

**Università degli Studi di Bologna**  
**“Alma Mater Studiorum”**

**Università degli Studi di Roma**  
**“La Sapienza”**

**Dottorato di Ricerca in Scienze Nefrologiche**  
**XVIII ciclo**  
**(MED/14)**

**EFFETTI DELL'ACIDO URICO SULLE CELLULE GLOMERULARI MESANGIALI:  
MECCANISMI INTRACELLULARI DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE E POSSIBILI  
IMPLICAZIONI NELLA PROGRESSIONE DEL DANNO RENALE E NELLA  
SINDROME INFIAMMATORIA IN CORSO DI NEFROPATIE CRONICHE**

**TUTOR**  
**Chiar.mo Prof. Paolo Menè**

**COORDINATORE**  
**Chiar.mo Prof. Sergio Stefoni**

**DOTTORANDA**  
**Dott.ssa Francescaromana Festuccia**

## ABSTRACT

Uric acid is a major inducer of inflammation in renal interstitium and may play a role in the progression of renal damage in hyperuricemic subjects with primary nephropathies, renal vascular disease, and essential hypertension. At the same time, UA also acts as a water-soluble scavenger of reactive oxygen species. We evaluated the cellular effects of UA on cultured HMC as a potential interstitial target for abnormally elevated levels in acute and chronic renal disease. Intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) was monitored by microfluorometry of fura 2-loaded cells, while oxidation of intracellularly trapped non-fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, 20  $\mu\text{M}$ ) was employed to assess the generation of reactive oxygen species during 12-hr incubations with various concentrations of UA or monosodium urate.

Fluorescent metabolites of DCFH-DA in the culture media of HMC were detected at 485/530 nm excitation/emission wavelengths, respectively. UA dose-dependently lowered resting  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (from  $102 \pm 9$  nM to  $95 \pm 3$ ,  $57 \pm 2$ ,  $48 \pm 6$  nM at 1-100  $\mu\text{M}$  UA, respectively,  $p < 0.05$ ), leaving responses to vasoconstrictors such as angiotensin II unaffected. The effect was not due to  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  exchange upon acidification of the bathing media, as acetate, glutamate, lactate and other organic acids rather increased  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (to max. levels of  $497 \pm 42$  nM with 0.1 mM acetate). The decrease of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was abolished by raising extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and not due to effects on  $\text{Ca}^{2+}$  channels or activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases, since unaffected by thapsigargin. The process rather appeared sensitive to removal of extracellular  $\text{Na}^+$  in combination with blockers of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange, such as 2',4'-dichlorobenzamil, pointing to a countertransport mechanism. UA dose-dependently prompted the extracellular release of oxidised DCFH (control  $37 \pm 2$  relative fluorescence units (RFU)/ml, 0.1  $\mu\text{M}$   $47 \pm 2$ , 1  $\mu\text{M}$   $48 \pm 2$ , 10  $\mu\text{M}$   $51 \pm 4$ , 0.1 mM  $53 \pm 4$ ; positive control, 10  $\mu\text{M}$  sodium nitroprusside  $92 \pm 5$  RFU/ml,  $p < 0.01$ ).

In summary, UA interferes with  $\text{Ca}^{2+}$  transport in cultured HMC, triggering oxidative stress which may initiate a sequence of events leading to interstitial injury and possibly amplifying renal vascular damage and/or the progression of chronic disease.

Parole chiave: acido urico, stress ossidativo, perossinitrito, cellule mesangiali.

## **INDICE**

<b>Introduzione</b>	<b>pag. 4</b>
<b>Chimica biologica degli urati</b>	<b>pag. 7</b>
<b>Metabolismo renale degli urati</b>	<b>pag. 10</b>
<b>Acido urico ed ipertensione arteriosa</b>	<b>pag. 12</b>
<b>Acido urico e nefropatie croniche progressive</b>	<b>pag. 15</b>
<b>Scopo dello studio</b>	<b>pag. 17</b>
<b>Materiali e metodi</b>	<b>pag. 19</b>
<b>Colture cellulari</b>	<b>pag. 19</b>
<b>Ca<sup>2+</sup> intracellulare</b>	<b>pag. 20</b>
<b>pH intracellulare</b>	<b>pag. 22</b>
<b>Perossinitrito</b>	<b>pag. 24</b>
<b>Risultati</b>	<b>pag. 25</b>
<b>Conclusioni</b>	<b>pag. 27</b>
<b>Figure</b>	<b>pag. 28</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>pag. 45</b>

## **Introduzione**

L'acido urico (AU) è il principale prodotto urinario del metabolismo delle purine nell'uomo, mentre in altre specie animali uricoteliche, come gli uccelli, rappresenta il principale catabolita azotato escreto con le urine (fino al 76% contro 20% di ammonio e solo 4% di urea) (1).

La concentrazione di AU nei liquidi corporei è data dall'equilibrio tra ritmo di produzione e velocità di escrezione. Si stima che nell'uomo il pool di AU sia di 1,2 g, con un turnover giornaliero di 0,7 g di cui circa 2/3 dovuti all'escrezione urinaria ed 1/3 escreto per via intestinale (secrezione biliare, gastrica e intestinale). Nell'intestino l'AU viene degradato dai batteri tramite un processo di uricolisi.

Le purine esogene, introdotte con la dieta, sono un'importante fonte di AU. Più del 50% delle purine dell'RNA e il 25% di quelle del DNA ingerite sono assorbite ed escrete con le urine come AU. Di conseguenza le diete ad alto contenuto purinico influenzano l'uricemia e l'escrezione urinaria. Anche le purine endogene sono un'importante fonte di AU, con aumentata produzione in relazione all'attività della via di sintesi e di riutilizzo delle stesse.

A causa dell'assenza di uricasi epatica nella specie umana per due mutazioni *nonsense* (codoni 33 e 187) e una mutazione *splice* nell'esone 3 del gene dell'uricasi intervenute durante l'evoluzione dei primati nel Miocene, questo acido organico debole viene eliminato in quanto tale piuttosto che in forma della più solubile allantoina, come in altri mammiferi (2,3,4). Ciò determina elevati livelli ematici di AU, spesso superiori a 7.5- 8 mg/dl in pazienti con sindrome metabolica, obesi,

diabetici, ipertesi, nefropatici cronici. Il rischio di precipitazione di AU in forma cristallina nei tessuti molli, particolarmente periarticolari, e talvolta nel rene e nelle vie urinarie, ha potenziato lo sviluppo nella specie umana di un efficace meccanismo di escrezione urinaria centrato su trasportatori anionici bidirezionali nel tubulo prossimale (5).

I livelli ematici di AU riflettono qualsiasi anomalia nel bilancio esterno, aumentando bruscamente in caso di lisi cellulare (come nel caso della rabdomiolisi e della sindrome da lisi tumorale, SLT) (6,7) o in condizioni di aumentato riassorbimento tubulare (contrazione di volume, diuretici). Nell'insufficienza renale cronica la riduzione della clearance degli urati e il frequente impiego di diuretici favoriscono l'iperuricemia. Per contro i livelli ematici diminuiscono in misura significativa in caso di espansione del volume circolante (gravidanza, sindrome da inappropriata secrezione di ADH) o di tubulopatia con difetto di riassorbimento (sindrome di Fanconi). La calcolosi uratica e la più nebulosa "nefropatia uratica" sono entità nosografiche associate ad elevati livelli tissutali e/o urinari di urati o loro precursori.

L'associazione dell'iperuricemia con ipertensione arteriosa, diabete e nefropatie croniche progressive ha stimolato la ricerca di un possibile ruolo patogenetico dell'AU come agente promotore di danno microvascolare, di cui potrebbe in ogni caso rappresentare un marker precoce. Il concetto dell'AU come tossina uremica è tuttora in attesa di validazione, ma certamente livelli ematici > 15 mg/dl si associano a precipitazione intratubulare e immediate conseguenze funzionali renali fino all'anuria, come nel caso della SLT (6,7). D'altra parte, l'AU ha effetti duplici,

proinfiammatori in quanto microprecipitato cristallino insolubile a pH fisiologico, e contemporaneamente citoprotettivi in vari sistemi biologici, come “scavenger” dei radicali dell'O<sub>2</sub> libero.

## **Chimica biologica degli urati**

L'AU è una triossipurina composta da una porzione pirimidinica e una imidazolica, con molecole di ossigeno in posizione 2, 6 e 8 dell'anello purinico. È un acido debole, in gran parte per la ionizzazione dell'atomo di idrogeno in posizione 8 dell'anello imidazolico (pKa 5.75). L'idrogeno in posizione 3 dell'anello pirimidinico (pKa 10.3) rimane indissociato nell'intervallo di pH che normalmente si trova nei liquidi intra ed extra-cellulari nell'uomo. L'urato monosodico è la forma predominante a pH 7.4 e costituisce il 98% dell'AU nel plasma. Meno del 5% è legato alle proteine plasmatiche e viene liberamente filtrato a livello glomerulare. Nel plasma la saturazione dell'urato monosodico avviene ad una concentrazione superiore a 6,8 mg/dl a 37°C. Sebbene la concentrazione sierica di AU superi questo valore, nel plasma avviene una sovrassaturazione piuttosto che una precipitazione. L'AU è più solubile nelle urine che nell'acqua, probabilmente per la presenza di urea, proteine e mucopolisaccaridi. Il pH urinario influenza sia il rapporto tra AU ed urato sia la solubilità dell'urato. A pH 5 le urine sono sature a una concentrazione di AU da 6 a 15 mg/dl, mentre a pH 7 la saturazione è raggiunta solo a concentrazioni che si avvicinano a 200 mg/dl (5).

