartimento Clinico Veterinario
Sezione di Medicina Interna
Direttore: Prof. Paolo Famigli Bergamini**

**Dottorato di Ricerca in
DIAGNOSTICA COLLATERALE IN MEDICINA INTERNA
VETERINARIA
XIX ciclo - AA. AA. 2003 - 2006
VET/08 – Clinica Medica Veterinaria**

**VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' DELLE
METALLOPROTEINASI 2 E 9 NELLE URINE
E NEL TESSUTO RENALE DI CANI NORMALI
E AFFETTI DA NEFROPATIA**

Tesi di Dottorato di:

Dr. Mancini Danilo

Coordinatore Dottorato:

Chiar.mo Prof. Paolo Famigli Bergamini

Relatore:

Chiar.mo Prof. Paolo Famigli Bergamini

INDICE

INTRODUZIONE.....	3
Parte I:.....	5
PARTE GENERALE.....	5
Capitolo 1.....	6
LE METALLOPROTEINASI	6
1.1 INTRODUZIONE.....	6
1.2 COMPORTAMENTO CELLULARE DELLE METALLOPROTEINASI.....	6
1.3 LA SUPERFAMIGLIA DELLE METZINCINE.....	8
1.3.1 STRUTTURA E FUNZIONE DELLE MMPs.....	9
1.4 REGOLAZIONE DELL'ATTIVITA' DELLE MMPs.....	14
1.4.1 REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLE MMPs.....	16
1.4.2 ATTIVAZIONE DELLE METALLOPROTEINASI LATENTI.....	17
1.4.3 GLI INIBITORI ENDOGENI DELLE MMPs.....	20
1.4.4 LOCALIZZAZIONE PERICELLULARE DELL' ATTIVITA' PROTEOLITICA	21
1.4.5 CATABOLISMO E CLEARANCE.....	22
1.5 I SUBSTRATI DELLE MMPs.....	24
1.6 LE METALLOPROTEINASI REGOLANO I SEGNALI CELLULARI	25
1.7 IL RIMODELLAMENTO DELLA ECM E IL COMPORTAMENTO CELLULARE	26
Capitolo 2.....	28
IL RUOLO DELLE METALLOPROTEINASI NELLE NEFROPATIE.....	28
2.1 INTRODUZIONE.....	28
2.2 CENNI DI ANATOMIA MOLECOLARE DEL RENE	29
2.2.1 L'INTERSTIZIO E LA MATRICE EXTRACELLULARE RENALE	31
2.3 IL CONTROLLO DEL TURNOVER DELLA ECM RENALE: LE	
METALLOPROTEINASI.....	33
2.3.1 ESPRESSIONE GENICA E SUOI REGOLATORI	36
2.3.2 ATTIVAZIONE EXTRACELLULARE DELLE MMPs.....	38
2.3.3 INIBIZIONE DELLE MMPs	39
2.4 NEFROPATIE & MMPs	40
2.5 GLOMERULOPATIE	40
2.5.1 GLOMERULOPATIE NON INFIAMMATORIE	44
2.5.2 GLOMERULONEFRITI.....	47
2.5.3 CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE E MOLECOLARI NELLA PATOGENESI	
DELLE GLOMERULONEFRITI	48
2.6 PATOLOGIE TUBULO-INTERSTIZIALI.....	55
2.6.1 TUBULONEFROSI	59
2.6.2 NEFRITI TUBULOINTERSTIZIALI.....	60
2.6.3 LA SINDROME DI ALPORT	61
2.7 SIGNIFICATO CLINICO DELLA VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' DELLE MMPs	
63.....	
Capitolo 3.....	69
DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA DELLE MMP-2 E MMP-9	69
3.1 INTRODUZIONE.....	69
3.2 ANALISI CHE UTILIZZANO PEPTIDI LINEARI SINTETICI	70

3.3	ANALISI CHE UTILIZZANO PEPTIDI A TRIPLA ELICA.....	70
3.4	ANALISI CHE UTILIZZANO PROTEINE.....	71
3.4.1	ANALISI CHE UTILIZZANO PROTEINE MARCATE.....	71
3.4.2	ANALISI CHE UTILIZZANO PROTEINE NON MODIFICATE.....	72
3.5	LA ZIMOGRAFIA.....	72
3.6	ANALISI SUL TRAFFICKING DELLE MMPs.....	75
Parte II:.....		77
SPERIMENTAZIONE.....		77
4.1	SOGGETTI SELEZIONATI.....	78
4.2	CAMPIONI DI URINE.....	78
4.2.1	METODI DI RACCOLTA, PROCESSAZIONE E CONSERVAZIONE DELL'URINA 78	
4.2.2	ZIMOGRAFIA URINE.....	79
4.3	CAMPIONI DI TESSUTO RENALE.....	80
4.3.1	METODI DI PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI.....	80
4.3.2	OMOGENEIZZAZIONE DEI CAMPIONI, ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DELLE PROTEINE.....	81
4.3.3	ZIMOGRAFIA TESSUTO RENALE.....	82
4.4	ANALISI STATISTICA.....	83
Capitolo 5.....		84
RISULTATI.....		84
5.1	RISULTATI ZIMOGRAFIA.....	84
5.1.1	DESCRIZIONE PATTERN ZIMOGRAFICI DEI TESSUTI.....	86
5.1.2	DESCRIZIONE PATTERN ZIMOGRAFICI DEI CAMPIONI DI URINA.....	88
5.2	VALIDAZIONE DELLA ZIMOGRAFIA.....	89
5.2.1	PRECISIONE.....	89
5.2.2	LINEARITA'.....	91
5.2.3	CORRELAZIONI.....	93
5.2.4	DISTRIBUZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DELLE MMPs NELLA POPOLAZIONE STUDIATA.....	94
5.3	REFERTI ANATOMOPATOLOGICI DEI CAMPIONI RENALI.....	97
Figura 17 – Pattern dei tessuti renali istologicamente sani.....		105
Capitolo 6.....		106
BIBLIOGRAFIA.....		114

INTRODUZIONE

La nefrologia veterinaria è un campo che quotidianamente, nella pratica clinica, è affrontato con enorme interesse. Nel cane, la diagnosi di una nefropatia richiede il riconoscimento del complesso spettro di alterazioni semiologiche e laboratoristiche legate ad un danno renale. Una caratterizzazione precoce dell'insulto renale è quindi necessaria per un appropriato e tempestivo intervento terapeutico al fine di arrestare la lesione al rene e migliorarne la funzionalità (Cowgill, 2005).

Il presente studio è stato intrapreso al fine di validare la misurazione dell'attività delle metalloproteinasi 2 e 9 nel tessuto renale e nelle urine di cane mediante tecnica zimografica.

In condizioni fisiologiche, il bilancio tra una lenta produzione e un'altrettanto lenta degradazione della matrice extracellulare (ECM) renale assicura un'omeostasi tissutale che invece non è mantenuta in condizioni patologiche. Le metalloproteinasi, essendo le più importanti proteasi che degradano l'ECM renale, giocano un ruolo fondamentale in tale equilibrio (Lenz et al., 2000). Tra le varie metalloproteinasi, la MMP-2 (Gelatinasi A) e la MMP-9 (Gelatinasi B) sono ampiamente studiate in nefrologia per la loro capacità di degradare il collagene di tipo IV che è il principale componente delle membrane basali glomerulari (Rankin et al., 1999; Waller e Nicholson, 2001). In nefrologia è sempre maggiore l'interesse verso gli studi e le metodiche molecolari.

Nella nostra sperimentazione abbiamo standardizzato un protocollo per l'estrazione delle MMPs dal tessuto renale di cane, ed abbiamo applicato la zimografia a due matrici molto differenti tra loro, quali le urine e il rene.

Parte I:

PARTE GENERALE

Capitolo 1

LE METALLOPROTEINASI

1.1 INTRODUZIONE

In questo capitolo saranno descritti brevemente la struttura e le funzioni delle metalloproteinasi ed i vari meccanismi di regolazione della loro espressione, attivazione ed inibizione. Quindi presenteremo, in modo schematico, i substrati di questi enzimi. Infine, accenneremo al ruolo delle metalloproteinasi nel rimodellamento della matrice extracellulare e alla loro influenza sul comportamento della cellula.

1.2 COMPORTAMENTO CELLULARE DELLE METALLOPROTEINASI

La regolazione del turnover delle macromolecole che compongono la matrice extracellulare è cruciale sia per l'interazione delle singole cellule con l'ambiente circostante, sia per la fisiologia e il normale sviluppo degli organismi multicellulari (Sternlicht e Werb, 2001).

Le metalloproteinasi giocano un ruolo fondamentale nell'adeguato rimaneggiamento della matrice extracellulare (ECM), nello sviluppo embrionale, nella morfogenesi, nel riassorbimento e nel rimodellamento tissutale (Nagase e Woessner, 1999).

Le metalloproteinasi, dette pure matricine, fanno parte di una famiglia di enzimi correlati tra loro ed individuati in molte specie, dai celenterati all'uomo. Il termine anglosassone "*matrix metalloproteinase*" (MMP) definisce questi enzimi in modo molto appropriato, sottolineando la

dipendenza della loro attività da ioni metallici e la loro capacità di degradare le proteine strutturali della matrice extracellulare (Sternlicht e Werb, 2001).

Oltre ai substrati della matrice extracellulare (ECM), le metalloproteinasi (MMPs) degradano anche alcune molecole cellulari di superficie ed altre proteine pericellulari.

Gli organismi superiori esprimono più di una MMP, ciascuna col proprio profilo d'espressione, di localizzazione, d'attivazione, d'inibizione e di clearance, oltre al proprio, talvolta ampio, range di substrati. La molteplicità delle loro funzioni, distinte ma talvolta sovrapposte, salvaguarda, tuttavia, qualsiasi perdita di controllo della loro regolazione. L'espressione della maggior parte delle MMPs è infatti regolata a livello trascrizionale da vari fattori di crescita, da ormoni, citochine e da trasformazioni cellulari. La loro attività proteolitica è controllata poi dagli inibitori endogeni (α -macroglobulina) e dagli inibitori tissutali delle metalloproteinasi (*Tissue Inhibitors Metalloproteinases* - TIMPs) (Nagase e Woessner, 1999; Sternlicht e Werb, 2001).

Le MMPs subiscono un processo di *up-regulation* in patologie maligne, la cui caratteristica più importante è la capacità delle cellule di attraversare i limiti tissutali e, in caso di neoplasie, metastatizzare in diverse parti dell'organismo. Di conseguenza, gli enzimi che degradano la ECM sono indispensabili per la distruzione delle barriere preposte contro l'invasività (Sternlicht e Werb, 2001).

La proteolisi di proteine della matrice può contribuire alla migrazione cellulare in diversi modi:

1. può semplicemente aprire una strada attraverso la matrice;
2. può esporre siti criptici sulle proteine tagliate che promuovono l'attacco della cellula, o entrambe le cose;

3. può promuovere il distacco della cellula, così che essa può muoversi in avanti;
4. può rilasciare proteine-segnale extracellulari che stimolano la migrazione cellulare (Alberts et al., 2004).

1.3 LA SUPERFAMIGLIA DELLE METZINCINE

Gli enzimi proteolitici vengono classificati in esopeptidasi ed endopeptidasi in base all'attività di clivaggio dei legami peptidici rispettivamente terminali o interni.

La maggior parte delle endopeptidasi sono classificate in serina proteasi, cisteina proteasi, aspartico-proteasi e metalloproteasi in base al loro meccanismo catalitico e alla loro sensibilità agli inibitori.

Le metalloproteasi sono ulteriormente suddivise in cinque superfamiglie, e tra queste, la superfamiglia delle metzincine comprende a sua volta quattro famiglie:

- *Serralisine*;
- *Astacine*;
- *ADAMs/Adamalisine*;
- *Metalloproteasi*.

La superfamiglia delle metzincine è caratterizzata da un motivo contenente tre istidine che legano un atomo di Zinco al sito catalitico, e dal *Met Turn*: un giro (*turn*) di metionina che si trova sotto il sito attivo dello Zinco (Sternlicht e Werb, 2001). Il *Met Turn* è una caratteristica strutturale delle metzincine. Esso contiene un residuo di metionina che conferisce un ambiente idrofobico per lo ione Zinco e per i tre residui d'istidina dei centri catalitici. Inoltre contiene un residuo di tirosina che è importante per la catalisi (Bode et al., 1993).

La sigla del motivo che lega lo Zinco é **H****E****B****X****H****X****B****G****B****X****H****Z**, in cui i residui d'istidina (**H**), di acido glutammico (**E**) e di glicina (**G**) restano invariati; **B** è un voluminoso residuo idrofobico, **X** un residuo variabile e **Z** un aminoacido famiglia-specifico: per quasi tutte le metalloproteinasi è la **serina** (Sternlicht e Werb, 2001).

Le Serralisine, che hanno una prolina in posizione Z, sono enzimi batterici che spesso giocano un ruolo importante nella virulenza e nella patogenicità dei microrganismi.

Le Astacine hanno un acido glutammico in posizione Z ed includono: la proteina-1 osteo-morfogenica (BMP-1), che è la C-proteinasi del procollagene, che rimuove i pro-peptidi C-terminali del procollagene fibrillare;

Per le Adamalisine, l'aminoacido che si trova in posizione Z è invece l'acido aspartico. Sono enzimi solubili di veleni di serpente ad azione molto aggressiva nel degradare la ECM. Le ADAMs sono proteine transmembranal di superficie che hanno *a disintegrin and metalloproteinase domain* (Sternlicht e Werb, 2001).

1.3.1 STRUTTURA E FUNZIONE DELLE MMPs

Attualmente sono state individuate 25 MMPs dei vertebrati e 22 omologhe umane, oltre a diverse MMPs di invertebrati (Remacle et al., 2005).

Sebbene ogni metalloproteinasi abbia una specificità di substrato distinta, talvolta sovrapposta ad altre MMPs, virtualmente tutte le proteine della matrice extracellulare potrebbero essere degradate dall'insieme delle MMPs (Tabella 2) . Si fa riferimento alle varie MMPs o con i loro nomi usuali oppure secondo una nomenclatura numerico-sequenziale riservata alle MMPs dei vertebrati (Tabella 1) (Sternlicht e Werb, 2001).

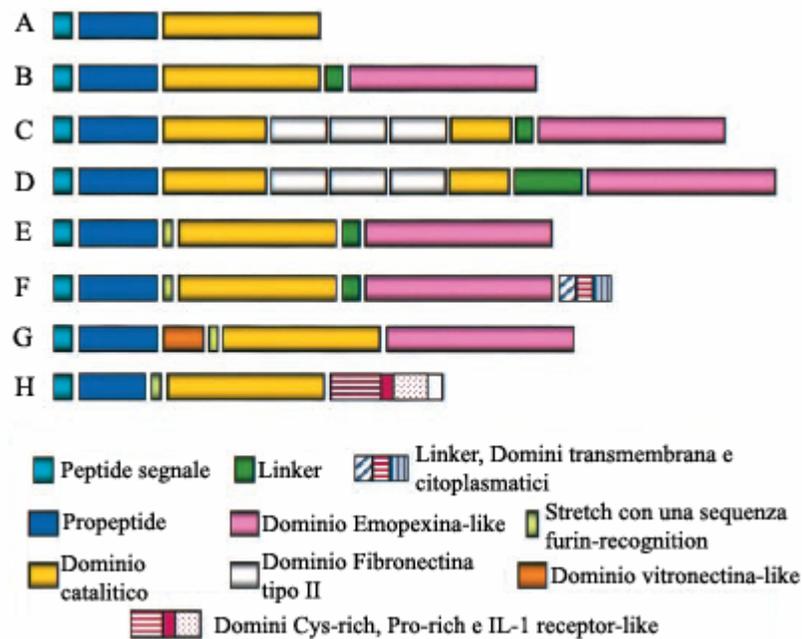
Tabella 1 – Le MMPs dei vertebrati

MMP	Nome	Struttura dominio
MMP1	Collagenasi-1	B
MMP2	Gelatinasi-A	C
		
MMP3	Stromolisina-1	B
MMP7	Matrilisina	A
MMP8	Collagenasi-2	B
MMP9	Gelatinasi-B	C
		
MMP10	Stromolisina-2	B
MMP11	Stromolisina-3	D
MMP12	Macrofago-metalloelastasi	B
MMP13	Collagenasi-3	B
MMP14	MT1-MMP	E
MMP15	MT2-MMP	E
MMP16	MT3-MMP	E
MMP17	MT4-MMP	F
MMP18	Collagenasi-4 (<i>Xenopus</i>)	B
MMP19	RASI-1	B
MMP20	Enamelisina o Smaltolisina?	B
MMP21	XMMP (<i>Xenopus</i>)	G
MMP22	CMMP (Chicken)	B
MMP23		H
MMP24	MT5-MMP	E
MMP25	MT6-MMP	F
MMP26	Endometasi, Matrilisina-2	A
MMP27		B
MMP28	Epilisina	D

(Sternlicht e Werb, 2001 modificato)

Inoltre esse sono spesso raggruppate in base alla loro struttura modulare di dominio (figura 1).

Figura 1 - Arrangiamenti dei domini delle MMPs dei vertebrati



(Nagase e Woessner, 1999 modificato)

Tutte le MMPs hanno una sequenza segnale N-terminale (“pre” *domain* ) che viene rimossa dopo che essa dirige la sintesi delle MMPs al reticolo endoplasmatico. Il dominio “pre” è seguito da un dominio propeptidico “pro” , che mantiene la latenza dell’enzima finché non viene rimosso o distrutto. A questo segue un dominio catalitico  che contiene la regione che lega lo Zinco (Sternlicht e Werb, 2001).

Il dominio catalitico delle metalloproteinasi ha inoltre due o tre ioni Calcio che sono importanti per la stabilità e l’attività enzimatica (Nagase

e Woessner, 1999). Ad eccezione della MMP-7 (matrilisina), della MMP-26 (endometasi/matrilisina-2) e della MMP-23, tutte le MMPs hanno un dominio emopexina/vitronectina like  che è connesso al dominio catalitico tramite una regione perno (*hinge*) o di legame (*linker*) . La MMP-7 e la MMP-26 mancano semplicemente di questi domini extra, mentre la MMP-23 ha un unico dominio *cystein-rich*, domini *proline-rich* e *IL-1 type II receptor-like*  al posto del dominio emopexina. Quand'è presente, il dominio emopexina  influenza il legame col TIMP, il legame con alcuni substrati, l'attivazione di membrana ed alcune attività proteolitiche. La regione perno ("*hinge*")  può variare in lunghezza e composizione a seconda dei casi, e influenza la specificità del substrato (Sternlicht e Werb, 2001).

Le Gelatinasi A e B (rispettivamente MMP-2 e MMP-9) sono caratterizzate dall'inserzione di tre ripetizioni *cysteine-rich* testa-coda all'interno del loro dominio catalitico . Queste inserzioni assomigliano alle ripetizioni di fibronectina di tipo II e sono necessarie per legare e scindere il collagene e l'elastina (Sternlicht e Werb, 2001).

La MMP-9, a livello della fine di questa regione perno, ha un'unica inserzione *collagen-like* tipo IV d'importanza non ancora conosciuta.

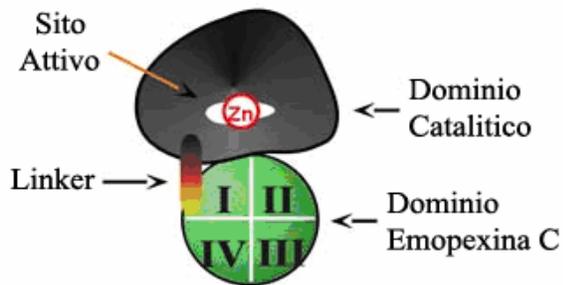
Infine le MT-MMPs (*Membrane Type Metalloproteinases*) hanno un dominio transmembrana e una corta estremità citoplasmatica C-terminale (MMPs 14, 15, 16 e 24), oppure una regione *linkage* di glicosilfosfatidilinositolo -GPI- (MMP-17 e MMP-25) , che imbrigliano queste proteasi alla superficie della membrana cellulare (figura 2c) (Sternlicht e Werb, 2001).

La MT1-MMP può essere inibita dagli inibitori delle MMPs -2, -3, -4 ma non dal TIMP-1 (Zucker et al., 2004; Remacle et al., 2005).

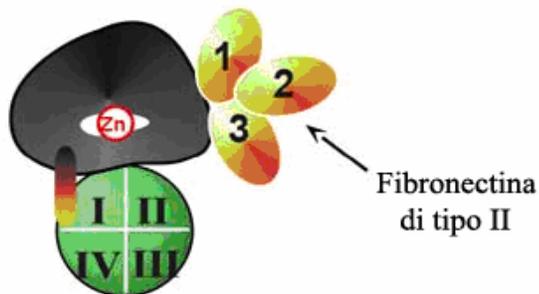
La figura 2 illustra le caratteristiche strutturali delle metalloproteinasi.

Figura 2 Caratteristiche strutturali delle metalloproteinasi

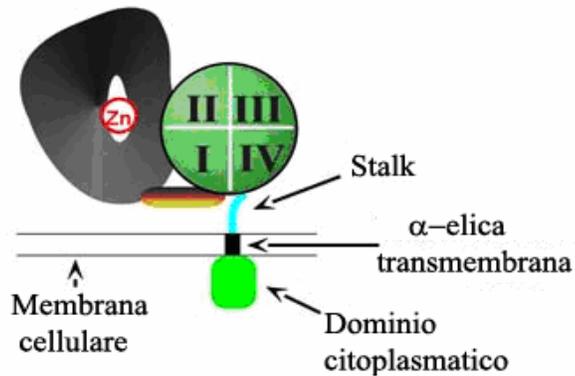
a) Struttura Archetipica della MMP



b) Gelatinasi



c) MT-MMPs



Spiegazione nel testo

(www.clip.ubc.ca Overall Lab, 2002 modificato.)

La struttura originaria della MMP (fig. 2 a) è rappresentata da un dominio catalitico (grigio), da un sito attivo a fessura (bianco), e da uno ione Zn^{2+} catalitico. A connettere il dominio Emopexina C al dominio catalitico vi è un peptide perno (*hinge*), o di legame (*linker*). La presenza di una buona densità di elettroni per il *linker* indica che questo assume una struttura stabile. Il dominio Emopexina C è costituito da 4 moduli (I-IV), ognuno dei quali rappresenta una lamina della struttura β -elica.

Nelle Gelatinasi (fig. 2 b), vi sono 3 moduli di fibronectina di tipo II (1-2-3) intercalati nel dominio catalitico prossimale al sito attivo.

A differenza delle MMPs secrete, le metalloproteinasi *membrane type* (MT-MMPs) (fig. 2 c) sono ancorate alla membrana cellulare da una catena peptidica che forma un “peduncolo” (*stalk*), e da una piccola coda citoplasmatica. Le MT-MMPs hanno un orientamento orizzontale, stirato. Questo perché il legame disolfuro del dominio Emopexina C caratterizza sia la porzione terminale del *linker*, sia l’origine dello *stalk*.

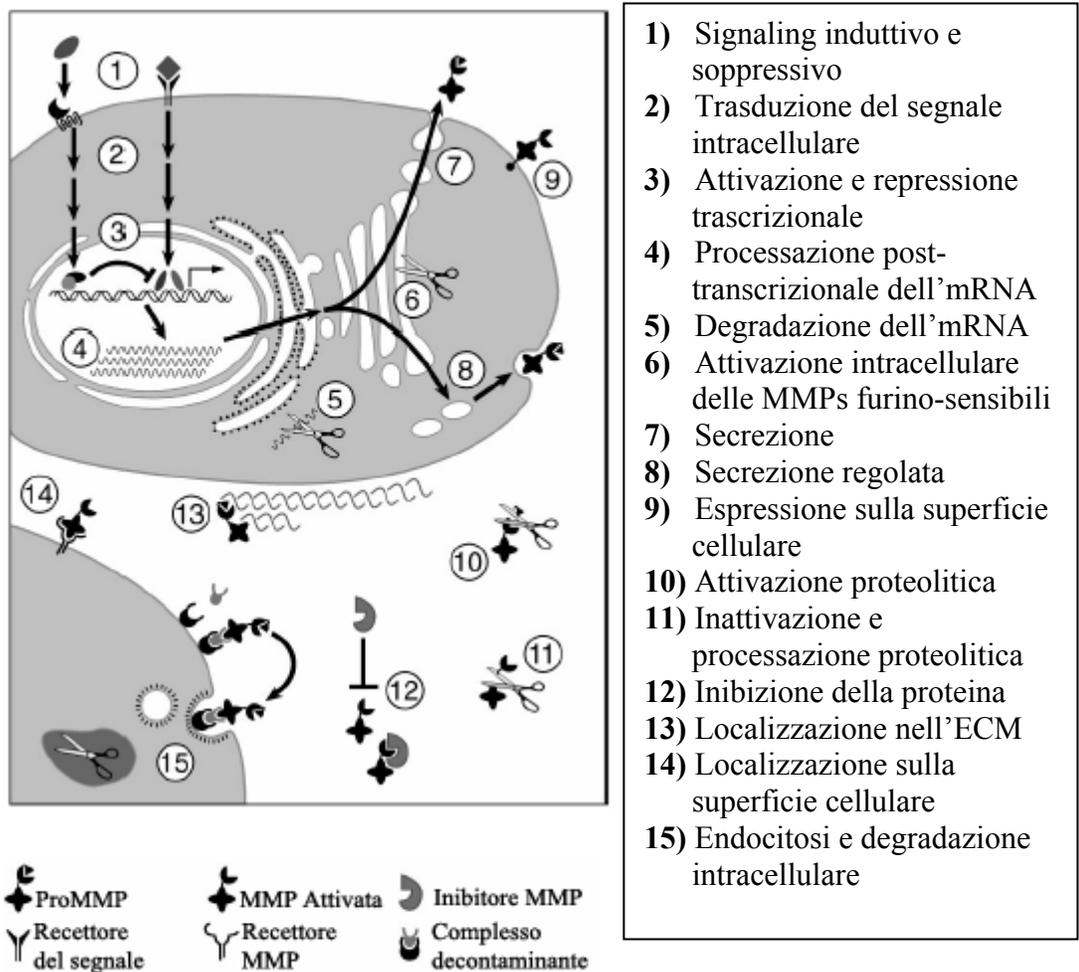
Le MT-MMPs 4 e 6 sono associate alla membrana tramite un’ancora di glicosilfosfatidilinositolo (GPI) e quindi non hanno un peptide transmembrana ed una coda citoplasmatica (www.clip.ubc.ca Overall Lab., 2002)

1.4 REGOLAZIONE DELL’ATTIVITA’ DELLE MMPs

Per svolgere correttamente le proprie funzioni fisiologiche (o patologiche), le metalloproteinasi devono essere presenti nel giusto tipo di cellula, nella corretta localizzazione pericellulare, al momento giusto, nella corretta quantità e devono essere attivate o inibite appropriatamente. Così le MMPs sono strettamente controllate a livello trascrizionale, post-trascrizionale e a livello proteico, attraverso i loro attivatori, i loro

inibitori e attraverso la loro localizzazione sulla superficie cellulare (figura 3) (Sternlicht e Werb, 2001).

Figura 3 – Regolazione delle metalloproteinasi



(Sternlicht et Werb, 2001 modificato)

1.4.1 REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLE MMPs

Dal momento che le specificità di substrato tendono a sovrapporsi, la funzione biologica delle singole MMPs è ampiamente dettata dai loro pattern differenziali d'espressione. Spesso il ruolo caratteristico di una MMP viene infatti indicato dalle differenze temporali, spaziali e di inducibilità. La maggior parte delle metalloproteinasi è strettamente regolata a livello di trascrizione, con la rilevante eccezione della MMP-2 che è controllata ed espressa essenzialmente attraverso un unico meccanismo di attivazione enzimatica e da alcuni gradi di stabilizzazione post-trascrizionali dell'mRNA (Sternlicht e Werb, 2001).

