

UNIVERSITÀ degli STUDI di MILANO-BICOCCA

**DOTTORATO IN TECNOLOGIE BIOMEDICHE  
(CICLO XXIV)**

**Ruolo di N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline  
(Ac-SDKP)  
nella progressione della Nefropatia Diabetica**

*Tutore:* Prof.ssa Marina Del Puppo  
*Cotutore:* Dott.ssa Giovanna Castoldi

Tesi di Dottorato di Ricerca  
Dott.ssa Barbara Corradi  
Matr. n. 725253

Anno Accademico 2011/2012

## INDICE

<b>ABBREVIAZIONI</b> .....	<b>4</b>
<b>SOMMARIO</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>8</b>
1.1 Nefropatia Diabetica .....	9
1.2 Fibrosi renale e collagene .....	12
1.3 N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline.....	14
❖ Biosintesi e degradazione .....	14
❖ Meccanismo anti-fibrotico di Ac-SDKP.....	15
<b>SCOPO della TESI</b> .....	<b>17</b>
<b>MATERIALI e METODI</b> .....	<b>19</b>
<b>RISULTATI</b> .....	<b>24</b>
<b>DISCUSSIONE e CONCLUSIONI</b> .....	<b>27</b>
<b>FIGURE e TABELLE</b> .....	<b>30</b>
Figura 1 .....	31
Figura 2 .....	32
Figura 3 .....	33

Figura 4 .....	34
Figura 5 .....	35
Figura 6 .....	36
Tabella 1 .....	37
Figura 7A.....	38
Figura 7B.....	39
Figura 8A.....	40
Figura 8B.....	41
Figura 9A.....	42
Figura 9B.....	43
Figura 10A.....	44
Figura 10B.....	45
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>46</b>

## **Abbreviazioni e acronimi**

ACE: enzima di conversione dell'angiotensina

Ac-SDKP: N-acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline

Ang-II: angiotensina II

AT<sub>1</sub>: recettore angiotensina II di tipo 1

AT<sub>2</sub>: recettore angiotensina II di tipo 2

COL4A3: collagene tipo 4  $\alpha$ 3

COL4A4 collagene tipo 4  $\alpha$ 4

COL4A5: collagene tipo 4  $\alpha$ 5

ECM: matrice extracellulare

GLUT4: trasportatore del glucosio tipo 4

MMPs : metalloproteasi

POP: prolil oligopeptidasi

RAS: sistema renina-angiotensina

RER: reticolo endoplasmatico rugoso

Smad2: Small body size mothers against decapentaplegic 2

Smad3: Small body size mothers against decapentaplegic 3

SBP: pressione arteriosa sistolica

T $\beta$ 4: Timosina- $\beta$ 4

TGF- $\beta$ : transforming growth factor-beta

VAMP2: Vesicle-associated membrane protein 2

## **SOMMARIO**

La nefropatia diabetica è la principale causa di insufficienza renale terminale. N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline (Ac-SDKP), tetrapeptide fisiologicamente presente nel plasma e nei tessuti, viene idrolizzato dall'enzima di conversione dell'angiotensina. Il tetrapeptide ha un effetto antifibrotico sul sistema cardiovascolare e nel rene in modelli sperimentali di ipertensione, infarto del miocardio e nefropatie. Lo scopo del nostro lavoro è stato studiare gli effetti antifibrotici di Ac-SDKP in un modello sperimentale di nefropatia diabetica, e il potenziale effetto additivo del tetrapeptide, in aggiunta al singolo trattamento con ACE-inibitore, sulla progressione della fibrosi renale.

A 28 ratti Sprague Dawley e' stato indotto diabete con un'iniezione di streptozotocina, mentre a 10 ratti controllo e' stata somministrata solo soluzione tampone. Dopo l'insorgenza di diabete a 11 ratti è stato somministrato un inibitore dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE-inibitore, ramipril 3 mg/Kg/die). Dopo 2 mesi di trattamento con ACE-inibitore a 7 ratti diabetici e a 6 ratti diabetici trattati con ramipril è stato somministrato per 8 settimane Ac-SDKP, alla dose di 1 mg/Kg/die, attraverso minipompe osmotiche impiantate nella regione infrascapolare. A 10 ratti controllo, a 10 ratti diabetici e a 5 ratti diabetici trattati con ramipril la minipompa osmotica rilasciava, per lo stesso periodo, solo soluzione fisiologica.

Al termine del trattamento i ratti diabetici rispetto ai ratti del gruppo di controllo mostravano un significativo aumento del livello di glucosio, dell'escrezione urinaria di albumina, della fibrosi renale e una significativa riduzione dell'espressione di nefrina a livello dei glomeruli. La somministrazione di Ac-SDKP riduceva significativamente la fibrosi renale nei ratti diabetici, ma non modificava significativamente l'escrezione urinaria di albumina. Il trattamento farmacologico con ACE-inibitore causava una significativa diminuzione dell'albuminuria e della fibrosi renale, ripristinando l'espressione della nefrina glomerulare. La somministrazione di Ac-SDKP, in aggiunta al trattamento con ACE-inibitore, riduceva ulteriormente la fibrosi renale rispetto al solo trattamento con ramipril, mentre non incrementava l'effetto antiproteinurico dell'ACE-inibitore.

In conclusione questo studio ha dimostrato che la somministrazione di Ac-SDKP in un modello di nefropatia diabetica riduce la fibrosi renale. Il trattamento combinato (Ac-SDKP

+ ACE-inibitore) aumenta l'effetto antifibrotico dell'ACE-inibitore nel tessuto renale, suggerendo il benefico effetto di questa associazione farmacologica nel trattamento della nefropatia diabetica.

## **INTRODUZIONE**



## 1. Nefropatia diabetica

Il diabete mellito è una malattia cronica con un forte impatto sociale e rappresenta una delle principali cause di morbidità e mortalità (1-3)

La nefropatia diabetica è una complicanza che colpisce il 20-40% dei pazienti diabetici e generalmente si sviluppa dopo circa 20-25 anni dall'insorgenza della malattia. Attualmente la nefropatia diabetica rappresenta la principale causa di insufficienza renale terminale che necessita di trattamento sostitutivo (4-6). Nello stadio iniziale la nefropatia diabetica è caratterizzata da iperfiltrazione glomerulare, da poliuria e da un aumento dell'escrezione urinaria di albumina. Nella fase precoce l'escrezione di proteine è caratterizzata prevalentemente dalla perdita di albumina, a causa del suo ridotto peso molecolare, in seguito, con il progredire delle compromissioni renale si può instaurare una proteinuria franca. Clinicamente si definisce microalbuminuria l'escrezione di albumina compresa tra i 30 e i 300 mg/die (7). Le principali alterazioni istopatologiche precoci che si evidenziano nelle fasi iniziali della malattia sono l'ispessimento della membrana basale glomerulare, una lieve espansione mesangiale, l'accumulo di sostanza ialina nelle arteriole e l'infiltrazione di cellule infiammatorie, macrofagi, nel parenchima renale.

La progressione della nefropatia comporta un aumento dell'espansione del mesangio e lo sviluppo delle alterazioni caratteristiche della malattia che sono rappresentate dai noduli di Kimmelsteil-Wilson (8-11). In questo stadio aumenta la ialinosi a carico delle arteriole afferenti ed efferenti e si instaura una progressiva perdita dei podociti (12,13). La continua perdita di albumina, che è considerata inizialmente manifestazione di danno glomerulare, provoca nel tempo una progressiva alterazione tubulo-interstiziale con conseguente sviluppo di fibrosi (14).

Nel glomerulo la barriera di filtrazione è costituita da un endotelio fenestrato, dalla membrana basale glomerulare e dai podociti, cellule epiteliali provviste di pedicelli che formano lo *slit diaphragm*. L'integrità dello *slit diaphragm* impedisce il passaggio delle proteine nello spazio urinario.

La nefrina è tra le principali componenti proteiche che costituiscono lo *slit diaphragm* (Fig.1). La nefrina è costituita da un corto dominio intracellulare, un dominio

transmembrana e un dominio extracellulare con 8 elementi distali IgG-simili e un elemento prossimale fibronectina III-simile. Oltre ad essere una proteina d'adesione, la nefrina è un regolatore dei segnali intracellulari dei podociti. La nefrina è implicata in diversi pathways intracellulari come la stimolazione dei membri della famiglia delle MAP chinasi (15) o l'attivazione del pathway fosfoinositide 3-OH chinasi-PKB.

L'azione della nefrina richiede l'interazione con la podocina, proteina di membrana ripiegata con ambedue le estremità dirette verso lo spazio intracellulare. L'interazione tra nefrina e podocina facilita la trasmissione del segnale della stessa nefrina (16). Nel pathway fosfoinositide 3-OH chinasi-PKB l'interazione della podocina con la nefrina riduce la morte cellulare (15-17) e regola il mantenimento della struttura del citoscheletro e della morfologia cellulare nei podociti (18). La podocina è, coinvolta nel trasporto della stessa nefrina. Mutazioni della podocina hanno come risultato l'accumulo di nefrina nel reticolo endoplasmatico anziché nella membrana plasmatica dove svolge la sua funzione di *signaling* a livello dello *slit diaphragm* (19). Il ruolo dei podociti è fondamentale nella funzione glomerulare. Infatti la perdita della funzionalità di queste cellule è strettamente correlata con la progressione delle nefropatie. L'espressione della nefrina è un marcatore della funzionalità dei podociti. È stato dimostrato che nella nefropatia diabetica alla diminuzione dell'espressione della nefrina corrisponde un aumento dell'albuminuria (20-22) e questo si osserva indipendentemente dall'espressione delle altre proteine localizzate nello *slit diaphragm*. Recentemente è stata studiata la risposta dei podociti allo stimolo insulinico. In vitro è stato dimostrato che queste cellule dopo essere state stimulate con insulina, assorbono dopo pochi minuti il glucosio (23). La risposta allo stimolo di insulina è nefrina-dipendente. Lo stimolo insulinico regola il metabolismo del glucosio nei podociti attraverso l'interazione della nefrina con VAMP2, proteina coinvolta nel trasporto di GLUT4 (24).

L'aumento dei livelli plasmatici di glucosio è la principale alterazione del metabolismo che porta allo sviluppo della nefropatia diabetica, mentre lo sviluppo di ipertensione arteriosa, che spesso si instaura nei pazienti diabetici, è il principale fattore emodinamico che promuove la progressione della nefropatia. In relazione a questi meccanismi patogenetici, il trattamento della nefropatia diabetica si basa sullo stretto controllo della glicemia e dei valori di pressione arteriosa in associazione ad un corretto stile di vita e ad adeguato controllo dietetico. Attualmente, i farmaci che intervengono sul sistema renina-

angiotensina, come gli ACE-inibitori e i bloccanti dei recettori AT<sub>1</sub> dell'angiotensina II sono il trattamento farmacologico di scelta per contrastare la progressione delle complicanze della nefropatia diabetica. Infatti sia gli ACE-inibitori, sia i bloccanti dei recettori AT<sub>1</sub> possiedono un effetto anti-proteinurico, riducendo quindi uno dei principali fattori di progressione delle nefropatie. L'azione nefroprotettiva di questi farmaci non dipende solo dal loro effetto anti-ipertensivo ma, almeno in parte, anche dalla loro azione diretta sul sistema delle bradichinine e in particolare dal loro effetto antifibrotico (25,26). Gli ACE-inibitori riducono la formazione di angiotensina II, il principale effettore del sistema renina angiotensina, e inibiscono la degradazione delle bradichinine, favorendo il loro accumulo nei tessuti e promuovendo vasodilatazione.

Il sistema renina-angiotensina (RAS) svolge un ruolo fondamentale nel controllo della pressione arteriosa, dell'omeostasi cardiovascolare e del bilancio idrosalino (Fig. 2).

L'Ang-II possiede una serie di effetti "non-emodinamici" in quanto interviene nei processi di ipertrofia, iperplasia cellulare, apoptosi, e nel rimodellamento della matrice extracellulare (27,28). L'Ang-II è uno dei principali fattori implicati nella progressione del danno renale, in particolare a causa del suo effetto profibrotico. Studi in vitro hanno dimostrato che l'Ang-II è responsabile dell'attivazione della sintesi di fattori profibrotici e di proteine della matrice extracellulare (ECM) nelle cellule renali (29,30). Il recettore AT<sub>1</sub> dell'angiotensina ha diffusione ubiquitaria nell'organismo adulto ed è responsabile delle azioni conosciute dell'Ang-II, quali la proliferazione, la stimolazione dei fattori di crescita e delle citochine, l'attivazione della sintesi delle proteine della matrice extracellulare. Meno noto è il ruolo nell'organismo adulto del recettore AT<sub>2</sub>, che sembrerebbe promuovere azioni opposte a quelle dovute alla stimolazione dei recettori AT<sub>1</sub> (31-33).