Nelle diverse specie animali deriva dal metabolismo di xantina o ipoxantina da parte della xantina-deidrogenasi o urato-sintetasi (Figura 1). A loro volta le xantine derivano dalle purine adenosina o inosina contenute nei nucleotidi del DNA, ad opera di un complesso enzimatico comprendente adenosina deaminasi, nucleoside fosforilasi e 5'-nucleotidasi (8, 9). Come già detto, la sostanziale assenza di urato-

ossidasi nell'uomo impedisce la ulteriore ossidazione ad allantoina, decisamente più solubile al consueto pH urinario lievemente acido (10). Calcoli di xantina e ipoxantina possono essere reperiti in pazienti con nefropatia uratica o SLT sottoposti a terapia alcalinizzante urinaria, dato il pKa elevato di 7.4 e 8.5, rispettivamente, di questi precursori della sintesi di AU.

Difetti enzimatici nella complessa sequenza di deaminazione delle purine portano alla formazione di composti intermedi come la 2,8-diidrossiadenina (2,8-DHA), responsabile a sua volta di nefrolitiasi. L'accumulo di 2,8-DHA è la manifestazione clinica più importante del deficit dell'enzima adenina-fosforibosil-transferasi (APRT), un disordine ereditario autosomico recessivo del metabolismo delle purine con impossibilità di trasformazione dell'adenina, proveniente dal catabolismo degli acidi nucleici, in adenosina monofosfato (AMP) (11,12). L'adenina in eccesso viene convertita dalla xantina-ossidasi in 2,8-DHA, metabolita praticamente insolubile ai comuni pH urinari. L'escrezione di eccessive quantità di questa purina insolubile determina cristalluria e/o calcolosi renale, talora erroneamente confusa con quella uratica.

Il gene per la sintesi dell'APRT è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 16.

Sono stati identificati due tipi di deficit:

Tipo 1: legato all'allele mutante APRT\*Q0, è stato segnalato nella razza caucasica (Islanda, Francia, etc.) ed è caratterizzato dall'assenza completa dell'enzima APRT. E' definito dalla presenza di due alleli APRT\*Q0 (la malattia si manifesta pertanto solo negli omozigoti).

Tipo 2: legato all'allele mutante APRT\*J, è stato riscontrato solo nella popolazione giapponese. Il deficit può essere solo parziale e la malattia si esprime già negli eterozigoti con genotipo APRT\*J/APRT\*Q0. I casi di litiasi o cristalluria da 2,8-DHA riportati in letteratura sono apparentemente rari, sebbene nella popolazione caucasica la frequenza degli eterozigoti vari tra 0.4%-1.1%, con una omozigosità che va da 1/50.000 a 1/100.000 individui. Tale discordanza tra calcolosi attesa e calcolosi segnalata è verosimilmente imputabile ad una diagnosi poco accurata e ad un generico inquadramento nella calcolosi uratica (11,12).

## **Metabolismo renale degli urati**

Lo sviluppo di un robusto apparato di trasporto dell'AU nel tubulo prossimale della specie umana è indicativo degli adattamenti evolutivi cui è stato sottoposto il nefrone dalla progressivamente crescente concentrazione di AU nei tessuti.

I meccanismi più importanti di trasporto renale dell'AU sono la filtrazione glomerulare, il riassorbimento, la secrezione e il riassorbimento post-secretivo.

L'AU è liberamente filtrato e ampiamente riassorbito con una frazione di escrezione (FE urato) che è compresa nell'uomo tra il 7e il 12%. Quasi tutto l'AU viene probabilmente riassorbito nel primo tratto del tubulo prossimale. Questo indica che l'AU urinario deriva prevalentemente dalla secrezione tubulare che avviene maggiormente nel segmento S2 del tubulo prossimale. Una parte significativa dell'AU secreto (40-45%) viene successivamente riassorbita (1,2) (Figura 2).

Ne deriva una escrezione finale a bilancio con la generazione endogena di 300-750 mg/die, le cui variazioni sono associate a fluttuazioni dei livelli ematici, particolarmente legati come già visto allo stato di volume nel compartimento extracellulare e intravascolare. Responsabile del trasporto bidirezionale dell'AU è uno scambiatore anionico condiviso da vari acidi organici, come l'acido lattico, radicali idrossilici, bicarbonato, cloro, acido p-aminoippurico. Sono stati recentemente clonati 4 DNA complementari codificanti per proteine che trasportano AU (5,13,14,15). Due di queste proteine sono localizzate sulla membrana apicale delle cellule tubulari prossimali: una galectina ha caratteristiche di trasportatore/canale elettrogenico; la seconda proteina è uno scambiatore

elettroneutrale AU-anioni appartenente alla famiglia dei trasportatori organici. I trasportatori organici anionici 1 e 3 sono localizzati sulla membrana basolaterale dell'epitelio tubulare prossimale. Il trasportatore degli anioni organici 1 è elettroneutrale, mentre il meccanismo del trasportatore 3 rimane da determinare. E' probabile che lo scambiatore AU/anioni sia responsabile del riassorbimento luminale, mentre il trasportatore/canale consente la secrezione dalla cellula verso il lume tubulare. I trasportatori degli anioni organici 1 e 3 verosimilmente effettuano il trasporto da e verso i capillari peritubulari. La captazione di AU dai capillari peritubulari da parte della cellula epiteliale è il primo passaggio nel processo di secrezione tubulare (5,13,14,15).

Un fenomeno di notevole importanza fisiopatologica è il rigoroso accoppiamento tra riassorbimento degli anioni ( $\text{Cl}^-$  e AU) e  $\text{Na}^+$  negli stati di riduzione del flusso tubulare prossimale, così che situazioni di disidratazione, contrazione di volume o riduzione acuta del filtrato glomerulare si associano pressochè invariabilmente ad aumento del riassorbimento di AU. E' il caso della terapia diuretica, indipendentemente dal sito di azione a livello dell'ansa di Henle (furosemide, acido etacrinico) o del tubulo contorto distale (tiazidici), laddove lo stimolo al riassorbimento prossimale di  $\text{Na}^+$  trascina AU per accoppiamento elettroneutrale incrementandone i livelli ematici (1,5).

## **Acido urico e ipertensione arteriosa**

La comune associazione tra ipertensione arteriosa e/o sindrome metabolica e iperuricemia ha promosso notevole interesse in un possibile nesso causale tra questi fenomeni. Certamente la dieta occidentale ricca in precursori dell'AU e  $\text{Na}^+$  rappresenta un co-fattore nella generazione di elevati livelli circolanti del primo e di ipertensione arteriosa. La relazione è peraltro più sottile, come dimostrato da una notevole mole di dati sperimentali accumulata dal gruppo di R.J. Johnson a Seattle e successivamente Gainesville, U.S.A. Questi Ricercatori hanno sviluppato un modello animale di blanda iperuricemia basata sulla somministrazione di acido oxonico nel ratto, un inibitore della urato-ossidasi in grado di riprodurre la deficienza dell'enzima tipica della specie umana (16,17). Gli animali divengono rapidamente ipertesi, fenomeno che può essere corretto dalla somministrazione di allopurinolo, inibitore della xantina-ossidasi largamente usato nella prevenzione della gotta e della calcolosi uratica. Anche un agente uricosurico come il benziodarone è in grado di contrastare l'ipertensione arteriosa (1,2,3,16,17,18). Per quanto non vi sia evidenza di un effetto antiipertensivo dell'allopurinolo nell'uomo, bisogna ammettere che la  $\text{Na}^+$ -dipendenza dell'effetto dell'acido oxonico nel ratto è suggestiva di un possibile collegamento tra ritenzione sodica, ridotta escrezione di AU e genesi dell'ipertensione arteriosa, quanto meno nell'animale da esperimento (2,3,4).

Nell'ipotesi di Johnson e coll., la genesi dell'iperuricemia riconosce un duplice stadio. In primo luogo, la rarefazione capillare caratteristica dell'ipertensione arteriosa determina ipossia tissutale con un accumulo relativo di acido lattico e

ketoacidi (acido acetoacetico,  $\beta$ -idrossibutirrico). La necessità di eliminare prioritariamente il lattato e/o ketoacidi attraverso uno o più degli scambiatori anionici del tubulo prossimale ostacola per inibizione competitiva la secrezione e quindi la clearance degli urati (2,3,4). In seconda istanza, elevati livelli di uricemia derivano dal breakdown di ATP nel tessuto ischemico, con liberazione di adenosina e quindi ipoxantina. Anche l'attività della xantina-ossidasi appare aumentata in corso di ischemia tissutale. In effetti, aumenti dei livelli di AU nel sangue venoso refluo di tessuti ischemici per occlusione vascolare sono di frequente osservazione (18). Data l'associazione dell'ipertensione arteriosa con danno tubulo-interstiziale renale, la possibilità che un rene ischemico determini una riduzione nell'escrezione di  $\text{Na}^+$  e AU è molto concreta, con un circolo vizioso tendente a perpetuare e forse aggravare lo stato ipertensivo, particolarmente in presenza di elevato apporto dietetico di  $\text{Na}^+$  (19,20,21,22,23). Studi sperimentali nell'animale e nell'uomo indicano una associazione tra iperuricemia e riduzione del flusso ematico renale, con una ulteriore interessante evidenza di danno tubulo-interstiziale nella nefropatia iperuricemica familiare, una sorta di modello naturale della nefropatia uratica, da molti (ma non da tutti) considerata una conseguenza della flogosi indotta da microcristalli di urati o xantine nella midollare renale iperosmotica (24). In effetti i cristalli di AU sono in grado di attivare il complemento attraverso la via classica o alterna, indurre aggregazione piastrinica, stimolare neutrofili e macrofagi, come nel classico caso dei depositi intraarticolari nella gotta o nei tessuti molli in forma di tofi (25,26).