L'espressione genica è regolata da numerosi fattori, stimolatori o soppressori. Ad esempio l'espressione delle varie MMPs può subire un *up-* o una *down-regulation* dagli esteri del forbolo, da proteine della matrice extracellulare, da stress cellulari e da variazioni di forma della cellula. L'espressione inoltre è regolata da diverse citochine e fattori di crescita, tra cui le interleuchine (IL), gli interferoni, l'EGF (*Epithelial Growth Factor*), il VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), il PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), il TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*), il TNF- β (*Tumor Necrosis Factor- β*) e l'EMMPRIN (*Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer*). Il TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) può limitare l'espressione delle MMPs (McLennan et al., 2000; Sternlicht e Werb, 2001).

Anche le interazioni cellula-matrice e cellula-cellula sono fondamentali per l'espressione genica delle matricine (Nagase e Woessner, 1999).

I livelli basali dell'espressione delle MMPs possono essere anche influenzati da variazioni genetiche che a loro volta possono influenzare lo sviluppo e il decorso di diverse malattie (Sternlicht e Werb, 2001).

A livello post-trascrizionale le MMPs possono essere regolate da vari meccanismi. Per esempio, le copie di mRNA che codificano per le MMPs 1 e 3 sono stabilizzate dall'EGF, mentre le copie della MMP-13 sono stabilizzate dal PDGF e dai glicocorticoidi e destabilizzate dal TGF- β . Le matricine vengono controllate anche a livello secretorio. Ad esempio, la MMP-8 (collagenasi-2) e la MMP-9 (Gelatinasi B) sono sintetizzate dai granulociti a livello di midollo osseo, vengono immagazzinate negli specifici granuli dei neutrofili circolanti, e quindi rilasciate dopo l'attivazione dei neutrofili da parte dei mediatori dell'infiammazione (Sternlicht e Werb, 2001).

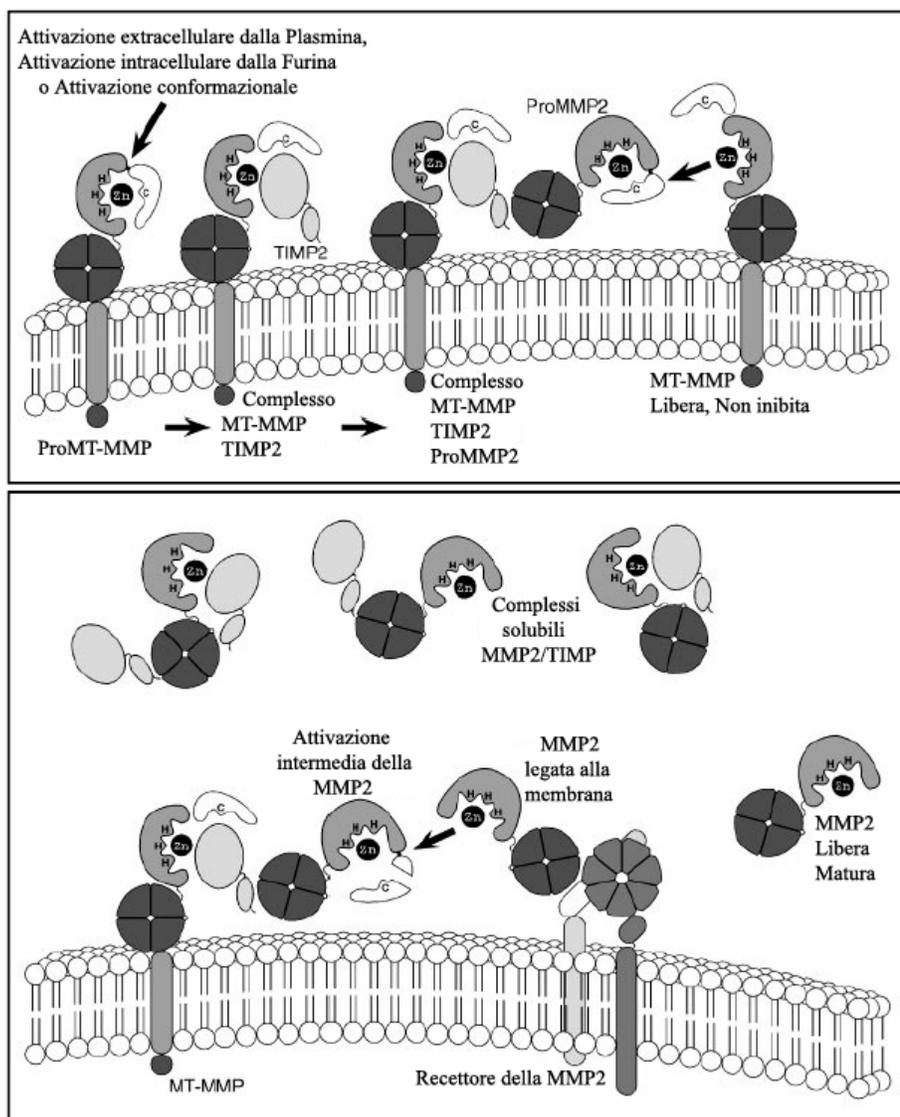
1.4.2 ATTIVAZIONE DELLE METALLOPROTEINASI LATENTI

Come altri enzimi proteolitici, le MMPs vengono dapprima sintetizzate come zimogeni inattivi (Nagase e Woessner, 1999). Le pro-metalloproteinasie secrete vengono attivate *in vitro* tramite proteinasie o agenti non-proteolitici come: denaturanti, composti mercuriali (*p*-aminofenilmercurio acetato -APMA-), etc. *In vivo* molte pro-matricine sono attivate da proteinasie tissutali o plasmatiche, oppure da proteinasie batteriche. Anche il sistema uPA/plasmina è molto importante nella fisiopatologia dell'attivazione delle pro-MMPs. In ogni caso, l'attivazione necessita della rottura delle interazioni tra Cys-Zn²⁺ (*cystein switch*) (Nagase e Woessner, 1999).

La latenza delle MMPs viene mantenuta da un gruppo sulfidrilico di cisteina vicino l'estremità C-terminale del dominio propeptidico (■). Il gruppo sulfidrilico agisce come un quarto ligando per lo ione Zinco del sito attivo, e l'attivazione richiede che lo *switch* cisteina-zinco venga aperto dalla rimozione proteolitica del dominio del propeptide ("pro" ■). Una

volta rimosso, il gruppo tiolo viene rimpiazzato da una molecola d'acqua che poi può attaccare i legami peptidici dei target delle MMPs (Sternlicht e Werb, 2001).

Figura 4 - Attivazione della MMP2 sulla superficie cellulare.



Spiegazione nel testo.

(Sternlicht et Werb, 2001 modificato)

L'attivazione extracellulare della maggior parte delle MMPs può essere iniziata da altre MMPs già attivate oppure da svariate serina proteasi che possono scindere i legami peptidici dentro i prodomini MMP. Tuttavia l'attivazione della ProMMP-2 avviene soprattutto a livello di superficie cellulare (figura 4). Questa attivazione richiede la MT1-MMP attiva e il TIMP-2 legato ad una MT1-MMP (Nagase e Woessner, 1999; Sternlicht e Werb, 2001). Per comprendere la complessa attivazione della Gelatinasi A (MMP-2), illustrata in figura 4, dobbiamo innanzitutto prendere in considerazione una ProMT-MMP nel comparto intracellulare. Questo proenzima è attivato, durante il trasporto verso la superficie della cellula o direttamente sulla membrana cellulare, da variazioni conformazionali non proteolitiche o da molecole quali le serina proteasi furina-like (a livello intracellulare) o la plasmina (a livello di superficie). Una volta attivata, la MT-MMP si lega al dominio N-terminale di una molecola TIMP-2 e viene così inibita nuovamente. Il ruolo dominante del TIMP-2 *in vivo* è appunto l'attivazione della ProMMP-2 (Wang et al., 2000; Sternlicht e Werb, 2001).

Il dominio C-terminale del TIMP-2 funge invece da recettore per il dominio emopexina di una ProMMP-2. Si viene così a costituire un complesso trimolecolare (MT-MMP inibita + TIMP-2 + ProMMP-2). Poi, una MT-MMP, libera e attiva, rimuove gran parte del propeptide della ProMMP-2 attivandola parzialmente. La porzione restante del propeptide sarà rimossa da un'altra MMP-2 a livello di superficie cellulare, per produrre una Gelatinasi A completamente attiva e matura. L'MMP2 matura potrà essere poi rilasciata dalla superficie cellulare, o essere bloccata da un'altra MMP2-*docking* di superficie. Potrà anche essere inibita da un'altra molecola TIMP o lasciata in uno stato attivo che dipenderà dal locale rapporto molare MMP:TIMP (Sternlicht e Werb, 2001).

1.4.3 GLI INIBITORI ENDOGENI DELLE MMPs

I TIMPs (tissue inhibitors metalloproteinase) sono i più importanti regolatori endogeni delle metalloproteinasi (Nagase e Woessner, 1999). Essi rappresentano una famiglia di almeno quattro proteine di 20-29 kDa (TIMPs -1, -2, -3 e -4) che inibiscono reversibilmente le MMPs in un rapporto stechiometrico di 1:1. Le porzioni del dominio N-terminale del TIMP sono quelle che interagiscono col sito catalitico della MMP. Sebbene l'attività inibitoria dei TIMPs risieda quasi interamente solo nel dominio N-terminale, entrambi i domini influenzano il legame enzima-inibitore. Come abbiamo visto precedentemente, la funzione dominante del TIMP-2 *in vivo* è il suo ruolo nell'attivazione della MMP2. Tuttavia, mentre il dominio C-terminale del TIMP-2 partecipa all'aggancio sulla superficie della cellula e all'attivazione della MMP2, il suo dominio N-terminale è un inibitore della metalloproteinasi. Mentre livelli medio-bassi di TIMP-2 promuovono l'attivazione della MMP-2, livelli maggiormente elevati ne inibiscono l'attivazione, per via della saturazione delle MT-MMPs libere necessarie a rimuovere il prodominio della MMP-2 stessa (Sternlicht e Werb, 2001).

I vari TIMPs differiscono tra loro per la capacità di inibire le diverse MMPs. Per esempio TIMP-2 e TIMP-3 inibiscono la MT1-MMP, mentre il TIMP-3 risulta essere un più potente inibitore della MMP-9 rispetto agli altri TIMPs (Sternlicht e Werb, 2001).

I TIMPs esercitano inoltre un'attività di promozione della crescita cellulare indipendentemente dalle loro proprietà inibitorie. Il TIMP-1, infatti, è stato per la prima volta clonato come EPA, cioè come promotore dell'attività eritroide. Successivamente si è dimostrato che i TIMPs 1, 2 e 3 agiscono come mitogeni in diversi tipi di cellule (Sternlicht e Werb, 2001).

I TIMPs, tuttavia, possono promuovere anche l'apoptosi o sopprimere i segnali mitogeni. Questo è vero per i TIMPs ma non per gli inibitori sintetici delle MMPs. Inoltre, il TIMP-2 può sopprimere i fattori della crescita e la sua capacità di bloccare il signaling mitogeno è indipendente dalla sua attività MMP-inibitoria (Sternlicht e Werb, 2001).

I TIMPs agiscono localmente a livello tissutale ma non sono gli unici inibitori endogeni delle MMPs. **L' α 2-macroglobulina**, essendo abbondantemente presente nel plasma, è il più importante inibitore endogeno circolante delle MMPs. Inoltre, poiché i complessi α 2-macroglobulina/MMPs vengono rimossi tramite un'endocitosi "decontaminante", l' α 2-macroglobulina svolge un ruolo importante nella clearance irreversibile delle matricine. Al contrario, i TIMPs inibiscono le MMPs in modo reversibile (Nagase e Woessner, 1999; Sternlicht e Werb, 2001).

1.4.4 LOCALIZZAZIONE PERICELLULARE DELL' ATTIVITA' PROTEOLITICA

Molti eventi che regolano il comportamento della cellula avvengono a livello o in prossimità della membrana cellulare, e molti segnali cellulari vengono creati o cancellati attraverso la proteolisi pericellulare. Ci sono specifici meccanismi che confinano le proteinasi nell'immediato microambiente pericellulare, concentrando le MMPs in vicinanza dei loro target e limitando l'estensione della proteolisi a regioni pericellulari ben determinate. Questi meccanismi per localizzare le MMPs sulla superficie cellulare includono:

- l'espressione delle MT-MMPs legate alla membrana;
- il legame delle MMPs ai recettori sulla superficie della cellula;

- la presenza di recettori di superficie per enzimi come l'uPA, il plasminogeno, la trombina e l'elastasi che attivano le MMPs;
- la concentrazione delle MMPs tra le molecole dell'ECM (Sternlicht e Werb, 2001).

Le MT-MMPs transmembrana e quelle legate al GPI sono gli esempi più evidenti della localizzazione sulla superficie cellulare dell'attività enzimatica. Un altro esempio è rappresentato dai recettori di superficie "docking". Le MMPs possono essere legate alla superficie cellulare anche dai loro substrati. Per esempio la ProMMP-9 lega le catene $\alpha 2$ del collagene di tipo IV sulla superficie di diversi tipi di cellule, concentrando così il proprio target sull'interfaccia cellula-ECM, in attesa di un'eventuale attivazione (Sternlicht e Werb, 2001).

1.4.5 CATABOLISMO E CLEARANCE

L'ultimo step nel processo di regolazione dell'attività delle matricine è rappresentato dall'inattivazione proteolitica e dalla clearance fisica delle stesse MMPs.

Si conosce ancora poco dell'autoproteolisi delle MMPs attive. Alcuni clivaggi inattivano completamente le MMPs, mentre altri, come quelli che rimuovono specificatamente il dominio emopexina, possono generare nuovi enzimi che acquistano nuove capacità di degradare nuovi substrati. La rimozione del dominio emopexina fa perdere pure ad alcune MMPs la capacità di localizzazione sulla superficie cellulare.

Un'altra via di regolazione è attraverso la clearance diretta degli enzimi ancora inattivi. Anche la trombospondina 2 (TS-2) è implicata nella clearance delle MMPs. I topi *TS2-deficient* mostrano delle importanti anomalie del connettivo e i loro fibroblasti mostrano difetti di adesione, risultato degli elevati livelli di MMP-2 (Sternlicht e Werb, 2001).

Tabella 2. Comuni substrati delle MMPs

MMP	1	2	3	7	8	9	10	11	12	13	14	16	18	19	26
Proteine dell'ECM:															
Aggrecano	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+				
Collagene I	+	+	-	+	+	-			+	+	+		+	+	-
Collagene II	+				+	-				+	+				-
Collagene III	+	+	+	-	+	-	+			+	+	+			
Collagene IV	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-				+	+
Collagene V	-	+	+	-	-	+	+			-					
Collagene VII	+	+	+												
Collagene VIII	+														
Collagene X	+	+	+	-						+					
Collagene XI	+	+	+			+				-					
Collagene XIV	-		-	-		+				+					
Decorina	-	+	+	+		+									
Elastina	-	+	+	+		+	+		+						-
Fibrillina		+	+			+			+	+	+				
Fibronectina	+	+	+	+	-	-	+		+	+	+	+		+	+
Fibuline	+	+		+											
Gelatina I	+	+	+	+		+	+		+	+	+			+	+
Laminina	+	+	+	+		+		-	+		+				-
Mielina Basica	+	+	+	+		+			+						
Osteonectina		+	+	+		+				+					
Tenascina	+	+	+	+		-								+	
Vitronectina	+	+	+	+		+			+		+				
Altre proteine:															
α 1-AC	+	+	+			-									
α 2-M	+	-	+		+	+		+	+	+	+				
α 1-PI	+	+	+	+	+	+		+	+		+				+
Caseina	+	-	+	+		+	+	-		+				+	-
C1q	+	+	+		+	+				+					
E-caderina			+	+											
Fattore XII					-				+	+	+				
Fibrina	+	+	+			+					+				
Fibrinogeno	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+				+
IL1 α	-	-	-			-									
IL1 β	+	+	+			+									
ProTGF β		+				+									
ProTNF α	+	+	+	+		+			+		+				
Plasminogeno		+	+	+		+			+						-
Sostanza P		+	+		+	+									

Abbreviazioni: α 1-AC: α 1-antichimotripsina; α 2-M: α 2-macroglobulina; α 1-PI: α 1-inibitore delle proteinasi. In verde i substrati delle MMPs 2 e 9.

(Sternlicht et Werb, 2001 modificato)

1.5 I SUBSTRATI DELLE MMPs

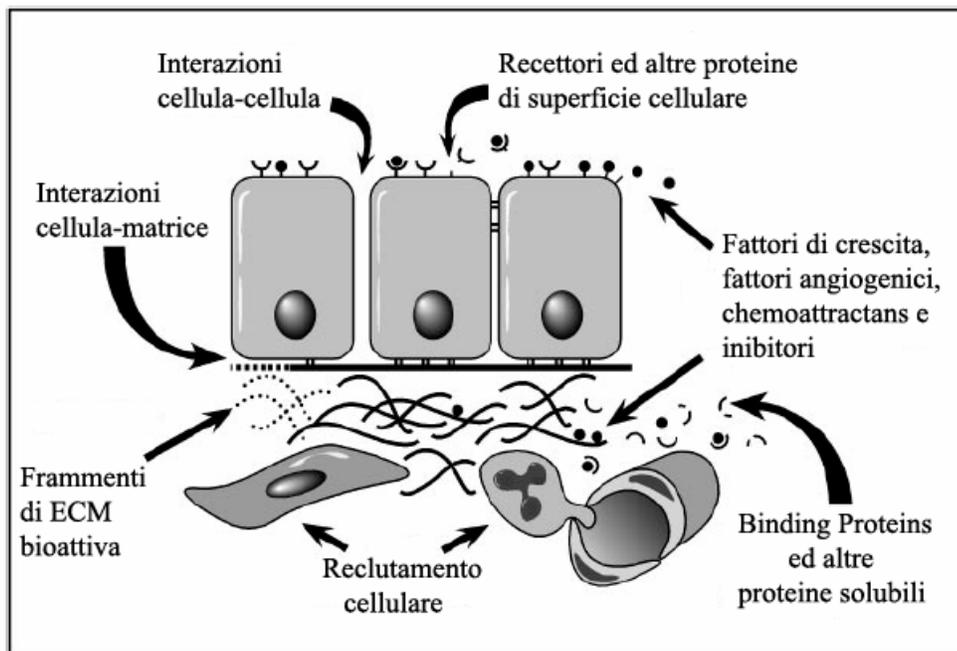
Come si è visto precedentemente, più metalloproteinasi possono degradare gli stessi substrati (tabella 2). E' interessante come, in presenza del collagene di tipo IV, il substrato della MMP-2, i livelli del TIMP-2 sono ridotti e l'attivazione della stessa Gelatinasi A è aumentata. La capacità del collagene ad indurre su richiesta (*on demand*) l'attivazione della MMP-2, probabilmente deriva dalla degradazione del TIMP-2. Infatti non ci sono né variazioni d'espressione della MMP-2, della MT1-MMP o del TIMP stesso, né variazioni nella sintesi o nell'attivazione della MT1-MMP. L'accumulo locale di collagene di tipo IV potrebbe scatenare quindi la sua stessa degradazione a partire da una riduzione delle concentrazioni locali di TIMP-2 fino a livelli che favoriscono l'attivazione della MMP2 (Sternlicht e Werb, 2001).

Le due gelatinasi, MMP-2 e MMP-9, sebbene condividano la capacità di degradare sia il collagene della membrana basale sia la gelatina, non mostrano un'identica specificità dei loro substrati. La MMP-2 degrada la fibronectina e la laminina e, rispetto alla MMP-9, possiede significativamente una minore attività nei confronti del collagene di tipo IV e V (Lenz et al., 2000).

Le MMPs possono degradare le serina proteasi (come il plasminogeno e l'uPA), diversi inibitori delle serina proteasi (tra cui l'inibitore della proteinasi α_1 , α_1 -PI), l' α_1 -antichimotripsina, l'antitrombina III e l'inibitore-2 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-2). Virtualmente tutte le MMPs possono degradare il fibrinogeno, inoltre le MMPs 12, 13 e 14 possono inattivare il fattore XII (fattore di Hagemann), influenzando così i normali meccanismi della coagulazione. Le metalloproteinasi possono mostrare un'attività fibrinolitica che rivestirebbe un ruolo importante nella neoangiogenesi, nella cicatrizzazione delle ferite cutanee, nella

funzione glomerulare e in altri processi biologici (Sternlicht e Werb, 2001).

Figura 5 - Meccanismi potenziali del signaling cellulare mediato dalle MMPs



(Sternlicht et Werb, 2001 modificato)

1.6 LE METALLOPROTEINASI REGOLANO I SEGNALI CELLULARI

Le MMPs non solo possono potenzialmente degradare tutte le molecole strutturali della matrice extracellulare, ma anche diverse proteine

pericellulari, circolanti e di superficie. La figura 5 illustra come le matricine possono regolare il comportamento attraverso:

- l'alterazione delle interazioni cellula-matrice e cellula-cellula;
- la liberazione, l'attivazione o l'inattivazione del signaling delle molecole (mediatori chimici autocrine paracrine);
- la potenziale attivazione o inattivazione dei recettori di superficie cellulare (Sternlicht e Werb, 2001).

Le MMPs non possono quindi essere considerate solo dei semplici enzimi. Alcune MMPs possono attivare segnali intracellulari e pertanto hanno una potenziale capacità di avviare numerose funzioni cellulari. Ad esempio, la MMP-2 *in vitro* è necessaria e sufficiente ad indurre la trasformazione epitelio-mesenchimale (EMT) delle cellule epiteliali tubulari (vedi avanti), così come la MMP-3 induce l'espressione del gene Rac1, che causa un incremento nelle cellule delle specie reattive dell'ossigeno e promuove la EMT (Lyu Y., 2006).

1.7 IL RIMODELLAMENTO DELLA ECM E IL COMPORTAMENTO CELLULARE

La matrice extracellulare non è semplicemente una statica impalcatura passiva. Per sopravvivere, la maggior parte delle cellule deve aderire ad una matrice naturale. La distruzione della matrice subcellulare, mediata dalle MMPs, può indurre l'apoptosi, rivestendo così un ruolo chiave nella morte cellulare fisiologica. Controllando l'adesione cellulare e l'organizzazione del citoscheletro, le matrici extracellulari regolano processi di base come la forma, il movimento, la crescita, la differenziazione e la sopravvivenza della cellula. Di conseguenza, le MMPs, modificando la composizione e l'organizzazione strutturale della ECM, influenzano gli stessi processi (Sternlicht e Werb, 2001).

Sequestrando le molecole di signaling (come i fattori di crescita) e agendo come ligandi per i recettori di adesione (come le integrine), la ECM influenza il comportamento cellulare. La matrice extracellulare agisce pure come riserva per diversi fattori di crescita e per diverse citochine. Una volta che le molecole della ECM vengono degradate, i fattori di crescita e le citochine sono liberati. Per esempio, la ECM agisce come un deposito di TGF- β , e la sua degradazione da parte delle MMPs 2 e 9 rende capace il TGF- β sequestrato a svolgere le proprie funzioni biologiche.

Funzioni biologiche che abbiamo già visto essere di tipo inibitorio nei confronti delle MMPs. Così l'attivazione e il rilascio del TGF- β potrebbero agire da feed-back negativo per le MMPs prima, e per il rilascio del TGF- β poi.

Le MMPs possono influenzare il comportamento cellulare tramite:

- la scissione delle proteine d'adesione cellula-cellula;
- il rilascio di molecole di superficie bioattive;
- la degradazione di molecole di superficie che trasducono i segnali dall'ambiente extracellulare (Sternlicht e Werb, 2001).

Capitolo 2

IL RUOLO DELLE METALLOPROTEINASI NELLE NEFROPATIE

2.1 INTRODUZIONE

La diagnosi di una nefropatia richiede il riconoscimento del complesso spettro di alterazioni semiologiche e laboratoristiche legate ad un danno renale. Una caratterizzazione precoce dell'insulto renale è quindi necessaria per un appropriato e tempestivo intervento terapeutico al fine di arrestare la lesione al rene e migliorarne la funzionalità (Cowgill, 2005). L'evoluzione della patologia renale coinvolge parametri istologici e funzionali che devono essere valutati concomitaneamente. Essa è legata all'attivazione e al rilascio di molecole biologicamente attive e procede in parallelo con l'evoluzione istologica, condizionandola e essendone condizionata (Zatelli, 2001). Sempre più in nefrologia è indicato l'uso di tecniche molecolari, come ad esempio le analisi sulla matrice extracellulare, soprattutto nei casi in cui queste tecniche possono fornire nuovi dati diagnostici (Eikmans et al., 2004).

Focalizzeremo quindi l'attenzione sul rimodellamento della matrice extracellulare (ECM), un'importante caratteristica della normale crescita e del fisiologico sviluppo renale (Lenz, et al., 2000). In condizioni fisiologiche, il bilancio tra una lenta produzione e un'altrettanto lenta degradazione dell'ECM assicura un'omeostasi tissutale che invece non è mantenuta in condizioni patologiche. Nel rene, infatti, l'iperproduzione e/o l'ipodegradazione dell'ECM può causare fibrosi. Le molecole della matrice sono soprattutto degradate dalle serina proteasi, dalla plasmina e dalle metalloproteinasi (Uchio-Yamada et al., 2005). Le MMPs sono le

più importanti proteasi che degradano l'ECM renale perché sono attive ad un pH neutro e sono secrete in un ambiente extracellulare. Tra le varie MMPs, la MMP-2 (Gelatinasi A) e la MMP-9 (Gelatinasi B) sono ampiamente studiate in nefrologia per la loro capacità di degradare il collagene di tipo IV che è il principale componente delle membrane basali (Rankin et al., 1999; Waller e Nicholson, 2001). Inoltre, la MMP-2 (Gelatinasi A) e la MMP-9 (Gelatinasi B) sono le uniche due metalloproteinasi che formano complessi proenzimatici con i loro inibitori endogeni (rispettivamente TIMP-2 e TIMP-1) dei quali si è dimostrata l'espressione nei glomeruli umani. In conclusione le metalloproteinasi giocano un ruolo fondamentale nel bilancio tra sintesi e degradazione della ECM essendo le più importanti regolatrici fisiologiche della degradazione della matrice extracellulare (Lenz et al., 2000).