L'Ang-II attraverso il recettore AT<sub>1</sub> stimola la deposizione della matrice extracellulare inducendo la sintesi di fattori di crescita profibrotici, quali, ad esempio, il TGF- $\beta$ .

TGF- $\beta$  inizia la trasmissione del segnale legandosi a recettori serina/treonina chinasi di tipo I e di tipo II presenti sulla superficie cellulare. Questo legame promuove l'accoppiamento dei recettori che permette al recettore di tipo II di fosforilare il dominio intracellulare del recettore di tipo I, che poi propaga il segnale attraverso la fosforilazione delle proteine Smad intracellulari (34,35). Si forma, quindi, un complesso di proteine Smad che viene traslocato nel nucleo dove regola la trascrizione dei geni target dei TGF- $\beta$  (Fig. 3).

Il trattamento farmacologico con ACE-inibitori o antagonisti del recettore AT<sub>1</sub> diminuisce significativamente l'espressione tissutale di TGF- $\beta$  e la produzione di matrice extracellulare, stimolata da Ang-II (30,36).

## **2. Fibrosi renale e collagene**

Lo sviluppo della fibrosi renale e' una grave conseguenza di molte nefropatie, tra cui la nefropatia diabetica. La fibrosi renale, indipendentemente dalla causa sottostante, e' causata dalla progressiva deposizione di matrice extracellulare e, soprattutto, di collagene, che compromette la funzionalità delle diverse strutture renali.

Il collagene è una proteina strutturale ubiquitaria nell'organismo di tutti i vertebrati. L'unità strutturale del collagene è rappresentata dal tropocollagene, proteina con una massa molecolare di circa 285 kiloDalton. La biosintesi del collagene avviene ad opera di diversi tipi cellulari in relazione al tessuto in cui è presente (ad esempio i fibroblasti nel tessuto connettivo). Nel tessuto connettivo i fibroblasti sono le principali cellule responsabili della sintesi di collagene. L'unità strutturale del collagene è rappresentata dal tropocollagene, formato da tre catene polipeptidiche intrecciate fra loro e resistenti allo stiramento, caratterizzate da un andamento sinistrorso, che si associano a formare una tripla elica destrorsa. Le catene polipeptidiche sono formate per un terzo da residui di glicina e per un quarto o più da residui di prolina ed idrossiprolina. La prolina è un amminoacido ciclico in cui il gruppo R si lega all'azoto  $\alpha$ -amminico conferendo una certa rigidità che impedisce la formazione di una struttura secondaria ad  $\alpha$ -elica, caratteristica di un gran numero di proteine. Il collagene origina come procollagene, che possiede rispetto al collagene maturo due telomeri, uno N-terminale e uno C-terminale, con struttura globulare. Durante la traduzione i ribosomi a ridosso della parete del RER (Reticolo Endoplasmatico Rugoso) formano due tipi di catene del peptide; queste due catene rappresentano la catena alfa 1 e alfa 2. Questi due peptidi formano il procollagene e sono il peptide di registrazione e il peptide segnale. Il procollagene viene poi rilasciato nel lume del RER (37). In seguito i peptidi segnale sono scissi all'interno del RER, mentre le catene del procollagene subiscono l'idrossilazione di specifici residui di prolina e lisina all'interno del lume del RER (37). Si formano quindi catene pro- $\alpha$ . Tre di queste

catene, due catene alfa 1 e una catena alfa 2 si avvolgono a formare una tripla elica, stabilizzata da legami idrogeno crociati tra amminoacidi idrossilati (38). Questa elica passa nell'apparato di Golgi dove viene completata la glicosilazione e da qui, attraverso vescicole di secrezione, la molecola viene secreta all'esterno. All'esterno della cellula la molecola subisce l'azione di alcune procollagene peptidasi, che rimuovono i residui N-terminali e C-terminali trasformando il procollagene in tropocollagene. Le molecole di tropocollagene si dispongono in file parallele a formare fibrille. Quest'ultime possono disporsi in fasci ondulati o paralleli per formare fibre, che, a loro volta, formano dei fasci (38). Il collagene di tipo I, è formato da due catene alfa 1 e una catena alfa 2. Tutte le unità di tropocollagene hanno la stessa lunghezza e la stessa ripetitività di amminoacidi. I filamenti di tropocollagene sono tenuti insieme da legami idrogeno. Questi legami sono possibili grazie alla presenza di glicine e dalle modifiche post-traduzionali di lisina e prolina. Entrambi questi amminoacidi subiscono una ossidazione per aggiunta di un gruppo ossidrilico. Queste modifiche sono necessarie per aumentare la possibilità di formazione dei legami H e per diminuire l'ingombro sterico. Le tre unità strutturali assumono una forma simile ad una treccia (38). Le fibre sono legate da legami crociati tra due allisine o tra una lisina e un' allisina. La lisina è convertita in allisina dall'enzima Lisina Ossidasi, che inserisce al posto del gruppo amminico della catena laterale della lisina in corrispondenza dell'ultimo carbonio un gruppo aldeidico. I geni codificanti le catene di collagene che costituiscono un'importante componente strutturale delle membrane basali del rene sono *COL4A3*, *COL4A4* e *COL4A5*. La mutazione di questi geni causa un'alterazione della membrana basale che appare assottigliata (39). Una formazione non corretta delle fibre di collagene di tipo IV è responsabile di alterazioni della membrana basale, che provoca il passaggio di sangue e proteine nelle urine, lo sviluppo di fibrosi e la riduzione della funzionalità renale (39). Anche i collagene di tipo I e di tipo III sono presenti nel rene a livello interstiziale e costituiscono lo scaffold strutturale dell'organo. Il collagene è il componente più importante della matrice extracellulare. La matrice extracellulare subisce, in condizioni fisiologiche, un continuo rimodellamento che dipende dal bilancio tra sintesi e degradazione delle proteine della matrice. Questo equilibrio tra sintesi e degradazione è finemente regolato da diversi enzimi che sono coinvolti nel turnover della matrice extracellulare quali le metalloproteasi (MMPs), le serin-proteasi e le cistein-proteasi. Le MMPs sono in grado di degradare tutte le componenti della matrice

extracellulare e sono implicate in diversi processi fisiologici, tra i quali la riproduzione, lo sviluppo fetale e la guarigione delle ferite.

### 3. N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline (Ac-SDKP)

#### ❖ Biosintesi e degradazione

N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline è un tetrapeptide fisiologicamente presente nel plasma e nei tessuti e viene idrolizzato dall'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE, fig. 4) (40-42). È stato dimostrato che il dominio catalitico N-terminale dell'ACE ha un'altissima affinità per Ac-SDKP, ben 50 volte superiore rispetto al secondo dominio catalitico c-terminale dell'ACE (43). È stato dimostrato che la somministrazione acuta di ACE inibitori aumenta i livelli plasmatici di Ac-SDKP di circa 5 volte (44,45), bloccando la degradazione di Ac-SDKP. L'aumento dei livelli plasmatici del tetrapeptide causa una simultanea inibizione della sintesi di Ac-SDKP da parte della prolil oligopeptidasi (POP), enzima appartenente alla classe delle serine peptidasi, impedendone l'accumulo. La prolil oligopeptidasi (POP) è un enzima citosolico coinvolto nel metabolismo di diversi ormoni e neuropeptidi come l'angiotensina, l'arginin-vasopressina, il substrato P, la neurotensina (46).

Il precursore di Ac-SDKP è la timosina- $\beta$ 4 (T $\beta$ 4). La T $\beta$ 4 è un peptide ubiquitariamente espresso nei tessuti e nel sangue costituito da 43 amminoacidi. La T $\beta$ 4 è una proteina prodotta dalla ghiandola timica, che agisce nella maturazione del sistema immunitario e nella produzione delle cellule T (47). Il rilascio di Ac-SDKP avviene attraverso due reazioni successive di idrolisi della T $\beta$ 4 (fig. 5) la prima reazione di clivaggio da parte di una proteasi taglia la proteina in due peptidi più piccoli, la seconda reazione catalizzata dalla prolil oligopeptidasi cliva uno dei due peptidi a livello dell'estremità N-terminale tagliando gli amminoacidi Pro<sup>4</sup>-Asp<sup>5</sup> e formando il peptide Ac-SDKP.

L'enzima POP regola la sintesi del tetrapeptide inibendo l'attività dell'enzima che catalizza la prima reazione enzimatica, questo permette la auto-regolazione della sintesi dello stesso tetrapeptide (47).

Studi recenti hanno dimostrato che un inibitore di POP causa una significativa diminuzione dei livelli di Ac-SDKP nel plasma, nel cuore e nei reni e un aumento del suo

precursore T $\beta$ 4 a conferma dell'ipotesi che Ac-SDKP deriva dalla timosina-  $\beta$ 4. L'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE) è responsabile dell'idrolisi di Ac-SDKP. Sia in vitro, sia in vivo Ac-SDKP è idrolizzato dal dominio NH<sub>2</sub>-terminale dell'enzima di conversione dell'angiotensina (44).

#### ❖ Meccanismo anti-fibrotico di Ac-SDKP

Ac-SDKP è un inibitore endogeno delle cellule staminali ematopoietiche pluripotenti. Il tetrapeptide infatti previene l'ingresso delle cellule nella fase S arrestando la sintesi del DNA, e mantenendo le cellule in fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (48).

Negli ultimi anni sono state indagate le proprietà antifibrotiche del tetrapeptide. Ac-SDKP è in grado di inibire la sintesi di DNA e di collagene nel tessuto renale e cardiaco riducendo l'infiammazione e l'infiltrazione cellulare (49,50,55). E' stato dimostrato che Ac-SDKP non solo sopprime la fosforilazione, indotta da TGF- $\beta$ , delle serine 465/467 di Smad2, ma arresta l'accumulo a livello nucleare di Smad2 e Smad3 (34,51,52). In cellule mesangiali la stimolazione con Ac-SDKP promuove la traslocazione di Smad7 dal citoplasma al nucleo, dove sopprime l'azione di Smad2 e Smad3. Questi dati dimostrano che Ac-SDKP blocca la trasduzione del segnale di TGF- $\beta$  attraverso il pathway di SMAD (51).

La somministrazione cronica di Ac-SDKP in topi db/db previene la glomerulosclerosi e l'insufficienza renale (53). Questi effetti dipendono dall'inibizione della traslocazione nel nucleo di Smad3, che blocca la via di segnale di TGF- $\beta$ . E' stato dimostrato che il tetrapeptide riduce la fibrosi e gli infiltrati infiammatori in un modello sperimentale di ostruzione ureterale (54-56). Ac-SDKP e' in grado di ridurre la proteinuria e la fibrosi renale in modelli sperimentali di nefrite (57) e di ipertensione causata da riduzione del parenchima renale (5/6 nefrectomia) (58) e nella nefropatia ipertensiva a bassi livelli di renina (DOCA-salt hypertension) (59). In linea con queste dimostrazioni, la diminuzione di Ac-SDKP endogeno promuove lo sviluppo di glomerulosclerosi, suggerendo il ruolo antifibrotico di questa molecola a livello renale.

E' stato dimostrato che il pathway TGF $\beta$ /SMAD e' implicato nell'azione antifibrotica del tetrapeptide nel sistema cardiovascolare in diversi modelli sperimentali di ipertensione arteriosa, insufficienza cardiaca (60-62,66) e nel diabete (65). Nella cardiopatia diabetica

in ratti con diabete indotto da streptozotocina, la somministrazione di tetrapeptide non solo era efficace nel ridurre la fibrosi miocardica a livello interstiziale e perivascolare, ma aveva un effetto additivo rispetto al singolo trattamento con ACE-inibitore nel ridurre la fibrosi cardiaca e migliorando la disfunzione diastolica ventricolare (65).



## **SCOPO della TESI**

L'obbiettivo di questo lavoro e' valutare gli effetti della somministrazione di Ac-SDPK sulla progressione della nefropatia diabetica in un modello sperimentale di diabete di tipo I.

In particolare e' stato indagato l'effetto della somministrazione cronica di Ac-SDPK e l'effetto additivo di Ac-SDPK in aggiunta all'ACE-inibitore:

- sull'escrezione urinaria di albumina e sull'espressione glomerulare di nefrina
- sulla fibrosi renale nel distretto glomerulare, tubulo-interstiziale e perivascolare

## **MATERIALI E METODI**

## Protocollo Sperimentale

Le procedure sperimentali sono state condotte secondo quanto riportato nel *Recommendation from the Declaration of Helsinki and the Guiding Principles in the Care and Use of Animals* (1996).