La stimolazione diretta del sistema renina-angiotensina (SRA) da parte dell'AU offre una ulteriore chiave interpretativa alla connessione iperuricemia/ipertensione (27). Tra l'altro questo fenomeno potrebbe, secondo Johnson e coll., avere costituito un vantaggio evolutivo per primati e progenitori della specie umana alimentati con una dieta povera di  $\text{Na}^+$  rispetto agli standard attuali (3,28,29). L'incremento della pressione arteriosa secondario all'aumento dell'uricemia potrebbe avere agevolato il mantenimento della stazione eretta e la sopravvivenza in climi estremi, creando una pressione evolutiva favorevole alla progressiva scomparsa dell'attività uricasica nell'uomo (3,28). Un altro elemento favorevole alla diffusione del carattere "iperuricemia" in alcune specie sarebbe secondo alcuni costituito dall'attività antiossidante dell'AU, che sarebbe in grado di antagonizzare radicali superossido, idrossilici e  $\text{O}_2$  attivo nelle reazioni determinanti stress ossidativo, oltre alla formazione di perossinitrito a partire da ossido nitrico (NO) e anione superossido (23,30,31). Hink et al. hanno recentemente descritto la stabilizzazione della superossido-dismutasi 3 extracellulare da parte dell'AU (32). In sintesi, AU avrebbe effetti protettivi in ambito cardiovascolare e livelli plasmatici più alti potrebbero avere possibilmente agevolato sul piano evolutivo una più lunga aspettativa e durata media di vita della specie umana rispetto ad altri primati (3,28). Una obiezione a queste vedute è che l'iperuricemia è generalmente un fattore prognostico cardiovascolare sfavorevole, ma è stato ovviamente prospettato come essa costituisca un possibile tentativo di compenso ad un ambiente microvascolare a maggiore rischio occlusivo/emorragico in funzione dei più elevati livelli pressori (33,34,35).

## **Acido urico e nefropatie croniche progressive**

La questione di un ruolo dell'AU nella progressione dell'insufficienza renale cronica e della effettiva esistenza di una nefropatia da AU nei pazienti gottososi o comunque iperuricemici è certamente controversa (36,37,38,39,40,41). Vari studi non randomizzati o retrospettivi tendono ad escludere un ruolo degli agenti ipouricemizzanti nel preservare la funzione renale (23,38,41), e vi è una certa sovrapposizione tra le conseguenze della iperuricemia in quanto tale e della frequentemente associata ipertensione arteriosa (nefroangiosclerosi, danno tubulo-interstiziale). In effetti scorporando i pazienti ipertesi dalle varie casistiche non vi è evidenza di un ruolo patogenetico della semplice iperuricemia, anche se ovviamente gli studi non sono corredati di biopsie renali seriate, e se l'ipertensione arteriosa deve essere considerata un elemento portante della "sindrome iperuricemica" (42). Peraltro sono state notate correlazioni tra i livelli di uricemia e la prognosi di nefropatie glomerulari evolutive, come recentemente nel caso della nefrite ad IgA (43). La situazione è diversa nell'animale da esperimento, dove la istologia renale in ratti resi iperuricemici offre ampia evidenza di arteriolopatia afferente, fibrosi tubulo-interstiziale, ipertrofia glomerulare e evoluzione verso la glomerulosclerosi, associate sul piano clinico a proteinuria (16,17,18,26). Johnson e Coll. hanno anche documentato un ruolo peggiorativo dell'iperuricemia (in assenza di microcristalli intra-parenchimali), qualora la lesione originale venga affiancata da somministrazione di acido ossonico per aumentare i livelli di AU (16,17,18). E' il caso della nefrotossicità da ciclosporina, farmaco antirigetto e antiproteinurico, esso

stesso frequentemente responsabile di iperuricemia (44,45). La tipica fibrosi a strisce indotta dalla ciclosporina è sensibilmente aggravata dalla contemporanea somministrazione di acido ossonico (43,44). Un altro modello di nefropatia cronica progressiva come la nefrectomia 5/6 è aggravato in termini di proteinuria e danno istologico dalla contemporanea iperuricemia. In generale comunque, i ratti iperuricemici presentano arteriolopatia afferente, fibrosi tubulo-interstiziale e tendenza allo sviluppo di glomerulosclerosi e albuminuria (16,17,46).

Un altro meccanismo patogenetico potenzialmente rilevante alla nefropatia da AU è l'impatto negativo sulla funzione endoteliale e l'attività di stimolo sulla proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari (47). L'infusione di AU nel circolo dell'avambraccio determina una riduzione della attività della NO-sintetasi, mentre il trasporto dell'AU nel citoplasma delle cellule muscolari lisce induce le kinasi ERK 1 e 2 e la sintesi delle catene A e C e di un recettore per il platelet-derived growth factor, producendo un effetto mitogenico (48,49).

## **Scopo dello studio**

L'AU è un potente stimolo infiammatorio per l'interstizio perivascolare agendo anche come "scavenger" di radicali superossido (ROS) prodotti in corso di flogosi e nei tessuti ischemici.

Lo studio si propone di valutare gli effetti dell'AU sui meccanismi di trasduzione del segnale e sulla proliferazione di cellule muscolari lisce glomerulari mesangiali umane in coltura, con particolare riferimento al suo ruolo nello stress ossidativo e nella difesa anti-ossidante.

In particolare sono state valutate le modificazioni delle concentrazioni intracellulari di  $\text{Ca}^{2+}$ , dello stress ossidativo attraverso la formazione di perossinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), del pH intra ed extra-cellulare con i relativi meccanismi omeostatici di trasporto di  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{HCO}_3^-$ , dell'effetto "scavenger" del  $\text{ONOO}^-$  in risposta a sostanze vasoattive.

## **Materiali e Metodi**

Abbiamo studiato gli effetti dell'acido urico (AU) in colture di cellule muscolari lisce umane derivate dal mesangio glomerulare (CMU) come modello di una popolazione interstiziale potenzialmente sensibile ad elevati livelli circolanti e tissutali in corso di ipertensione arteriosa e/o nefropatie.

### **Colture cellulari**

Linee cellulari pure di cellule mesangiali umane (CMU) sono state ottenute da estratti glomerulari con tecnica standard (50). Reni non idonei per il trapianto o campioni di rene da nefrectomia istologicamente privi di lesioni sono stati ottenuti previo consenso informato scritto dai pazienti o dai familiari. Quattro linee cellulari indipendenti sono state usate al passaggio 3-16. Per l'iniziale impianto e la propagazione delle colture cellulari è stato usato terreno RPMI 1640 supplementato con siero bovino fetale al 10% inattivato dal calore (FBS, Flow Laboratories, Irvine, Scotland, U.K.), 5 ug/ml insulina umana ricombinante (Novo, Copenhagen, Denmark), 10 ug/ml ceftriaxone (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) o 100 ug/ml gentamicina (Fournier Pierrel, Milan, Italy). Le cellule sono state mantenute a 37°C in atmosfera controllata, umidificata al 95% di O<sub>2</sub> e al 5% di CO<sub>2</sub> e subcoltivate ogni 4-7 giorni. Ogni volta appropriatamente, le cellule sono state subcoltivate in terreno regolare completo RPMI e 24 ore dopo sostituito con Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM, Paisley, Scotland, U.K.) con glucosio 5.5 mM o 30 mM supplementato con 10% di FBS e antibiotici in assenza di insulina. Il terreno è stato sostituito ogni 24 ore per 5 giorni.

## Ca<sup>2+</sup> intracellulare ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)

Il [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> è stato misurato fluorometricamente in cellule caricate con una sonda intracellulare, fura 2 (Molecular Probes, Eugene, OR) come precedentemente descritto (50, 51,52, 53,54,55,56). Brevemente, dopo rimozione di FBS dal terreno di coltura 24 ore prima dell'esperimento, monostrati confluenti di cellule su coprioggetto di plastica Aclar (Allied Engineered Plastics, Pottsville, PA) sono stati caricati per 40 min a 37°C con 1 µM fura 2 in DMEM privo di siero, successivamente sottoposti ad ulteriore incubazione per 20 min nello stesso terreno senza fura-2. La concentrazione di glucosio è stata mantenuta a 5.5 o 30 mM per tutta la procedura di caricamento. Le misurazioni della fluorescenza sono ottenute inserendo il coprioggetto diagonalmente in una cuvetta di quarzo riempita con 2 ml di soluzione modificata Krebs-Henseleit (KHH) di un'appropriata concentrazione di glucosio, con HEPES (N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) 20 mM e supplementata con albumina sierica bovina priva di acidi grassi 0.2%. I monostrati sono stati eccitati a 340 nm con emissioni raccolte a 500 nm in uno spettrofluorometro Perkin-Elmer LS5B munito di stirrer e termostaticamente controllato per le cellule. Onde di eccitazione/emissione sono state settate a 2.5/5 nm, rispettivamente. La calibrazione della fluorescenza Ca<sup>2+</sup>-dipendente è stata ottenuta dalla saturazione sequenziale del marker ionomicina da 15 a 40 µM (Calbiochem-Behring, La Jolla, CA) ± 10 mM CaCl<sub>2</sub> alla massima fluorescenza (F<sub>max</sub>), seguita da

chelazione di  $\text{Ca}^{2+}$  alla fluorescenza minima ( $F_{\min}$ ) con EGTA (ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) 7.5 mM e Tris 60 mM di, pH 10.5. La fluorimetria ad eccitazione alternata 340/380 nm ad intervalli di 6 sec è stata utilizzata per validare ciascun set di esperimenti. Formule Standard sono state utilizzate per il calcolo del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , utilizzando un  $K_d$  di fura 2 per  $\text{Ca}^{2+}$  di 224 nM (50,54). Negli esperimenti con  $\text{Mn}^{2+}$ , il decadimento della fluorescenza del fura 2 è stato monitorato con eccitazione settata a 340 nm e a 360 nm, punto isosbestico per fura 2 per almeno 3 min dopo aggiunta di  $\text{MnCl}_2$  100  $\mu\text{M}$ , e poi per altri 3 min dopo applicazione di vasocostrittori utilizzati per favorire l'ingresso di  $\text{Ca}^{2+}$ .