2.2 CENNI DI ANATOMIA MOLECOLARE DEL RENE

L'unità specifica e funzionale del rene è il nefrone. Nel cane, in cui ciascun rene contiene circa 400.000 nefroni, esiste una correlazione tra diametro dei glomeruli e peso o superficie corporea e non tra numero di nefroni e peso o superficie corporea (Osborne e Fletcher, 1999). Il glomerulo è costituito dalla matassa glomerulare, in cui possiamo riconoscere un'arteriola afferente ed una efferente, tra le cui anse si trovano le cellule mesangiali. Queste ultime sono inserite nella matrice mesangiale e insieme costituiscono il mesangio. La matrice contiene glicosaminoglicani, collagene, fibronectina e laminina. Le cellule mesangiali hanno funzione fagocitaria (possono fagocitare proteine e immunocomplessi) e capacità contrattile (posseggono infatti numerosi filamenti di actina e miosina). L'angiotensina II e il trombossano

stimolano la capacità contrattile, al contrario le prostaglandine (PGE₂) e gli agonisti dell'AMPC determinano il rilasciamento delle cellule. Tali proprietà di contrazione e rilasciamento permettono pertanto la regolazione della circolazione sanguigna nel glomerulo. Le cellule mesangiali sono in grado di sintetizzare citochine, chemochine e fattori di crescita, ovvero sostanze immunoflogistiche che svolgono un ruolo importante nelle glomerulonefriti (Skena e Ditunno, 2003). Il mesangio è separato dal lume dei capillari per mezzo dell'endotelio. L'endotelio fenestrato del glomerulo poggia sulla membrana basale dei podociti che sono le cellule costituenti l'epitelio viscerale. I processi pedicellari dei podociti delimitano i c.d. *slit pores*, chiusi da una sottile membrana (*slit diaphragm*). I podociti sono dotati di attività endocitica nei confronti delle proteine e degli altri componenti dell'ultrafiltrato, come è dimostrato nelle sindromi nefrosiche, in cui il contenuto proteico citoplasmatico dei podociti aumenta notevolmente. *In vitro* i podociti sono in grado di produrre collagene di tipo IV e glicosaminoglicani, proteine che si trovano nelle membrane basali. E' possibile quindi che i podociti partecipino alla costituzione della membrana basale e probabilmente intervengono nei processi di riparazione della stessa membrana (Skena e Ditunno, 2003). Le cellule epiteliali sintetizzano fisiologicamente sia la MMP-2 che la MMP-9, mentre le cellule mesangiali producono soltanto la MMP-2. I podociti poggiano sulla membrana basale che si compone di tre strati: lamina rara esterna (su cui vi poggiano le cellule epiteliali), lamina densa e lamina rara interna (su quest'ultima vi poggiano le cellule endoteliali). La membrana basale è formata da collagene di tipo IV e V, laminina e piccole quantità di fibronectina. Sulla superficie della membrana basale si trova un lattice di siti anionici di glicosaminoglicani ricchi di eparan solfato che influenzano la filtrazione delle macromolecole. Ricapitolando, la parete

dei capillari è formata, dal lume verso l'esterno, da tre strati: endotelio fenestrato, membrana basale e cellule epiteliali; i podociti sono le cellule dell'epitelio viscerale il quale proviene dall'epitelio parietale che costituisce poi la capsula di Bowmann. Tra epitelio viscerale e parietale è presente lo spazio di Bowmann (Lelongt et al., 2001; Schena e Ditunno, 2003).

Il comparto tubulare origina in corrispondenza del polo urinario del glomerulo. Il tubulo prossimale è costituito da una parte convoluta ed una parte retta ed è caratterizzato da un epitelio che poggia su una membrana basale il cui spessore si riduce gradualmente lungo il decorso del tubulo. Al tubulo prossimale segue poi l'ansa di Henle, quindi il tubulo distale, il segmento di connessione ed infine il dotto collettore. Nel topo, la MMP-9 è espressa a livello di tubulo prossimale e di tubulo collettore, la MMP-2 a livello di tubulo prossimale, distale e collettore (Lelongt et al., 2001; Schena e Ditunno, 2003).

2.2.1 L'INTERSTIZIO E LA MATRICE EXTRACELLULARE RENALE

L' interstizio renale è costituito dalle cellule interstiziali e dalla matrice extracellulare. Esso è poco rappresentato nella corticale, mentre aumenta gradualmente dalla midollare esterna verso quella interna. L'interstizio corticale si divide in due spazi: uno più ampio localizzato tra due o più tubuli adiacenti, ed uno più stretto situato tra la membrana basale del tubulo e il capillare peritubulare. Nell'interstizio della corteccia vi sono due tipi di cellule:

- le cellule corticali interstiziali di tipo I che somigliano ai fibroblasti e sono situate tra le membrane basali dei tubuli e i

capillari peritubulari. Secernono collagene e hanno capacità fagocitante;

- le cellule corticali interstiziali di tipo II, simili alle cellule linfatiche mononucleate, sono invece di probabile origine ematica perché somigliano ai linfociti (Schena e Ditonno, 2003).

Nell'interstizio midollare vi sono tre tipi di cellule:

- Il tipo I, di forma analoga a quello riscontrato nella corticale, ma ricco di gocce di lipidi, è presente particolarmente tra le branche dell'ansa di Henle ed i vasa recta. *In vitro*, questo tipo di cellula produce prostaglandine, in particolar modo PGE₂, sotto l'azione dell'angiotensina, cui le cellule sono sensibili perché presentano alcuni recettori specifici. Le cellule interstiziali di tipo I produrrebbero i glicosaminoglicani presenti nella matrice dell'interstizio;
- Il tipo II simil-linfocitario, come quello della corticale, è presente maggiormente nella midollare esterna ed ha probabilmente una funzione fagocitaria;
- Il tipo III è un pericita presente particolarmente nella midollare esterna vicino ai vasa recta discendenti.

La matrice extracellulare è un reticolo di proteine e proteoglicani in cui, come già detto, sintesi e degradazione sono fisiologicamente bilanciate (Furness, 1996; Schena e Ditonno, 2003).

Le proteine della ECM si dividono in collagene e non collagene.

Nel rene i più importanti tipi di collagene sono l'I, il III e il IV. L'interstizio tubulare contiene tutti e tre tipi di collagene mentre i glomeruli contengono solo il tipo III e il tipo IV. Mentre il collagene di tipo I e di tipo III sono proteine fibrillari, il collagene di tipo IV è di tipo reticolare ed è il principale componente della membrana basale. Le molecole fibrillari e non fibrillari vengono entrambe sintetizzate come

molecole di procollagene e sono formate da catene polipeptidiche α assemblate in triplice elica. Fino ad oggi si conoscono 25 catene α (α_1 , α_2 , ecc...) che, in base alla loro diversa combinazione, caratterizzano i diversi tipi di collagene. Così, ad esempio, i collageni di tipo I e di tipo IV sono formati da due catene α_1 ed una catena α_2 , il collagene di tipo III da tre catene α_1 ecc (Furness, 1996; Eurell e Van Sickle, 2000; Waller e Nicholson, 2001).

Le proteine non collagene della ECM sono glicoproteine come la laminina, la fibronectina e la tenascina, oltre a proteoglicani, decorina e biglicani. La laminina è la più abbondante e connette in modo specifico la cellula alla membrana basale in cui il collagene di tipo IV forma un reticolato di notevole resistenza. La fibronectina, prodotta dalle cellule mesenchimali, è una proteina fibrillare che media la connessione tra citoscheletro e matrice extracellulare. La tenascina è associata al controllo del movimento cellulare e al rimodellamento ed involuzione della matrice. I proteoglicani, glicosaminoglicani (GAG) legati ad un asse proteico, riempiono gli spazi nella matrice del tessuto connettivo e regolano il passaggio di molecole attraverso lo spazio intercellulare. Essi hanno inoltre un ruolo importante per i segnali chimici fra le cellule (Furness, 1996; Eurell e Van Sickle, 2000; Waller e Nicholson, 2001).

2.3 IL CONTROLLO DEL TURNOVER DELLA ECM RENALE: LE METALLOPROTEINASI

Abbiamo già chiarito che nei tessuti si verifica, in condizioni fisiologiche, un equilibrio tra una lenta sintesi e un'altrettanto lenta degradazione della matrice extracellulare garantendo così un'omeostasi tissutale che poi risulta alterata in condizioni patologiche. L'ECM influenza la morfologia e le funzioni delle cellule come la migrazione, la

proliferazione e l'apoptosi cellulare mediante l'attivazione di specifici recettori di membrana che attivano vie di trasduzione del segnale che a loro volta influenzano il citoscheletro e altre funzioni. Nelle patologie, il controllo del corretto metabolismo della matrice viene a mancare e la normale forma e funzionalità della cellula possono non essere mantenute. I cambiamenti della composizione della ECM potrebbero essere legati ad una maggiore sintesi e/o ad una diminuita degradazione delle proteine della matrice extracellulare. L'accumulo di matrice extracellulare in molte patologie renali croniche è l'esito sia dell'aumentata sintesi sia della diminuita degradazione dei componenti della ECM stessa. Il turnover della ECM è controllato da un network complesso di citochine e proteasi di cui le MMPs sono le più importanti (Furness 1996; Senatorsky et al., 1998; Lelongt et al., 2001; Baricos et al. 2003; Uchio-Yamada et al., 2005).

Le Gelatinasi sono fisiologicamente sintetizzate dalle cellule epiteliali (MMP-2 e MMP-9), mesangiali (MMP-2) e tubulari (MMP-2 e MMP-9) (Lelongt et al., 2001), vedi figura 6.

Anche in questo organo il controllo delle metalloproteinasi avviene a più livelli:

- espressione genica;
- attivazione extracellulare;
- inibizione (Waller e Nicholson, 2001).

Figura 6 - Espressione delle MMPs nel nefrone

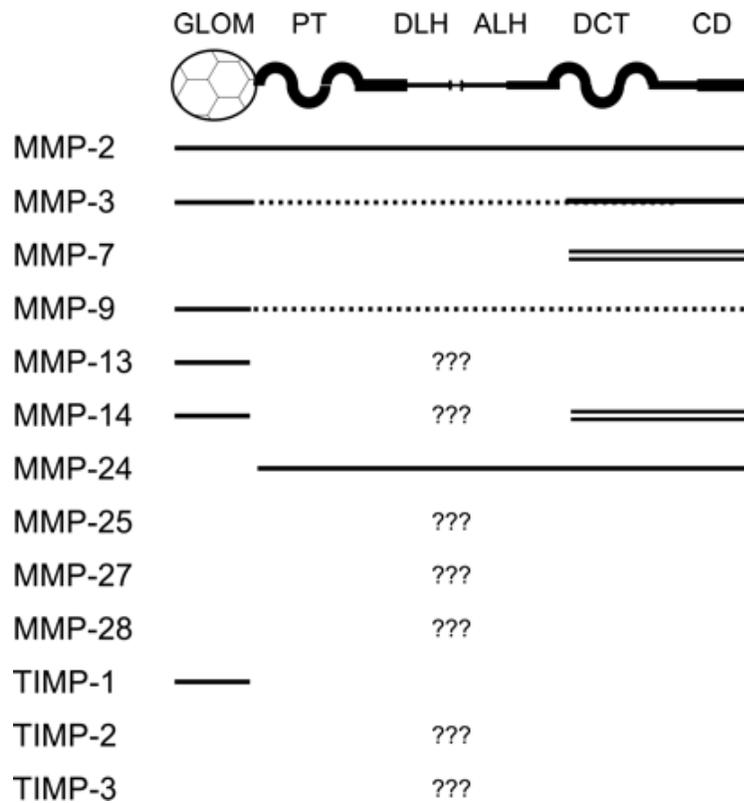


Figura 6 – Rappresentazione dell'espressione delle MMPs e TIMPs lungo il nefrone. GLOM: glomerulo; PT: tubulo prossimale; DHL: branca discendente dell'ansa di Henle; AHL: branca ascendente dell'ansa di Henle; DCT: tubulo contorto distale; CD: dotto collettore.

— : espressione nel segmento del nefrone corrispondente

.....: espressione con variabilità specie-specifica (ratto, topo, uomo)

== : espressione in condizioni patologiche (Catania et al., 2007)

2.3.1 ESPRESSIONE GENICA E SUOI REGOLATORI

L'espressione genica delle metalloproteinasi è regolata da diverse citochine e fattori di crescita, tra cui l'interleuchina-2 (IL-2), il PDGF ed il TGF- β (Sternlicht e Werb, 2001; Waller e Nicholson, 2001).

Il *Transforming Growth Factor*- β (TGF- β) può limitare l'espressione delle metalloproteinasi e, alterando il bilancio tra sintesi e degradazione dell'ECM, contribuisce all'accumulo di matrice extracellulare (McLennan et al., 2000; Eikmans et al., 2004). Inoltre, parallelamente all'inibizione delle metalloproteinasi, il TGF- β incrementa la sintesi dei loro inibitori, come i TIMPs ed il PAI-1 (Inibitore dell'Attivatore del Plasminogeno) (vedi oltre). Il ruolo principale del TGF- β nelle patologie renali sembra essere il rimodellamento della ECM. Nelle nefropatie acute il TGF- β è prodotto principalmente dai macrofagi infiltrati, ma può anche essere sintetizzato da altri tipi di cellule tra cui le cellule mesangiali (Furness, 1996). *In vitro* il TGF- β stimola le cellule mesangiali, i fibroblasti e induce la EMT. *In vivo* la somministrazione di TGF- β esogeno al topo induce fibrosi renale, mentre la sua inibizione protegge il topo dalla progressione della fibrosi (Liu Y., 2006). Il TGF- β è essenziale per la normale cicatrizzazione delle ferite e la sua assenza è incompatibile con la vita. Normalmente la molecola di TGF- β è rilasciata transitoriamente in risposta ad insulti singoli e isolati, e così i suoi effetti sono limitati. Dopo un danno tissutale, il TGF- β è prodotto in forma inattiva e, per legarsi ai suoi recettori, deve essere prima sganciato dal peptide di latenza da parte di alcune proteasi. L'aumentata sintesi di TGF- β determina uno *shift* verso l'accumulo di ECM, poiché esso stimola la produzione di collagene, fibronectina e proteoglicani e ne inibisce la degradazione. Inoltre il TGF- β dimostra un'autoregolazione positiva della sua sintesi e perciò la sua azione profibrotica viene ancor di

più amplificata (Furness, 1996; Waller e Nicholson, 2001). *In vivo* la fibrosi renale è associata a livelli elevati di TGF- β , come dimostrato dal modello di nefrite anti Thy 1.1 del ratto (Harendza et al., 1999; Cheng e Lovett, 2003). Il ruolo del TGF- β tuttavia resta controverso nella regolazione della Gelatinasi A: è stato infatti dimostrato che il TGF- β promuove l'*upregulation* della MMP-2 (Lenz et al., 2000). Le cellule mesangiali sono stimulate dal TGF- β a sintetizzare, sia *in vivo* che *in vitro*, la metalloproteinasi 2 dimostrando l'importanza del TGF- β nel rimodellamento della matrice glomerulare durante i processi infiammatori (Marti et al., 1994). Questo può già farci sospettare come, al variare della natura del processo patologico (infiammatorio o non infiammatorio), varia l'espressione e l'attività delle MMPs.

Il TGF- β non è l'unica molecola implicata nella regolazione dell'espressione delle MMPs. Il Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) e l'Interleuchina-1 β (IL-1 β) sono coinvolte durante i processi infiammatori che si sviluppano a livello renale. Queste citochine sono prodotte principalmente dai macrofagi infiltrati, ma anche dalle cellule renali residenti, in particolar modo dalle cellule mesangiali. *In vitro*, su una linea di cellule mesenchimali umane (T-HMC), il TNF- α si è dimostrato capace di indurre l'espressione di MMP-9 ed al tempo stesso di diminuire l'espressione del TIMP-1. L'associazione dell'IL-1 β , insieme al TNF- α , ha determinato un'aumentata inibizione dell'espressione del TIMP-1, mentre, da sola, l'IL-1 β non ha avuto alcun effetto inibitorio. Entrambi i mediatori chimici non hanno invece conseguenze nell'espressione della MMP-2 (Nee L. et al., 2007). Lo stesso autore sottolinea come in un precedente lavoro trovò una risposta simile nelle cellule epiteliali del tubulo contorto prossimale dell'uomo stimulate con TNF- α .

In particolare è interessante evidenziare come alcuni lavori raggiungono conclusioni contrastanti. Eberhardt ha dimostrato che la stimolazione di

cellule mesangiali di ratto con IL-1 β determina un aumento dell'espressione di MMP-9, in contrasto con le conclusioni raggiunte da Nee L. Ciò probabilmente è dovuto alle differenze specie-specifiche nel profilo di espressione delle MMPs in seguito a stimoli infiammatori (Nee L. et al., 2007).

2.3.2 ATTIVAZIONE EXTRACELLULARE DELLE MMPs

Una volta sintetizzate, le proteasi sono secrete in forma inattiva come zimogeni. L'attivazione extracellulare richiede sia la distruzione delle interazioni Cisteina-Zinco (*Cystein switch*), sia clivaggi proteolitici da parte di altre MMPs o da altre proteasi plasmatiche come la plasmina. In questo processo, infatti, è importante il sistema uPA-Plasmina. L'uPA (l'Attivatore del Plasminogeno Urokinasi tipo) è sintetizzato dalle cellule del tubulo prossimale e distale e, oltre alle capacità fibrinolitiche, ha un ruolo importante nella degradazione della matrice. La plasmina, oltre alla diretta degradazione di vari componenti della matrice, è ritenuta capace di attivare direttamente o indirettamente la MMP-2 latente. L'attività dell'uPA è inibita dal PAI-1 (Inibitore dell'Attivatore del Plasminogeno) i cui livelli, non a caso, risultano essere elevati nei modelli animali di fibrosi (Furness, 1996; McLennan et al., 2000; Nagase e Woessner, 1999; Waller e Nicholson, 2001; Baricos et al., 2003). Nella fibrosi il TGF- β , aumentando la sintesi del PAI-1, determina l'inibizione dell'uPA e di conseguenza l'inibizione delle MMPs, contribuendo quindi all'accumulo di matrice extracellulare. Con l'eccezione del TGF- β , gli altri fattori che regolano l'attività del sistema uPA-Plasmina restano tuttora sconosciuti, (Baricos et al., 2003) (vedi figura 7).

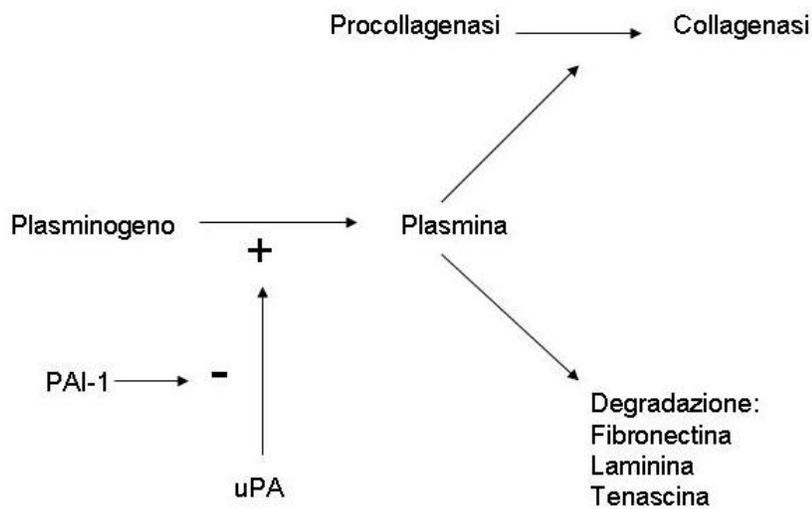


Figura 7 – Ruolo del sistema uPA - Plasmina - PAI-1 nell’attivazione delle MMP (PAI-1: inibitore dell’attivatore del plasminogeno; uPA: attivatore del plasminogeno urokinasi-tipo). Da: Waller e Nicholson, 2001, modificato.

2.3.3 INIBIZIONE DELLE MMPs

L’inibizione dell’attività delle MMPs è garantita dai loro più importanti inibitori endogeni: i TIMPs. Questi inibiscono le MMPs reversibilmente in un rapporto stechiometrico di 1:1. Il TIMP-1, che inibisce tutte le MMPs latenti, non è riscontrabile nel rene normale, ma la sua espressione è incrementata in molti modelli animali di fibrosi renale. Al contrario, il TIMP-2 ed il TIMP-3 si trovano nei reni sani ed hanno minore importanza nella patogenesi della fibrosi renale. Il complesso sistema di regolazione assicura pertanto un equilibrio tra espressione ed inibizione delle metalloproteinasi le quali, a loro volta, garantiscono il corretto rimodellamento della matrice extracellulare. Quindi se cambia

l'espressione, l'attività o l'inibizione delle MMPs, cambierà direttamente il turnover della matrice extracellulare (Sternlicht e Werb, 2001; Waller e Nicholson, 2001). Ai TIMPs sono riconosciute altre funzioni biologiche, oltre a quella inibitoria sulle MMPs. TIMP-1 e TIMP-2 aumentano l'attività eritroide e promuovono la crescita cellulare, anche attraverso un effetto antiapoptotico; TIMP-2 partecipa nella morfogenesi del nefrone e dell'uretere e inibisce la crescita endoteliale indotta dal Fibroblast growth factor. E' dimostrato che queste attività sono distinte dalla capacità inibitoria sulle MMPs (Visse R.et al., 2003). Recentemente, inoltre, il **RECK**, una proteina *cystein-rich* normalmente ancorata alla membrana cellulare, è stato studiato quale inibitore endogeno delle MMPs (Baker A.H.et al., 2002)

2.4 NEFROPATIE & MMPs

Il termine nefropatia indica la presenza di un danno renale o di una lesione renale intrinseca e comprende qualsiasi grado di coinvolgimento parenchimale focale o diffuso, localizzato o generalizzato, morfologico o funzionale. La nefropatia può essere reversibile, se lieve e limitata, oppure, se estesa e progressiva, culminare nell'insufficienza renale (Cowgill, 2005). Le nefropatie possono interessare i glomeruli, i tubuli, il tessuto interstiziale e/o la vascolarizzazione di uno o entrambi i reni (Polzin e Osborne, 1999).

2.5 GLOMERULOPATIE

I danni glomerulari rappresentano la causa più frequente di patologia ed insufficienza renale nel cane e nel gatto, colpendo generalmente soggetti

di età media o avanzata e, sebbene possano avere diverse manifestazioni cliniche, sono spesso associati a proteinuria. Le due malattie glomerulari più importanti nel cane sono la glomerulonefrite da immunocomplessi e l'amiloidosi (Grauer e Di Bartola, 2002; Castagnaro e Brovida, 2005). La caratteristica clinico-patologica più importante delle glomerulopatie del cane è una persistente proteinuria (principalmente albuminuria) con un sedimento urinario inattivo. Sebbene in medicina veterinaria l'utilizzo del rapporto Proteine Urinarie/Creatinina (UP/C) abbia fornito un utile aiuto diagnostico per quantificare la proteinuria, la conferma di una glomerulopatia richiede l'esame istologico da una biopsia renale (Grauer, 2005). Da un punto di vista pratico le tecniche di istopatologia renale possono essere applicate su biopsia oppure su prelievi *post-mortem*. In medicina umana le specifiche patologie glomerulari vengono caratterizzate sulla base dei reperti istopatologici, immunoistochimici ed ultrastrutturali. Mediante queste metodologie la classificazione di una malattia glomerulare ne identifica la patogenesi, la prognosi e le terapie specifiche. Nel cane e nel gatto, per motivi tecnici ed economici, spesso si effettua la sola valutazione al microscopio ottico, impedendo così, ai patologi veterinari, una precisa e sistematica classificazione morfologica delle patologie glomerulari (Castagnaro e Brovida, 2005).

Abbiamo già accennato che è sempre maggiore in nefrologia l'interesse verso gli studi e le metodiche molecolari, e che lesioni istologiche e rilascio di molecole bioattive sono un binomio inscindibile nel determinismo della lesione renale (Zatelli, 2001; Eikmans et al., 2004). Le indagini sulla ECM e sui suoi regolatori nei modelli sperimentali riflettono la progressione della malattia e, pertanto, le analisi dei meccanismi regolatori della degradazione dell'ECM sarebbero dei metodi diagnostici e prognostici nelle patologie glomerulari. In medicina umana la valutazione dell'espressione delle molecole della ECM, delle

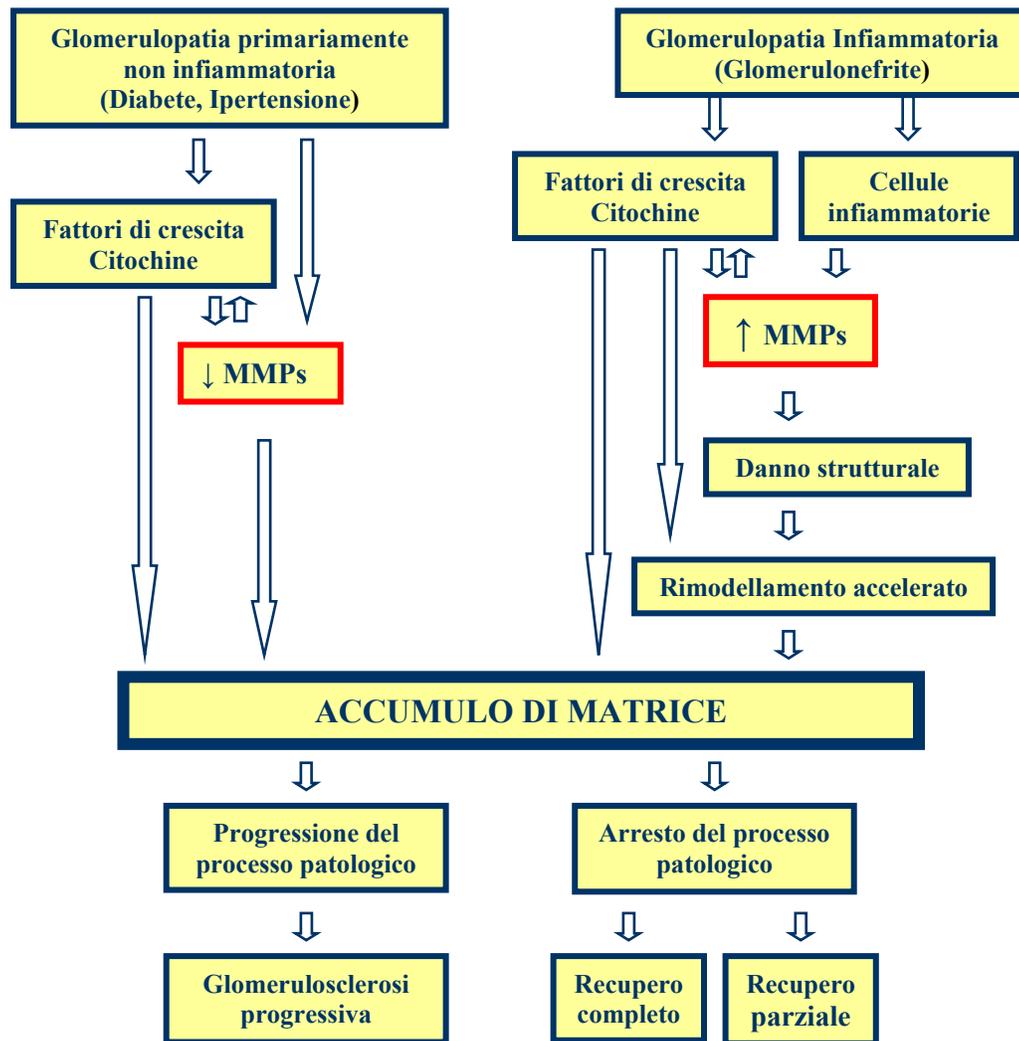
citochine e delle MMPs nelle biopsie renali potrebbero discriminare i pazienti a rischio di sviluppare un'insufficienza renale da quelli che mostrano una naturale capacità di rimodellamento dopo insulti al rene (Eikmans et al., 2004).

Il bilancio tra la sintesi e la degradazione della matrice extracellulare è un requisito indispensabile per mantenere l'integrità strutturale e funzionale del glomerulo. Molte glomerulopatie sono caratterizzate da un cambiamento di cellularità che, a sua volta, potrebbe alterare la composizione e il turnover della ECM. (Lenz et al., 2000). Se nel glomerulo cambia l'espressione o l'attività delle Gelatinasi, l'ECM perde il suo fisiologico equilibrio e si verifica un danneggiamento glomerulare ed un declino della funzionalità renale (Lenz et al., 2000; Lelongt et al., 2001).