Gli esperimenti sono stati eseguiti su ratti Sprague-Dawley maschi di 12 settimane di età (peso 250-275 g). Gli animali sono stati stabulati singolarmente, con libero accesso all'acqua e al cibo (dieta standard), in una stanza a temperatura controllata con un periodo di luce/buio (12h/12h) per tutto il periodo sperimentale. La figura 6 mostra il protocollo sperimentale.

Il diabete mellito è stato indotto tramite iniezione intraperitoneale singola di streptozotocina (75mg/kg di peso corporeo, dissolta in tampone citrato 0.1 mol/l). A 10 ratti (gruppo di controllo), veniva somministrata una soluzione tampone. Sono stati considerati diabetici solo i ratti che, 48 ore dopo l'iniezione di streptozotocina, presentavano un valore di glicemia uguale o maggiore di 250 mg/dl. I ratti diabetici (n=28) venivano trattati due volte alla settimana con 2-4 unità di insulina per prevenire lo sviluppo di chetoacidosi.

Dopo lo sviluppo di diabete 11 ratti diabetici iniziavano un trattamento per via orale con ACE-inibitore (Ramipril, 3 mg/kg/die) dissolto nell'acqua da bere.

Dopo 2 mesi dallo sviluppo di diabete i ratti sono stati anestetizzati (pentobarbital sodico 40 mg/kg, iniezione intra-peritoneale), e sottoposti all'impianto di minipompe osmotiche (ALZET 2004) in regione infrascapolare sottocutanea. Le minipompe osmotiche rilasciavano, per un periodo di 2 mesi, Ac-SDKP alla dose di 1mg/kg/die (Primm, Milano, Italia) a 7 ratti diabetici e a 6 ratti diabetici trattati con ACE-inibitore. Le minipompe osmotiche rilasciavano soluzione fisiologica nei corrispondenti gruppi di controllo (10 ratti diabetici e 5 ratti diabetici trattati con ACE-inibitore).

Due volte alla settimana si misurava il peso corporeo (g). La pressione arteriosa sistolica (PAS, mmHg) è stata misurata 2 volte alla settimana con metodo pletismografico (Tail Cuff, Ugo Basile Instruments). Il valore di pressione è stato calcolato facendo la media di 6 misurazioni per ogni animale. I livelli di glicemia (mg/dl, OneTouch Ultra2, LifeScan

Inc. Milpitas, CA) sono stati misurati una volta alla settimana. Una volta al mese, tutti gli animali venivano stabulati in gabbie metaboliche per permettere la raccolta delle urine delle 24 ore che venivano centrifugate 1100 r.p.m. a 4°C per 20 minuti. Il surnatante è stato aliquotato e conservato a -20°C. Al termine del periodo sperimentale i ratti sono stati sacrificati con overdose di anestetico (pentobarbital sodico), e si raccoglieva un campione plasmatico per misurare la concentrazione di Ac-SDKP e la creatininemia. I reni sono stati espianati, pesati e sezionati longitudinalmente. Una sezione è stata fissata in formalina 10% ed inclusa in paraffina, l'altra è stata congelata in azoto liquido, previo passaggio in isopentano, e conservata a -80°C in OCT Compound Tissue-Tek (Sakura, Zoeterwoude, The Netherlands).

### **Valutazione dell'albuminuria, del filtrato glomerulare e dei livelli plasmatici di Ac-SDKP**

La velocità di Filtrazione Glomerulare (GFR, ml/min) è stata calcolata attraverso la clearance della creatinina. L'albuminuria è stata espressa come rapporto tra albumina/creatinina urinaria. I valori di creatinina nel plasma e nelle urine (mg/dl) sono stati valutati mediante tecnica colorimetrica (Cobas Mira Plus Instruments Roche, Basilea, Svizzera). L'albuminuria è stata misurata con tecnica E.L.I.S.A. (Nephrot II ELISA, Philadelphia, USA). Questo Kit permette di quantificare in modo specifico ed accurato l'albumina di ratto, rapportando i valori trovati di albumina nelle urine con una curva standard costituita da 6 punti con valori compresi tra 1.56 µg/ml e 100 µg/ml.

Il livello di Ac-SDKP nel sangue dei ratti dei differenti gruppi è stato valutato con uno specifico saggio immunologico (Inalco, Milano, Italia).

### **Analisi Istologica e Valutazione Morfometrica della fibrosi renale**

Per la valutazione della morfologia renale è stato utilizzato il microscopio ottico Leica (Leitz Camera, Wetzlar, Germany). Ogni rene, incluso in paraffina, è stato tagliato in sezioni di 4 µm di spessore. Le sezioni sono state prima deparafinizzate e reidratate con serie decrescenti di etanolo e infine colorate con ematossilina-eosina.

Abbiamo quantificato la presenza di collagene a livello glomerulare, tubulointerstiziale e perivascolare, previa colorazione Rosso Sirio, mediante un sistema di analisi di immagini computerizzato (Olympus Camedia 5050, Olympus Inc., Tokyo, Giappone). Il contenuto di collagene nella frazione glomerulare e tubulointerstiziale è stato valutato con ingrandimento 200X selezionando rispettivamente un' area con almeno 20 glomeruli e selezionando un' area priva di vasi e glomeruli.

Il contenuto di collagene glomerulare è stato misurato come rapporto fra area di collagene /area glomerulare totale; mentre il contenuto di collagene tubulointerstiziale è stato misurato come rapporto tra area contenente collagene/area totale.

La valutazione della fibrosi perivascolare è stata determinata selezionando 10 vasi parenchimali e studiati ad un ingrandimento 400X per ciascuna sezione di rene. Solo il collagene circostante l'area dei vasi intraparenchimali è stato valutato come una deposizione patologica di matrice. Il volume di collagene perivascolare è stato misurato come rapporto di area di collagene circostante i vasi selezionati/area totale.

### **Analisi delle fibre di collagene**

Per ciascun gruppo ogni sezione colorata con Rosso Sirio è stata analizzata con un microscopio a luce polarizzata per valutare i differenti tipi di collagene nell'area glomerulare, tubulointerstiziale e perivascolare. Al microscopio a luce polarizzata, il collagene di tipo I appare di colore giallo/arancio, mentre il collagene di tipo III è di colore verde (22). Per ciascun campione, con il microscopio a luce polarizzata (Leiz Camera, Wetzlar, Germania) sono stati studiati i diversi distretti glomerulare, tubulointerstiziale e perivascolare (ingrandimento 20X). Le immagini, acquisite da una camera digitale computerizzata (Olympus Instruments, Sterling Heights, MI), sono state analizzate per individuare i diversi tipi di collagene presenti nel tessuto renale.

### **Valutazione della nefrina**

Le sezioni renali (4 µm) di tutti i campioni sono state fissate in acetone, permeabilizzate con PBS-2% e Triton 100X 0.3%. Sigma,Milano) e bloccate con Donkey Serum al 10%

(Jackson ImmuoResearch, Suffolk, UK). Le sezioni sono state incubate tutta la notte con un anticorpo policlonale primario contro la nefrina (Guinea Pig, Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Germania) e poi incubate con un anticorpo secondario (Donkey anti- Guinea Pig, Jackson ImmuoResearch, Suffolk, UK) per un'ora. I nuclei sono stati colorati con DAPI (Sigma, Milano, Italia). Le immagini sono state esaminate con l'impiego del microscopio a fluorescenza Zeiss AxioImager A1 (Zeiss, Arese, Italia).

Le immagini di 15 glomeruli scelti random nelle sezioni di rene sono state acquisite da una camera digitale (AxioCam MRc5, Zeiss, Arese, Italia) ad ingrandimento 40X per un tempo di esposizione di 4 secondi. L'immunostaining per la nefrina è stata quantificata calcolando la proporzione di area occupata dalla colorazione verde in ciascun glomerulo utilizzando un software specifico per l'analisi delle immagini (Image J, NIH, Bethesda, Maryland).

### **Analisi Statistica**

I dati sono presentati come media  $\pm$  S.E.M. e calcolati mediante analisi di varianza ANOVA, seguita da test a posteriori (test di Fisher).

Le differenze delle medie dei gruppi di ratti (controllo, diabetico, diabetico + Ac-SDKP, diabetico + ramipril e diabetico + Ac-SDKP + ramipril) per i valori di pressione arteriosa sistolica, peso corporeo, glicemia, rapporto peso rene/peso corporeo, filtrato glomerulare, escrezione urinaria di albumina, contenuto di collagene nel distretto glomerulare, tubulointerstiziale e perivascolare ed espressione della nefrina sono state considerate significative per un valore di  $p < 0.05$  ( $P < 0.05$ ).

## **RISULTATI**



### **Effetto della somministrazione di Ac-SDKP e di Ramipril sull' escrezione urinaria di albumina e sul filtrato glomerulare**

I risultati ottenuti al termine del periodo sperimentale sono riportati nella tabella 1. I livelli plasmatici di glucosio aumentavano significativamente nei ratti diabetici e questo aumento non era modificato dalla somministrazione di ramipril o di Ac-SDKP. Il peso degli animali diabetici e diabetici trattati con ACE-inibitore e/o Ac-SDKP era inferiore rispetto al gruppo di controllo. La somministrazione di ACE-inibitore e tetrapeptide non alterava la pressione sistolica, mentre il rapporto peso rene/ peso corporeo era aumentato in tutti i ratti diabetici. La somministrazione di tetrapeptide aumentava i livelli plasmatici di Ac-SDKP nei gruppi di ratti trattati. I valori di filtrazione glomerulare nei ratti diabetici non erano diversi rispetto a quelli misurati nel gruppo di controllo. Nei ratti diabetici la somministrazione di Ac-SDKP o di ACE-inibitore o di Ac-SDKP + ACE-inibitore non modificava i valori di filtrazione glomerulare rispetto a quelli misurati nel gruppo dei ratti controllo. I valori di escrezione urinaria di albumina, espressi come rapporto tra albumina e creatinina (A/C), erano significativamente più alti nei ratti diabetici rispetto ai controlli. La somministrazione di Ac-SDKP ai ratti diabetici non modificava significativamente l'escrezione urinaria dell'albumina rispetto al gruppo dei ratti diabetici non trattati. Al contrario, la somministrazione di ACE-inibitore riduceva significativamente l'escrezione di albumina nei ratti diabetici, mentre la somministrazione di Ac-SDKP, in aggiunta all'ACE-inibitore, non modificava i valori di A/C rispetto al gruppo di ratti diabetici trattati solo con ACE-inibitore.

### **Effetto della somministrazione di Ac-SDKP e di Ramipril sulla fibrosi renale ed espressione della nefrina**

Al termine del periodo sperimentale il contenuto di collagene nel distretto glomerulare (Fig. 7A e Fig. 7B), nell'area tubulointerstiziale (Fig. 8A e Fig. 8B ) e perivascolare (Fig. 9A e Fig. 9B) era significativamente aumentato nei ratti diabetici rispetto ai ratti controllo. Nei ratti diabetici a cui è stato somministrato Ac-SDKP si è osservata una riduzione significativa del livello di fibrosi nel distretto glomerulare (Fig. 7A e Fig. 7B), nell'area tubulointerstiziale (Fig. 8A e Fig. 8B ) e perivascolare (Fig. 9A e Fig. 9B).

Anche il trattamento con ACE-inibitore causava una significativa riduzione della fibrosi nei diversi distretti renali glomerulare (Fig. 7A e Fig. 7B), tubulointerstiziale (Fig. 8A e Fig. 8B) e perivascolare (Fig. 9A e Fig. 9B). Tuttavia, i dati ottenuti dimostravano che il trattamento con ACE-inibitore è meno efficace rispetto al trattamento con Ac-SDKP nel ridurre la fibrosi nell'area glomerulare e perivascolare.

Nel distretto tubulointerstiziale, invece, si è osservata un'analogia riduzione del livello di fibrosi indipendentemente dal trattamento farmacologico (Fig. 8A e Fig. 8B).

La somministrazione di Ac-SDKP in aggiunta all'ACE-inibitore riduceva ulteriormente la fibrosi a livello glomerulare (Fig. 7A e Fig. 7B), tubulointerstiziale (Fig. 8A e Fig. 8B) e perivascolare (Fig. 9A e Fig. 9B), suggerendo che il trattamento cronico con Ac-SDKP ha un effetto antifibrotico additivo rispetto al trattamento con il solo ACE-inibitore.

L'utilizzo del microscopio a luce polarizzata ha permesso di individuare quale tipo di collagene era presente nel tessuto fibrotico nei diversi distretti renali. In particolare, poiché le fibre di collagene appaiono alla luce polarizzata di colore giallo/arancio è possibile indicare la prevalenza di collagene di tipo I.