## **pH intracellulare (pH<sub>i</sub>)**

CMU subconfluenti sono state cresciute a monostrato in piastre da 12 pozzetti contenente vetrini coprioggetto in plastica Aclar. Le cellule sono state caricate mediante incubazione per 40 min in 1  $\mu$ M 2',7'-bis-(2-carbossietil)-5-(e 6)-carbossifluoresceina (BCECF) acetossimetilestere (BCECF) in RPMI 1640 privo di FBS a 37°C seguita da lavaggio per 20 min nello stesso terreno.

Un coprioggetto veniva trasferito nella cuvetta in quarzo dello spettrofluorimetro Perkin-Elmer LS-5B contenente 2 ml KHH termostato a 37°C sotto agitazione magnetica posizionandolo verticalmente e in diagonale (lato con le cellule ortogonale alla sorgente luminosa). Venivano effettuate letture a eccitazione di 440 / 500 nm (alternata ogni 6 sec) con emissione a 540 nm. Gli slits di eccitazione / emissione erano 2.5 / 5 nm, rispettivamente. Una fluorescenza basale 20-50 unità arbitrarie è stata corretta per l'autofluorescenza di un monostrato non caricato con BCECF. Sono state quindi aggiunte le sostanze da testare (forbolo miristato acetato 0.1  $\mu$ M, che determina dopo 2-3 minuti alcalinizzazione citoplasmatica con aumento della fluorescenza per attivazione di un controtrasporto  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , acidi organici deboli misurando contemporaneamente il pH extracellulare mediante pHmetro digitale). Il segnale è stato calibrato mediante aggiunta di 2  $\mu$ l nigericina (ionoforo del  $\text{K}^+$  che equilibra  $\text{K}^+$  con  $\text{H}^+$  transmembrana, finale 5  $\mu$ g/ml) dopo sostituzione del tampone con soluzione di KCl a pH 6.5 (fluorescenza minima) seguito da aggiunta di KOH fino a pH extracellulare 7.0 e quindi 7.5 (fluorescenza massima). La risultante curva

di calibrazione è stata impiegata per calcolare graficamente il  $\text{pH}_i$ . L'attività di controtrasporto  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  è stata determinata dalla velocità di recupero del  $\text{pH}_i$  ( $\text{pH}/\text{sec}$ ) dopo acidificazione del citoplasma con la tecnica dell' $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  (sostituzione del terreno con una soluzione KHH contenente  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20 mM per 3 min, seguita da aspirazione e rapida sostituzione con soluzione KHH normale).

## **Perossinitrito** (ONOO<sup>-</sup>)

La formazione di (ONOO<sup>-</sup>), indicatore di generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), è stata misurata durante incubazione per intervalli di tempo variabili tra 30 min e 12 ore con AU o NaU attraverso rilevazione microfluorimetrica (485/530 nm eccitazione/emissione), dei livelli extracellulari del metabolita fluorescente deesterificato del tracciante intracellulare 2', 7'-dicloro-fluoresceina DCFH-DA, introdotto mediante incubazione dei monostrati coltivati su vetrini coprioggetto in plastica Aclar per 20 min in RPMI 1640 contenente 20 uM DCFH-DA (Calbiochem, La Jolla, CA). In studi preliminari è stato osservato che dopo rimozione del tracciante in soluzione si verifica una progressiva modesta fuoriuscita del composto deesterificato fluorescente nel terreno di coltura (Figura 3), mentre la fluorescenza associata alle cellule appare sostanzialmente trascurabile e vicina all'autofluorescenza misurata prima del caricamento ( $0.6 \pm 0.3$  unità di fluorescenza relative – RFU/ml). L'applicazione di stimoli della formazione di ONOO<sup>-</sup> come il sodio nitroprussiato ( $10^{-4}$  M) potenziava in maniera significativa, tempo-dipendente e lineare la fluorescenza extracellulare del tracciante (Figura 4). Per tale motivo la formazione di ONOO<sup>-</sup> è stata determinata mediante rilevazione microfluorimetrica direttamente nel terreno di incubazione ai diversi tempi sperimentali.

## **Risultati**

L'AU determina entro 3 minuti una rapida e costante riduzione del  $[Ca^{2+}]_i$  basale in maniera dose-dipendente (da  $102 \pm 9$  nM a  $95 \pm 3$ ,  $57 \pm 2$ ,  $48 \pm 6$  nM, 1-100 uM AU, rispettivamente,  $p < 0.05$ ) (Figura 5) senza alterare la normale risposta cellulare (liberazione di  $Ca^{2+}$  dai depositi) ad altri vasocostrittori quali angiotensina II (1 uM) o arginina vasopressina (Figura 6). L'effetto non appare legato a scambi  $Ca^{2+}/H^+$  per acidificazione extracellulare, in quanto non riprodotto dall'aggiunta di acidi organici deboli (citrato, lattato, acetato), che tendono piuttosto ad aumentare i livelli di  $[Ca^{2+}]_i$  (max  $497 \pm 42$  nM con acetato 0.1 mM) e a potenziare il successivo influsso di  $Ca^{2+}$  attraverso i canali di membrana (Figura 7).

L'aumento di  $Ca^{2+}$  extracellulare a livelli sopraffisiologici ( $10^{-3}M$ ) (Figura 8, pannello B) ostacola il normale deflusso di  $Ca^{2+}$  verso l'ambiente extracellulare che normalmente è legato alla  $Ca^{2+}$ -ATPasi di membrana o al controtrasporto  $Na^+/Ca^{2+}$ ; in queste condizioni l'AU non ha effetti sul  $[Ca^{2+}]_i$ . Viceversa, mantenendo costante la concentrazione di  $Ca^{2+}$  nel bagno a 1.25 mM si ha una riduzione del  $Ca^{2+}$  dose-dipendente in risposta a concentrazioni crescenti di AU (Figura 8, pannello A). Quindi l'AU determina un efflusso di  $Ca^{2+}$  verso l'ambiente extracellulare.

Inoltre le cellule trattate con tapsigargina, un bloccante della  $Ca^{2+}$ -ATPasi del reticolo endoplasmico, conservano una normale sensibilità all'AU (Figura 9). Questo indica come la riduzione di  $Ca^{2+}$  in risposta all'AU non è determinata da un aumento del trasporto dello ione verso i depositi intracellulari. Da notare come la risposta

all'angiotensina II, che in larga parte dipende dalla liberazione di  $\text{Ca}^{2+}$  dai depositi, sia significativamente ridotta dalla taspigargina.

Il possibile ruolo del controtrasporto  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  all'efflusso di  $\text{Ca}^{2+}$  in risposta all'AU è stato studiato utilizzando soluzioni prive di  $\text{Na}^+$ . L'effetto di riduzione del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  da parte dell'AU è totalmente abolito (Figura 10). Questo suggerisce che il controtrasporto  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  sia almeno in parte responsabile del fenomeno biochimico. L'AU determina inoltre formazione dose-dipendente di perossinitrito rilevato dall'ossidazione del DCFH-DA (basale  $37 \pm 2$  unità di fluorescenza RFU/ml, 0.1  $\mu\text{M}$   $47 \pm 2$ , 1  $\mu\text{M}$   $48 \pm 2$ , 10  $\mu\text{M}$   $51 \pm 4$ , 0.1 mM  $53 \pm 4$ ) (Figura 11); ossidazione max 10  $\mu\text{M}$  sodio nitroprussiato  $92 \pm 5$  RFU/ml,  $p < 0.01$ ) (Figura 4).

L'AU viceversa interferisce con l'accumulo di perossinitrito indotto da altri agenti vasoattivi e donatori di ossido nitrico (NO) apparendo protettivo nei confronti dello stress ossidativo.

L'AU/NaU inducono accumulo dose-dipendente di PXN (basale  $14.6 \pm 0.6$  fino ad un max di  $54 \pm 4$  RFU/ml a 0.1 mM) (Figura 12). Analoghi effetti vengono osservati con vasocostrittori come l'angiotensina II ( $+48 \pm 4\%$ ) o l'analogo del trombossano  $\text{A}_2$ , U46619 ( $+33 \pm 2\%$ ), mentre i donatori di NO quali il sodio nitroprussiato (SNP) e NONOato 1-10  $\mu\text{M}$  producevano effetti superiori (max  $+94 \pm 5\%$ ) (Figura 13). Il ruolo di NO e ROS è confermato dagli effetti inibitori di L-NAME ed ebselen sull'accumulo di PXN. Durante coincubazione AU/NaU 10  $\mu\text{M}$  bloccavano completamente l'induzione di PXN da parte di tutti gli agenti testati (ANG II 1  $\mu\text{M}$   $40 \pm 0.8$ , + AU  $28.5 \pm 0.2$ ; SNP  $108 \pm 5$ , +AU  $32 \pm 0.8$  UFR/ml,  $p < 0.01$ ) (Figura 14). Tale

effetto “scavenger” non appariva mediato da acidificazione in quanto immutato variando il pH finale delle soluzioni (da 5.5 a 7.2) (Figure 15-16) e dal  $[Ca^{2+}]_i$  misurato mediante fluorimetria del fura 2 (Figura 17). Inoltre gli incrementi del  $[Ca^{2+}]_i$  indotti dall'ANG II e U46619 non erano alterati dall'AU nonostante una rapida riduzione dei livelli basali e il SNP/NONOato non avevano effetti sul  $[Ca^{2+}]_i$  basale o stimolato.