Nei glomeruli normali umani c'è solamente una moderata presenza di MMP-9, mentre la MMP-2 non è rilevabile tramite tecnica zimografica (Urushihara M. et al., 2002). Le cellule epiteliali glomerulari possono comunque produrre sia la MMP-2 che la MMP-9, mentre le cellule mesenchimali producono solamente la MMP-9 (Lelongt et al., 2001).

In termini generali la progressione di patologie non infiammatorie è stata associata ad una *downregulation* delle MMPs, mentre livelli elevati di MMPs sono generalmente correlati ad un processo flogistico attivo e all'invasione delle cellule infiammatorie (vedi fig. 8) (Lenz et al., 2000; Lelongt et al., 2001).

Figura 8 – Espressione e attività enzimatica delle MMPs nelle glomerulopatie



(Lenz et al., 2000 modificato)

Le Gelatinasi potrebbero essere considerate molecole protettive ad attività antifibrotica. Tuttavia questa visione è troppo semplice ed ottimistica e la realtà è più complessa. La MMP-2 e la MMP-9 inducono, infatti, alterazioni alla GBM (Membrana Basale Glomerulare) con

conseguente deposito di fibrina. La MMP-2 può funzionare come mediatore infiammatorio per le cellule mesangiali (Marti H., 2002). Le MMPs possono influenzare il comportamento delle cellule glomerulari attraverso i prodotti di degradazione della loro attività o regolare la disponibilità di fattori di crescita intervenendo nella loro sintesi o degradazione. Inoltre, la MT-1MMP (*Membrane Type MMP*) e la MMP-2, degradando la fibrina, favoriscono la proliferazione delle cellule epiteliali e l'invasione dei fibroblasti, influenzando così anche il comportamento delle cellule glomerulari attraverso i prodotti di degradazione dell'ECM (Lenz et al., 2000; Lelongt et al., 2001).

2.5.1 GLOMERULOPATIE NON INFIAMMATORIE

Le glomerulonefrosi sono glomerulopatie non infiammatorie, solitamente bilaterali, che non dipendono da una vasculopatia primitiva (Marcato, 2002).

Le glomerulonefrosi provocano alterazioni metaboliche locali che s'instaurano in conseguenza di lesioni acquisite di tipo atrofico, degenerativo, pigmentario, infiltrativo, necrotico. Dal momento che il nefrone è un'unità anatomico-funzionale inscindibile, nelle nefrosi le alterazioni regressive glomerulari e tubulari sono sempre in qualche modo correlate tra loro. Spesso vi sono inoltre stretti rapporti tra fenomeni regressivi e fenomeni infiammatori (Marcato, 2002).

La nefrosi a lesione minimale (*minimal change nephrosis*), sebbene molto rara nel cane, può essere considerata una glomerulonefrosi acuta caratterizzata da sensibile proteinuria ma da lievi modificazioni glomerulari (alterazioni dei proteoglicani della membrana basale, appiattimento o scomparsa dei pedicelli dei podociti). Come reazione alla glomerulonefrosi acuta, si rileva un ampliamento del mesangio ed un

ispessimento delle membrane basali per l'ipertrofia delle cellule mesangiali e dei podociti, e per l'aumento della sintesi di collagene di tipo IV e glicoproteine non collagene. Istologicamente si osserva materiale albuminoso acidofilo nello spazio capsulare, globuli ialini acidofili e PAS positivi nelle cellule tubulari (tubulonefrosi a gocce ialine) e stampi PAS positivi nei lumi tubulari che segnalano istologicamente la proteinuria (Marcato, 2002).

La glomerulonefrosi cronica è riscontrabile nel cane in associazione a diabete mellito, piometra, miocarditi, tumori, leucemie. Essa è caratterizzata dall'occlusione dei lumi capillari e dello spazio di Bowmann (per aumento della matrice mesangiale e del collagene di tipo IV) e da una diminuzione, fino alla scomparsa, delle cellule endoteliali ed epiteliali. Si parla pertanto di glomerulosclerosi, processo caratterizzato da un profondo shift nel turnover dell'ECM che porta alla proliferazione della matrice mesangiale, alla diminuzione dell'area filtrante ed infine all'insufficienza renale di stadio terminale. Ad eccezione del rene diabetico, le glomerulonefrosi croniche del cane (glomerulosclerosi) vengono interpretate come forme di glomerulonefrite cronica. La glomerulonefrosi diabetica è una glomerulosclerosi diffusa con ispessimento ialino delle membrane basali e del mesangio (ialinosi glomerulare). L'elevata produzione di collagene è l'elemento chiave delle alterazioni diabetiche della ECM glomerulare (Del Prete et al., 1997; Lenz et al., 2000; Marcato, 2002). E' plausibile quindi che la MMP-2 possa essere coinvolta in questa patologia vista la sua specificità a degradare il collagene di tipo IV, il cui accumulo è l'evento centrale e precoce della glomerulopatia diabetica. In questa patologia la proliferazione del mesangio è strettamente legata alla prognosi del paziente, poiché l'incremento dell'area mesangiale è predittiva di una insufficienza renale (Del Prete et al., 1997). Nella nefropatia diabetica le

MMPs potrebbero giocare un ruolo determinante dal momento che l'accumulo di matrice è legato ad un'aumentata sintesi e ad una minor degradazione della matrice stessa (Lenz, et al., 2000).

I livelli elevati di glucosio, in presenza o meno di insulina, incrementano direttamente l'espressione delle molecole della matrice e inibiscono l'espressione delle MMPs 2 e 9 nelle cellule del mesangio (vedi figura 6). Questi risultati sono stati confermati su ratti diabetici nei quali è stata osservata non solo una *downregulation* delle MMPs, ma anche l'*upregulation* del TIMP-1 (Lenz et al., 2000; Baricos et al., 2003). La MMP-2 nei glomeruli di uomini diabetici subisce universalmente una *downregulation* (Del Prete et al., 1997). Il diabete però, oltre agli effetti diretti del glucosio sulle MMPs, agisce anche indirettamente sul turnover della matrice renale. Lo stato iperglicemico determina, infatti, la glicosilazione delle proteine sieriche, tra cui l'albumina. L'albumina glicosilata dimostra un'azione inibitoria dose-dipendente nei confronti della degradazione della ECM renale (Lenz et al., 2000; Baricos et al., 2003). L'influenza genetica, poi, avrebbe una grossa importanza nell'incidenza delle complicazioni renali nei diabetici, e il livello di espressione delle MMPs sarebbe un fattore determinante. Pertanto queste proteasi potrebbero essere sfruttate per identificare i pazienti a rischio di una progressiva insufficienza renale. I livelli tissutali di MMPs potrebbero determinare la gravità del danno glomerulare e della progressione della glomerulopatia (Lenz et al., 2000). Le urine di pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2, con proteinuria manifesta e GFR subnormale, mostrano un notevole incremento della MMP-9 rispetto ai controlli ed un modico incremento di MMP-2. Quindi la MMP-9 potrebbe essere sfruttata come un nuovo marker urinario di monitoraggio del danno renale in corso di diabete di tipo 2 (Zoai P. et al., 2000). Inoltre, nella stessa patologia, l'incremento plasmatico della MMP-9

predice di almeno 3 anni l'insorgenza della microalbuminuria. Non è ben chiaro comunque se la MMP-9 sia originata dall'epitelio glomerulare o dai macrofagi infiltrati nel glomerulo (Ebihara I. et al., 1998).

2.5.2 GLOMERULONEFRITI

Nella patogenesi delle glomerulonefriti del cane, causate soprattutto dalla presenza di immunocomplessi nella parete dei capillari glomerulari, domina una stretta interazione tra processi immunologici e infiammatori che danneggiano l'integrità strutturale e funzionale del glomerulo (Marcato, 2002; Grauer e Di Bartola, 2002). La maggior parte delle glomerulonefriti mostra alterazioni nella proliferazione delle cellule glomerulari e nella composizione dell'ECM (Marti, 2002). Il glomerulo, infatti, risponde ai vari stimoli flogogeni con la proliferazione cellulare, l'ispessimento della membrana basale glomerulare e, se l'insulto persiste, con la ialinizzazione e la sclerosi (Grauer, 2005). La proliferazione e l'espansione delle cellule e della matrice mesangiali sono infatti considerati precursori della glomerulosclerosi e, pertanto, la regolazione di questi processi può impedire un danno glomerulare irreversibile (Grauer e Di Bartola, 2002).

L'ECM, legando i componenti del citoscheletro e i segnali di trasduzione, influenza la morfologia e le funzioni della cellula come la migrazione, la proliferazione e l'apoptosi cellulare. Il metabolismo anormale della ECM determina la progressione della fibrosi. Le metalloproteinasi, regolando il turnover della matrice del mesangio e le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice, svolgono un ruolo importante nell'impedire un'espansione eccessiva della matrice mesangiale glomerulare. Naturalmente anche i TIMPs, regolando l'attività delle

MMPs, partecipano attivamente nell'evoluzione della glomerulopatia. Nelle glomerulonefriti generalmente si assiste ad un aumento della quantità di MMPs all'interno del glomerulo (Lenz et al., 2000), ma è stato osservato a sua volta che non c'è correlazione tra la quantità delle MMPs e la loro attività (forme inattive, dimeri, alterazione delle MMPs durante la processazione dei tessuti) (Furness P.N., 1996). Anche l'apoptosi, determinata dalle citochine e dai linfociti, può essere molto importante per un efficace rimodellamento del glomerulo in seguito a lesioni infiammatorie. Un'alterazione della morte cellulare apoptotica e dell'attività delle metalloproteinasi glomerulari contribuisce allo sviluppo della glomerulosclerosi (Marti, 2002; Grauer e Di Bartola, 2002; Uchio-Yamada et al., 2005).

2.5.3 CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE E MOLECOLARI NELLA PATOGENESI DELLE GLOMERULONEFRITI

Le manifestazioni istologiche basilari della glomerulonefrite possono essere:

- l'essudazione (fibrinosa, granulocitaria, monocitaria, eritrocitaria) con formazione, tra gomitolo capillare e capsula di Bowmann, di *crescents*, cioè "semilune" fibrino-cellulari;
- proliferazione cellulare (mesangiale, endoteliale, epiteliale, fibroblastica);
- ispessimento della membrana basale per deposito di immunocomplessi e/o di complemento oppure per apposizione di matrice mesangiale;
- ispessimento del mesangio per deposito e accumulo di immunocomplessi e/o di matrice;

- trombosi e necrosi (Marcato, 2002).

La proliferazione delle cellule mesangiali rappresenta la reazione basilare del glomerulo alle noxae: le cellule mesangiali possono produrre IL-1, eicosanoidi, radicali liberi dell'ossigeno e vari fattori di crescita che possono innescare la flogosi anche in assenza di leucociti. La proliferazione cellulare può essere accompagnata dall'accumulo intracapillare di leucociti che contribuiscono al forte aumento della cellularità nel glomerulo (Marcato, 2002).

Le categorie istologiche delle glomerulonefriti diffuse comprendono:

la glomerulonefrite essudativa, in cui prevale la formazione di "semilune" fibrinose e/o cellulari; la glomerulonefrite membranosa, caratterizzata dall'ispessimento della membrana basale per il deposito subepiteliale di immunocomplessi; la glomerulonefrite membranoproliferativa in cui si apprezzano l'ispessimento della membrana basale e la proliferazione cellulare mesangiale o extracapillare (Marcato, 2002).

Da un punto di vista "molecolare-infiammatorio" sono riconoscibili quattro stadi evolutivi caratterizzati da markers molecolari e da markers cellulari:

- *iniziale*, contraddistinto dalla presenza di piastrine, polimorfonucleati, complemento e citochine;
- *cronico iniziale*, caratterizzato da proliferazione parenchimale, macrofagi, linfociti, IL, TNF- α , PDGF e TGF- β ;
- *cronico avanzato*, con markers cellulari sovrapponibili a quelli dello stadio cronico iniziale e markers molecolari rappresentati da proteine della matrice;
- *fase fibrotico*, nella quale prevalgono fibrosi e sclerosi (Zatelli, 2001).

Il glomerulo fornisce un ambiente unico per i fattori lesivi (ad es. immunocomplessi) per stimolare la produzione di mediatori bioattivi come:

- citochine proinfiammatorie;
- fattori di crescita;
- eicosanoidi e sostanze vasoattive;
- proteine dell'ECM;
- proteasi.

Questi mediatori possono contribuire alle lesioni e sono prodotti dalle cellule glomerulari oppure dalle cellule circolanti reclutate (piastrine, macrofagi e neutrofili) (Grauer, 2005).

Le citochine ed i fattori di crescita sono prodotti dalle cellule infiammatorie e si localizzano nelle cellule del glomerulo in corso di lesioni glomerulari. Il TNF, l'IL, il PDGF, l'EGF, il PAF (*Platelet Activating Factor*) ed il fattore di crescita dei fibroblasti contribuiscono tutti alla proliferazione delle cellule mesangiali, alla produzione di matrice mesangiale, all'adesione cellulare infiammatoria, all'aumento della permeabilità capillare, alla coagulazione intraglomerulare, alla deposizione di fibrina ed alla glomerulosclerosi (Grauer e Di Bartola, 2002).

Gli eicosanoidi sono prodotti delle cicloossigenasi e delle lipossigenasi che fanno parte del metabolismo dell'acido arachidonico. Le prostaglandine e il trombossano sono prodotti per azione della cicloossigenasi, mentre i leucotrieni sono prodotti della lipossigenasi. Il trombossano induce aggregazione piastrinica, è chemiotattico per i neutrofili e causa sia vasocostrizione sia contrazione delle cellule del mesangio interferendo con la fagocitosi mesangiale. Al contrario, le prostaglandine inibiscono l'aggregazione piastrinica e tendono ad avere effetti anti-infiammatori e vasodilatatori all'interno del rene. Come il

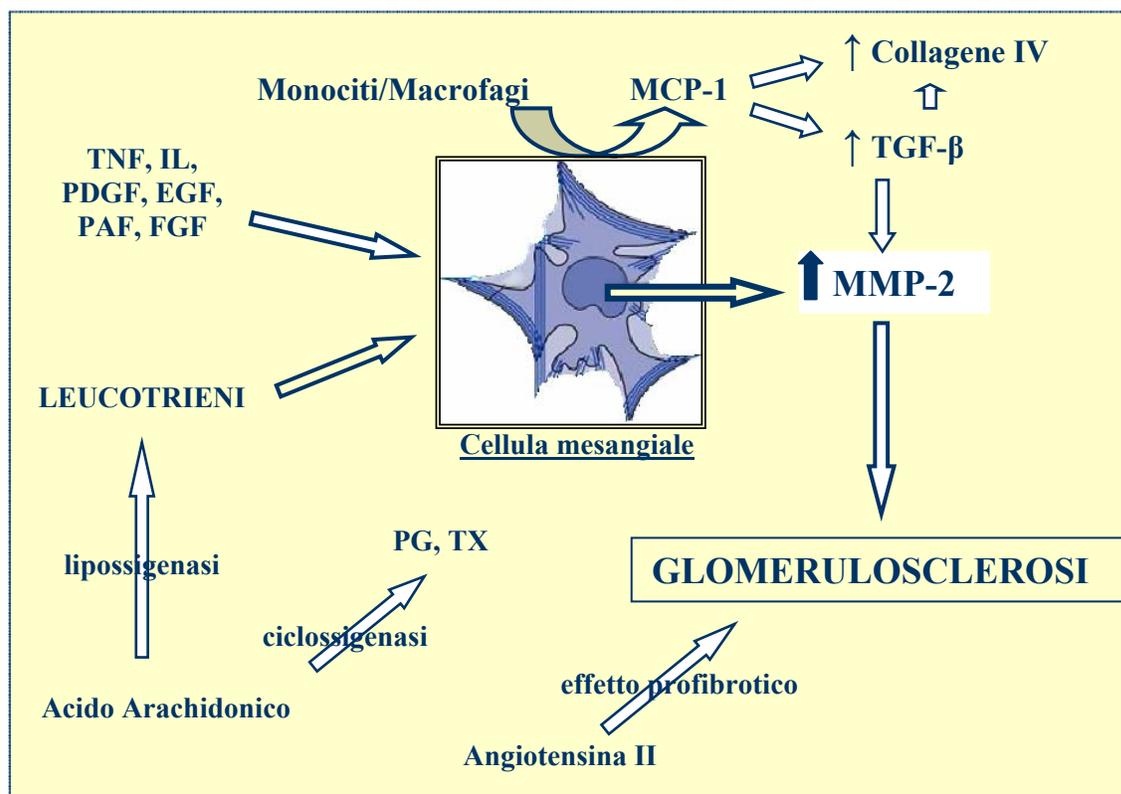
trombossano, anche i leucotrieni diminuiscono la filtrazione glomerulare per mezzo della vasocostrizione e della contrazione mesangiale. I leucotrieni attraggono i neutrofili e promuovono l'adesione e l'attivazione leucocitaria, inoltre stimolano la proliferazione delle cellule mesangiali e la produzione di matrici proteiche extracellulari (vedi fig. 7) (Grauer e Di Bartola, 2002).

La localizzazione dei neutrofili e dei macrofagi all'interno del glomerulo è la risposta ai numerosi mediatori solubili (complemento, PDGF, PAF, eicosanoidi). I neutrofili tentano di fagocitare gli immunocomplessi, determinando il rilascio di proteasi e di ossidanti, quali ad esempio il perossido d'idrogeno. I composti reattivi dell'ossigeno, anch'essi responsabili della progressione del danno renale, possono esser generati anche dalle cellule mesangiali. Gli ossidanti attivano le proteasi e quindi potenziano la loro azione. E' importante il ruolo dei monociti/macrofagi che, attratti verso il glomerulo, infiltrano il mesangio, le aree subendoteliali e lo spazio di Bowmann, e producono proteasi ed ossidanti. L'interazione da contatto tra cellule mesangiali e macrofagi induce nelle prime l'espressione di un fattore chemiotattico per i macrofagi (MCP-1, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*) che ha, inoltre, l'effetto di aumentare la sintesi di collagene di tipo IV, attraverso la stimolazione del TGF- β (fig. 7) (Marcato, 2002; Grauer e Di Bartola, 2002; Schena e Grandaliano, 2003). Inoltre, nel ratto, in corso di glomerulonefrite essudativa causata da iniezione di anticorpi anti-GBM, i macrofagi infiltranti producono elevate quantità di MT1-MMP, che è essenziale per l'attivazione della MMP-2 (Hayashi K. Et al., 2000).

Anche l'angiotensina II ha un effetto proinfiammatorio e può stimolare la proliferazione mesangiale e la fibrogenesi. Insieme al TGF- β , l'angiotensina II sembra essere il più importante mediatore profibrotico nel glomerulo (fig. 9). E' stato dimostrato inoltre che l'effetto

profibrotico dell'angiotensina II è indipendente dai suoi effetti ipertensivi (Waller e Nicholson, 2001; Grauer, 2005).

Figura 9 – La stimolazione del mesangio determina l'aumento dell'attività della MMP-2.



Gli stimoli infiammatori hanno come risultato una maggiore espressione della MMP-2 da parte del mesangio. Inoltre la MMP-2, in culture di cellule mesangiali di ratto, dimostra un'azione pro-infiammatoria, determinando aumento della sintesi delle proteine dell'ECM,

proliferazione cellulare e attivazione dei marker di α -actina della muscolatura liscia (vedi fig. 9) (Marti, 2002).

Nelle glomerulonefriti i livelli elevati di metalloproteinasi sono solitamente associati ad un processo attivo e alla presenza di cellule infiammatorie. Non solo: anche i livelli e la durata dei picchi di MMPs determinano l'entità del danno glomerulare. Studi sull'uomo hanno dimostrato che i livelli elevati di MMPs sono legati ad una risposta estremamente attiva associata ad un danno glomerulare. Dati sperimentali umani indicano inoltre che l'elevata espressione glomerulare delle MMPs contribuisce al processo patologico, e che l'elevata attività delle MMPs è correlata ad un danno strutturale glomerulare (Lenz et al., 2000).

Tuttavia, in base al modello di patologia infiammatoria esaminata, il comportamento e gli effetti delle MMPs sono differenti (Lelongt et al., 2001). Numerosi quadri di espressione e attivazione delle MMPs sono stati descritti da vari autori nelle diverse forme di malattia glomerulare, ad evoluzione sia acuta che cronica, a volte con quadri molto differenti o addirittura contrastanti. Il modello di nefrite anti-Thy 1.1 del ratto è un modello di glomerulonefrite mesangioproliferativa cronica. E' considerato un modello di patologia autolimitata, caratterizzata da ipercellularità glomerulare, aumento dell'attività della MMP-2 e, di conseguenza, elevata degradazione dell'ECM. L'espressione di mRNA del collagene IV, di MMP-2 e di TGF- β risulta elevata per ogni fase della malattia. L'aumento dell'espressione delle MMPs nella nefrite Thy1.1 potrebbe essere parzialmente mediato anche dai vari fattori di crescita rilasciati dai neutrofili e dai macrofagi. Le glomerulonefriti croniche sono caratterizzate da distruzione dell'integrità glomerulare a cui segue una diminuzione della funzionalità che è associata alla proliferazione delle cellule glomerulari, all'aumento di matrice e al rimodellamento. In questo modello una singola iniezione di ATS (*Anti-rat Thymocyte Serum*)

provoca un danno glomerulare acuto con proliferazione cellulare, accumulo di collagene e *upregulation* reversibile dell'espressione di collagene IV, della MMP-2 e TGF- β . Iniezioni settimanali, quindi insulti continuativi, fanno sviluppare una malattia cronica con una diminuzione della cellularità. La minore proliferazione mesangiale insieme al simultaneo aumento del collagene è una caratteristica molto importante del modello di glomerulonefrite cronica. Si registrano livelli elevati di TGF- β che ha un effetto inibitorio sulla proliferazione mesangiale. Come risultato netto si ha un accumulo di matrice nel glomerulo. IL TGF- β è ritenuto responsabile dell'accumulo di matrice, dell'aumento dell'espressione della MMP-2 e della minore proliferazione cellulare (Harendza et al., 1999; Lenz et al., 2000). L'attività proteolitica delle MMPs induce, o per lo meno mantiene, l'attivazione delle cellule mesangiali e quindi una continua espressione mesangiale della MMP-2 contribuisce all'evoluzione della glomerulosclerosi (Marti, 2002).

Il modello ICGN del topo rappresenta, invece, un modello di glomerulonefrite cronica spontanea e mostra un accumulo di componenti della ECM nei comparti glomerulari e tubulointerstiziali. Il metabolismo anormale della ECM è infatti legato ad un'iperproduzione e ad un'ipodegradazione dei componenti della matrice e può portare alla fibrosi renale. In particolare si notano bassi livelli di MMP-2, MMP-9, MT1-MMP, TIMP-1 e TIMP-2. La diminuzione dei livelli di degradazione della matrice extracellulare da parte delle MMPs esita quindi nell'ispessimento delle membrane basali. I topi ICGN rappresentano un importante modello per studiare i meccanismi molecolari del catabolismo della ECM, e la patogenesi della fibrosi renale (Uchio-Yamada et al., 2005).

Il comportamento controverso sostenuto dalle MMPs in questi due modelli differenti potrebbe essere legato al grado reale di attività del processo patologico in atto.

Nei glomeruli umani, come già accennato, in condizioni fisiologiche la MMP-2 non è rilevabile, mentre la MMP-9 lo è in maniera molto debole (Urushihara M. et al., 2002). Altri autori hanno però dimostrato che in colture cellulari di cellule mesangiali umane (T-HMC) in stato quiescente, oltre alla MMP-9 e pro-MMP-9, è presente sia la MMP-2 che la pro-MMP-2 (Nee L. et al., 2007). L'analisi di glomeruli umani isolati, prelevati da campioni bioptici di rene umano in corso di glomerulonefrite, ha dimostrato un aumento della MMP-9, mentre la MMP-2 aumenta in maniera molto limitata. La MMP-9 è prodotta prevalentemente dalle cellule mesangiali e dai neutrofili infiltrati, mentre macrofagi, cellule epiteliali e cellule endoteliali glomerulari ne producono solo piccole quantità. Inoltre, i livelli di MMP-9, sono significativamente correlati con il grado di proliferazione cellulare glomerulare. Risulta perciò evidente un ruolo fondamentale della MMP-9 nella patogenesi delle glomerulonefriti nell'uomo. Ciò si discosta da molti studi eseguiti su modelli murini, in cui spesso le alterazioni maggiori sono state trovate a carico della MMP-2 (Urushihara M. et al., 2002).

Pattern diversi di espressione delle MMPs e differenze specie-specifiche devono quindi essere ancora ben analizzati (Nee L. et al, 2007).

2.6 PATOLOGIE TUBULO-INTERSTIZIALI

Le lesioni tubulari più frequentemente osservabili sono quelle primarie a carattere degenerativo-necrotico (necrosi tubulare acuta - NTA) su base tossica o da ipoperfusione. In questo tipo di lesioni, la valutazione dello

stadio evolutivo (lesioni acute e croniche) e di alcuni elementi morfologici, quali l'integrità della membrana basale tubulare, rappresenta un fattore prognostico negativo. Le patologie infiammatorie tubulo-interstiziali sono frequentemente osservabili come conseguenza (e quindi associate) di infezioni ascendenti (pielonefriti), anche se possono essere osservate delle forme ematogene (ad es. trombo-embolismi settici) (Castagnaro e Brovida, 2005). Abbiamo già chiarito che il nefrone, essendo un'unità funzionale inscindibile, di fronte ad un insulto di un suo segmento, risponde coinvolgendo in qualche modo tutte le sue strutture. Inoltre vi sono stretti rapporti tra fenomeni regressivi e infiammatori. Ad esempio, la sclerosi di un glomerulo induce la riduzione del flusso ematico al comparto peritubulare provocando inattività ed atrofia in tutto il sistema tubulare da esso dipendente. Lesioni tubulo-interstiziali viceversa possono provocare atrofia glomerulare con un meccanismo di retroazione tubuloglomerulare sul flusso sanguigno glomerulare (Marcato, 2002). Infatti, un danno tubulare secondario ad una glomerulopatia deriva da un danno microvascolare interstiziale, da un ipermetabolismo tubulare compensatorio, o da proteinuria. I segmenti tubulari, quando subiscono danni irreversibili, possono venire rigenerati, tuttavia la rigenerazione di interi nefroni non è possibile. L'unica reazione compensatoria a gravi tubulonefrosi è l'ipertrofia dei nefroni rimasti indenni (Marcato, 2002; Cheng e Lovett, 2003).