Le figure 10A e 10B mostrano i dati ottenuti dallo studio dei livelli di espressione di nefrina. La nefrina glomerulare nei ratti diabetici era significativamente diminuita rispetto ai ratti del gruppo controllo. La somministrazione di Ac-SDKP ripristina solo parzialmente l'espressione della nefrina, mentre il trattamento con ACE-inibitore o l'associazione di Ac-SDKP e ramipril ripristina completamente l'espressione della nefrina glomerulare.

## **DISCUSSIONE**

I risultati di questo studio dimostrano che la somministrazione di Ac-SDKP esercita un'azione antifibrotica a livello del tessuto renale nella nefropatia diabetica. Inoltre, i dati ottenuti dimostrano che la somministrazione di Ac-SDKP in aggiunta all' ACE-inibitore è in grado di potenziare l'effetto antifibrotico dell'ACE-inibitore.

Studi sperimentali hanno dimostrato che Ac-SDKP riduce la fibrosi tissutale nel sistema cardiovascolare e renale in modelli sperimentali di ipertensione arteriosa (54,59,60,63-64) e diabete mellito (53,65).

I nostri esperimenti confermano l'effetto antifibrotico di Ac-SDKP ed dimostrano un effetto additivo del tetrapeptide sulla riduzione della fibrosi renale rispetto al singolo trattamento con ACE-inibitore.

Infatti, in ratti diabetici di tipo I, la somministrazione di Ac-SDKP o di ACE-inibitore riduce la fibrosi glomerulare, tubulointerstiziale e perivascolare, mentre la concomitante somministrazione di Ac-SDKP e ACE-inibitore provoca un'ulteriore e significativa riduzione della fibrosi renale rispetto al singolo trattamento con ramipril. Questi risultati potrebbero avere nuove implicazioni cliniche, suggerendo che il Ac-SDKP possa essere indicato come farmaco antifibrotico, da utilizzare per contrastare lo sviluppo della nefropatia nel diabete di tipo I, in accordo con quanto è stato osservato nel diabete di tipo II (53).

Nel modello sperimentale utilizzato la somministrazione di Ac-SDKP non modificava l'escrezione urinaria di albumina, ma riduceva la fibrosi renale nei diversi distretti glomerulare, tubulointerstiziale e perivascolare, senza modificare la pressione arteriosa e i livelli plasmatici di glucosio. In particolare, Ac-SDKP risultava avere un capacità superiore nel ridurre la fibrosi nel distretto glomerulare e perivascolare rispetto all'ACE-inibitore, mentre l'effetto a livello tubulointerstiziale risultava essere equivalente.

La somministrazione di Ac-SDKP nei ratti trattati con ramipril riduceva la fibrosi glomerulare, interstiziale e perivascolare dimostrando un effetto antifibrotico additivo rispetto all'ACE-inibitore, come era stato precedente dimostrato per la cardiomiopatia diabetica (65). Complessivamente, i dati ottenuti dimostrano un importante effetto antifibrotico del tetrapeptide in due organi bersaglio del diabete, come il rene e il cuore (65).

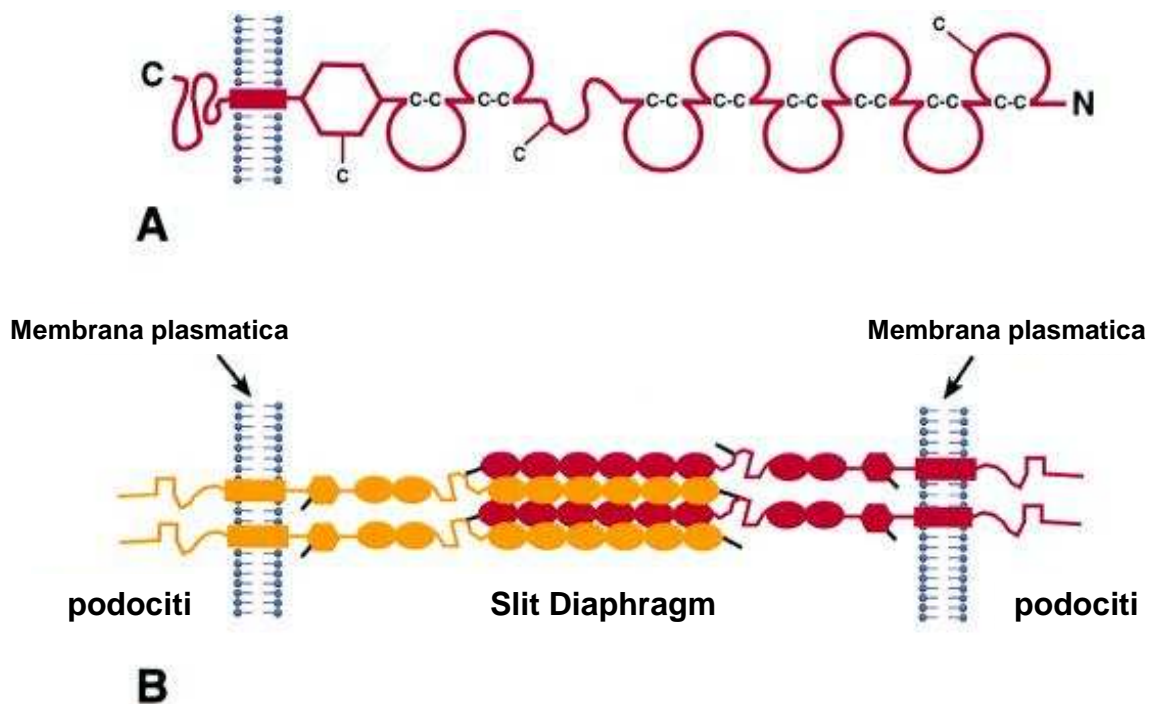
I dati ottenuti confermano che la terapia con ACE-inibitore ha un effetto protettivo nella nefropatia diabetica in quanto modifica significativamente l'escrezione urinaria dell'albumina e preserva i normali livelli glomerulari di espressione della nefrina. Nelle nostre condizioni sperimentali, in assenza di trattamento ipoglicemizzante, il Ac-SDKP non modificava significativamente l'escrezione urinaria di albumina nei ratti diabetici, mentre il trattamento con ramipril induceva una significativa riduzione dell'albuminuria.

L'associazione tra Ac-SDKP e ACE-inibitore non ha dimostrato un effetto additivo nel ridurre all'albuminuria rispetto al singolo trattamento con ramipril. Il maggiore effetto del ramipril sull'escrezione urinaria di albumina rispetto all'Ac-SDKP potrebbe essere spiegato dagli effetti degli ACE-inibitori sull'emodinamica renale (68).

In differenti modelli sperimentali è stato dimostrato che l'effetto benefico di Ac-SDKP sulla fibrosi tubulointerstiziale e sulla glomerulosclerosi è mediato da un effetto antinfiammatorio, attraverso la riduzione dell'infiltrazione dei macrofagi nel tessuto (54,56,58,59). Al contrario, nel nostro modello sperimentale, non era presente nel tessuto renale un'infiltrazione dei macrofagi, di conseguenza l'effetto antifibrotico di Ac-SDKP potrebbe essere sostenuto da un effetto antifibrotico diretto attraverso l'inibizione del pathways di TGF $\beta$ /SMAD (53,62,65).

In conclusione, i risultati ottenuti dimostrano che Ac-SDKP è in grado di ridurre la fibrosi nel rene in un modello sperimentale di nefropatia diabetica. La somministrazione di Ac-SDKP, in aggiunta al trattamento con ramipril, potenzia l'effetto antifibrotico dell'ACE-inibitore nel tessuto renale dei ratti diabetici, suggerendo un benefico effetto di questa associazione farmacologica nel trattamento della nefropatia diabetica.

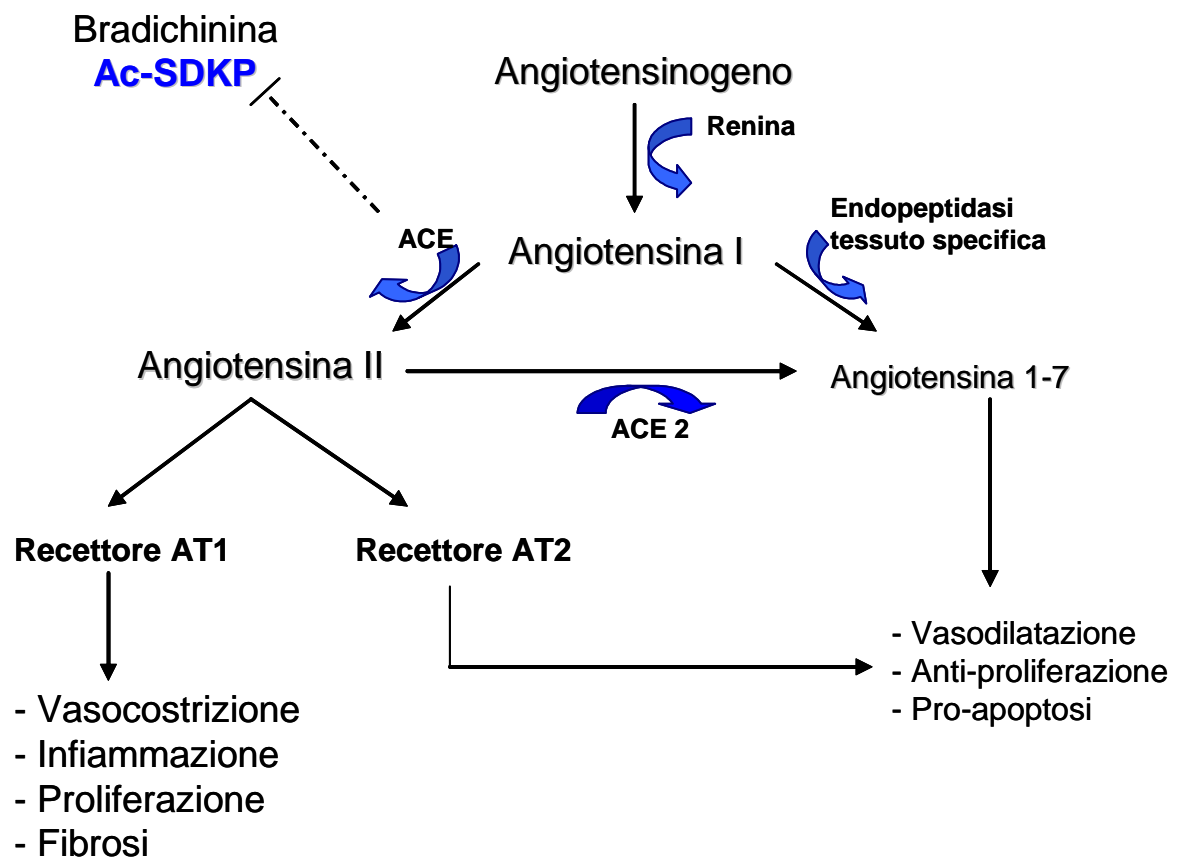
## **FIGURE E TABELLE**



**Fig. 1 Struttura e organizzazione della Nefrina nello *Slit Diaphragm*.** **A.** Schema della struttura della nefrina. I cerchi incompleti rappresentano le ripetizioni di domini tipo-Ig connesse tra loro con ponti disolfuro (C-C), i residui di cisteina liberi sono indicati da simbolo -C. Il dominio extracellulare della nefrina è costituito da 6 consecutive ripetizioni di domini tipo-Ig, un dominio spaziatore, 2 ripetizioni di dominio tipo-Ig e un dominio di ripetizione di fibronettina tipo III (fibronectin type III-like.) **B.** Rappresentazione schematica dell'interazione omofilica di 4 molecole di nefrina nello *slit diaphragm*. Le molecole di nefrina di due podociti opposti sono indicate in colore diverso. I residui di cisteina (indicati con la linea nera) formano ponti disolfuro intermolecolari e provvedono a mantenere stretto il legame tra le molecole di nefrina dello *slit diaphragm*. Questi residui sono molto importanti, in loro assenza si osserva uno sviluppo di proteinuria e sindrome nefrosica congenita (67). Il restante residuo di cisteina rimasto libero può interagire con un'altra

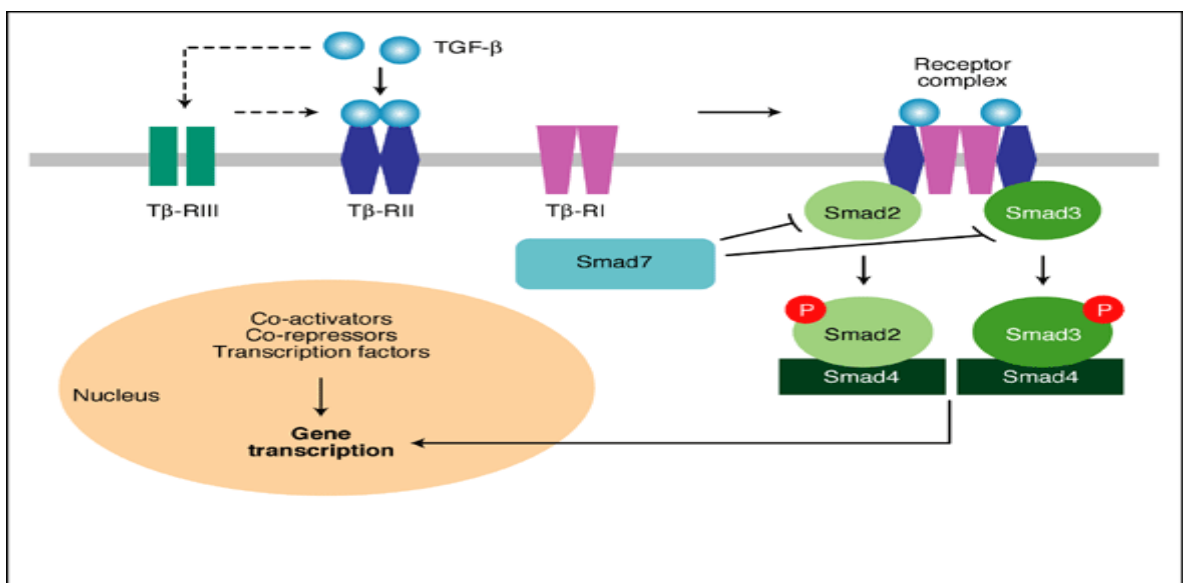
molecola di nefrina o con proteine della membrana plasmatica e del citoscheletro.  
(Immagine modificata: Proc. Natl. Acad. Sci.1999; 96(14): 7962–7967).