Pertanto l'acido urico (AU) determina formazione di perossinitriti rilevati tramite l'ossidazione del DCFH-DA, ha effetti antagonisti sul metabolismo proinfiammatorio dell'ossido nitrico in cellule mesangiali umane ed interferisce inoltre con il trasporto del  $[Ca^{2+}]_i$  inducendo stress ossidativo e conseguenti eventi cellulari potenzialmente responsabili del danno vasculo-interstiziale; viceversa ha anche effetti antagonisti sul metabolismo proinfiammatorio del NO in cellule mesangiali umane.

Entrambe i meccanismi possono essere implicati nella patogenesi del danno vasculo-interstiziale in corso di ipertensione arteriosa e nefropatie progressive.

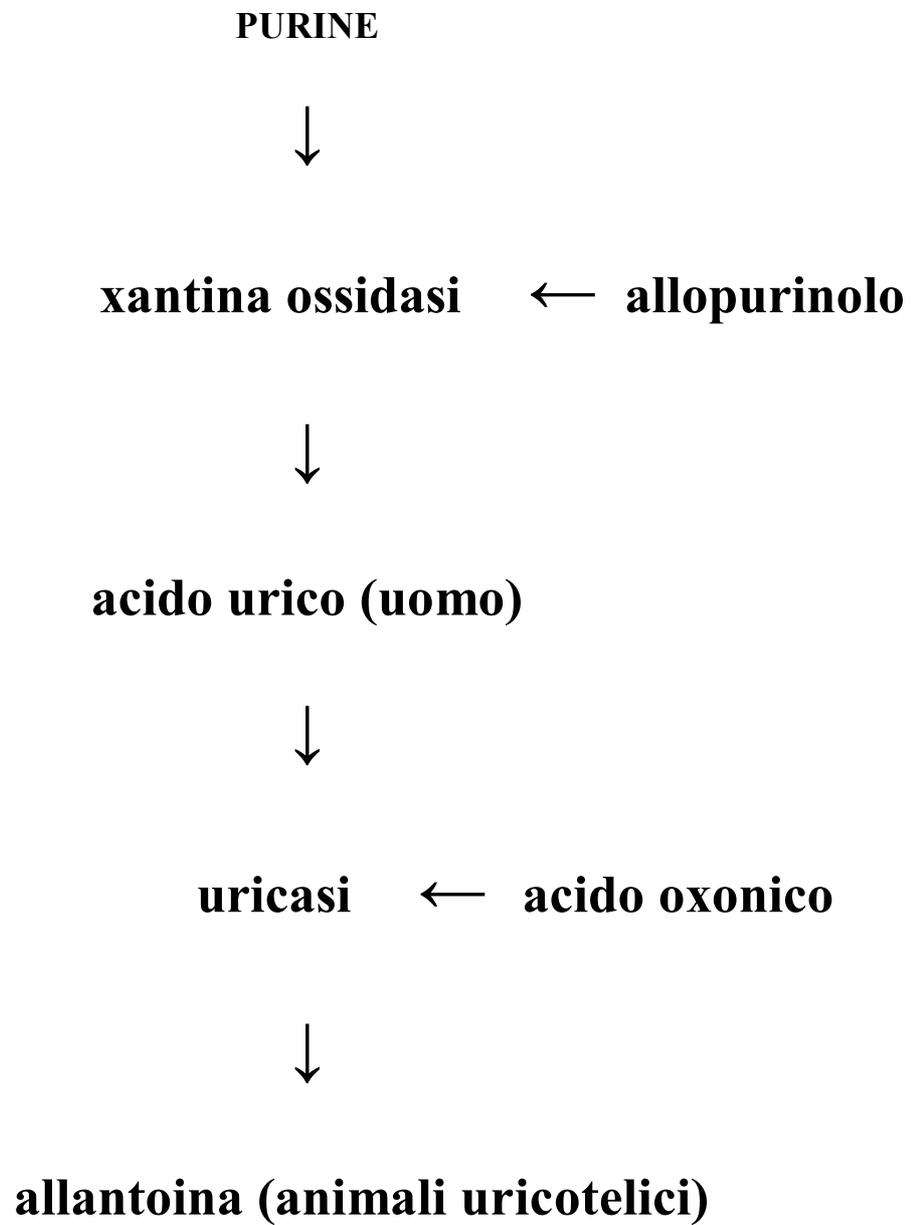
## **Conclusioni**

I recenti progressi nella comprensione del ruolo metabolico e fisiopatologico dell'AU hanno posto in nuova luce uno dei principali composti azotati, i cui livelli ematici sono diversamente regolati nelle diverse specie animali. Superato il logoro clichè di una sostanza responsabile di fastidiose ma raramente fatali patologie tipiche delle popolazioni occidentali, quali la gotta o la calcolosi uratica, comincia a diffondersi la consapevolezza che certe molecole organiche possano svolgere funzioni ben più complesse di quelle di semplici scorie del metabolismo.

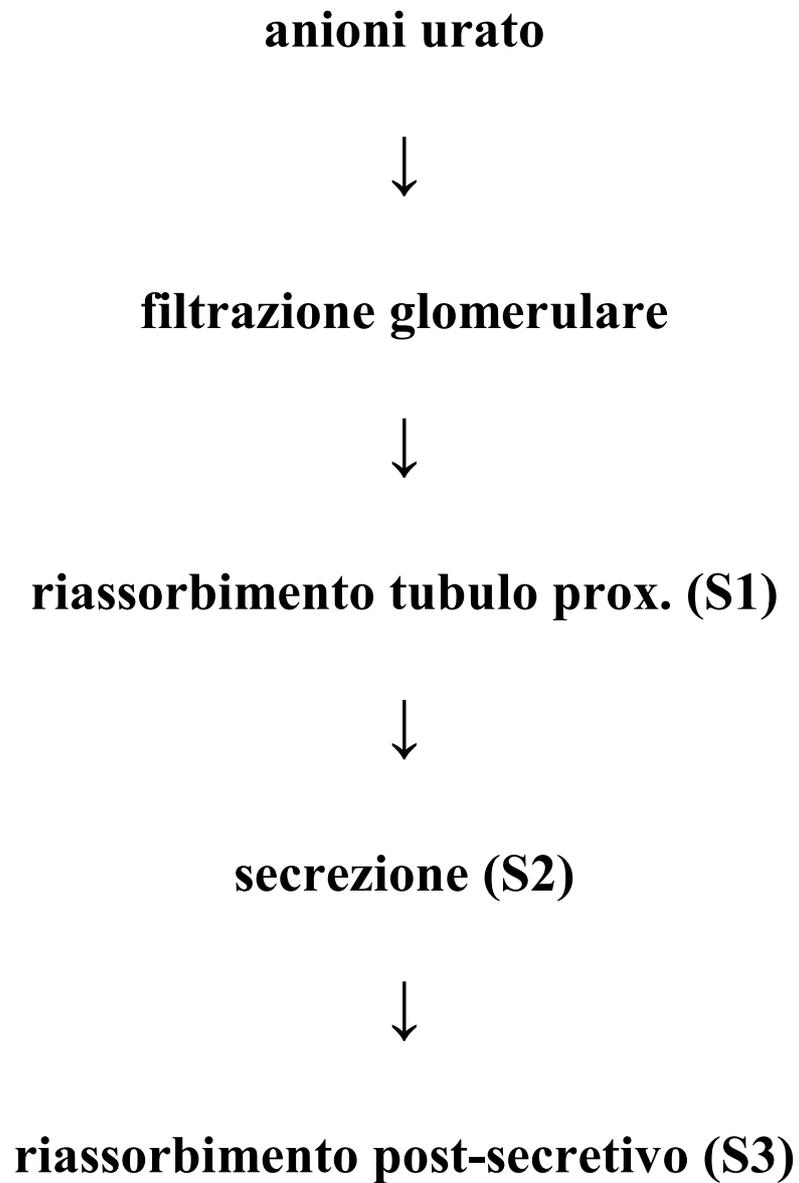
Dalla nostra ricerca su CMU in coltura si evince che l'AU riduce  $[Ca^{2+}]_i$  il attraverso attivazione del controtrasporto  $Na^+/Ca^{2+}$  e che determina stress ossidativo rilevabile attraverso la liberazione di metaboliti fluorescenti del DCFH-DA. Questi fenomeni possono promuovere infiammazione e danno vascolare in presenza di elevati livelli tissutali di AU, con possibili implicazioni per la progressione del danno renale.

Inoltre l'AU, pur inducendo direttamente accumulo dose-dipendente di perossinitrito (come i vasocostrittori angiotensina II e trombossano A2), ha un'azione nettamente inferiore ai donatori di ossido nitrico (NO). L'azione dell'AU sulla riduzione del perossinitrito è un effetto indipendente dalle variazioni del  $[Ca^{2+}]_i$  e del pH. Gli effetti antagonisti nei confronti del perossinitrito, liberato dalla reazione di NO e radicali superossido, potrebbero avere implicazioni protettive nelle patologie infiammatorie e ischemiche renali.