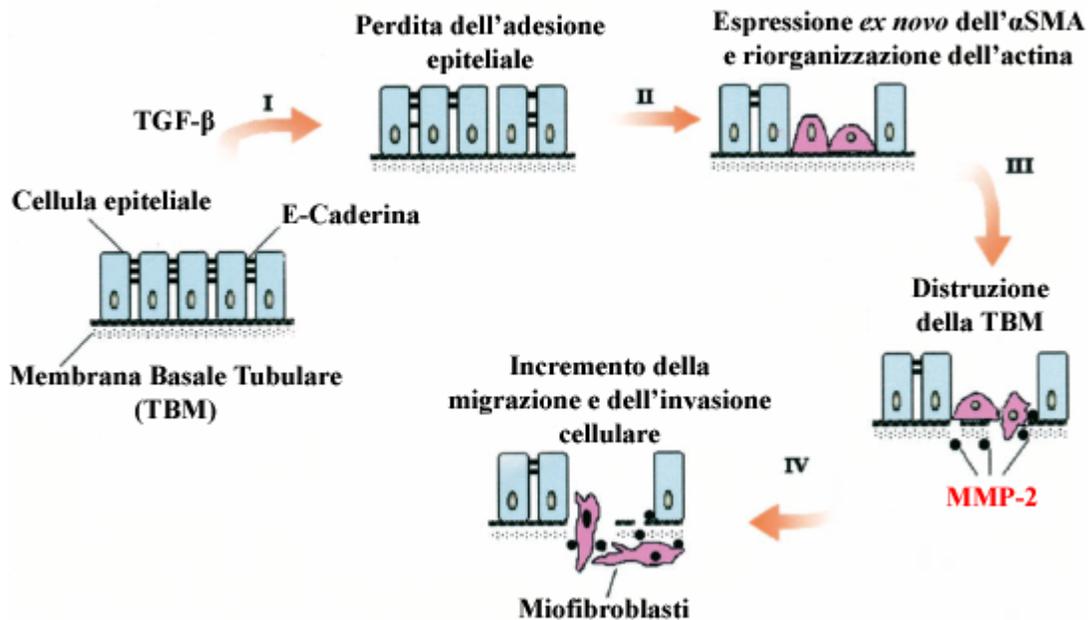
Nelle glomerulopatie, l'atrofia e la perdita tubulare sono l'esito di un ipermetabolismo dei tubuli restanti e determinano un aumento del consumo di O₂. L'ipossia contribuisce alla produzione di matrice da parte dei tubuli e dei fibroblasti e, oltre a stimolare la sintesi di collagene, fa aumentare l'espressione dei fattori di crescita e delle citochine tra cui TGF- β , PDGF, Angiotensina II. Le citochine ed i fattori di crescita stimolano i fibroblasti a diventare miofibroblasti che diventano quindi i

principali componenti dell'interstizio e i più importanti responsabili della deposizione di collagene interstiziale. Questo cambiamento fenotipico, da stato quiescente a stato secretorio, è un evento chiave nella progressione delle nefropatie croniche. Anche le cellule tubulari subiscono cambiamenti fenotipici in risposta a citochine e fattori di crescita. In condizioni fisiologiche, le cellule epiteliali tubulari sono responsabili della produzione di matrice della membrana basale ma, in risposta a stimoli profibrotici, esse sintetizzano matrice e collagene di tipo IV in modo eccessivo. La trasformazione dell'epitelio tubulare rappresenta il processo inverso della differenziazione cellulare mesenchimo-epiteliale della nefrogenesi (Waller e Nicholson, 2001; Cheng e Lovett, 2003).

Questa trasformazione delle cellule epiteliali tubulari in miofibroblasti si esplica in quattro *steps* ben orchestrati ed altamente regolati (fig 10):

1. perdita dell'adesione delle cellule epiteliali (assicurata normalmente dalla E-caderina);
2. espressione *ex novo* di α -SMA (α -Smooth muscle actin) e riorganizzazione dell'actina;
3. distruzione della membrana basale tubulare;
4. aumento della migrazione e dell'invasione cellulare (Yang e Liu, 2001).

Figura 10 – I quattro *steps* della trasformazione epitelio-mesenchimale delle cellule tubulari.



(Yang e Liu, 2001 modificato)

L'integrità della lamina basale è necessaria a mantenere il corretto orientamento del fenotipo epiteliale e, non a caso, nella trasformazione epitelio-mesenchimale si riscontra la distruzione del componente principale della membrana basale: il collagene di tipo IV. La distruzione delle giunzioni cellula-cellula o cellula-matrice potrebbe essere poi un altro meccanismo per tale trasformazione. E' stato dimostrato che nella trasformazione epitelio-mesenchimale, mediata dal TGF-β, vi è un aumento della sola MMP-2 e che solo la MMP-2 è necessaria e sufficiente a questa trasformazione. Non è stato infatti riscontrato un

aumento anche della MMP-9, malgrado la sua simile struttura proteica con l'altra gelatinasi (Waller e Nicholson, 2001; Cheng e Lovett, 2003). La differenza è nella specificità di substrato: la MMP-9 è attiva nei confronti del collagene di tipo IV e V, mentre la MMP-2 oltre a questi substrati è attiva anche contro la fibronectina e la laminina. La trasformazione epitelio-mesenchimale delle cellule epiteliali tubulari mostra un'assoluta dipendenza dalla Gelatinasi A attivata (Waller e Nicholson, 2001; Cheng e Lovett, 2003).

2.6.1 TUBULONEFROSI

Si parla di tubulonefrosi in riferimento a turbe metaboliche del tubulo conseguenti a lesioni regressive acquisite di tipo atrofico, degenerativo, pigmentario, infiltrativo, necrotico. Le tubulonefrosi, in caso di alterazioni regressive causate da ischemia o da nefrotossine, possono determinare gravi turbe funzionali. Le tubulonefrosi comprendono inoltre depositi intracellulari di pigmenti o di proteine, lipidi o carboidrati con o senza evidenti turbe funzionali. Infine, anche il deposito di minerali cristallizzati può causare lesioni regressive con variabili turbe funzionali (Marcato, 2002).

Istologicamente le tubulonefrosi possono manifestarsi con:

- rigonfiamento torbido;
- degenerazione vacuolare;
- degenerazione a gocce ialine;
- steatosi;
- glicogenosi;
- necrosi (Marcato, 2002).

2.6.2 NEFRITI TUBULOINTERSTIZIALI

Le nefriti tubulointerstiziali sono molto più frequenti delle glomerulonefriti, ma spesso sono la conseguenza di glomerulopatie non diagnosticate. Si tratta di processi infiammatori non suppurativi, che si sviluppano primitivamente nell'interstizio intertubulare, e sono caratterizzati da infiltrazioni di mononucleati e da un successivo sviluppo di fibrosi (Marcato, 2002).

Quando vi sono condizioni di proteinuria, la nefrite tubulo-interstiziale (NTI) può derivare da un danno all'epitelio tubulare causato da fattori patogeni filtrati dai glomeruli. Il passaggio di un eccesso di proteine filtrate dal glomerulo nel tubulo (*protein-overload proteinuria*) assume rilievo nel dare inizio alla nefrite tubulointerstiziale determinando:

- un effetto citotossico *per se* in quanto determina rigonfiamento lisosomiale (degenerazione a gocce ialine al microscopio ottico);
- ostruzione, dilatazione dei tubuli e rotture focali della membrana basale che innescano l'infiammazione;
- esaltazione dell'endocitosi e degradazione enzimatica nell'epitelio tubulare;
- liberazione di ferro da transferrina o dai globuli rossi filtrati che può danneggiare i tubuli generando radicali liberi;
- un'esposizione a citochine proinfiammatorie;
- accumulo di frazioni del complemento ultrafiltrate dai glomeruli lesi (Marcato, 2002).

La cronicizzazione della NTI è caratterizzata dalla predominanza relativa di fibroblasti con deposito di reticolina e collagene. L'atrofia tubulare è accentuata dalla fibrosi che determina la scomparsa di interi segmenti di tubuli. La retrazione cicatriziale dei focolai infiammatori conferisce al rene un aspetto macroscopico granuloso e grinzoso. Il fenomeno cruciale

nel processo di cronicizzazione con fibrosi tubulointerstiziale è la lesione dei tubuli. La cronicizzazione del processo infiammatorio dipende dalla persistenza, nell'epitelio o nel lume tubulare, di agenti eziologici (ad esempio nelle forme infettive come la leptospirosi), oppure dalla persistenza di antigeni dei microrganismi nei macrofagi che li hanno fagocitati (Marcato, 2002).

2.6.3 LA SINDROME DI ALPORT

La sindrome di Alport si presenta con una certa frequenza in alcune razze di cani (Samoyedo, Coker, Bull terrier), oltre che nell'uomo e in modelli murini. Si caratterizza come una nefrite a trasmissione ereditaria, dominante, legata o al cromosoma X, o ad un cromosoma autosomico, in cui le lesioni risalgono ad un'anomalia molecolare del collagene tipo IV della membrana basale molecolare, per effetto di una mancata sintesi delle catene $\alpha 3$ o $\alpha 4$ o $\alpha 5$. Questa alterazione comporta istologicamente una glomerulonefrite membrano-proliferativa in età giovanile, che evolve, nel cane, in glomerulosclerosi diffusa con insufficienza renale terminale già all'età di 8-15 mesi (Marcato, 2002).

Al coinvolgimento glomerulare è correlata anche consequenzialmente una nefrite tubulo-interstiziale. Le maggiori alterazioni nell'espressione e nell'attività delle MMPs si evidenziano, in effetti, nella corticale renale, proprio a livello tubulo-interstiziale. Nel modello murino affetto da sindrome di Alport non sono state rilevate alterazioni della MMP-9 a livello glomerulare. Inoltre nello stesso modello la deplezione del gene che codifica per la MMP-9 non comporta alterazioni nella progressione della glomerulonefrite (Andrews K.L., et al.,2000; Rao H. V., et al., 2003). Si è visto invece che, in cani in avanzato stadio di malattia e con elevato grado di fibrosi renale, c'è un rilevante aumento dell'espressione e della quantità delle MMP-2 e 9 (7 e 80 volte rispettivamente rispetto ai

controlli), sia nella loro forma attiva che inattiva. La zimografia *in situ* e l'immunofluorescenza con Ab anti-MMP-2 e 9 hanno confermato che l'attività metalloproteinasica è confinata alle zone periglomerulari, negli spazi interstiziali e sulla superficie della membrana basale tubulare, mentre manca all'interno del glomerulo. Allo stesso modo è stato rivelato un incremento della MT1-MMP a livello dell'interfaccia tra le cellule epiteliali tubulari e la membrana basale. La MT1-MMP, oltre a partecipare attivamente alla degradazione della ECM, è essenziale per l'attivazione della MMP-2 (Rao H. V., et al., 2003). Anche altre MMP, quali la 3, 7 e la 14 sono sovraesprese in questa patologia. Le MMP-3 e 7 possono contribuire all'attivazione della MMP-9. Di queste, solo la MMP-7 è stata trovata anche a livello glomerulare, mentre tutte le altre sono localizzate a livello tubulo-interstiziale. E' tuttavia vero che nel glomerulo la proliferazione delle cellule mesangiali e il deposito di matrice extracellulare precedono la sclerosi, quindi è possibile che alcune alterazioni riguardanti le MMPs glomerulari non siano più rilevabili nello stadio di sclerosi avanzata (Rao H. V., et al., 2005). Sempre lo stesso autore ha riscontrato, nello stadio precoce della malattia, che nel glomerulo c'è un aumento significativo delle MMP-3 e 9 (5 volte), ma soprattutto un aumento di 40 volte della MMP-12, prodotta dai podociti glomerulari. L'inibizione specifica della MMP-12 può inoltre ritardare o riparare le lesioni alla membrana basale glomerulare negli stadi precoci della malattia (Rao H. V., 2006)

La sclerosi interstiziale inizia in seguito all'infiltrazione di cellule infiammatorie, attraverso la produzione di citochine, *grow factor*, MMPs, TIMPs e altri mediatori. I monociti infiltrati, possono indurre l'atrofia tubulare con o senza l'intervento dei miofibroblasti locali e avere quindi un ruolo fondamentale nella progressione della malattia renale in corso di sindrome di Alport (Rao H. V., et al., 2005).

2.7 SIGNIFICATO CLINICO DELLA VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' DELLE MMPs

L'importanza diagnostica e prognostica delle metalloproteinasi è stata ampiamente ribadita in numerosi studi (Ebihara et al., 1998; Zaoui et al., 2000; Marti et al., 2002; Eikmans et al., 2004). Nell'ultimo decennio la misurazione delle MMPs e dei loro inibitori (TIMPs) in fluidi biologici, quali sangue e urine, ha suscitato un interesse sempre maggiore in prospettiva di un aiuto nella prognosi e nella diagnosi di molte malattie. Nel 1986 le MMPs sono state identificate nel sangue circolante e, in seguito, sono stati definiti i livelli medi fisiologici delle MMPs 1, 2, 3, 9 e dei TIMPs 1 e 2 nel plasma e nel siero del sangue umano (Zucker et al., 2004).

Tuttavia si devono considerare alcuni limiti tecnici di queste analisi. Un'importante considerazione da fare per la misurazione delle MMPs in caso di patologie è la distribuzione bimodale dei livelli ematici di MMPs nei soggetti sani. Ad esempio, è stato notato come circa il 20% di soggetti sani ha livelli ematici di MMP-9 quasi doppi rispetto al resto della popolazione e si ritiene pertanto che queste variazioni all'interno di una stessa popolazione siano probabilmente imputabili a differenze genetiche. Un'altra considerazione va fatta sulle differenze dei livelli di MMPs legate al sesso: il valore sierico medio della stromolisina-1 (MMP-3) nell'uomo è circa due volte quello della donna. Inoltre i livelli sierici della MMP-3 aumentano talvolta con l'aumento dell'età (Zucker et al., 2004).

Basandosi sul ruolo delle MMPs in determinate malattie, molti ricercatori hanno analizzato i livelli delle MMPs e dei TIMPs nel sangue e nelle urine di pazienti con diverse patologie, definendone l'importanza diagnostica e prognostica. Così, in pazienti umani affetti da neoplasia

prostatica, alti livelli urinari di MMP-9 dimostrano un'importanza prognostica per il potenziale metastatico, mentre gli elevati livelli urinari della MMP-2 hanno importanza per la diagnosi di metastatizzazione. Le concentrazioni urinarie delle MMPs 2 e 9 hanno anche un importante valore per diagnosticare il potenziale metastatico delle neoplasie vescicali (Zucker et al., 2004).

In pazienti umani con diabete mellito di tipo II, i livelli medi della MMP-9 nelle urine, non solo sono significativamente più elevati rispetto ai soggetti sani, ma il loro aumento è proporzionale allo stadio clinico della malattia ed è in relazione col danno glomerulare. Inoltre l'aumento dell'escrezione urinaria della MMP-9 avviene nello stadio precoce (normoalbuminurico o microalbuminurico) della nefropatia diabetica di tipo II (Tashiro et al., 2004).

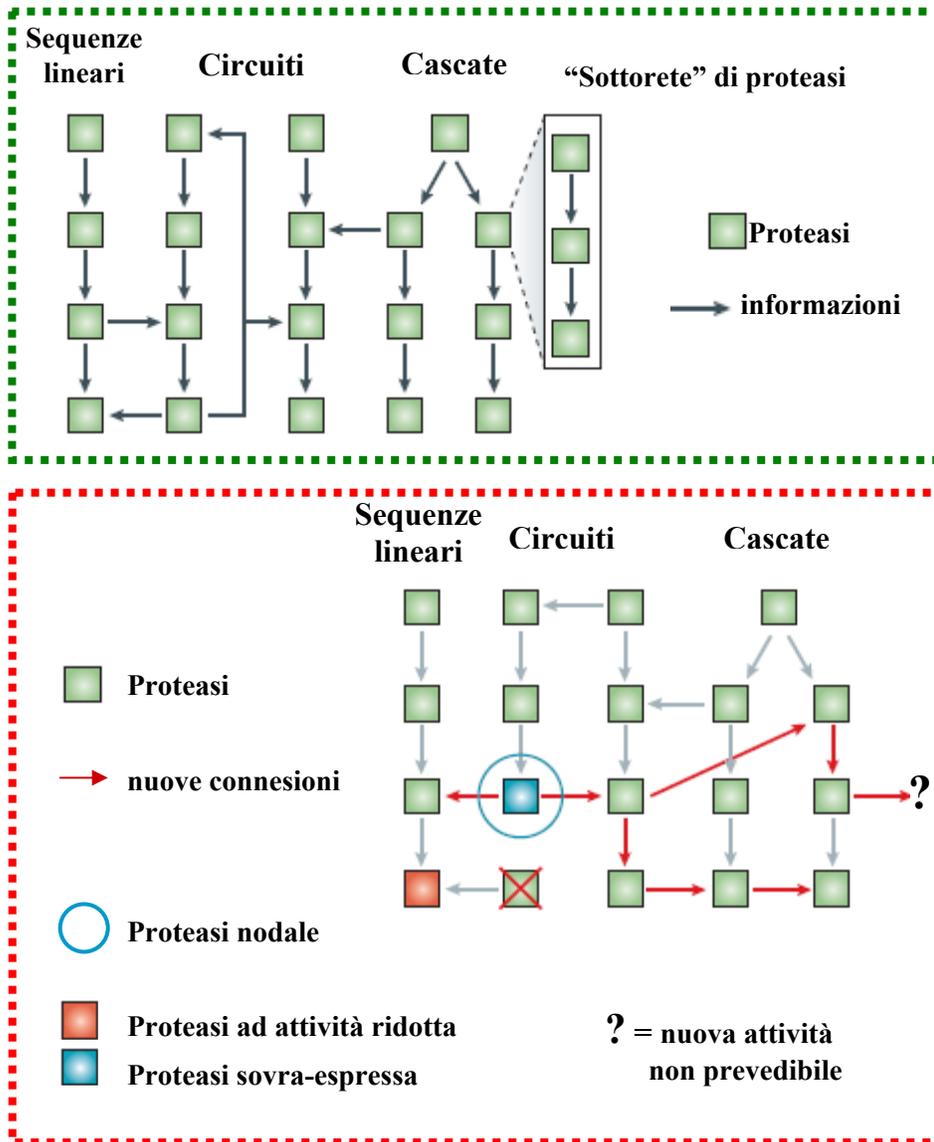
Poiché le metalloproteinasi hanno dei ruoli importanti in determinate fasi patogenetiche di una malattia (come ad esempio la penetrazione attraverso la membrana basale delle metastasi, oppure la trasformazione epitelio-mesenchimale delle cellule tubulari renali) si è ipotizzato che l'inibizione della loro attività possa fornire delle nuove opportunità terapeutiche. Tuttavia le funzioni di queste proteasi sono molto complesse e la loro attività è anche associata a molti processi fisiologici e/o protettivi. L'opportunità terapeutica esiste quindi solo se l'inibizione delle MMPs non comporta un contemporaneo stravolgimento di quei meccanismi fisiologici o protettivi in cui le stesse MMPs sono coinvolte (Cheng e Lovett, 2003; Overall e Kleifeld, 2006).

Abbiamo già evidenziato il ruolo delle MMPs nella patogenesi e nella progressione delle nefropatie, comprendendo i duplici effetti (protettivi e/o negativi) che le MMPs possono determinare. Anche in oncologia è stata studiata la complessità delle funzioni delle metalloproteinasi. Esse promuovono infatti la progressione dei tumori non solo attraverso la

degradazione della ECM, ma anche tramite le funzioni di signaling. Controllando l'apoptosi, coordinando la neoangiogenesi ed alcuni meccanismi immunitari, le MMPs contribuiscono alla metastatizzazione ed alla crescita neoplastica. Però le MMPs hanno anche delle funzioni protettive: reprimono l'angiogenesi in alcuni modelli murini e clivano ed inattivano le chemochine che mediano le metastasi organo-specifiche (Overall e Kleifeld, 2006).

Nella terapia contro la progressione delle metastasi, la strategia di inibire le MMPs non ha ottenuto i risultati sperati, poiché l'inibizione ha determinato la perdita involontaria delle funzioni anti-tumorali espresse dalle MMPs (Overall e Kleifeld, 2006).

Figura 11 – Biologia dei sistemi della “rete” delle proteasi



Area tratteggiata verde: i quadrati rappresentano le proteasi o “sottoreti” di proteasi che operano come un sistema unico; le frecce indicano il flusso di informazioni.

Area tratteggiata rossa: stato patologico o stato alterato da inibitori delle MMPs (MMPI). Spiegazione nel testo. (Overall e Kleifeld, 2006 modificato)

La figura 11 illustra come le proteasi non operino da sole, ma nell'ambito di una "rete" biologica caratterizzata da flussi d'informazioni che interconnettono le varie proteasi. In questo sistema le interconnessioni sono più importanti delle stesse proteasi. Normalmente (area verde tratteggiata), le informazioni possono viaggiare a senso unico in un contesto di sequenze lineari e di cascate d'amplificazione, oppure essere delle informazioni feedback nell'ambito di circuiti regolatori. La "rete" delle proteasi non è in equilibrio ma in continuo cambiamento, in più il tutto è complicato dalla presenza di proteine d'interazione, recettori, substrati, prodotti di clivaggio e inibitori. Negli stati patologici o negli stati farmacologicamente alterati da inibitori delle MMPs (MMPI) (area rossa tratteggiata), la "rete" subisce dei cambiamenti che possono portare a dei meccanismi di sovra-espressione o d'inibizione di alcune proteasi che a loro volta determinerebbero degli sconvolgimenti nella trasmissione delle informazioni. Ad esempio, una proteasi sovra-espressa (quadrato blu) instaura nuove connessioni (freccie rosse) che inducono nuove attività non prevedibili (punto interrogativo) che promuovono, a loro volta, la progressione della malattia. Una proteasi (quadrato barrato con la X rossa), la cui espressione è stata ridotta da delezione o da un farmaco specifico, perde le connessioni con la "rete" e determina effetti a valle riducendo l'attività di altre proteasi (quadrato rosso) (Overall e Kleifeld, 2006). L'identificazione di proteasi nodali (cerchio blu) ovvero proteasi che hanno connessioni cruciali all'interno della rete, permetterà di identificare nuovi target farmaceutici. Un buon farmaco inibitore delle proteasi (MMPI) deve ristabilire, nella "rete", le normali attività alterate dalla patologia (Overall e Kleifeld, 2006).

Lo studio dei nuovi farmaci inibitori (MMPI) dovrà distinguere le metalloproteinasi come *targets*, *anti-targets*, *counter-targets* di un determinato farmaco.

Il **target** è una molecola che contribuisce senza ambiguità all'insorgenza o alla progressione di una patologia. Quando la sua attività subisce una modulazione negativa da parte di un farmaco, viene ristabilito lo stato fisiologico della cellula o del tessuto.

Per **anti-target** si intende una molecola che ha dei ruoli essenziali nelle funzioni della cellula e del tessuto normale. La *down-modulation* di un *anti-target* comporta degli effetti collaterali clinicamente non accettabili, l'insorgenza di una malattia, o delle complicazioni nella progressione della malattia stessa.

Il **counter-target** è invece una proteina omologa del target ma non ha un ruolo significativo nella patologia. Quando è modulato da un farmaco, il *counter-target* ha la potenzialità di produrre effetti collaterali oppure alterare in modo indesiderato alcune funzioni. Per le MMPs si può parlare di "*family counter-targets*". Esse infatti fanno parte di una famiglia di proteine con elevati gradi di omologia. Un farmaco può avere come target un solo membro della famiglia, ma quando il farmaco modifica anche altre proteine della stessa famiglia non implicate nella patogenesi della patologia, queste proteine sono definite *family counter-targets* (Overall e Kleifeld, 2006).

Capitolo 3

DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA DELLE MMP-2 E MMP-9

3.1 INTRODUZIONE

Per misurare l'attività di un enzima la scelta del metodo analitico dipende strettamente dagli obiettivi quali e quantitativi dello studio. Questo è particolarmente importante nel caso delle MMPs. I loro substrati naturali infatti sono di solito proteine insolubili (o scarsamente solubili), miscele complesse di proteine e macromolecole, componenti strutturali della matrice extracellulare (Lombard et al., 2005).

Per quantificare la loro attività enzimatica, la scelta cade tra tecniche facili con substrati sintetici, che però non sempre dimostrano l'attività biologica degli enzimi, e tra metodi più scomodi e complessi che usano proteine native (*native proteins*) o proteine modificate. Per studi sull'attività delle metalloproteinasi è utile sfruttare come substrati le proteine native, mentre, per le indagini sui loro inibitori, le tecniche con substrati sintetici risultano più semplici e veloci. Per quanto riguarda le analisi sui fluidi biologici, queste sono complicate dalle interferenze di altre molecole (principalmente inibitorie), e dalle specificità simili di MMPs differenti. L'immunochimica in molte circostanze può sostituire le analisi enzimatiche, sebbene spesso non discrimini tra zimogeni e forme attive (Lombard et al., 2005).

Le valutazioni dell'attività delle metalloproteinasi potrebbero essere classificate schematicamente in:

- Analisi che utilizzano peptidi lineari sintetici;
- Analisi che utilizzano peptidi a tripla elica;
- Analisi che utilizzano proteine (modificate o non);

3.2 ANALISI CHE UTILIZZANO PEPTIDI LINEARI SINTETICI

La maggior parte delle analisi che utilizzano substrati peptidici sono esami fluorimetrici e basati sul “*quenching*” di trasferimento dell'energia di risonanza (*FRET: Fluorescence resonance energy transfer*). Un tale effetto si ha tra un gruppo donatore di fluorescenza (*dye*) e uno accettore (*quencher*) ad un'ottimale distanza tra loro. L'idrolisi del substrato e la separazione di entrambi i frammenti annulla il trasferimento di energia e induce l'interruzione dell'emissione di fluorescenza. Questo principio generale è stato applicato per le analisi fluorimetriche di molti enzimi proteolitici.

Le analisi fluorimetriche sono adatte per le indagini sulle MMPs e per i test sugli inibitori, tuttavia si è notato che i cambiamenti di fluorescenza non sono lineari con le concentrazioni del substrato. Inoltre i substrati fluorescenti sono sensibili e rapidi ma non sempre rappresentano l'attività degli enzimi *in vivo* (Lombard et al., 2005).

3.3 ANALISI CHE UTILIZZANO PEPTIDI A TRIPLA ELICA

Gli studi sugli esatti meccanismi d'azione delle MMPs e dei TIMPs hanno portato allo sviluppo di peptidi a tripla elica, al fine di sfruttare

molecole che corrispondono ai substrati nativi. Tuttavia i peptidi a tripla elica non sono semplici da sintetizzare e non si trovano al momento in commercio (Lombard et al., 2005).

3.4 ANALISI CHE UTILIZZANO PROTEINE

Per misurare l'attività delle MMPs il metodo migliore sarebbe usare come substrato le loro più specifiche proteine native. Tuttavia la quota idrolizzata è bassa e la sensibilità non è elevata. Perciò sarebbe l'ideale utilizzare proteine marcate (Lombard et al., 2005).

3.4.1 ANALISI CHE UTILIZZANO PROTEINE MARCATE

Sono state sviluppate diverse metodiche che sfruttano proteine legate a radioelementi o a gruppi fluorescenti, analisi di citometria a flusso o analisi spettrofotometriche con gelatine succinilate, ma un metodo semplice, poco costoso e altamente sensibile è quello che sfrutta gelatina biotinilata (*Biotinylated gelatin*).

Biotinylated gelatin è una tecnica basata sul seguente principio: dopo la degradazione dei complessi gelatina-biotina, da parte delle MMPs, vengono usate delle piastre rivestite di streptavidina. Le piastre catturano solo i frammenti proteolitici contenenti biotina. Questi ultimi sono poi rivelati da un complesso enzimatico streptavidina-perossidasi (HRP) aggiunto al medium. L'attività dell'HRP viene quindi misurata con un substrato colorimetrico standard. Minore è l'assorbanza, maggiore è il substrato degradato (Ratnikov et al. 2000).

Questo rapidissimo test (sono sufficienti 2 ore) permette la misurazione dell'attività gelatinolitica della MMP-2 per piccole concentrazioni come 0.16 ng/ml. Una relazione lineare tra la diminuzione dell'assorbanza e la

concentrazione enzimatica è stata dimostrata in un range tra 0.15 e 2.5 ng/ml (Lombard et al., 2005).

3.4.2 ANALISI CHE UTILIZZANO PROTEINE NON MODIFICATE

L'analisi spettrofotometrica dell'idrossiprolina negli idrolisati ha più valore per uno studio sull'attività collagenolitica delle metalloproteinasi batteriche piuttosto che per quelle della matrice extracellulare.