# Sistema RAS



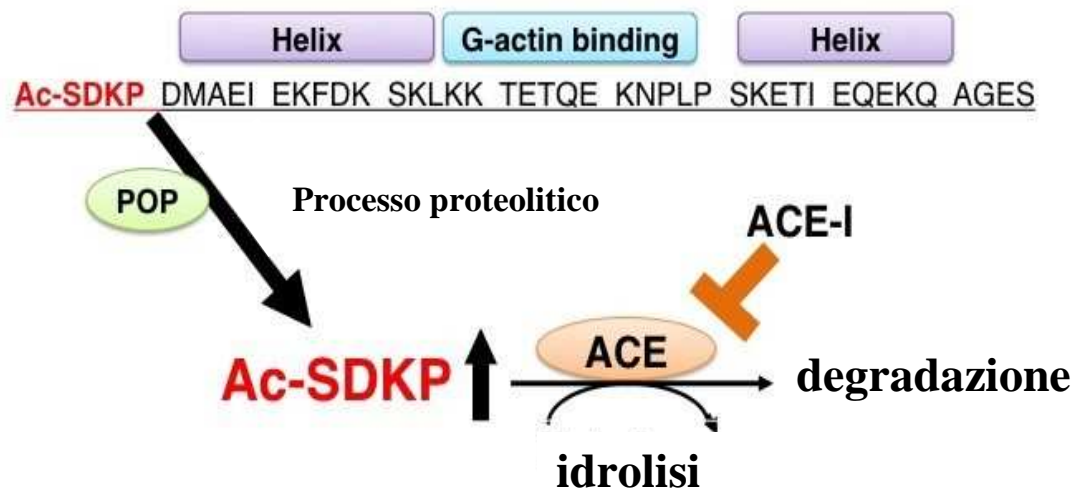


**Fig 2 Il sistema Renina-Angiotensina (RAAS).** (Immagine modificata: Curr Cardiol Rep 2012; 14:433-442).

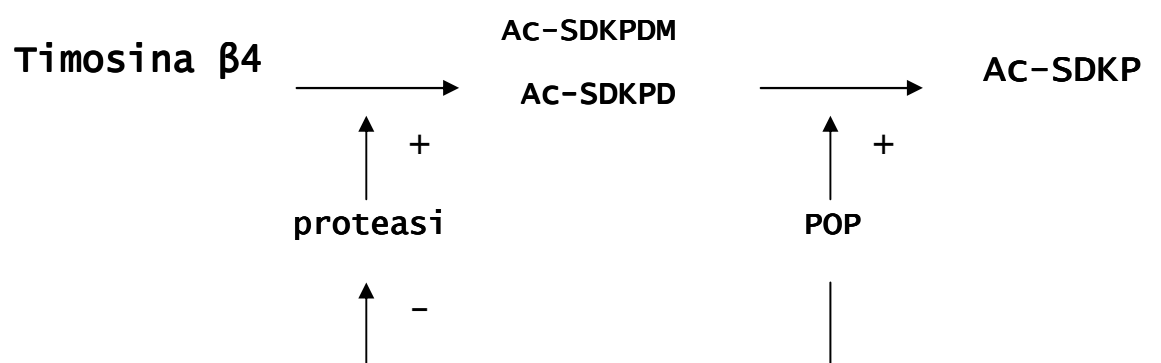


**Figura 3 Signalling pathway del transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ).** TGF- $\beta$  lega il recettore T $\beta$ -RII; questo legame è potenziato dalla presenza del recettore. Dopo il legame al recettore TGF- $\beta$  recluta e fosforila T $\beta$ -RI, il complesso formatosi permette l'attivazione di Smad2 e di Smad3 attraverso la loro fosforilazione. Quest'ultimo processo è inibito dalla proteina Smad7. Una volta fosforilate Smad2 e Smad3 formano un eterodimero con Smad4 e traslocano nel nucleo dove regolano l'espressione genica. (Semin. Liver Dis. 2001; 21: 397-416).

# Timosina $\beta$ 4



**Figura 4 Timosina  $\beta$ 4.** Sequenza amminoacidica della Timosina  $\beta$ 4 e formazione di *N*-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (AcSDKP). La sintesi di AcSDKP avviene attraverso un singolo clivaggio degli aminoacidi Pro<sup>4</sup> Asp<sup>5</sup> da parte dell'enzima prolil oligopeptidasi (POP). AcSDKP viene idrolizzato e degradato dall'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE). (Immagine modificata: Fibrogenesis & Tissue Repair 2011; 4:25)



**Figura 5 Sintesi Ac-SDKP.** Rappresentazione schematica delle 2 reazioni di idrolisi che portano alla sintesi di *N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline* (Ac-SDKP) partendo dalla Timosina- $\beta$ 4 (Immagine modificata: Br J Pharmacol. 2011; 163 (8): 1666–1678).

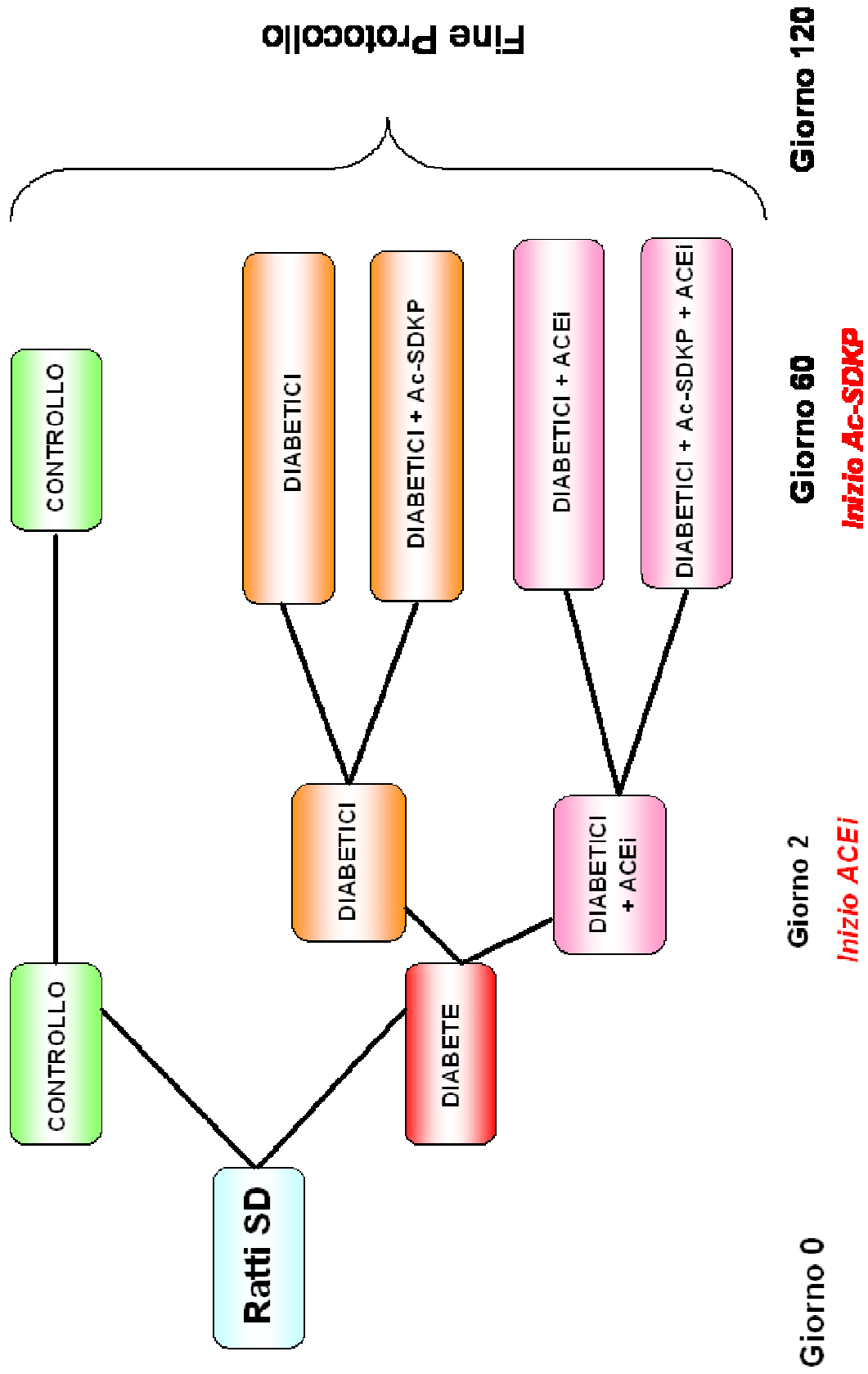
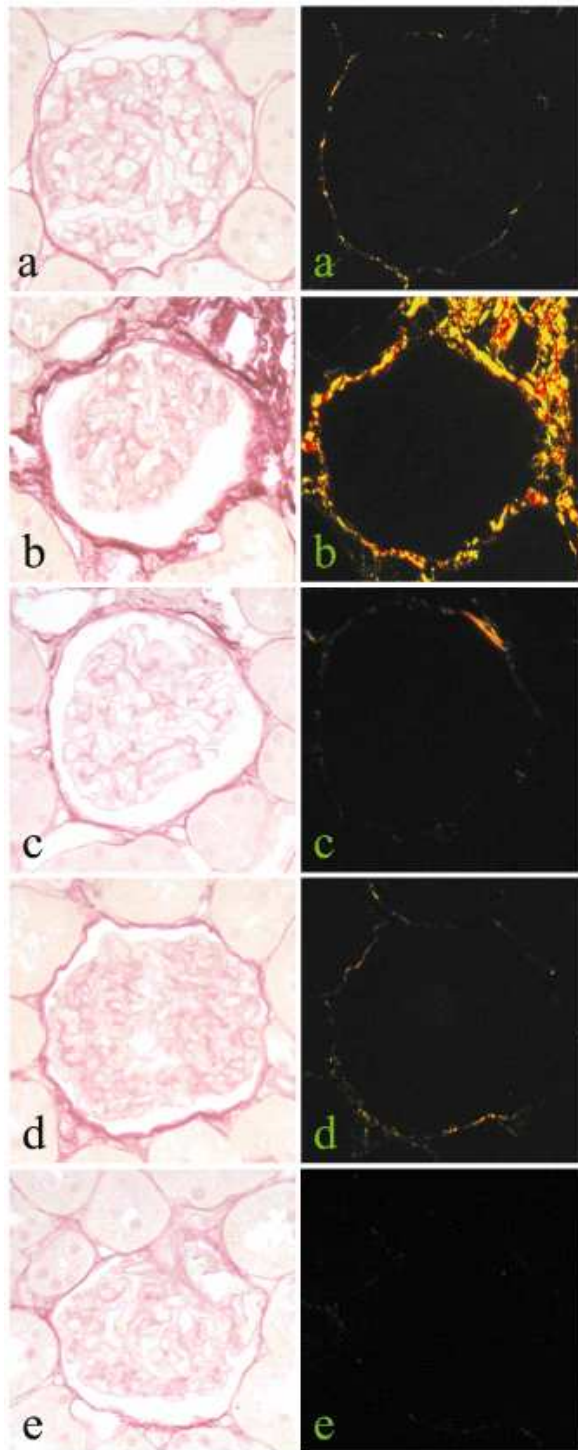