**Figura 1**

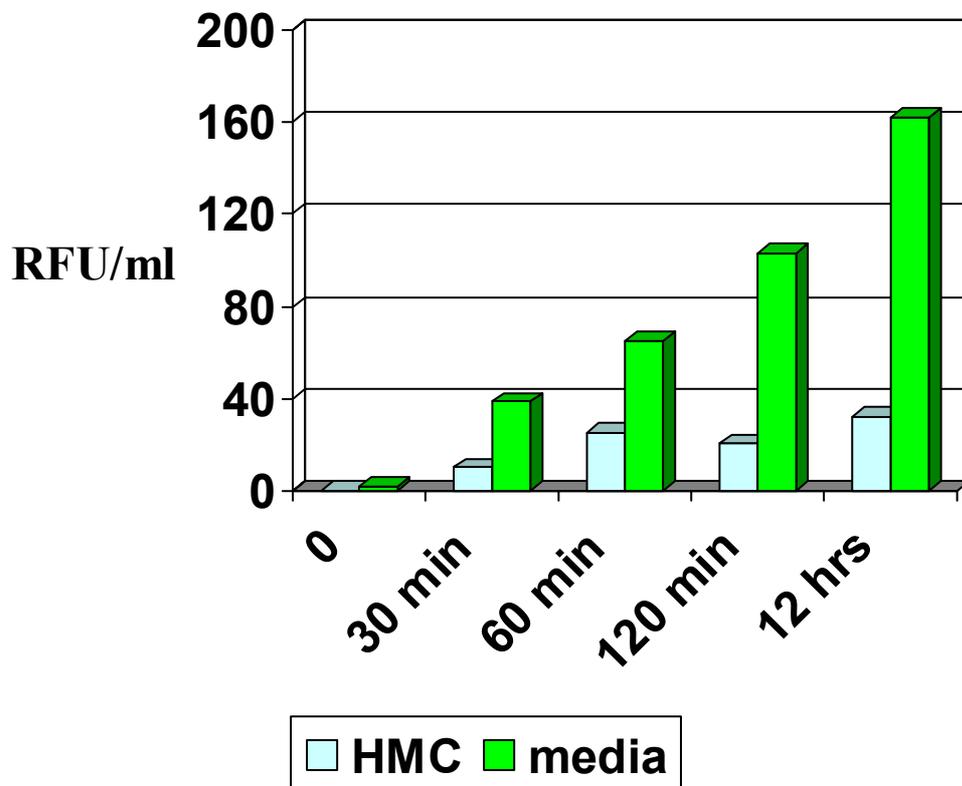


**Figura 2**



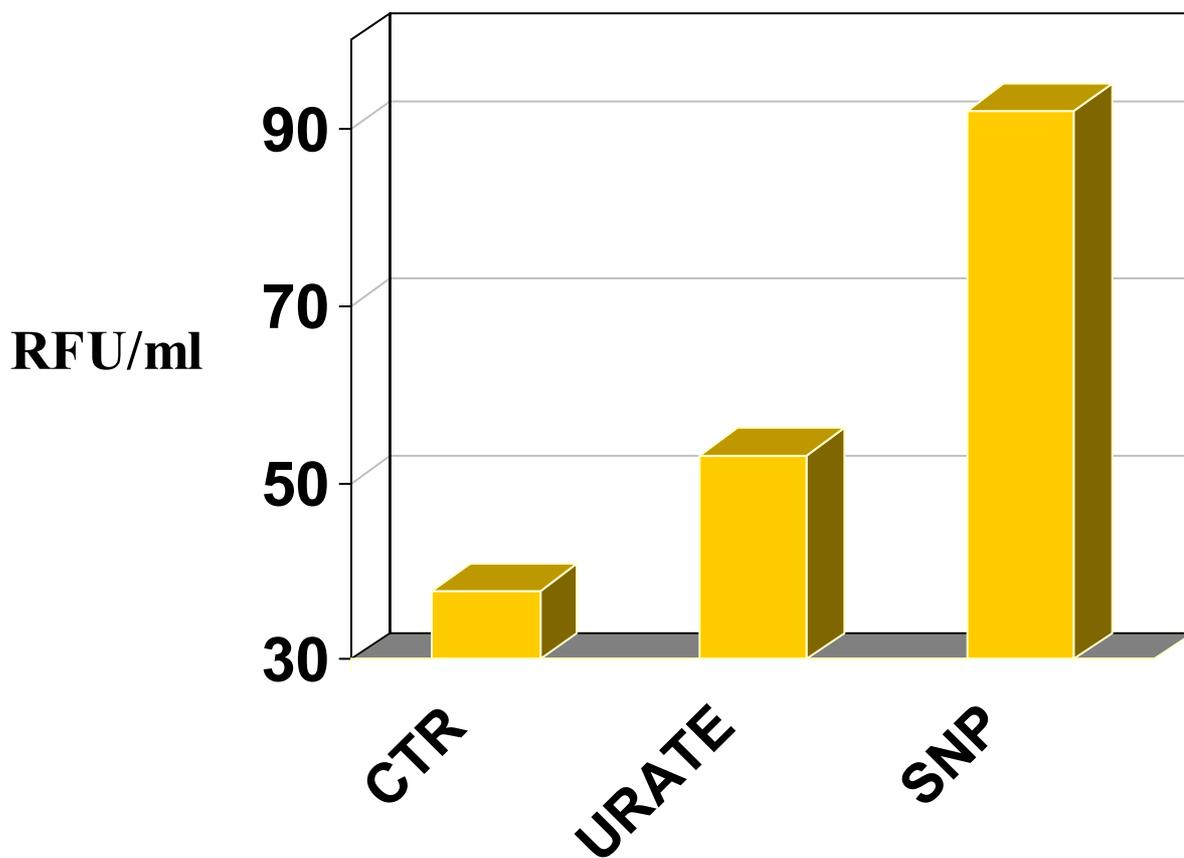
**Figura 3**

**DCDHF-DA INTRACELLULARE vs. DCF EXTRACELLULARE**



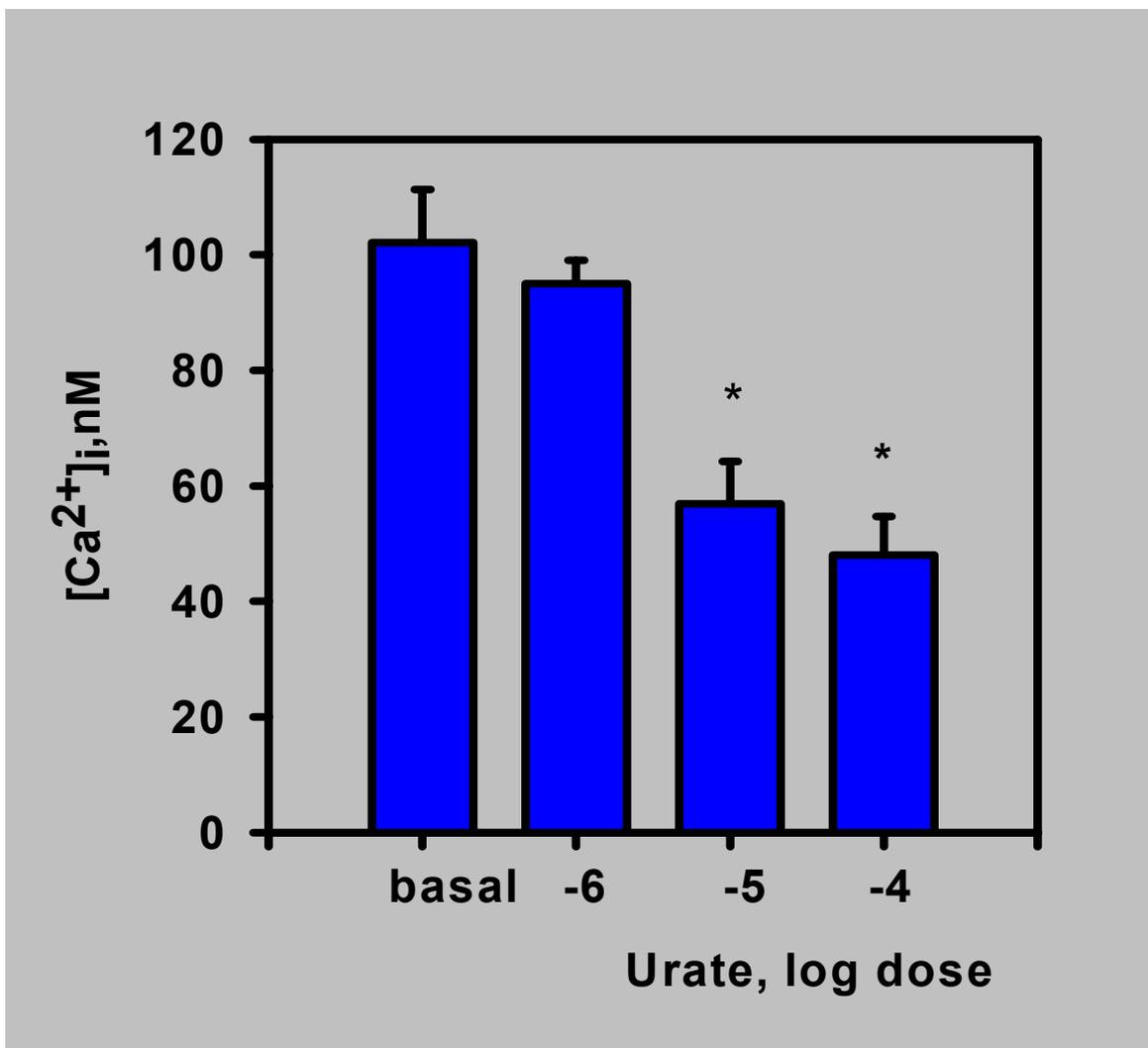
**Figura 4**

**EFFETTI DELL'ACIDO URICO E DEL SODIO NITROPRUSSATO (0.1 mM E 10  $\mu$ M RISPETTIVAMENTE) SULLO STRESS OSSIDATIVO**



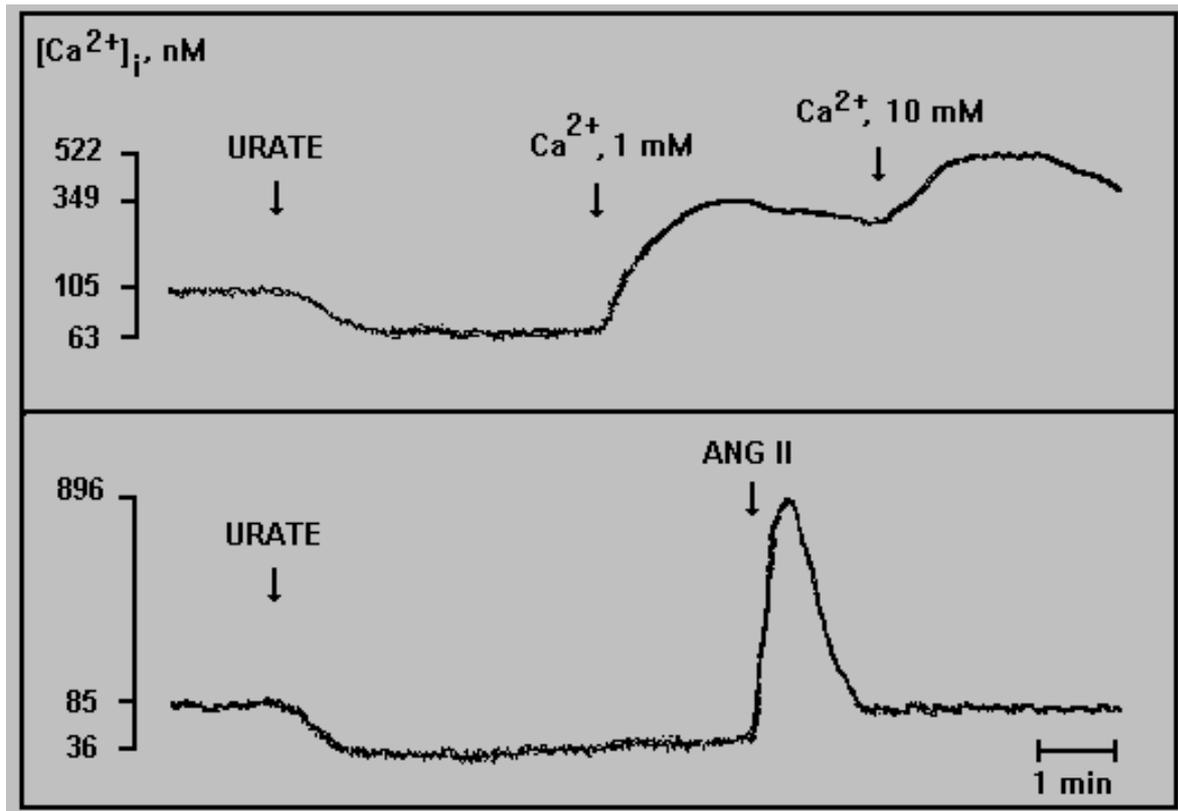
**Figura 5**

**EFFETTI DELL'AU SULLA RIDUZIONE DEL  $[Ca^{2+}]_i$**



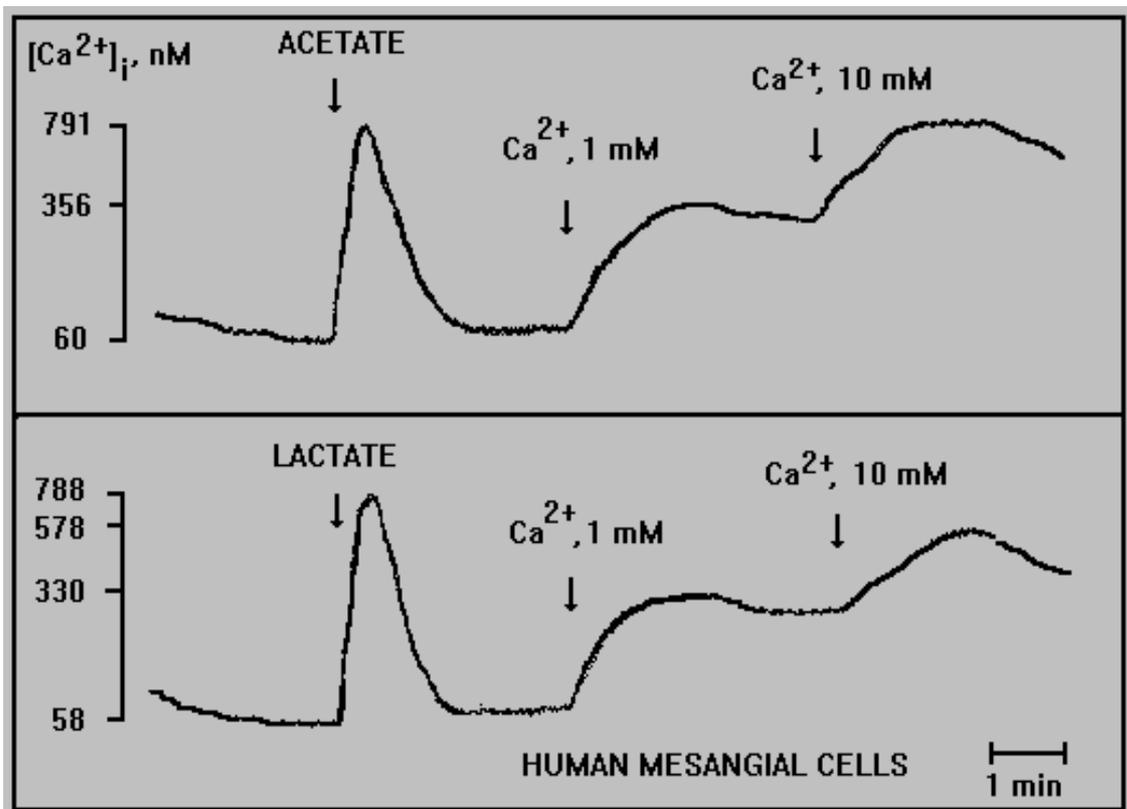