Attraverso misurazioni di fluorescenza sono state monitorate l'idrolisi e la separazione con HPLC di peptidi degradati dalle collagenasi tissutali. Molto recentemente, un'elettroforesi in gel capillare con rivelazione di fluorescenza dinamica laser-indotta, con un colorante fluorescente non-covalente (NanoOrange), è stata applicata nelle analisi delle Collagenasi 1, 2 e 3 (rispettivamente MMP-1, MMP-8 e MMP-13) che hanno come substrato il collagene a tripla elica. La metodica è stata applicata con successo anche nell'analisi degli inibitori (Lombard et al., 2005).

Una delle tecniche più diffuse per misurare l'attività delle metalloproteinasi è, ad oggi, la zimografia.

3.5 LA ZIMOGRRAFIA

Questa tecnica ha permesso di ottenere una elevata quantità di dati sull'attività proteasica delle MMPs. La zimografia prevede un'elettroforesi attraverso un gel di poliacrilamide che incorpora un substrato copolimerizzato per le proteasi (gelatina). La gelatina, infatti, altro non è che collagene di tipo I denaturato, il più comune ed

economico substrato specifico per le Gelatinasi (MMP-2 e MMP-9) (Ratnikov et al., 2000; Lombard et al., 2005).

L'elettroforesi è di solito eseguita in SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfate), un detergente ionico denaturante. Dopo la corsa, le proteasi vengono "rinaturate" con un tampone a base di detergente non-ionico, il Triton X-100. Questo passaggio ha notevole importanza poiché il Triton X-100, essendo un detergente poliossietilenico, rimuove l' SDS dal gel e dalle proteine, rinaturandole. Il gel viene quindi incubato in un buffer di sviluppo che fornisce i cationi metallici bivalenti necessari per l'attività delle gelatinasi. Il periodo d'incubazione è variabile in funzione della matrice del campione, della sua concentrazione e della sensibilità dell'indagine. Le gelatinasi degradano quindi il substrato di gelatina, lasciando delle zone di digestione che, dopo la colorazione, possono essere evidenziate e/o quantificate come bande più chiare rispetto allo sfondo blu scuro (Woessner, 1995; Von Jagow et al., 2003; Lombard et al., 2005).

La zimografia è quindi una tecnica basata sulla capacità delle MMPs, denaturate dall' SDS, di digerire il proprio substrato, la gelatina, una volta che lo stesso denaturante SDS viene rimosso (Woessner, 1995).

Per la Gelatinasi A (MMP-2) può essere evidenziata una correlazione lineare tra 10 e 120 pg, dopo un periodo di digestione di 18 ore, e, dopo un'incubazione di 43 h, il suo limite di rilevazione può essere ridotto fino a 2 pg (Lombard et al., 2005).

La Gelatinasi B (MMP-9) ha un limite di rilevazione pari a 32 pg, e un range di linearità al di sotto di 1 ng (Leber e Balkwill, 1997).

La zimografia potrebbe essere inoltre eseguita in modo inverso, sviluppata cioè per rilevare gli inibitori delle metalloproteinasasi (TIMPs). In questo caso una proteinasasi viene incorporata nel substrato contenente il gel. La metodica è stata applicata per la valutazione quantitativa

dell'attività dei TIMPs usando come substrati gelatina e caseina (Lombard et al., 2005).

La zimografia è stata anche applicata in situ (Mungall e Pollitt, 2001). In situ zymography (ISZ) è un adattamento del substrato della zimografia a sezioni di tessuto congelati, ed è una tecnica che può essere sfruttata per localizzare l'attività proteasica nel tessuto. Un substrato enzimatico, specifico per le MMPs, viene depositato sopra o sotto una sezione congelata di un tessuto non fissato. Durante il periodo di incubazione, il substrato viene digerito e, al termine dell'incubazione, la lisi del substrato può essere rilevata con un microscopio ottico o a fluorescenza, permettendo così la precisa localizzazione dell'attività proteasica nella sezione di tessuto (Yan e Blomme, 2003).

I limiti attuali della ISZ sono una scarsa risoluzione ed una limitata capacità di quantificare accuratamente l'attività proteasica, sebbene gli sviluppi e le future applicazioni di questa tecnica siano promettenti. La ISZ ha una grande potenzialità nella validazione dei modelli utilizzati per testare l'efficacia di diversi inibitori sperimentali delle proteasi. Infatti un passo critico dopo l'identificazione di un ipotetico target terapeutico è validare la relazione tra il target stesso e il processo patologico. La zimografia in situ potrebbe inserirsi nella validazione dei modelli preclinici animali, consentendo ai ricercatori di dimostrare, in un modo relativamente rapido ed economico, il corretto rapporto tra attività proteasica e il tessuto bersaglio patologico (Yan e Blomme, 2003).

Analogamente, nell'ambito di trattamenti terapeutici con inibitori sperimentali delle metalloproteinasi, l'applicazione della ISZ su campioni biotici, potrebbe fornire importanti informazioni per valutare l'efficacia clinica dei composti farmaceutici, e determinare le dosi efficaci dei composti stessi (Yan e Blomme, 2003).

3.6 ANALISI SUL TRAFFICKING DELLE MMPs

Il trafficking della MT-1MMP è stato studiato mediante l'*uptake* di anticorpi e il *delivery Chariot* (Remacle et al., 2005).

E' stato impiegato un reagente Chariot di nuovo sviluppo. Questo reagente non covalente permette la consegna (*delivery*) delle proteine, inclusi gli anticorpi, all'interno della cellula. Seguendo la penetrazione attraverso la membrana cellulare, il complesso anticorpo *Chariot*-mediato si dissocia all'interno della cellula e libera l'anticorpo. Quest ultimo, una volta liberato, interagisce con la proteina target e quindi permette l'identificazione dei compartimenti subcellulari che racchiudono le proteine target stesse. Le cellule poi vengono colorate per l' α -tubulina, un marker del citoscheletro di microtubulina. L'*uptake* degli anticorpi è stato poi utilizzato per confermare l'esistenza del trasporto vescicolare della MT1-MMP cellulare. Grazie a questa tecnica è stato confermato come il citoscheletro di microtubulina giochi un ruolo chiave nell'esocitosi e nell'endocitosi della MT1-MMP (Remacle et al., 2005).

In conclusione, lo sviluppo di una tecnica sensibile, specifica e rapida per l'analisi delle MMPs sarebbe l'ideale. Purtroppo nessuna delle metodiche menzionate soddisfa a pieno questi requisiti. L'uso di substrati naturali mima la vera attività delle MMPs ma richiede molto tempo ed è tecnicamente complesso. I substrati fluorescenti sono sensibili, rapidi ma non sempre rappresentano l'attività in vivo degli enzimi.

I peptidi a tripla elica sembrano un buon compromesso ma i substrati non sono semplici da sintetizzare e non si trovano al momento in commercio.

Un confronto diretto tra zimografia e fluorimetria dimostra che la prima è più sensibile ma la fluorimetria è più indicata per indagare l'attività degli inibitori (Lombard et al., 2005).

Parte II:
SPERIMENTAZIONE

Capitolo 4

MATERIALI E METODI

4.1 SOGGETTI SELEZIONATI

Nel presente lavoro sono stati analizzati campioni di tessuto renale ed urine prelevati su soggetti deceduti spontaneamente o sottoposti ad eutanasia. In particolare, 9 soggetti presentavano una diagnosi clinica di nefropatia a differente eziologia. Otto ulteriore soggetti sono stati inclusi come controllo negativo, deceduti per cause non imputabili a nefropatia.

4.2 CAMPIONI DI URINE

4.2.1 METODI DI RACCOLTA, PROCESSAZIONE E CONSERVAZIONE DELL'URINA

I campioni di urina sono stati prelevati o per cistocentesi, o per minzione spontanea, o per spremitura della vescica o tramite catetere uretrovescicale.

Per ogni paziente sono stati raccolti almeno 5 ml di urina in una siringa sterile (in caso di cistocentesi e di catetere) o in un contenitore monouso pulito (per gli altri metodi di raccolta).

La procedura alla quale sono stati sottoposti i campioni è stata standardizzata come segue:

1. processazione del campione entro trenta minuti dalla raccolta o, quando non è stato possibile, il campione è stato mantenuto ad una temperatura di +4°C per un periodo non superiore alle 4 ore;
2. suddivisione del campione in due aliquote, una maggiore ed una minore;
3. esame chimico-fisico e del sedimento urinario dell' aliquota minore;
4. centrifugazione dell' aliquota maggiore a 400g per 10 minuti;
5. prelievo del surnatante e suddivisione ulteriore in diverse aliquote;
6. stoccaggio delle aliquote a -20°C per le successive determinazioni (valore delle proteine totali urinarie e zimografia);
7. determinazione delle proteine totali urinarie con metodo colorimetrico al rosso di pirogallolo (Urinary/CSF Protein OSR6170 Olympus system reagent);
8. zimografia.

4.2.2 ZIMOGRRAFIA URINE

Per indagare e caratterizzare l'attività enzimatica delle MMPs 2 e 9 abbiamo scelto la tecnica zimografica.

Scongelati i campioni, si è provveduto alla loro concentrazione o diluizione al fine di ottenere un' omogenea concentrazione proteica pari a 5µg.

Ad ogni campione è stato aggiunto un Loading Buffer a base di Tris, Glicina e SDS (*Novex® Tris-Glycine SDS Sample Buffer 2X Invitrogen™*). I campioni sono stati quindi caricati su gel da zimografia (*Novex® 10% Zymogram Gelatin Gel Invitrogen™*) aventi le seguenti caratteristiche:

- matrice del gel: Acrilamide;

- Bis-Acrilamide: 2.6% ;
- spessore: 1.0mm ;
- pH: 8.6 ;
- Tris-Glicina: 10% ;
- substrato: gelatina 0.1% ;
- sensibilità del gel: 10^{-6} unità di collagenasi ;

E' stato utilizzato un buffer di corsa contenente Tris, Glicina e SDS (*Novex® Tris-Glycine SDS Running Buffer Invitrogen™*).

La corsa è stata eseguita per 90' con una cella elettroforetica (*XCell SureLock™ Mini-Cell Invitrogen™*) ad un voltaggio costante di 125V e ad una corrente di 35 mA/gel. Al termine della corsa i gel sono stati immersi in un tampone rinaturante (*Novex® Zymogram Renaturing Buffer Invitrogen™*) per 30', in lieve agitazione su un agitatore orbitale, a temperatura ambiente. Trasferiti in un buffer di sviluppo (*Novex® Zymogram Developing Buffer Invitrogen™*) a temperatura ambiente, in lieve agitazione, per 30', i gel sono stati quindi incubati per 48 ore, in un identico tampone di sviluppo "fresco", a 37°C, in lieve agitazione.

Si è provveduto a sostituire il tampone di sviluppo alla scadenza delle 24 ore e, al termine dell'incubazione, sono stati eseguiti tre lavaggi di 5' ciascuno con acqua deionizzata. I gel sono stati colorati per una notte con 100 ml di *SimplyBlue™ SafeStain Invitrogen™*, a temperatura ambiente su un agitatore orbitale.

4.3 CAMPIONI DI TESSUTO RENALE

4.3.1 METODI DI PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

I prelievi, di uno o entrambi i reni, sono stati eseguiti presso l'Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria dell'Alma Mater Studiorum – Università di Bologna.

Per ogni campione di tessuto si è provveduto:

1. alla fissazione in formalina per l'allestimento del preparato istologico;
2. allo stoccaggio di almeno 100 mg di rene, in un contenitore monouso, alla temperatura di -20°C, per le successive operazioni (omogeneizzazione, estrazione delle proteine e zimografia);
3. omogeneizzazione dei campioni;
4. estrazione delle proteine;
5. zimografia.

4.3.2 OMOGENEIZZAZIONE DEI CAMPIONI, ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DELLE PROTEINE

Abbiamo provveduto alla preparazione di un Lysis Buffer così costituito:

- Tris HCl pH8 50 mM
- Triton X-100 0.25% (v/v)
- NaCl 150 mM
- H₂O MilliQ

La procedura alla quale sono stati sottoposti i campioni è stata standardizzata come segue:

1. i tessuti, stoccati a -20°C , sono stati portati alla temperatura di $+4^{\circ}\text{C}$ circa 6-10 ore prima dell'inizio dell'omogeneizzazione, e quindi a temperatura ambiente;
2. i campioni sono stati sezionati e pesati per ottenere aliquote di 100mg;
3. sospensione dei campioni nel Lysis Buffer, precedentemente costituito, ad un rapporto 1:100 (100mg di campione in 1ml di Lysis Buffer);
4. omogeneizzazione con ultraturrax per 1';
5. centrifugazione dell'omogenato a $1500\text{g} \times 10'$ a $+4^{\circ}\text{C}$;
6. prelievo e suddivisione del surnatante in due aliquote;
7. immediato stoccaggio di una aliquota a -80°C per la successiva zimografia;
8. stoccaggio della restante aliquota a $+4^{\circ}\text{C}$ e, entro 24 ore dall'omogeneizzazione, determinazione del valore delle proteine totali.

4.3.3 ZIMOGRAFIA TESSUTO RENALE

Gli estratti proteici, congelati ad una temperatura di -80°C , sono stati portati ad una temperatura di -20°C e quindi a $+4^{\circ}\text{C}$. A differenza delle zimografie eseguite sui campioni urinari, gli omogenati di tessuto renale sono stati diluiti, o concentrati, al fine di avere una concentrazione proteica finale pari a $30\mu\text{g}$. La zimografia degli omogenati renali è stata eseguita rispettando il protocollo già descritto per i campioni urinari, apportandovi però delle modifiche riguardo ai tempi d'incubazione e, come abbiamo già detto, alle concentrazioni proteiche.

Si rimanda quindi alla descrizione della zimografia dei campioni di urine, specificando però che l'incubazione per i gel degli omogenati renali è stata di 24 ore (a 37°C, in lieve agitazione) e non di 48.

4.4 ANALISI STATISTICA

I risultati dell'analisi zimografica sono stati riportati mediante statistica descrittiva. La riproducibilità del test sia intra-assay sia inter-assay è stata valutata mediante misurazione in replicato sullo stesso gel (intra-assay) o su differenti gel (inter-assay) dei medesimi campioni. La precisione è stata espressa come coefficienti di variazione (CV%) calcolati secondo la seguente formula: deviazione standard replicati/media replicati. I dati sono stati infine correlati mediante Spearman R per dati non parametrici. Per l'analisi della distribuzione tra la popolazione di campioni di cani con reni normali e patologici è stato utilizzato il test U di Mann-Whitney. Sono stati ritenuti significativi valori di $p < 0.05$.

Capitolo 5

RISULTATI

5.1 RISULTATI ZIMOGRAFIA

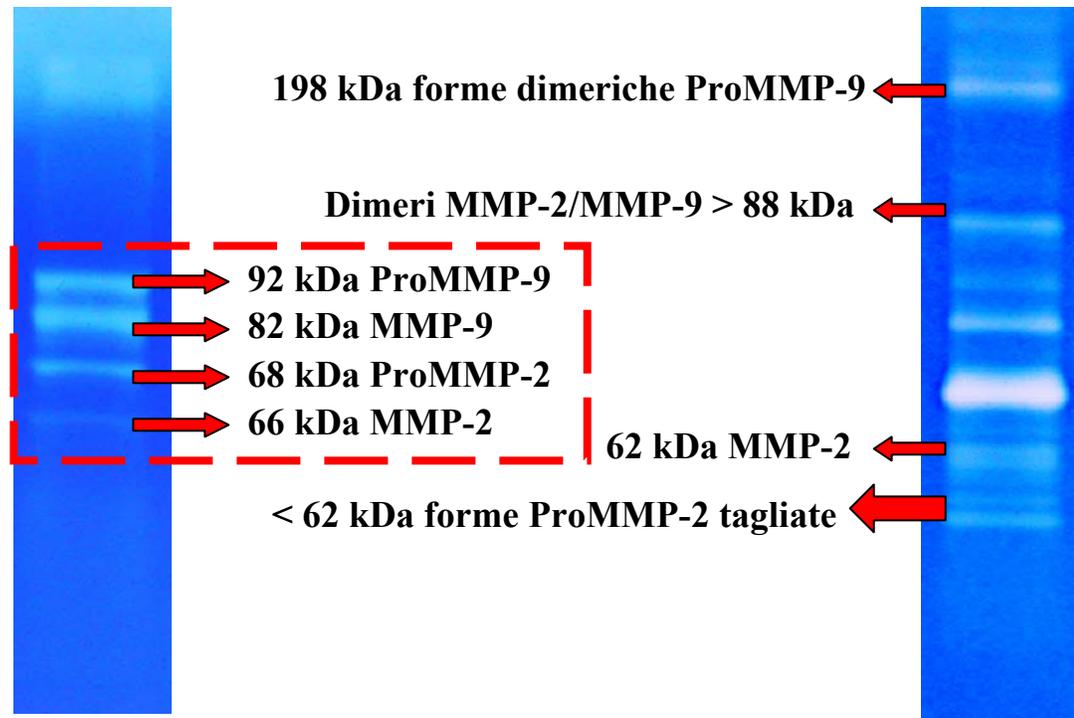
Tutte le forme di Gelatinasi (attive e non) hanno mostrato la loro attività enzimatica con delle bande di digestione di pesi molecolari approssimativamente di 92, 82, 68, 66 e 62 kDa (vedi figura 12).

Le bande di 92 e 82 kDa corrispondono alle forme inattive e attive della Gelatinasi B canina, rispettivamente ProMMP-9 e MMP-9. La Gelatinasi A è stata rilevata in forma inattiva dalle bande di 68 kDa (ProMMP-2 canina) e, nella forma attivata, dalle bande di digestione di 66 e 62 kDa (MMP-2 canina) (Gentilini et al., 2005; Loukopulos et al., 2003). Forme dimeriche della proMMP-9 determinano bande approssimativamente di 198 kDa (Bee et al., 2000) così come possono essere evidenziate delle bande maggiori di 88 kDa riferibili a dimeri MMP-2/MMP-9. Inoltre possono essere presenti bande di digestione inferiori ai 62 kDa che indicano forme proteoliticamente tagliate della ProMMP-2 (Coughlan et al., 1998; Bergman et al., 2002).

La quantificazione dell'attività gelatinolitica delle MMP-2 e 9 è stata eseguita solo per le bande di digestione di peso molecolare indicativo di 92, 82, 68, e 66 kDa (vedi riquadro tratteggiato figura 12).

Talvolta le bande possono non essere ben distinguibili tra loro poiché si ha la formazione di complessi MMPs e prodotti di degradazione che determinano nel gel di zimografia una “colatura”, una “macchia”, che appunto viene definita col termine di “*smear*”.

Figura 12 – Interpretazione delle bande di digestione in zimografia



A sinistra, zimografia di un campione che presenta le quattro forme di Gelatinasi A e B (ProMMP-2, MMP-2, ProMMP-9, MMP-9) che determinano quattro bande di digestione corrispondenti al peso molecolare approssimativo indicato dalle frecce.

A destra, le frecce indicano le bande di digestione delle forme dimeriche e delle forme proteoliticamente tagliate delle MMPs. Nella zimografia di destra sono state omesse le frecce che indicano proforme e forme attivate della MMP-2 e 9.

Il riquadro tratteggiato indica le bande gelatinolitiche oggetto della quantificazione.

5.1.1 DESCRIZIONE PATTERN ZIMOGRAFICI DEI TESSUTI

I campioni n° 5 (tabella 4) e dall'11 al 17 (Figura 17) sono campioni provenienti da cani con reni sani. I campioni dall'11 al 17 sono stati fatti correre in doppio e la quantificazione delle bande di digestione è il risultato della media dei due valori, in previsione delle successive correlazioni. I restanti campioni provengono da cani affetti da diverse patologie renali come illustrato nella tabella 4.

Le MMPs sono risultate presenti in quasi tutti i campioni di tessuto esaminati, ma con pattern differenti e bande di digestione di diversa intensità.

Nei campioni di rene sano la banda di **92 kDa** (ProMMP-9) è rappresentata da un'area di digestione di modica intensità, assente nel campione 13, mentre tutti i campioni patologici mostrano la stessa banda molto marcata, soprattutto i campioni n°2, 3, 4, 6, 10 e 1. In questo ultimo, la banda si estende fin quasi a raggiungere la banda inferiore di 82 kDa (MMP-9) creando così un lieve *smear*.

La banda del peso molecolare approssimativo di **82 kDa** indica la forma attivata della Gelatinasi B (MMP-9). Essa, come riscontrato per la banda corrispondente alla ProMMP-9, è scarsamente rappresentata nei campioni sani, tranne per il campione n° 11, dove è ben rappresentata. Inoltre la stessa banda si nota in tutti i campioni patologici e nei campioni 1, 2, 3 e 6 ha un'intensità maggiore.

Possiamo dire che la banda corrispondente alla ProMMP-9 è rappresentata nei tessuti sani in maniera uguale o modicamente maggiore rispetto alla banda della MMP-9, tranne che nel campione n° 11 dove è decisamente inferiore rispetto alla sua proforma. Nei tessuti patologici invece c'è spesso una predominanza della forma ProMMP-9 sulla forma attiva.

La banda di **68 kDa** (ProMMP-2) è presente in tutti i campioni sani con molta variabilità di intensità: molto lieve nel campione n°5, 12, 13, 15, 17, più marcata nei campioni 14, 16 e 11, così come per i campioni patologici 3, 8 e 9. La stessa banda risulta invece molto intensa nei campioni 1, 2, 4, 6 e 10. In questo ultimo produce uno *smear* che si estende fino alla banda successiva.

L'ultima banda quantificata è quella di **62 kDa** (MMP-2). I campioni sani mostrano delle bande lievi, con la sola eccezione del campione n°11, che ha un'intensità modicamente superiore. Nei campioni patologici, così come per i sani, questa banda è scarsamente rappresentata, generalmente meno marcata della sua proforma. Fa eccezione il campione n° 10, dove la banda della MMP-2 è molto evidente, con intensità simile a quella della ProMMP-2.

Non vi è stata finora nessuna descrizione del pattern del settimo campione. Questo campione ha infatti prodotto un'unica grossa banda di digestione (*smear*) che non consente di distinguere le singole bande di peso molecolare noto.

Talvolta i pattern zimografici hanno mostrato differenze più o meno marcate tra i due reni di uno stesso soggetto (come ad esempio i campioni 6 e 8). Mentre per il sesto campione l'intensità dell'intero pattern è maggiore in uno dei due reni, il campione n°8 mostra due pattern più sovrapponibili. Nei casi in cui sono stati campionati entrambi i reni, la quantificazione delle bande di digestione ha previsto la media dei valori dei due i reni, in previsione della successiva correlazione con i valori riscontrati nelle urine.

Le zimografie dei tessuti hanno permesso inoltre di apprezzare altre bande che non sono state oggetto di quantificazione: la forma dimerica della ProMMP-9 ha dato luogo ad una banda gelatinolitica di 198 kDa nei campioni n°1 e n°4. Nel campione n°1 e 13 si è potuto apprezzare

inoltre una debole banda di peso molecolare inferiore a 62 kDa che indica una forma proteoliticamente tagliata della ProMMP-2.

5.1.2 DESCRIZIONE PATTERN ZIMOGRAFICI DEI CAMPIONI DI URINA

L'attività digestiva delle Gelatinasi è stata riscontrata anche nelle zimografie dei campioni di urina. I pattern zimografici urinari mostrano bande approssimativamente di 92, 82, 68, 66 e 62 kDa, del tutto sovrapponibili alle bande gelatinolitiche delle zimografie tissutali.

La banda di **92 kDa** (ProMMP-9) è presente più intensamente nei campioni 1, 4, 7, 8 e 10. Nei campioni 7 e 10 questa banda si prolunga fino alla banda inferiore di 82 kDa (MMP-9) formando uno *smear*. La banda è presente anche nei campioni 2, 3 e 9 ma con minore intensità.

La banda di **82 kDa** (MMP-9) è visibile nei campioni 1, 7 e 10, molto debole o assente nei campioni 2, 3, 4, 8 e 9.

La banda indicativa di **68 kDa** (ProMMP-2) è ben apprezzabile nel quarto campione, lieve nei campioni 1, 8 e 9, molto debole nei campioni 2 e 3. Essa produce nel campione n°7 uno *smear* che non consente di distinguere bene le bande di 68 e 66 kDa. Nel decimo campione la banda è più lieve ma anch'essa produce un lieve *smear*.

La banda del peso molecolare approssimativo di **66 kDa** (MMP-2) è l'ultima banda oggetto di quantificazione: non è visibile nei campioni n°2, 3, 4, 8 e 9. Il campione n°1 mostra una banda molto debole, mentre i campioni n°7 e n°10, come già detto, non consentono di far distinzione tra le bande di 68 e 66 kDa in quanto presentano uno *smear*.

Il campione n°6 presenta uno *smear* che non consente di distinguere nessuna delle singole bande di peso molecolare noto. Il campione n°5 invece mostra solo una banda molto debole di 92 kDa (ProMMP-9).

Anche nelle zimografie urinarie sono state evidenziate, ma non quantificate, bande aggiunte. Ad esempio nei campioni n°1, n°3, n°8 e n°10 si possono notare bande maggiori di 88 kDa (che indicano dimeri MMP-2/MMP-9) e nel campione n°4 forme dimeriche della ProMMP-9 (banda di circa 198 kDa).

5.2 VALIDAZIONE DELLA ZIMOGRAFIA

Al fine di validare l'analisi zimografica sul tessuto renale e sulle urine abbiamo calcolato la precisione, ovvero la vicinanza tra loro di una serie di misurazioni sulla stessa matrice, mediante i metodi intra-assay e inter-assay; abbiamo calcolato la linearità della metodica e analizzato le correlazioni esistenti tra gli elementi in esame.

5.2.1 PRECISIONE

Per i tessuti renali i valori di precisione della zimografia intra-assay e inter-assay sono stati rispettivamente di 8.18% e 16.65%.

Per i campioni di urina i valori di precisione della zimografia per l'intra-assay e per l'inter-assay sono stati rispettivamente di 7.90% e 25.52%.

Complessivamente i valori di precisione della zimografia per l'intra-assay e per l'inter-assay sono stati rispettivamente di 8.13% e 19.60%.

Tessuti Intra-assay				
	ProMMP-9	MMP-9	ProMMP-2	MMP-2
CV%	11.47%	10.40%	6.15%	4.70%
Totale CV	8.18%			

Tessuti Inter-assay				
	ProMMP-9	MMP-9	ProMMP-2	MMP-2
CV%	18.54%	14.10%	17.22%	16.73%
Totale CV	16.65%			

Urine Intra-assay				
	ProMMP-9	MMP-9	ProMMP-2	MMP-2
CV%	12.10%	11.74%	4.72%	3.04%
Totale CV	7.90%			

Urine Inter-assay				
	ProMMP-9	MMP-9	ProMMP-2	MMP-2
CV%	20,92%	26.94%	26.93%	27.28%
Totale CV	25.52%			

5.2.2 LINEARITA'

La linearità fa riferimento all'accuratezza del test diagnostico ed esprime la qualità della misurazione in relazione a cambiamenti di concentrazione. Nel nostro studio si riferisce alla diluizione oppure ai cambiamenti del quantitativo proteico delle matrici (urine e tessuto).

Per alcuni campioni di omogenato di tessuto si è eseguita la zimografia con quantitativi proteici differenti. A tal fine abbiamo valutato tre campioni a diversa concentrazione (30, 25 e 20 μ g) di proteine totali ed i risultati sono espressi dalla curva rappresentata nel grafico 1.

Per i campioni di urina la linearità della zimografia è stata valutata eseguendo delle diluizioni di 1:10 e 1:50 della matrice tal quale, avente un contenuto di proteine totali pari a 5 μ g. Il grafico 2 esprime la linearità della zimografia nelle urine per concentrazioni proteiche pari a 0.01 μ g, 0.5 μ g e 5 μ g.