Fig.6 Schema del protocollo sperimentale

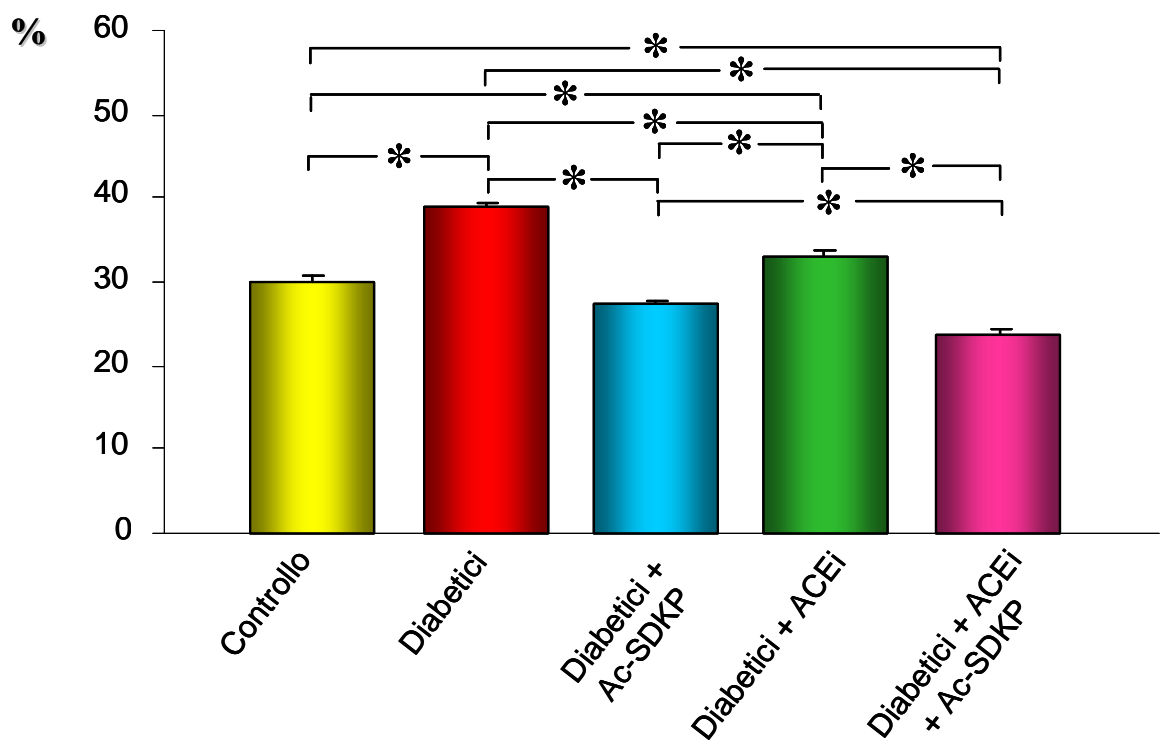
	<b>CONTROLLI</b>	<b>DIABETICI</b>	<b>DIABETICI + Ac-SDKP</b>	<b>DIABETICI + ACE</b>	<b>DIABETICI + Ac-SDKP + ACE</b>
<b>Glicemia (mg/dl)</b>	88.1 ± 4.6	419.1 ± 23.3*	382 ± 28.8	407.5 ± 35.3*	386 ± 27.2*
<b>SBP (mmHg)</b>	115.4 ± 4.6	124.9 ± 7.2	123.4 ± 10.4	125. ± 4.0	130.0 ± 7.0
<b>Peso corporeo (g)</b>	580.2 ± 21.6	428.0 ± 13.1*	449.6 ± 21.3*	425.8 ± 8.8*	424.5 ± 16.4*
<b>Peso rene/Peso corporeo (mg/g)</b>	2.68 ± 0.11	4.54 ± 0.16*	4.58 ± 0.24*	4.85 ± 0.21*	4.88 ± 0.32*
<b>Ac-SDKP(nmol/L)</b>	2.36 ± 0.11	1.86 ± 0.16	3.90 ± 0.48§	2.98 ± 0.39	6.26 ± 1.38§
<b>GFR (ml/min)</b>	3.19 ± 0.43	3.47 ± 0.34	3.70 ± 0.33	4.60 ± 0.62	4.26 ± 0.39
<b>A/C</b>	0.045 ± 0.01*	0.371 ± 0.04*	0.330 ± 0.03*	0.205 ± 0.03*§	0.192 ± 0.03*§

**Tabella 1** Valori di glicemia, pressione arteriosa sistolica (SBP, mmHg), livelli plasmatici di Ac-SDKP, peso corporeo, rapporto peso rene/peso corporeo, valori di Filtrazione Glomerulare (GFR, ml/min) ed escrezione urinaria di albumina (A/C) nei gruppi studiati al termine del periodo sperimentale. \*p<0.01 vs. ratti gruppo controllo § p<0.01 vs. ratti diabetici.

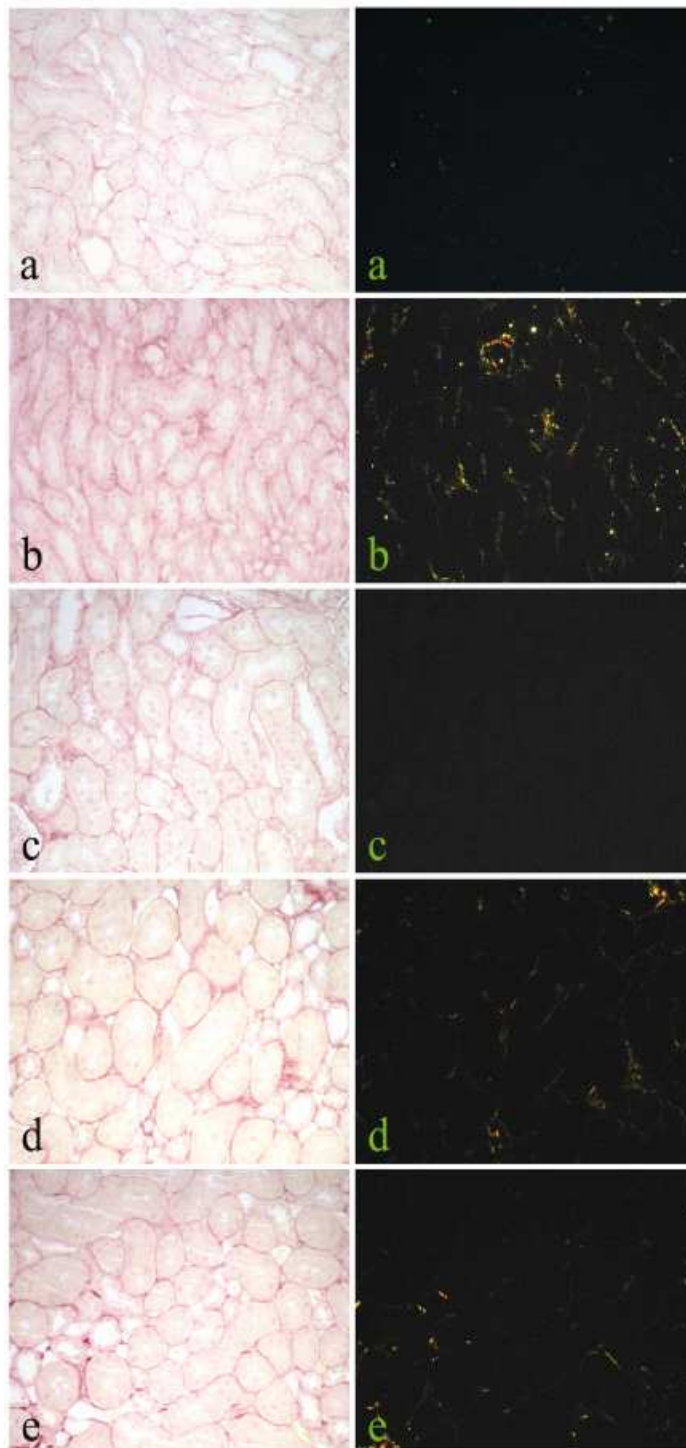
§ p<0.05 vs i corrispondenti gruppi controllo.



**Fig. 7A Effetto della somministrazione di Ac-SDKP e di ramipril sulla fibrosi glomerulare nel rene.** Immagine rappresentativa della fibrosi glomerulare nei controlli (a), nei diabetici (b), nei diabetici trattati con Ac-SDKP (c), nei diabetici trattati con ACEi (d) e nei diabetici trattati con ACEi + Ac-SDKP (e) (Sirius Red Staining, ingrandimento 20X). Le immagini mostrano un aumento del livello di fibrosi glomerulare nei ratti diabetici (b) verso il gruppo controllo (a), i ratti diabetici + Ac-SDKP (c), i ratti diabetici + ACEi (d) e i ratti diabetici + ACEi + Ac-SDKP (e). La somministrazione di Ac-SDKP (c) e di ramipril (d) riduce la fibrosi glomerulare nei ratti diabetici; la co-somministrazione di ACEi + Ac-SDKP (e) riduce ulteriormente la fibrosi rispetto al trattamento con ramipril da solo (d). Le immagini a luce polarizzata dimostrano che l'aumento di fibrosi è dovuto ad un aumento di deposizione di collagene di tipo I (colorazione arancione/giallo).

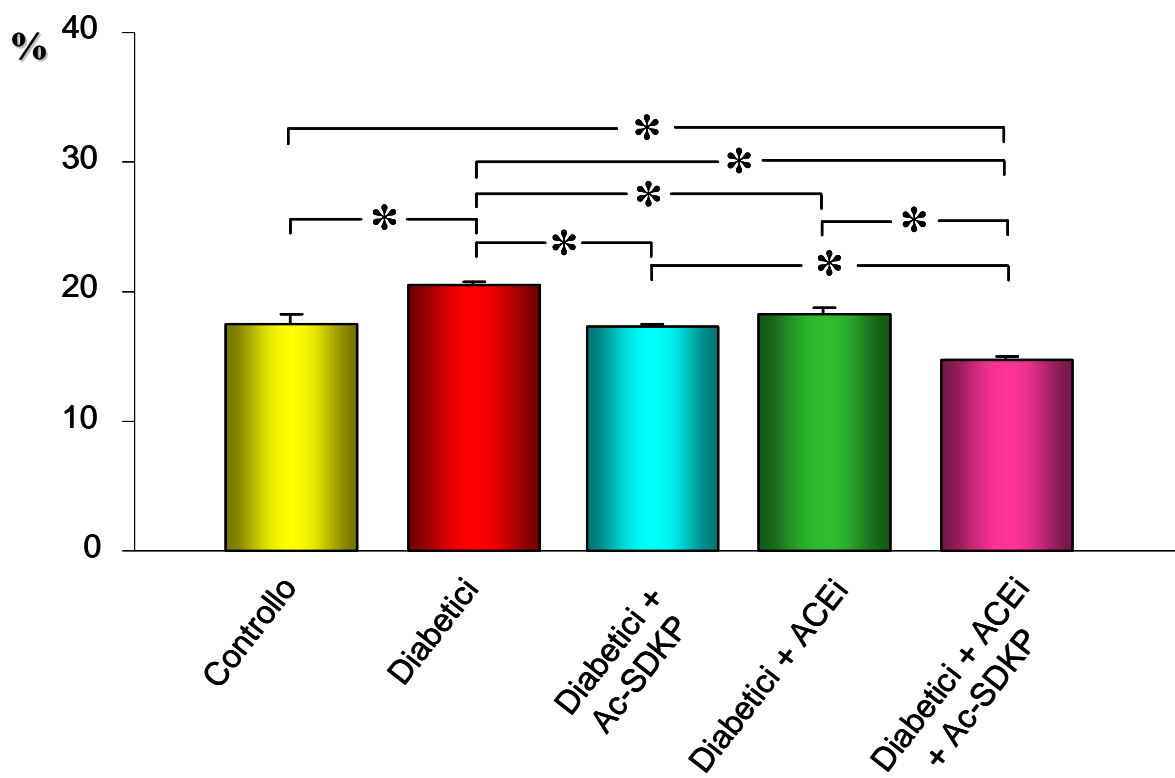


**Fig. 7B Effetto della somministrazione di Ac-SDKP e di ramipril sulla fibrosi glomerulare nel rene.** Quantificazione della fibrosi glomerulare nei diversi gruppi trattati. \*:  $p < 0.01$ .