## Figura 6

**EFFETTI DELL'AU SUL  $[Ca^{2+}]_i$  IN MONOSTRATI DI CMU**  
(Tracciato fluorimetrico rappresentativo di n. 8 esperimenti)



**Figura 7**

**EFFETTI DEGLI ACIDI ORGANICI SUL  $[Ca^{2+}]_i$  IN MONOSTRATI DI CMU**  
**((Tracciato fluorimetrico rappresentativo di n. 4-6 esperimenti))**

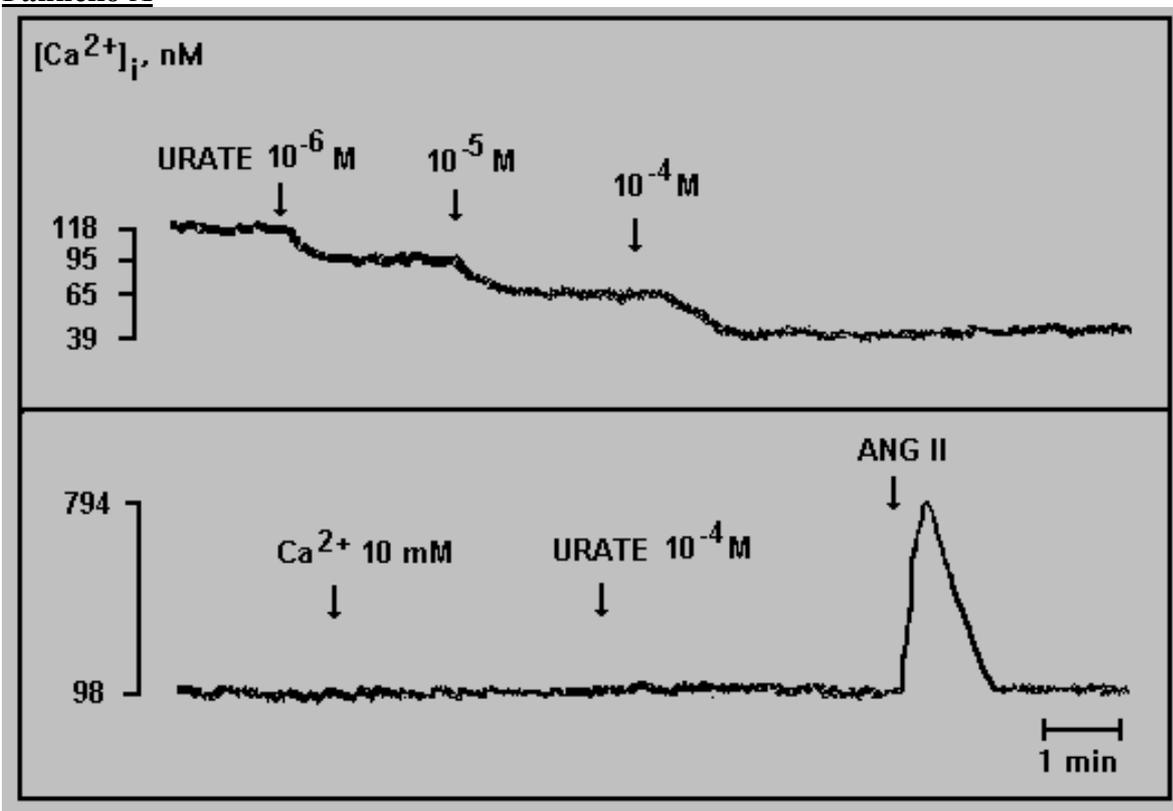


## Figura 8

### INIBIZIONE DEGLI EFFETTIDELL'AU IN RISPOSTA ALL'AUMENTO DEL $\text{Ca}^{2+}$ EXTRACELULARE

(Tracciato fluorimetrico rappresentativo di n. 4 esperimenti)