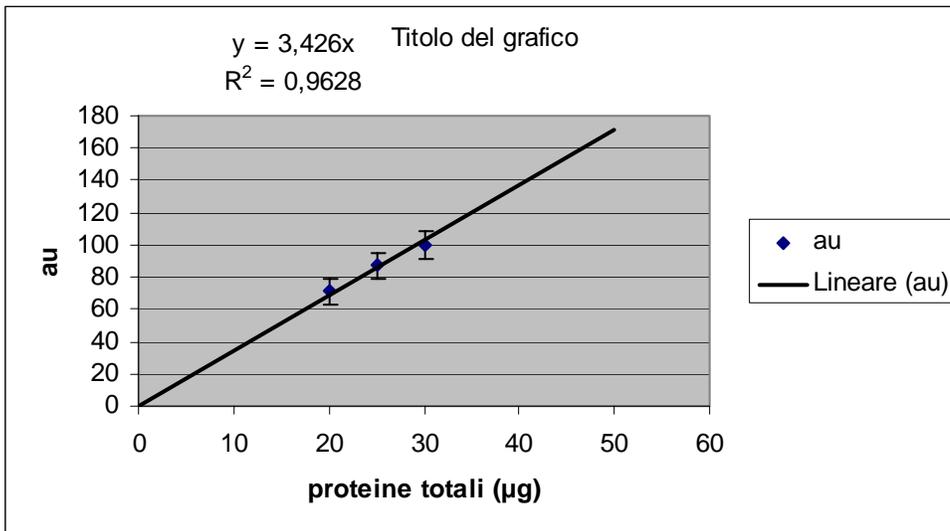


Grafico 1 – Attività zimografica nel tessuto renale espressa come Unità arbitrarie in funzione di differenti concentrazioni di proteine.

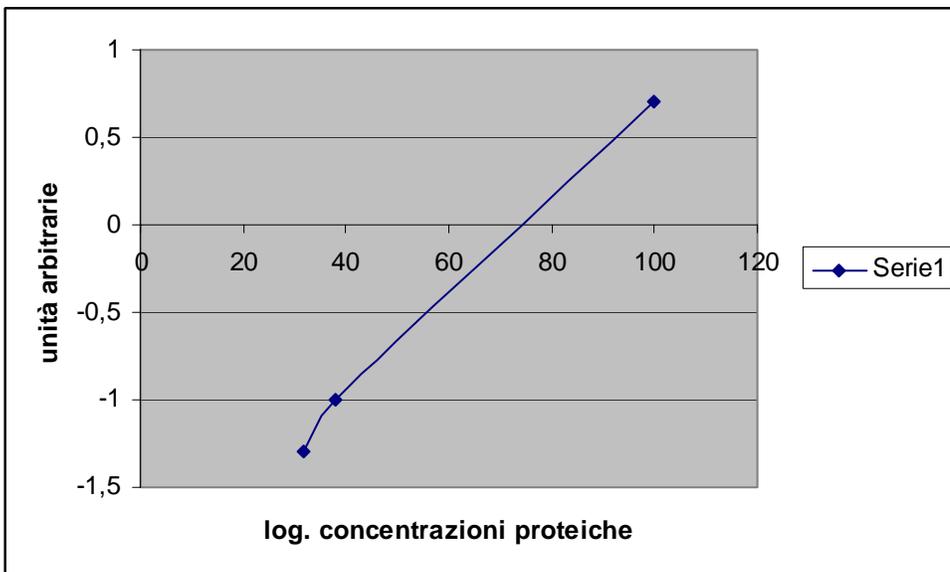


Grafico 2 – Attività zimografica urinaria espressa come Unità arbitrarie in funzione di differenti concentrazioni proteiche.

5.2.3 CORRELAZIONI

I dati ottenuti in questa sperimentazione sono stati sottoposti ad un'analisi statistica di correlazione ed è stato calcolato il coefficiente "R" di Spearman. Sono state messe a confronto tutte le forme (attive e non) delle MMPs 2 e 9 rispettivamente sia nei tessuti che nelle urine. La tabella 3 illustra le correlazioni con livelli di significatività per $p < 0.05$.

	Coppie di variabili	Valid N	Spearman R	p-level
p<0.05	ProMMP-2 TES & ActMMP-2 TES	10	.830303	.002940
	TOT-2 URI & TOT-9 URI	10	.913043	.000225
	ProMMP-9 URI & ActMMP-9 URI	10	.987578	.000000
	ProMMP-2 URI & ActMMP-2 URI	10	.975155	.000002
	TOT-9 URI & ProMMP-2 URI	10	.913043	.000225
	TOT-9 URI & ActMMP-2 URI	10	.875776	.000894
	TOT-2 URI & ProMMP-9 URI	10	.913043	.000225
	TOT-2 URI & ActMMP-9 URI	10	.950311	.000025
	ProMMP-9 URI & ActMMP-2 URI	10	.875776	.000894
	ProMMP-2 URI & ActMMP-9 URI	10	.950311	.000025
	ProMMP-9 URI & ProMMP-2 URI	10	.913043	.000225
	ActMMP-9 URI & ActMMP-2 URI	10	.900621	.000378

Tabella 3 – Correlazione mediante Spearman R per dati non parametrici.

5.2.4 DISTRIBUZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DELLE MMPs NELLA POPOLAZIONE STUDIATA

La distribuzione tra la popolazione di cani sani e cani nefropatici è stata analizzata tramite il test U di Mann-Whitney per ProMMP-9, MMP-9, ProMMP-2 e MMP-2. La concentrazione delle MMPs sono state espresse come AU, al solo fine di confrontare l'attività delle proteinasi nel campione. La distribuzione tra le due popolazioni è risultata statisticamente significativa solo per la ProMMP-9 e la MMP-9, con $p = 0,01$ e $p < 0,01$ rispettivamente, mentre non è statisticamente significativa per la ProMMP-2 e la MMP-2 ($p > 0,05$), come mostrato nelle figure 13, 14, 15, 16.

Figura 13 - ProMMP-9: soggetti sani vs soggetti nefropatici.

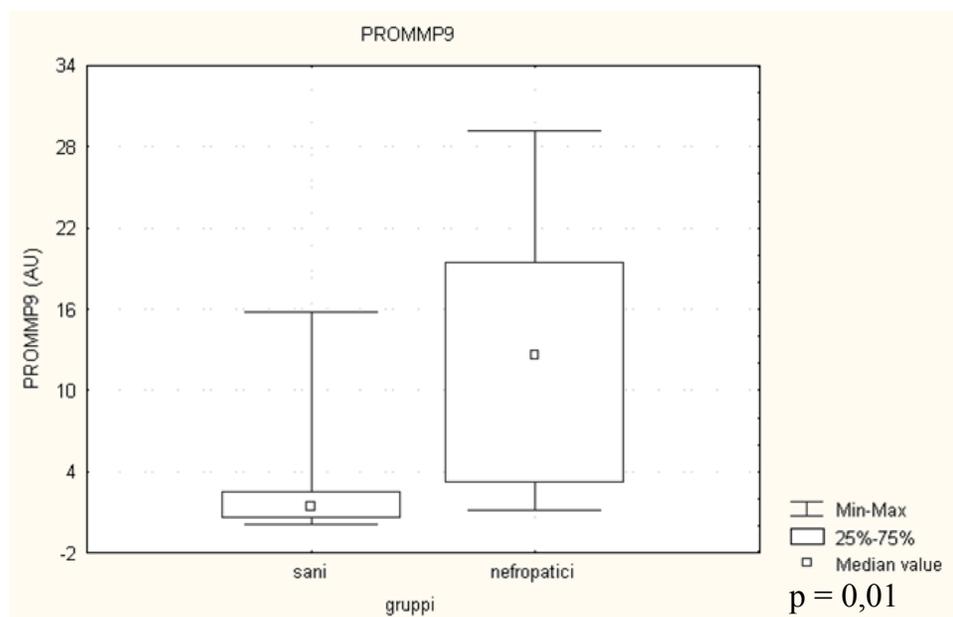


Figura 14 - actived MMP-9: soggetti sani vs soggetti nefropatici

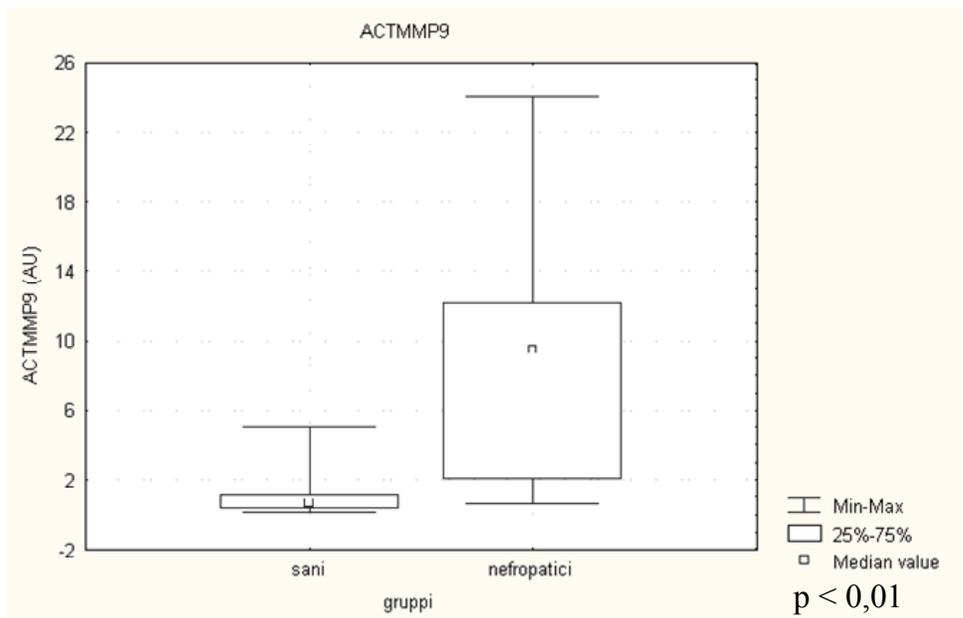


Figura 15 - ProMMP-2: soggetti sani vs soggetti nefropatici

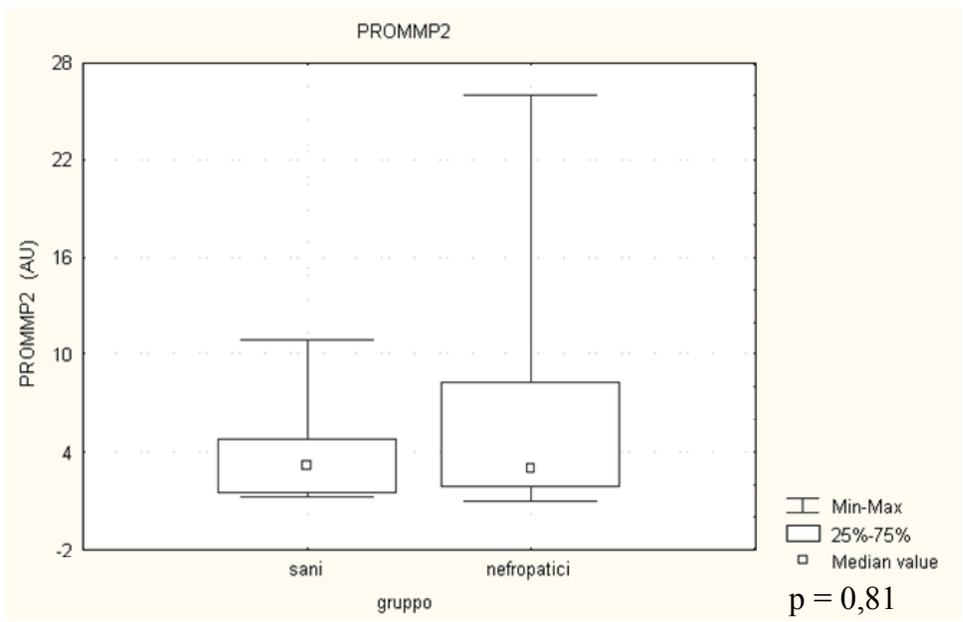
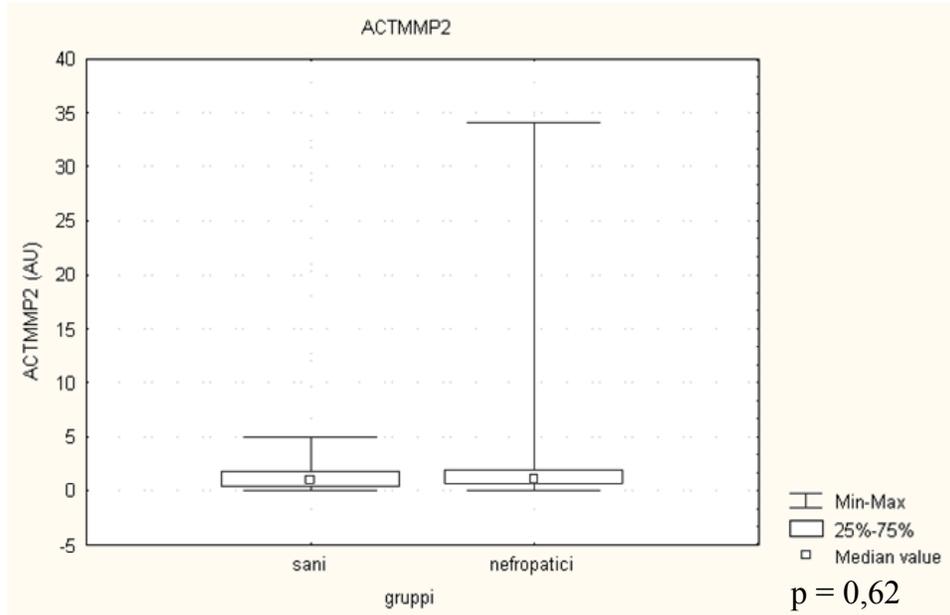


Figura 16 - activated MMP-2: soggetti sani vs soggetti nefropatici



5.3 REFERTI ANATOMOPATOLOGICI DEI CAMPIONI RENALI

Campione n°1: Cane Rottweiler M, 3 anni 5 mesi.

Reni difficilmente scapsulabili, con superficie esterna chiara e irregolare per la presenza di aree depresse. In sezione si osserva atrofia della corticale che mostra anche striature biancastre. Al microscopio ottico sono apprezzabili glomerulonefrite cronica con fibrosi renale, nefrite interstiziale multifocale e fenomeni di microlitiasi.

Diagnosi istologica: glomerulonefrite cronica con grave nefrite interstiziale.

Campione n°2: Cane Meticcio F, 4 anni.

Diagnosi istologica: glomerulonefrite mesangio-proliferativa ed aspetti di glomerulo- e tubulo-nefrosi.

Campione n°3: Cane Meticcio F, 13 anni e 10 mesi.

Rene con neoformazione a livello di polo caudale e numerosi noduli di dimensioni millimetriche sub-capsulari. Microscopicamente a livello della midollare è apprezzabile un nodulo di 2 mm di origine neoplastica mesenchimale maligna. Sono osservabili infiltrati linfoplasmocitari interstiziali sottocapsulari, visibili anche a livello midollare, cilindri epiteliali intratubulari, sclerosi glomerulare ed ispessimento della capsula di Bowmann.

Diagnosi istologica: metastasi renale di condrosarcoma con aspetti focali di nefrite interstiziale linfo-plasmocitaria.

Campione n°4: Cane Setter Inglese M, 9 anni e 10 mesi.

Descrizione microscopica: tubulonefrosi con accumulo intratubulare di materiale eosinofilo di natura proteica; a livello glomerulare si apprezzano ispessimento delle membrane basali e della capsula di Bowmann, stasi ematica a carico del convoluto capillare e proliferazione del mesangio; infiltrati infiammatori disseminati linfoplasmocitari. Diagnosi istologica: glomerulonefrite mesangioproliferativa cronica e nefrite tubulointerstiziale linfoplasmocitaria con tubulonefrosi.

Campione n°5: Cane Pointer M, 10 anni.

I reni si scapsulano male ma non mostrano alterazioni corticali o midollari sia macroscopicamente sia alla successiva indagine microscopica.

Diagnosi istologica: quadro renale privo di alterazioni apprezzabili.

Campione n°6: Cane Barbone medio M, 16 anni e 1 mese.

Macroscopicamente il rene si presenta di colore rosso scuro. L'esame istologico mostra glomeruli caratterizzati da semilune di probabile natura proteica ed infiltrati infiammatori disposti soprattutto a livello periglomerulare. L'interstizio è caratterizzato da stasi ematica lieve e moderata fibrosi, con aree di sclerosi.

Diagnosi istologica: nefrite tubulointerstiziale cronica e glomerulonefrosi.

Campione n°7: Cane Yorkshire F, 7 anni e 7 mesi.

I reni sono di colore variegato, con sfumature più chiare ed intensa iniezione vascolare. Microscopicamente sono presenti cilindri ialini e l'epitelio tubulare è caratterizzato da vacuolizzazioni (degenerazione a

gocce ialine, idropico-vacuolare, steatosi); le membrane basali glomerulari sono ispessite e mostrano aspetti di glomerulonefrite membranosa.

Diagnosi istologica: tubulonefrosi a gocce ialine ed idropico-vacuolare, con presenza di cilindri intratubulari; glomerulonefrite membranosa.

Campione n°8: Cane Alano M, 7 anni e 11 mesi.

Glomerulonefrite membranoproliferativa con ispessimento delle capsule glomerulari, stasi ematica acuta ed aspetti di tubulonefrosi (materiale proteinaceo intratubulare).

Diagnosi istologica: glomerulonefrite membranoproliferativa e tubulonefrosi.

Campione n°9: Cane Pastore Tedesco M, 8anni.

I reni, che macroscopicamente sono di colore rosso scuro ed edematosi, mostrano al microscopio ottico: necrosi epiteliale tubulare, ialinosi glomerulare, tubulonefrosi pigmentaria, piccole aree di calcificazione metastatica e cristalli aghiformi od amorfi intra-tubulari.

Diagnosi istologica: quadro compatibile con tubulonefrosi da accumulo di cristalli (ossalato di calcio?).

Campione n°10: Cane Springer Spaniel M, 1 anno.

Istologicamente si apprezza un infiltrato infiammatorio a piccoli focolai disseminati, in assenza di fibrosi radiale; i glomeruli sono, a volte, caratterizzati da proliferazione del mesangio con frequenti accumuli proteici semilunari; i tubuli mostrano aspetti di rigenerazione tubulare; la presenza di globuli debolmente eosinofili a livello sia glomerulare che tubulo-interstiziale è da correlare a materiale proteinaceo/amiloidosico; presenti anche calcificazioni disseminate.

Diagnosi istologica: glomerulonefrite mesangioproliferativa cronica.

Campione n°11: Cane Pastore Tedesco F, 10 mesi.

Diagnosi istologica: quadro renale privo di alterazioni apprezzabili.

Campione n°12: Cane Meticcio M, 18 mesi

Diagnosi istologica: quadro renale privo di alterazioni apprezzabili.

Campione n°13: Dobermann, F, 8 anni

Diagnosi istologica: quadro renale privo di alterazioni apprezzabili.

Campione n°14: Cane Bracco Tedesco, M, 11 aa

Diagnosi istologica: quadro renale privo di alterazioni apprezzabili.

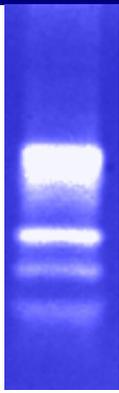
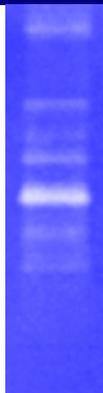
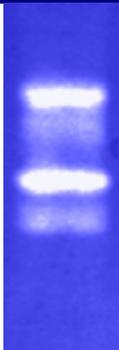
Campione 15, 16, 17: assenza di dati anamnestici.

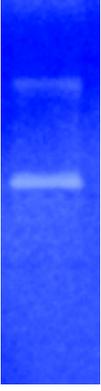
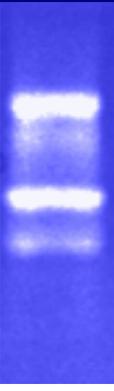
Diagnosi istologica: quadro renale privo di alterazioni apprezzabili.

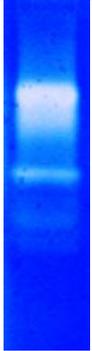
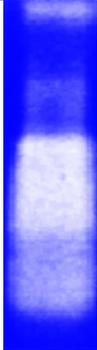
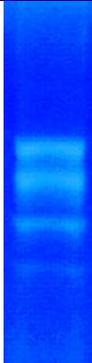
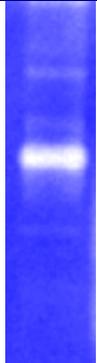
Riassumendo, oltre ai soggetti non nefropatici, sono stati campionati soggetti che dimostrano una netta prevalenza di nefropatie croniche, soprattutto glomerulopatie di natura infiammatoria. Tre campioni mostrano quadri diversi di glomerulonefrite mesangioproliferativa cronica (campioni 2, 4 e 10): mentre nei campioni 4 e 10 è prevalente la componente infiammatoria, nel campione 2 si hanno aspetti di nefrosi glomerulare e tubulare. Anche il sesto campione mostra glomerulonefrosi ma in un contesto tubulointerstiziale moderatamente fibrotico. Gravi segni di fibrosi renale sono invece evidenti nel campione 1. Il campione 8 presenta una glomerulonefrite membranoproliferativa oltre a tubulonefrosi. La tubulonefrosi è invece la lesione principale del settimo campione, soggetto diabetico che mostra pure un quadro di glomerulonefrite membranosa. Completano la casistica un quadro di necrosi tubulare/tubulonefrosi da accumulo di cristalli del soggetto relativo al campione 9, ed il quadro del campione n°3 con metastasi neoplastica renale (condrosarcoma) e nefropatia infiammatoria interstiziale a focolai.

Tabella 4- Correlazione tra le lesioni istologiche, i pattern zimografici dei tessuti e delle urine e l'UPC (rapporto proteine totali urinarie/creatinina urinaria).

Legenda: GN = glomerulonefrite.

Campione	Istologia renale	Zimografia Tessuto	Zimografia Urine	UPC
1	GN cronica, nefrite interstiziale			2.4
2	GN mesangio-proliferativa, glomerulo e tubulo nefrosi			8.2

Campione	Istologia renale	Zimografia Tessuto	Zimografia Urine	UPC
3	Condrosarcoma metastatico, nefrite			0.9
4	GN mesangio- proliferativa, nefrite tubulointerstiziale, tubulonefrosi			3.0
5	Nessuna alterazione			0.4

Campione	Istologia renale	Zimografia Tessuto	Zimografia Urine	UPC
6	Nefrite tubulointerstiziale cronica, tubulonefrosi			1.2
7	Tubulonefrosi ialina, GN membranosa			8.2
8	GN membrano- proliferativa, tubulonefrosi			1.0

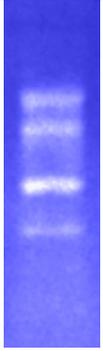
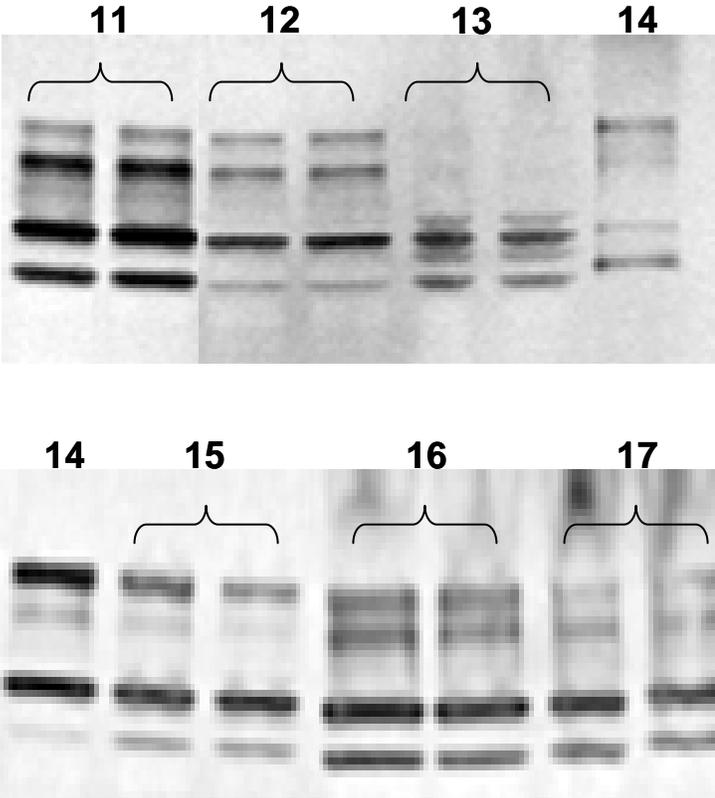
Campione	Istologia renale	Zimografia Tessuto	Zimografia Urine	UPC
9	Necrosi tubulare, ialinosi glomerulare			1.1
10	GN mesangio-proliferativa cronica			4.0

Figura 17 – Pattern dei tessuti renali istologicamente sani.



Capitolo 6

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il presente studio è stato intrapreso al fine di validare la misurazione dell'attività delle MMPs 2 e 9 nel tessuto renale e nelle urine di cane mediante tecnica zimografica. In molti studi, la zimografia è stata largamente utilizzata per la valutazione dell'attività enzimatica delle MMPs *in vitro* (Marti, 2002; Nutt et al., 2002; Cheng e Lovett, 2003; Baricos et al., 2003; Lombard et al., 2005) ed *in vivo*. Le indagini sulle metalloproteinasi sono state eseguite da molti autori, sia su modelli animali sia nell'uomo, per studiare vari tipi di patologie come neoplasie, malattie cardiache, dermopatie, artriti, diabete e nefropatie (Zucker et al., 2004).

Nella nostra sperimentazione abbiamo standardizzato un protocollo per l'estrazione delle MMPs dal tessuto renale di cane, ed abbiamo applicato la zimografia a due matrici molto differenti tra loro, quali le urine e il rene. Abbiamo quindi valutato la ripetibilità della zimografia e considerato le eventuali potenzialità che l'analisi delle MMPs nelle urine e nel tessuto renale potrebbe avere anche nella nefrologia veterinaria.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che la zimografia sulle urine e sul tessuto renale di cane è una tecnica adeguatamente accurata. Le prove intra- ed inter-assay hanno fornito dei coefficienti di variabilità accettabili, in linea con i valori di precisione delle tecniche basate sul principio dell'elettroforesi. Le analisi sulla linearità del test hanno prodotto dei risultati soddisfacenti per valori proteici compresi tra 20 e 30 µg nei tessuti (grafico 1), e per concentrazioni proteiche tra 0.01 µg e 5 µg nelle urine (grafico 2). Pertanto riteniamo che i protocolli applicati in

questa sperimentazione siano validi per la valutazione dell'attività delle MMPs nelle urine e nel tessuto renale di cane.

Lo studio delle correlazioni tra le varie forme di Gelatinasi ha mostrato correlazioni significative ($p < 0.05$) tra le proforme e le rispettive forme attivate delle MMPs 2 e 9 nell'ambito della stessa matrice (ad es. ProMMP-2 URI & ActMMP-2 URI, Tabella 3).

Nelle urine si è osservata una significativa correlazione ($p < 0.05$) tra i livelli totali della MMP-2 e quelli della MMP-9, tra la ProMMP-2 e la MMP-9 attivata e, viceversa, tra la ProMMP-9 e la MMP-2 attiva (Tabella 3). Non sono invece state rilevate correlazioni significative tra le MMPs tissutali e le MMPs urinarie. Ad esempio, le attività totali tissutali della MMP-2 e della MMP-9 non sono significativamente correlate con le attività totali delle omologhe urinarie ($p > 0.05$).