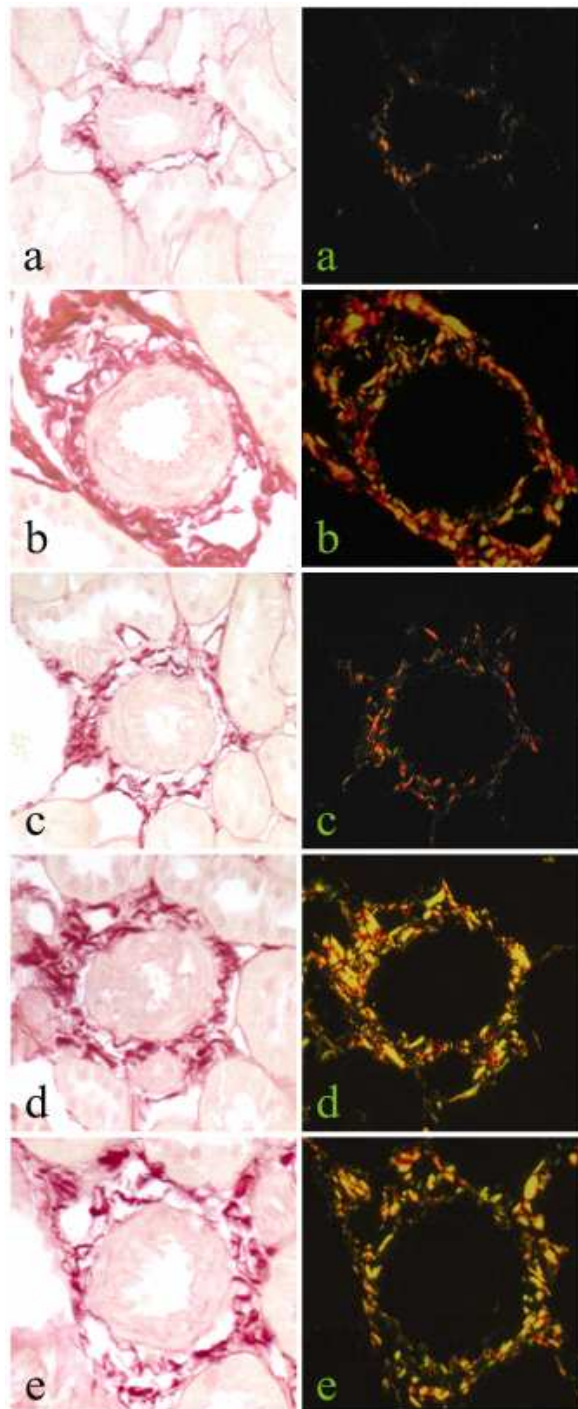


**Fig. 8A Effetto della somministrazione di Ac-SDKP e di ramipril sulla fibrosi tubulointerstiziale nel rene.** Immagine rappresentativa della fibrosi tubulointerstiziale nei controlli (a), nei diabetici (b), nei diabetici trattati con Ac-SDKP (c), nei diabetici trattati con ACEi (d) e nei diabetici trattati con ACEi + Ac-SDKP (e) (Sirius Red Staining, ingrandimento 20X). Le immagini mostrano un aumento del livello di fibrosi tubulointerstiziale nei ratti diabetici (b) verso il gruppo controllo (a), i ratti diabetici + Ac-SDKP (c), i ratti diabetici + ACEi (d) e i ratti diabetici + ACEi + Ac-SDKP (e). La somministrazione di Ac-SDKP (c) e di ramipril (d) riduce la fibrosi tubulointerstiziale nei ratti diabetici; la co-somministrazione di ACEi + Ac-SDKP (e) riduce ulteriormente la fibrosi rispetto al trattamento con ramipril da solo (d). Le immagini a luce polarizzata dimostrano che l'aumento di fibrosi è dovuto ad un aumento di deposizione di collagene di tipo I (colorazione arancione/giallo).

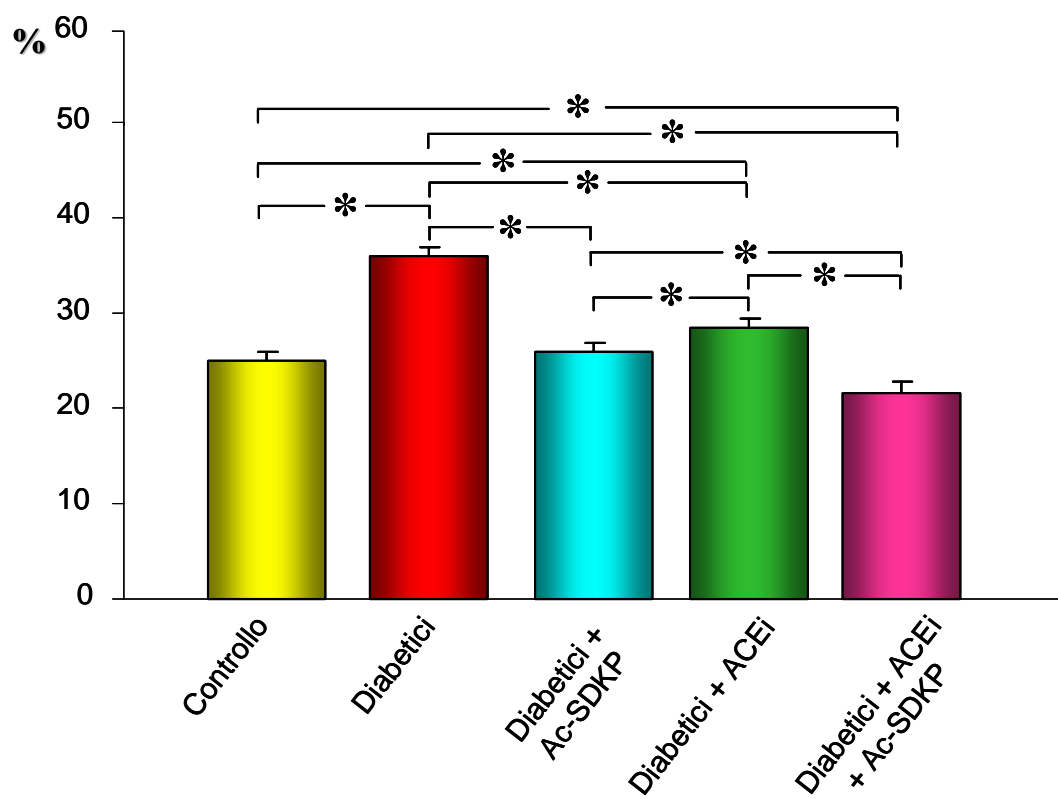




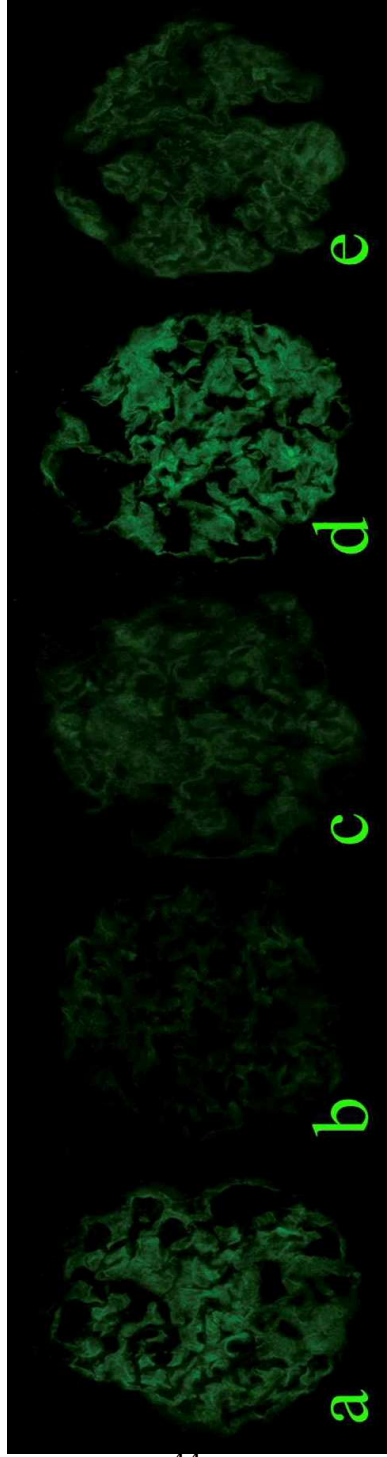
**Fig. 8B** Effetto della somministrazione di Ac-SDKP e di ramipril sulla fibrosi tubulointerstiziale nel rene. Quantificazione della fibrosi tubulointerstiziale nei diversi gruppi trattati. \*:  $p < 0.01$ .



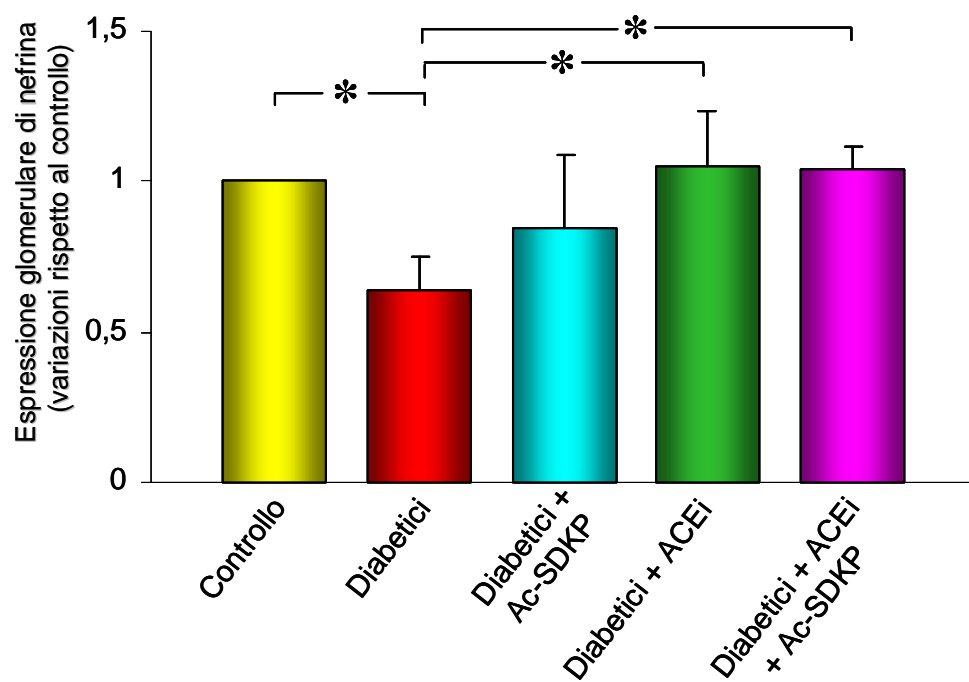
**Fig. 9A Effetto della somministrazione di Ac-SDKP e di ramipril sulla fibrosi perivascolare nel rene.** Immagine rappresentativa della fibrosi perivascolare nei controlli (a), nei diabetici (b), nei diabetici trattati con Ac-SDKP (c), nei diabetici trattati con ACEi (d) e nei diabetici trattati con ACEi + Ac-SDKP (e) (Sirius Red Stanning, ingrandimento 20X). Le immagini mostrano un aumento del livello di fibrosi perivascolare nei ratti diabetici (b) verso il gruppo controllo (a), i ratti diabetici + Ac-SDKP (c), i ratti diabetici + ACEi (d) e i ratti diabetici + ACEi + Ac-SDKP (e). La somministrazione di Ac-SDKP (c) e di ramipril (d) riduce la fibrosi perivascolare nei ratti diabetici; la co-somministrazione di ACEi + Ac-SDKP (e) riduce ulteriormente la fibrosi rispetto al trattamento con ramipril da solo (d). Le immagini a luce polarizzata dimostrano che l'aumento di fibrosi è dovuto ad un aumento di deposizione di collagene di tipo I (colorazione arancione/giallo).



**Fig. 9B** Effetto della somministrazione di Ac-SDKP e di ramipril sulla fibrosi perivascolare nel rene. Quantificazione della fibrosi perivascolare nei diversi gruppi trattati. \*:  $p < 0.01$ .



**Fig.10A** Effetto della somministrazione di Ac-SDKP e di ramipril sull'espressione della nefrina nel glomerulo nei ratti diabetici. Immagine rappresentativa della nefrina glomerulare nei controlli (a), nei diabetici (b), nei diabetici trattati con Ac-SDKP (c), nei diabetici trattati con ACEi (d) e nei diabetici trattati con ACEi + Ac-SDKP (e) (ingrandimento 40X). Le immagini mostrano una diminuzione del livello di espressione di nefrina nei ratti diabetici (b) verso il gruppo controllo (a). La somministrazione di Ac-SDKP nei ratti diabetici ripristina parzialmente l'espressione di nefrina (c), mentre nei ratti diabetici trattati con ACEi (d) e trattati con ACEi + Ac-SDKP (e) si osserva un'espressione di nefrina simile al gruppo dei ratti controllo (a).