Questo risultato ha dato luogo ad una serie di considerazioni sull'effettivo valore delle MMPs urinarie. Confortati dalla letteratura, riteniamo che il riscontro di queste proteasi nelle urine non sia necessariamente legato ad eventi che interessano esclusivamente il parenchima renale, ma possa essere legato anche a patologie delle vie genito-urinarie oppure a patologie sistemiche. Le Gelatinasi canine hanno, infatti, un peso molecolare analogo o di poco superiore alla barriera filtrante glomerulare (MMP-2= ~ 66kDa e MMP-9= ~ 82kDa). E' quindi prevedibile che l'alterazione della permeabilità e permselectività della barriera filtrante glomerulare determini il passaggio nell'ultrafiltrato di MMPs plasmatiche. Pertanto, l'ipotesi che l'attività urinaria delle MMPs possa rispecchiare quella del tessuto renale è da escludere. Inoltre, come si osserva nella tabella 4, i pattern zimografici urinari non sempre correlano con quelli tissutali, né si può paragonare il quadro istologico con l'attività urinaria delle MMP-2 e MMP-9. A differenza della proteinuria, che è un dato obiettivo di danno renale, i

livelli urinari delle MMPs possono riflettere un quadro sistemico alterato da svariate patologie. Nel topo, ad esempio, i livelli urinari di MMP-2 e -9 sono stati messi in relazione col grado di rigenerazione epatica dopo epatectomia parziale sperimentale. La rigenerazione epatica, come i tumori, è dipendente dalla neoangiogenesi e dal rimodellamento della ECM da parte delle MMPs. E' stato dimostrato che il profilo urinario delle MMPs, nei topi parzialmente epatectomizzati, correla e, di fatto, predice, lo stadio di rigenerazione epatica (Greene et al., 2004).

Anche nell'uomo la concentrazione delle MMPs nelle urine è correlata con malattie maligne non limitate esclusivamente al tratto urogenitale (Zucker et al., 2004). In medicina umana la zimografia urinaria è stata sfruttata, per lo più, per valutare l'attività delle MMPs 2 e 9 nei pazienti affetti da tumori prostatici, vescicali, e renali. Le più frequenti neoplasie maligne del tratto urogenitale dell'uomo sono l'adenocarcinoma prostatico, i tumori epiteliali della vescica ed il carcinoma renale (Ditunno et al., 2003; Sherief et al., 2003). L'analisi delle MMPs nelle urine è stata pertanto proposta, quale indagine poco invasiva, per la valutazione del potenziale metastatico delle neoplasie prostatiche e vescicali e per la diagnosi precoce del carcinoma renale (Nutt et al., 2002; Sherief et al., 2003; Zucker et al., 2004). In alcuni casi tuttavia, la valutazione della concentrazione urinaria delle MMPs può essere correlata con un evento patologico che coinvolge il sistema urinario, come nella pielonefrite acuta del bambino. In questo caso è stato segnalato che l'aumento della MMP-9 e del TIMP-1, con una diminuzione però del rapporto MMP-9/TIMP-1, è correlato positivamente sia con il danno renale sia con il grado di fibrosi conseguente alla pielonefrite (Chromek M., et al., 2003).

In medicina veterinaria lo studio delle MMPs urinarie merita un approfondimento maggiore su una popolazione più ampia di cani. Per

incrementare la specificità e la sensibilità della zimografia delle urine di pazienti nefropatici, si potrebbe proporre la valutazione parallela tra MMPs urinarie e plasmatiche in modo tale da escludere l'influenza delle MMPs circolanti su quelle urinarie. L'applicabilità sulle urine di questa metodica è possibile, ed abbiamo dimostrato l'importanza della zimografia come tecnica ripetibile, accurata e non specie-specifica. Tuttavia nel nostro studio abbiamo escluso che la valutazione delle MMPs nelle urine rifletta l'attività metalloproteinasica del tessuto renale, e che pertanto, secondo noi, non possa essere utilizzata a fini diagnostici o prognostici.

Al contrario delle urine, nella nostra sperimentazione la zimografia del tessuto ha dimostrato che l'attività delle MMPs 2 e 9 nel rene di cane è imputabile al rimodellamento attivo della ECM renale in vari contesti di nefropatia. Per ovvi motivi etici e logistici, abbiamo eseguito i campionamenti dei tessuti su cadaveri di cani deceduti o soppressi a causa di gravi patologie. Ciò spiega la presenza sia di pochi soggetti nefrologicamente sani nella nostra casistica, sia di un numero di soggetti che non ha comunque consentito una categorizzazione dei pattern gelatinolitici in funzione di diagnosi istologiche differenti.

Quindi, pur con un numero esiguo di casi, è stato possibile studiare come la MMP-9, sia in forma attivata sia come proforma, abbia una differenza statisticamente significativa nella distribuzione tra la popolazione di cani con reni sani e patologici, mentre non c'è significatività statistica per la distribuzione della MMP-2 o della ProMMP-2. Evidentemente perciò, durante i processi patologici presi in considerazione in questo studio, la MMP più coinvolta, sia nei processi infiammatori, sia nei processi degenerativo-fibrotici, è la MMP-9.

A nostro parere, i dati della presente sperimentazione sono sufficienti per ritenere che la valutazione dell'attività metalloproteinasica direttamente

dal tessuto renale possa fornire, al contrario delle urine, utili dati clinici e prognostici. In questo studio, la quantità di campione prelevata da ogni rene è stata pari a 100mg. Per questo quantitativo di matrice è stata standardizzata una metodica di estrazione che ha previsto la sospensione dei campioni in *Lysis Buffer* ad un rapporto 1:100 (100mg di campione in 1ml di *Lysis Buffer*). Abbiamo calcolato che il peso medio di una biopsia renale eseguita con Tru-cut di 18G è pari a circa 8 mg. Mantenendo il rapporto di 1:100 tra il Lysis Buffer e la matrice (8mg di campione bioptico in 0.08ml di Lysis Buffer), la zimografia potrebbe essere facilmente sfruttata anche per campioni bioptici.

Nella nostra sperimentazione, oltre alle analisi zimografiche sono state svolte delle indagini istologiche. Tale approccio parallelo sarebbe applicabile anche alle agobiopsie renali di cane. Ovviamente, le carote di tessuto destinate all'istologia dovranno essere opportunamente fissate in formalina, mentre i frustoli da omogenare per la zimografia dovranno essere separati e congelati a -20°C .

Negli ultimi anni l'interesse verso le tecniche molecolari a fini diagnostici e/o prognostici è stato sempre maggiore. Come sottolineato da Eikmans e coll., le analisi sul rimaneggiamento della ECM nel rene sono utili per capire la progressione di una nefropatia. L'utilità della misurazione dell'attività metalloproteinasica nel tessuto renale offre delle ottime possibilità per comprendere meglio i processi patologici attivi a carico del rene. In nefrologia l'integrazione di tecniche molecolari nei campioni bioptici è particolarmente indicata, poiché queste tecniche forniscono un utile supplemento diagnostico e/o prognostico alle analisi istopatologiche convenzionalmente applicate nella pratica clinica (Lenz et al., 2000; Eikmans et al., 2004). Ad esempio, la valutazione delle MMPs nelle biopsie renali sembra essere in grado di discriminare i pazienti a rischio di sviluppare un'insufficienza renale, da quelli che

mostrano una notevole capacità di rimodellamento dopo insulti al rene (Cheng e Lovett, 2003). Per localizzare l'attività proteasica nel tessuto, la zimografia è stata anche applicata in situ (*In Situ Zymography* ISZ). Sebbene gli sviluppi e le future applicazioni della ISZ siano promettenti, questa tecnica mostra dei limiti in termini di laboriosità, di risoluzione e di quantificazione dell'attività proteasica (Mungall e Pollitt, 2001; Yan e Blomme, 2003).

Nella nefrologia veterinaria le indagini molecolari non hanno ancora fornito dei contributi apprezzabili alla pratica clinica, sebbene le potenzialità di tali applicazioni siano notevoli.

Riteniamo che la zimografia applicata al tessuto renale di cane sia una tecnica laboriosa ma vantaggiosa da un punto di vista clinico. I risultati ottenuti in questo studio confermano un'adeguata performance analitica della zimografia in termini di precisione, ripetibilità, accuratezza e linearità. Inoltre la zimografia non è un'analisi specie-specifica ed il bilancio costi-benefici è vantaggioso.

Certamente la nostra casistica non consente di chiarire l'importanza delle gelatinasi nelle nefropatie del cane, né di correlare un pattern zimografico ad un parallelo reperto istologico. Tuttavia in questo studio, oltre a validare la tecnica zimografica sulle urine e sul tessuto renale di cane, abbiamo rilevato una correlazione tra l'aumento dell'attività metalloproteinasi e processi patologici attivi nel rene.

E' possibile pertanto ipotizzare che il cane possa rappresentare un modello adeguato per lo studio delle MMPs nelle nefropatie, come già avviene per lo studio della sindrome di Alport. In particolare, la valutazione delle Gelatinasi direttamente sul tessuto renale potrebbe essere sfruttata per validare le MMPs come target terapeutici delle nefropatie.

Le MMPs evidenziano duplici effetti (protettivi e/o negativi) nella patogenesi e nella progressione delle patologie renali, giocando quindi un ruolo attivo, ma non esclusivamente dannoso. Le funzioni di queste proteasi sono molto complesse e la loro attività è associata a molti processi fisiologici e/o protettivi.

Molti studi hanno proposto l'inibizione dell'attività delle MMPs come nuova opportunità terapeutica. Tuttavia l'opportunità terapeutica esiste solo se l'inibizione delle MMPs non comporta un contemporaneo stravolgimento di quei meccanismi fisiologici o protettivi in cui le stesse MMPs sono coinvolte (Figura 9) (Overall e Kleifeld, 2006). Ad esempio, l'inibizione delle MMPs nella terapia contro la progressione delle metastasi, non ha mantenuto le aspettative, ed i risultati ottenuti fino ad ora non sono stati lusinghieri. La strategia di inibire le MMPs, per impedire la penetrazione delle cellule neoplastiche attraverso le membrane basali, non ha infatti tenuto conto della contemporanea inibizione delle funzioni anti-tumorali espresse dalle MMPs stesse. Nello studio dei farmaci inibitori delle MMPs (MMPI) è importante individuare il *target*, ovvero la molecola che contribuisce senza ambiguità all'insorgenza o alla progressione della patologia, ed è altrettanto importante stabilire se la *downregulation* del *target* non comporti la rottura di altri equilibri molecolari. A questo ultimo concetto si riferisce la definizione di *anti-target*. L'*anti-target*, infatti, è una molecola che possiede dei ruoli essenziali nella fisiologia cellulare e tissutale, e la sua inibizione farmacologica comporta l'insorgenza di complicazioni o addirittura di altre patologie. Il *counter-target* è invece una proteina omologa del *target* che non ha un ruolo significativo nella patologia. Quando è modulato da un farmaco, il *counter-target* ha la potenzialità di produrre effetti collaterali oppure alterare in modo indesiderato alcune funzioni. Studi sull'inibizione delle proteasi per la terapia oncologica

hanno dimostrato, ad esempio, che l'inibizione della MMP-9 può determinare un effetto pro- o anti-cancerogeno, a seconda dello stadio del tumore. Si è osservato che l'inibizione della MMP-9 potrebbe essere utile nel trattamento dei pazienti con forme neoplastiche allo stadio iniziale, mentre la stessa MMP-9 si comporta da *anti-target* nei pazienti con patologie in stadio avanzato (Overall e Kleinfeld, 2006).

Oltre all'impiego del cane come modello di validazione del target delle MMPs nella terapia delle nefropatie, l'attività metalloproteinasi potrebbe essere valutata all'interno di sperimentazioni di farmaci che presentino target differenti, come ad esempio, gli ACE inibitori, farmaci largamente utilizzati in nefrologia, dimostrandone le influenze sull'espressione e sull'attività delle MMPs (Bolbrinker et al., 2006).

In conclusione possiamo affermare che i protocolli standardizzati in questo studio si sono dimostrati validi e, pertanto, la loro applicazione potrebbe essere utile nell'ambito dello studio delle metalloproteinasi nella nefrologia veterinaria.

BIBLIOGRAFIA

Alberts B., Johnson A., Lewis J, Raff M., Roberts K., Walter P.
“Giunzioni cellulari, adesione cellulare e matrice extracellulare”. In:
Alberts B., Johnson A., Lewis J, Raff M., Roberts K., Walter P.
Biologia molecolare della cellula. Zanichelli editore, Bologna, **19**,
1137-1203, 2004.

Baricos W.J., Reed C., Cortez S.L.
“Extracellular Matrix Degradation by Cultured Mesangial Cells:
Mediators and Modulators”. *Experimental Biology and Medicine*, **228**,
1018-1022, 2003.

Baker A. H., Edwards D. R., Murphy G.
“Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutics
opportunities” *Journal of cell science*, **115** (19), 3719-3727, 2002.

**Bee A., Barnes A., Jones M.D., Robertson D.H.L., Clegg P.D.,
Carter S.D.**
“Canine TIMP-2: purification, characterization and molecular
detection”. *The Veterinary Journal*, **160**, 126-134, 2000.

Bergman R.L., Inzana K.D., Inzana T.J.
“Characterization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in
cerebrospinal fluid of clinically normal dogs”. *American journal of
veterinary research*, **63** (10), 1359-1362, 2002.

Bode W., Gomis-Rüth F., Stöckler W.

“Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the metzincins”. *Federation of European Biochemical Societies*, **331**, 1,2, 134-140, 1993.

Bolbrinker J., Markovic S., Wehland M., Melenhorst W.B.W.H., van Goor H., Kreutz R.

“Expression and response to Angiotensin-Converting Enzyme inhibition of matrix metalloproteinases 2 and 9 in renal glomerular damage in young transgenic rats with Renin-dependent hypertension”. *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics*. **316** (1), 8–16, 2006.

Castagnaro M., Brovida C.

“Istopatologia renale, aspetti pratici ed obiettivi diagnostici”. In: Atti del Congresso Nazionale AIVPA “*Nuove Prospettiva in Nefrologia e Urologia*”, Padova 7-9 Ottobre 2005, 92-94.

Catania J. M., Chen G., Parrish A.R.

“Role of matrix metalloproteinases in renal patophysiology”. *American journal physiology renal physiology*, **295**, 905-911, 2007.

Cheng S., Lovett D.H.

“Gelatinase A (MMP-2) is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial-mesenchymal transformation”. *American Journal of Pathology*, **162** (6), 1937-1949, June 2003.

Chromek M., Tullus K., Hertting O., Jaremco G., Khalil A., Li Y., Brauner A.

“Matrix metalloproteinases-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases_1 in acute pielonephritis and renal scarring”. *Pediatric research*, **53** (4), 698-705, 2003.

Coughlan A.R., Robertson D.H.L., Burke R., Beynon R.J., Carter S.D.

“Isolation and identification of canine matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)”. *The Veterinary Journal*, **155**, 231-237, 1998.

Cowgill L.D.

“Laboratory assessment of kidney disease”. In: Atti del Congresso Nazionale AIVPA “*Nuove Prospettiva in Nefrologia e Urologia*”, Padova 7-9 Ottobre 2005, 13-30.

Del Prete D., Anglani F., Forino M., Ceol M., Fioretto P., Nosadini R., Baggio B., Gambaro G.

“Down-regulation of glomerular matrix metalloproteinase-2 gene in human NIDDM”. *Diabetologia*, **40**, 1449-1454, 1997.

Ditunno P., Battaglia M., Selvaggi F.P.

“Tumori dell’apparato urogenitale”. In: Schena F.P., Selvaggi F.P. *Malattie dei reni e delle vie urinarie*. Ed.: McGraw-Hill, Milano, **19**, 487-543, 2003.

Ebihara I., Nakamura T., Shimada N., Koide H.

“Increased plasma metalloproteinase-9 concentrations precede development of microalbuminuria in non-insulin-dependent diabetes mellitus”. *American Journal of Kidney Diseases*, **32** (4), 544-550, 1998.

Eikmans M., IJpelaar D.H.T., Baelde H.J., De Heer E., Bruijn J.A.

“The use of extracellular matrix probes and extracellular matrix-related probes for assessing diagnosis and prognosis in renal diseases”. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, **13**, 641–647, 2004.

Eurell J.A.C., Van Sickle D.C.

“Tessuti connettivi e di sostegno”. In: Dellmann H.D., Eurell J.A. *Istologia e anatomia microscopica veterinaria*. Casa Editrice Ambrosiana, Milano, **3**, 42-80, 2000.

Furness P. N.

“Extracellular matrix and the kidney”. *Journal of Clinical Pathology*, **49**, 355-359, 1996.

Gentilini F, Calzolari C, Turba M.E., Agnoli C, Fava D, Forni M, Famigli P.B.

“Prognostic value of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and plasma activity of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and 9 in lymphoma-affected dogs”. *Leukemia Research*, **29**, 1263-1269, 2005.

Grauer G.F.

“Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinuria and treatment”. *Journal of Small Animal Practice*, **46**, 469-478, 2005.

Grauer G.F., Di Bartola S.

“Malattia glomerulare”. In: Ettinger S.J., Feldman E.C. *Trattato di clinica medica veterinaria Malattie del cane e del gatto*. Antonio Delfino Editore Medicina-Scienze, Roma, **170**, 1662-1678, 2002.

Greene A.K., Puder M., Roopali R., Kilroy S., Louis G., Folkman J., Moses M.A.

“Urinary matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors predict hepatic regeneration after murine partial hepatectomy”. *Transplantation*, **78** (8), 1139-1144, 2004.

Harendza S., Schneider A., Helmchen U., Stahl R.A.K.

“Extracellular matrix deposition and cell proliferation in a model of chronic glomerulonephritis in the rat”. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **14**, 2873-2879, 1999.

Hayashi K., Hosikoshi S., Osada S., Shofuda K., Shirato I., Tomino Y.

“Macrophage-derived MT1-MMP and increased MMP-2 activity are associated with glomerular damage in crescentic glomerulonephritis”. *Journal of Pathology*, **191**, 299-305, 2000.

Leber T.M., Balkwill F.R.

“Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels”. *Analytical Biochemistry*, **249**, 24–28, 1997.

Lelongt B., Legallicier B., Piedagnel R., Ronco P.M.

“Do matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 (gelatinases) play a role in renal development, physiology and glomerular diseases?”. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, **10**, 7-12, 2001.

Lenz O., Elliot S.J., Stetler-Stevenson W.G.

“Matrix metalloproteinases in renal development and disease”. *Journal of the American Society of Nephrology*, **11**, 574–581, 2000.

Liu Y.

“Renal fibrosis: New insights into the pathogenesis and therapeutics”. *Kidney International*, **69**, 213-217, 2006

Lombard C., Saulnier J., Wallach J.

“Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: a review”. *Biochimie*, **87** (3-4), 265-272, 2005.

Loukopulos P., Mungall B.A., Straw R.C., Thorton J.R., Robinson W.F.

“Matrix metalloproteinase-2 and -9 involvement in canine tumors”. *Veterinary Pathology*, **40**, 382-394, 2003.

Marcato P.S.

“Sistema urinario”. In: Marcato P.S. *Patologia Sistematica Veterinaria*. Edagricole, Bologna, **7**, 841-905, 2002.

Marti H.P.

“The role of matrix metalloproteinases in the activation of mesangial cells”. *Transplant Immunology*, **9**, 97-100, 2002.

Marti H.P., Lee L., Kashgarian M., Lovett D.H.

"Transforming growth factor-beta 1 stimulates glomerular mesangial cell synthesis of the 72-kd type IV collagenase". *American Journal of Pathology*, **144** (1), 82-94, 1994.

McLennan S.V., Fisher E., Martell S.Y., Death A.K., Williams P.F., Lyons J.G., Yue D.K.

“Effects of glucose on matrix metalloproteinase and plasmin activities in mesangial cells: possible role in diabetic nephropathy”. *Kidney International. Supplement*, **77**, 81-87, 2000

Mungall B.A., Pollitt C.C.

“In situ zymography: topographical considerations”. *Journal of biochemical and biophysical methods*, **47**, 169-176, 2001.

Nagase H., Woessner J.F.Jr.

“Matrix metalloproteinases”. *The Journal of biological chemistry*, **274** (31), 21491-21494, 1999.

Nee L., Tuite N., Ryan M. P., McMorrow T.

“TNF-Apha and IL-1Beta-mediated regulation of MMP-9 and TIMP-1 in human glomerular mesangial cells”. *Nephron experimental nephrology*, **107**, 73-86, 2007.

Nutt J.E., Durkan G.C., Mellon J.K, Lunec J.

“Matrix metalloproteinases (MMPs) in bladder cancer: the induction of MMP9 by epidermal growth factor and its detection in urine”. *BJU international - British journal of urology*, **91**, 94-104, 2003

Osborne C.A., Fletcher T.F.

“Anatomia applicata dell’apparato urinario e correlazioni clinico patologiche”. In: Osborne C.A., Finco D.R. *Nefrologia e urologia del cane e del gatto*. Ed.: Utet, Torino, **1**, 3-27, 1999.

Overall C.M., Kleinfeld O.

“Tumour microenvironment – opinion: Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy”. *Nature reviews. Cancer*, **6** (3), 227-239, 2006.

Polzin D.J., Osborne C.A.

“Fisiopatologia dell’insufficienza renale e dell’uremia”. In: Osborne C.A., Finco D.R. *Nefrologia e urologia del cane e del gatto*. Ed.: Utet, Torino, **16**, 342-374, 1999

Rankin C.A., Itoh Y., Tian C., Ziemer D.M., Calvet J.P., Gattone V H.

“Matrix metalloproteinase-2 in a murine model of infantile-type polycystic kidney disease”. *Journal of the American Society of Nephrology*, **10**, 210–217, 1999.

Rao H. V., Lees G. E., Kashtan C. E., Nemori R., Singh R. K., Meehan D. T., Rodgers K., Berridge B. R., Bhattacharya G., Cosgrov D.

“Increased expression of MMP-2, MMP-9 (type IV collagenases/gelatinases) and MT1-MMP in canine X-linked Alport disease”. *Kidney international*, **63**, 1736-1748, 2003.

Rao H. V., Lees G. E., Kashtan C. E., Nemori R., Singh R. K., Meehan D. T., Rodgers K., Berridge B. R., Bhattacharya G., Cosgrove D.

“Disregulation of renal MMP-3 and MMP-7 in canine X-linked Alport disease”. *Pediatric nephrology*, **20**, 732-739, 2005.

Rao V. H., Meehan D. T., Delimont D., Nakajima M., Wada T., Gratton M. A., Cosgrove D.

“Role for Macrophage Metalloelastase in Glomerular Basement membrane Damage Associated with Alport Syndrome”. *Cardiovascular, Pulmonary and Renal Pathology*, 169 (1), 32-46, 2006

Ratnikov B., Deryugina E., Leng J., Marchenko G., Dembrow D., Strongin A.

“Determination of matrix metalloproteinase activity using biotinylated gelatin”. *Analytical Biochemistry*, **286**, 149-155, 2000.

Remacle A.G., Rozanov D.V., Baciuc P.C., Chekanov A.V., Golubkov V.S., Strongin A.Y.

“The transmembrane domain is essential for the microtubular trafficking of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)”. *Journal of Cell Science*, **118** (21), 4975-4984, 2005.

Schena F.P., Ditonno P.

“Cenni di anatomia dell’apparato urogenitale”. In: Schena F.P., Selvaggi F.P. *Malattie dei reni e delle vie urinarie*. Ed.: McGraw-Hill, Milano, **1**, 1-23, 2003.

Schena F.P., Grandaliano G.

“Glomerulonefriti”. In: Schena F.P., Selvaggi F.P. *Malattie dei reni e delle vie urinarie*. Ed.: McGraw-Hill, Milano, **7**, 153-156, 2003.

Senatorski G., Pączek L., Sułowicz W., Gradowska L., Bartłomiejczyk I.

“Urine activity of cathepsin B, collagenase and urine excretion of TGF- β 1 and fibronectin in membranous glomerulonephritis”. *Research in experimental medicine*, **198**, 199-206, 1998.

Sherief M.H, Low S.H., Miura M., Kudo N., Novick A.C., Weimbs T.

“Matrix metalloproteinase activity in urine of patients with renal cell carcinoma leads to degradation of extracellular matrix proteins: possible use as a screening assay”. *The Journal of Urology*, **169**, 1530–1534, 2003.

Sternlicht M.D., Werb Z.

“How matrix metalloproteinases regulate cell behavior”. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **17**, 463-516, 2001.

Tashiro K., Koyanagi I., Ohara I., Ito T.i, Saitoh A., Horikoshi S., Tominon Y.

“Levels of urinary matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy”. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **18**, 206-210, 2004.

Uchio-Yamada K., Manabe N., Goto Y., Anann S., Yamamoto Y., Takano K., Ogura A., Matsuda J.

“Decreased expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase in the kidneys of hereditary nephrotic (ICGN) mice”. *Journal of Veterinary Medical Science*, **67** (1), 35-41, 2005.

Urushihara M., Kagami S., Kuhara T., Tamaki T., Koruda Y.

“Glomerular distribution and gelatinolytic activity of matrix metalloproteinases in human glomerulonephritis”. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **17**, 1189-1196, 2002.

Visse R., Nagase H.

“Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases”. *Circulation Research*, **92**, 827-839, 2003.

Von Jagow G., Link T.A., Schägger H.

“Purification strategies for membrane proteins”. In: Hunte C., von Jagow G., Schägger H. *Membrane Protein Purification and Crystallization: a practical guide*. Ed: Academic Press, San Diego, **1**, 1-18, 2003.

Waller J.R., Nicholson M.L.

“Molecular mechanisms of renal allograft fibrosis”. *British Journal of Surgery*, **88**, 1429-1441, 2001.

Wang Z., Juttermann R., Soloway P.D.

“TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 *in vivo*”.
The Journal of Biological Chemistry, **275** (34), 26411-26415, 2000.

Woessner J.F.Jr.

“Quantification of matrix metalloproteinases in tissue samples”.
Methods in Enzymology, **248** (31), 510-528, 1995.

Yan S.J, Blomme E.A.G.

“In situ zymography: a molecular pathology technique to localize endogenous protease activity in tissue sections”. *Veterinary Pathology*, **40**, 227-236, 2003.

Yang J., Liu Y.

“Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis”. *American Journal of Pathology*, **159** (4), 1465-1475, 2001.

Zatelli A, 2001

“Procedure diagnostiche per la diagnosi precoce delle malattie renali”.
In: Atti del 42° Congresso Nazionale SCIVAC, Milano, 1-4 Marzo 2001, 439-440.

Zaoui P., Cantin J.F., Alimardani-Besette M., Monier F., Halimi S., Morel F., Cordonnier D.

“Role of metalloproteinases and inhibitors in the occurrence and progression of diabetic renal lesions”. *Diabetes & Metabolism (Paris)*, **26**, 25-29, 2000

M. Zeisberg, M. Khurana, V. H. Rao, D. Cosgrove, J. Rougier, M. C. Werner, C. F. Shield III, Z. Werb, R. Kalluri.

“Stage-Specific Action of MatrixMetalloproteinases Influences progressiveHereditary Kidney Disease”. *PLOSmedicine*, **3** (4), 535-546, 2006

Zucker S, Doshi K, Cao J.

“Measurement of matrix metalloproteinase (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in blood and urine: potential clinical applications”. *Advance in clinical chemistry*, **38**, 37-85, 2004.