**Fig. 10B** Effetto della somministrazione di Ac-SDKP e di ramipril sull'espressione della nefrina nel glomerulo nei ratti diabetici. Quantificazione dell'espressione della nefrina nei diversi gruppi trattati. \*:p< 0.05.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Alvarez LM, Di Stefano JK. The role of non-coding RNAs in diabetic nephropathy: Potential applications as biomarkers for disease development and progression. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2012; 2-11.
2. Nathan DM, Zinman B, Leary, et al. Modern-day clinical course of type 1 diabetes mellitus after 30 years 'duration: the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications and Pittsburg epidemiology of diabetes complications experience. *Arch Intern Med*. 2009; 169: 1307-1316.
3. Gray SP, Cooper ME. Alleviating the burden of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2011;7:71–3.
4. Kendrick J, Chonchol MB. Nontraditional risk factors for cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2008; 4(12): 672:681.
5. Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, et al. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetic Care* 2005;28(1):164-176.
6. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, et al. 2007 ESH-ESC Practice guidelines for management of arterial hypertension, ESH-ESC Task Force on the management of arterial hypertension. *J Hypertension*. 2007; 25 (9): 1751-1762.
7. Roscioni SS, de Zeeuw D, Hellemons ME, et al. A urinary peptide biomarker set predicts worsening of albuminuria in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2013; 56: 259-267.
8. Sandison A, Newbold KM, Howie AJ. Evidence for unique distribution of Kimmelstiel-Wilson nodules in glomeruli. *Diabetes*. 1992;41(8):952-955.
9. Schwartz MM, Lewis EJ, Leonard-Martin T, et al. Renal pathology patterns in type II diabetes mellitus: relationship with retinopathy. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 2547-2552.
10. Tervaert TW, Mooyaart AL, Amann K, et al. Pathologic Classification of Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2010; 21: 556–563.
11. Farris AB, Colvin RB. Renal interstitial fibrosis: mechanisms and evaluation. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012; 21: 289-300.

12. Ziyadeh FN, Wolf G. Pathogenesis of the Podocytopathy and Proteinuria in Diabetic Glomerulopathy. *Current Diabetes Reviews*. 2008; 4: 39-45.
13. Steffes MW, Schmidt D, McCreery R, et al. Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients. *Kidney Int* 2001; 59: 2104-2113.
14. P. Fioretto P, Caramori ML, Mauer M. The kidney in diabetes: dynamic pathways of injury and repair. The Camillo Golgi Lecture 2007. *Diabetologia* 2008; 51:1347–1355.
15. Huber TB, Hartleben B, Kim J, et al. Nephritin and CD2AP Associate with Phosphoinositide 3-OH Kinase and Stimulate AKT-Dependent Signaling. *Mol Cell Biol* 2003; 23 (14): 4917-4928.
16. Huber TB, Kottgen M, Schilling B, et al. Interaction with Podocin Facilitates Nephritin Signaling. *J Biol Chem*. 2001; 276: 41543–41546.
17. Foster RR, Saleem MA, Mathieson PW, et al. Vascular endothelial growth factor and nephritin interact and reduce apoptosis in human podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 288: F48–F57.
18. Shih NY, Jun Li J, Cotran R, et al. CD2AP Localizes to the Slit Diaphragm and Binds to Nephritin via a Novel C Terminal Domain. *Am J Pathol*. 2001; 159:2303–2308.
19. Schermer B, Benzing T. Lipid–Protein Interactions along the Slit Diaphragm of Podocytes *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20: 473–478.
20. Bonnet F, Cooper ME, Kawachi H, et al. Irbesartan normalises the deficiency in glomerular nephritin expression in a model of diabetes and hypertension. *Diabetologia*. 2001; 44(7): 874-877.
21. Doublier S, Salvidio G, Lupia E, et al. Nephritin Expression Is Reduced in Human Diabetic Nephropathy: Evidence for a Distinct Role for Glycated Albumin and Angiotensin II. *Diabetes*. 2003; 52:1023–1030.
22. Infanger M, Grosse J, Westphal K. et al. Vascular endothelial growth factor induces extracellular matrix proteins and osteopontin in the umbilical artery. *Ann. Vasc. Surg*. 2008; 22,: 273-284.
23. Coward RJM, Welsh GI, Yang J, et al. The Human Glomerular Podocyte Is a Novel Target for Insulin Action. *Diabetes*. 2005; 54: 3095–3102.
24. Coward RJM, Welsh GI, Koziell A, et al. Nephritin Is Critical for the Action of Insulin on Human Glomerular Podocytes. *Diabetes*. 2007; 56:1127–1135.



25. Siragy HM, Carey RM. Role of the intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system in chronic kidney disease. *Am J Nephrol.* 2010; 31: 541-550.
26. Carretero OA. Novel mechanism of action of ACE and its inhibitors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 289: H1796-H1797.
27. Touyz RM. Recent advances in intracellular signalling in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertension.* 2003; 12: 165-174.
28. Urushihara M, Kinoshita Y, Kondo S, et al. Involvement of the Intrarenal Renin-Angiotensin System in Experimental Models of Glomerulonephritis. *J Biomed Biotechnol Epub* 2012 Jul 2
29. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, et al. Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 21(1): 16–20.
30. Wolf G. Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney Int.* 2006; 70: 1914–1919.
31. Stoll M, Unger T. Angiotensin and its AT<sub>2</sub> receptor: new insights into an old system. *Regulatory Peptides.* 2001; 99: 175-182.
32. Zhang C, Hein TW, Wang W, Kuo L. Divergent roles of angiotensin II AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors in modulating coronary microvascular function. *Circ Res.* 2003; 92: 322-329.
33. Jhren O, Dendorfer A, Dominiak P. Cardiovascular and renal function of angiotensin II type-2 receptors. *Cardiovasc Res.* 2004; 62: 460-467.
34. Heldin CH, Miyazono K, Dijke PT. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 1997;390 (6659):465-471.
35. Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. TGF-b-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J. Dermatol Sci.* 2004; 35: 83-92.
36. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, et al. Molecular mechanisms of angiotensin II-induced vascular injury. *Curr Hypertens Rep.* 2003; 5:73-79.
37. Bienkowski RS. Intracellular degradation of newly synthesized collagen. *Coll Relat Res.* 1984;4(5):399-411.
38. Fallas JA, O'Leary LE, Hartgerink JD .Synthetic collagen mimics: self-assembly of homotrimers, heterotrimers and higher order structures. *Chem Soc Rev.* 2010; 39(9): 3510-27.

39. Tryggvason K, Heikkila P, Pettersson E, et al. Can Alport syndrome be treated by gene therapy? *Kidney International*. 1997; 51(5):1493-1499.
40. Pradelles P, Frobert Y, Creminon C, et al. Negative regulator of pluripotent hematopoietic stem cell proliferation in human white blood cells and plasma as analysed by enzyme immunoassay. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990; 170: 986-993.
41. Pradelles P, Frobert Y, Creminon C, et al. Distribution of a negative regulator of haematopoietic stem cell proliferation (AcSDKP) and thymosin  $\beta$ 4 in mouse tissues. *FEBS Lett*. 1991; 289: 171-175.
42. Stéphan JP, Melaine N, Ézan E, et al. Source, catabolism and role of the tetrapeptide N-Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro within the testis. *J Cell Sci*. 2000; 113: 113-121.
43. Rousseau A, Michaud A, Chauvet MT, et al. The hemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of N-terminal active site of human angiotensin-converting-enzyme. *J Clin Chem*. 1995; 270: 3656-3661.
44. Azizi M, Rousseau A, Ezan E, et al. Acute Angiotensin-converting enzyme inhibition increases the plasma level of natural stem cell regulator N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline. *J Clin Invest*. 1996; 97: 839-844.
45. Azizi M, Ezan E, Nicolet L, et al. High plasma level of N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline: a new marker of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition. *Hypertension* 1997; 30:1015-1019.
46. Myöhänen TT, Tenorio-Laranga J, Jokinen B, et al. Prolyl oligopeptidase induces angiogenesis both *in vitro* and *in vivo* in a novel regulatory manner *Br J Pharmacol*. 2011; 163(8): 1666–1678.
47. Sosne G, Qiu P, Goldstein AL, et al. Biological activities of thymosin- $\beta$ 4 defined by active sites in short peptide sequences. *FASEB J*. 2010; 24: 2144–2151.
48. Lenfant M, Wdzieczak-Bakala J, Guittet E, et al. Inhibitor of hematopoietic pluripotent stem cell proliferation: purification and determination of its structure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86: 779-782.
49. Rhaleb NE, Peng H, Harding P, et al. Effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on DNA and collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts. *Hypertension*. 2001; 37: 827-832.
50. Sharma U, Rhaleb NE, Pokharel S, et al. Novel anti-inflammatory mechanisms of NAcetyl-Ser-Asp-Lys-Pro in hypertension-induced target organ damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294: H1226-H1232.

51. Kanasaki K, Koya D, Sugimoto T, et al. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline inhibits TGF- $\beta$  mediated plasminogen activator inhibitor-1 expression via inhibition of Smad pathway in human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14: 863–872.
52. Pokharel S, Van Geel PP, Sharma UC, et al. Increased myocardial collagen content in transgenic rats overexpressing cardiac angiotensin-converting enzyme is related to enhanced breakdown of N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro and increased phosphorylation of Smad2/3. *Circulation*. 2004; 110: 3129–3135.
53. Shibuya K, Kanasaki K, Isono M, et al. N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline Prevents Renal Insufficiency and Mesangial Matrix Expansion in Diabetic db/db Mice. *Diabetes*. 2005; 54: 838–845.
54. Wang M, Liu R, Jia X, et al. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline attenuates renal inflammation and tubulointerstitial fibrosis in rats. *Int J Mol Med*. 2010; 26: 795-801.
55. Peng H, Carretero OA, Raji L, et al. Antifibrotic effects of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on the heart and kidney in aldosterone-salt hypertensive rats. *Hypertension*. 2001; 37: 794-800.
56. Peng H, Carretero OA, Liao NE, et al. Role of N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline in the antifibrotic and anti-inflammatory effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril in hypertension. *Hypertension*. 2007; 49: 695 – 703.
57. Omata M, Taniguchi H, Koya D, et al. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline ameliorates the progression of renal dysfunction and fibrosis in WKY rats with established anti-glomerular basement membrane nephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17 (3): 674-685.
58. Liao TD, Yang XP, D'Ambrosio M, et al. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline attenuates renal injury and dysfunction in hypertensive rats with reduced renal mass: council for high blood pressure research. *Hypertension*. 2010; 55: 459-467.
59. Rhaleb NE, Pokharel S, Sharma U, et al. Renal protective effects of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline in DOCA-salt hypertensive mice. *J Hypertens*. 2011; 29: 330-338.
60. Rasoul S., Carretero OA, Peng H, et al. Antifibrotic effect of Ac-SDKP and angiotensin-converting enzyme inhibition in hypertension. *J Hypertens*. 2004; 22, 593-603.
61. Peng H, Carretero OA, Brigstock DR, et al. Ac-SDKP reverses cardiac fibrosis in rats with renovascular hypertension. *Hypertension*. 2003; 42: 1164-1170.
62. Peng H, Carretero OA, Vuljai N, et al. Angiotensin converting enzyme inhibitors. A new mechanism of action. *Circulation*. 2005; 112: 2436-2445.

63. Lin C-H, Rhaleb N-E, Yang X-P, et al. Prevention of aortic fibrosis by N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline in angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; 295: H1253-H1261.
64. Yang F, Yang XP, Liu YH, et al. Ac-SDKP reverses inflammation and fibrosis in rats with heart failure after myocardial infarction. *Hypertension*. 2004; 43: 229-236.
65. Castoldi G, di Gioia CR, Bombardi C, et al. Prevention of myocardial fibrosis by N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline in diabetic rats. *Clin Sci*. 2010; 118: 211-220.
66. Rhaleb NE, Peng H, Yang XP, et al. Long-term effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on left ventricular collagen deposition in rats with 2-kidney, 1-clip hypertension. *Circulation*. 2001; 103 (25):3136-3141.
67. Lenkkeri U, Mannikko M, McCready P, et al. Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the finnish type (NPHS1) and characterization of mutations. *Am J Hum Genet*. 1999; 64:51–61.
68. Nakamura Y, Ono H, Zhou X, et al. Angiotensin type I receptor antagonism and ACE inhibition produce similar renoprotection in N-nitro-L-arginine methyl ester/spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2001; 37: 1262-1267.