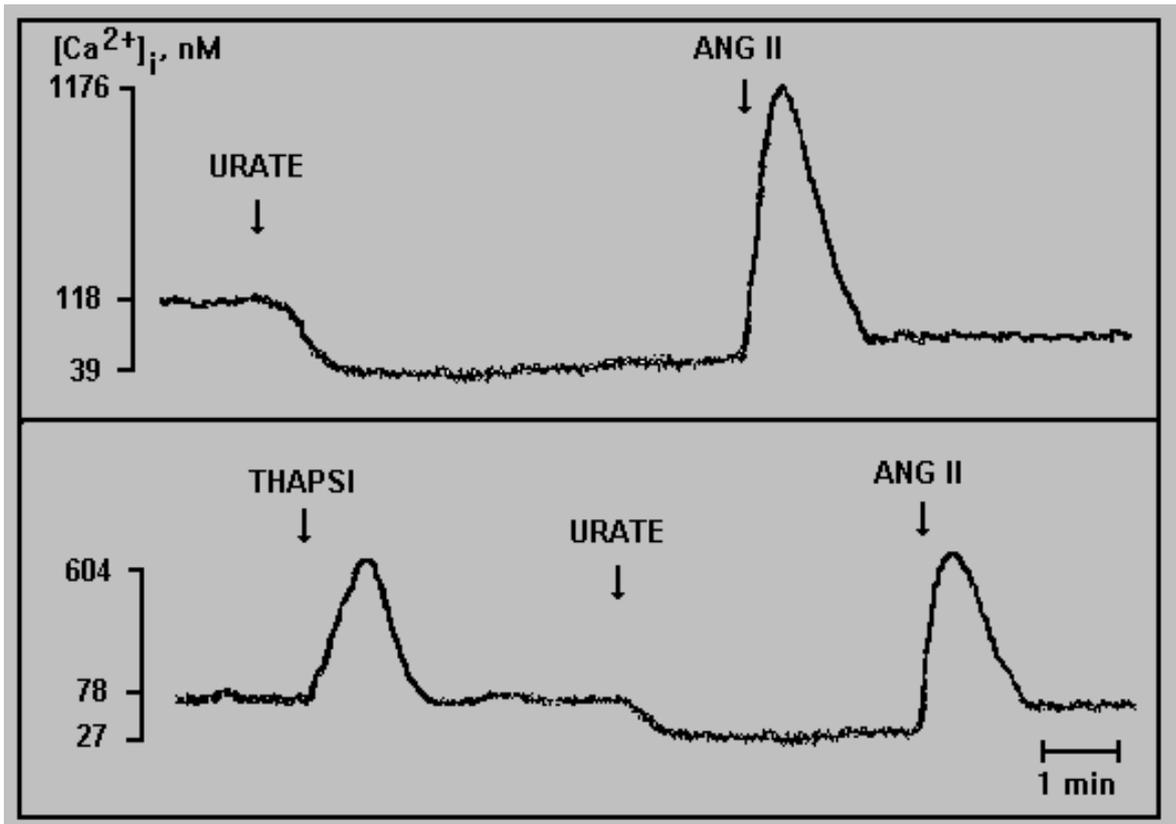
#### Pannello A



#### Pannello B

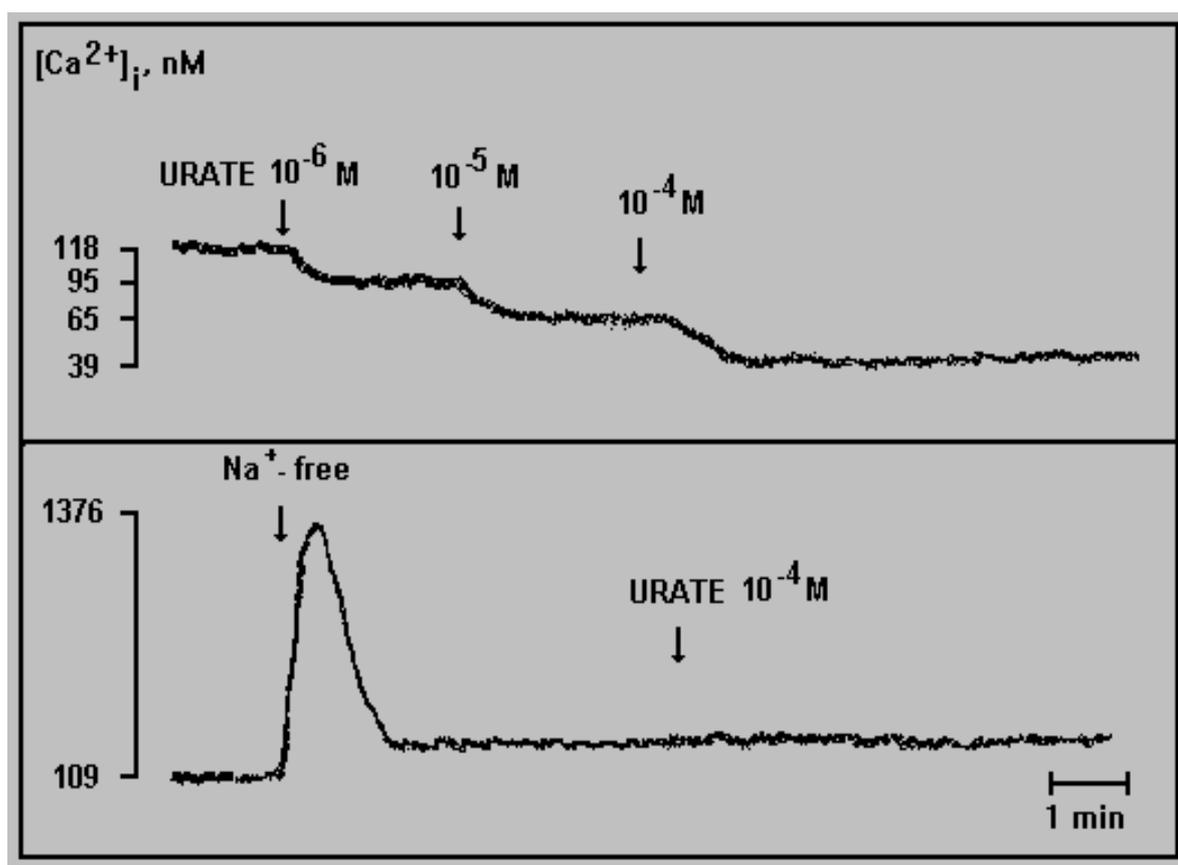
**Figura 9**

**EFFETTI DELL'AU DOPO INIBIZIONE DELLA POMPA  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasi  
(Tracciato fluorimetrico rappresentativo di n.4 esperimenti)**



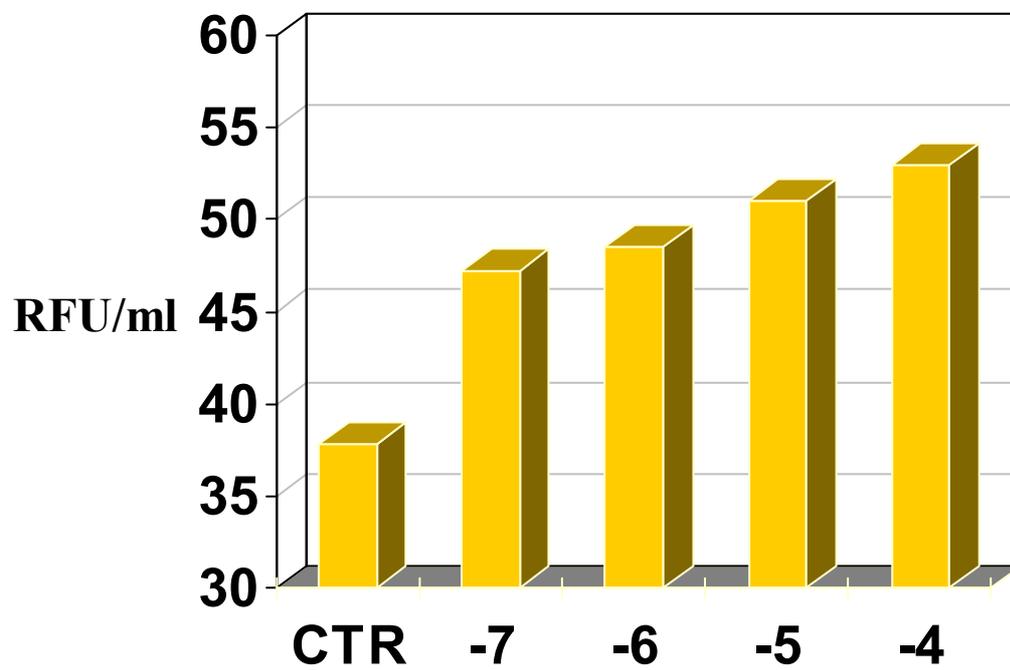
**Figura 10**

**INIBIZIONE DEGLI EFFETTI DELL'AU DOPO IL BLOCCO DEL  
CONTROTRASPORTO  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$**   
(Tracciato fluorimetrico rappresentativo di n. 4 esperimenti)



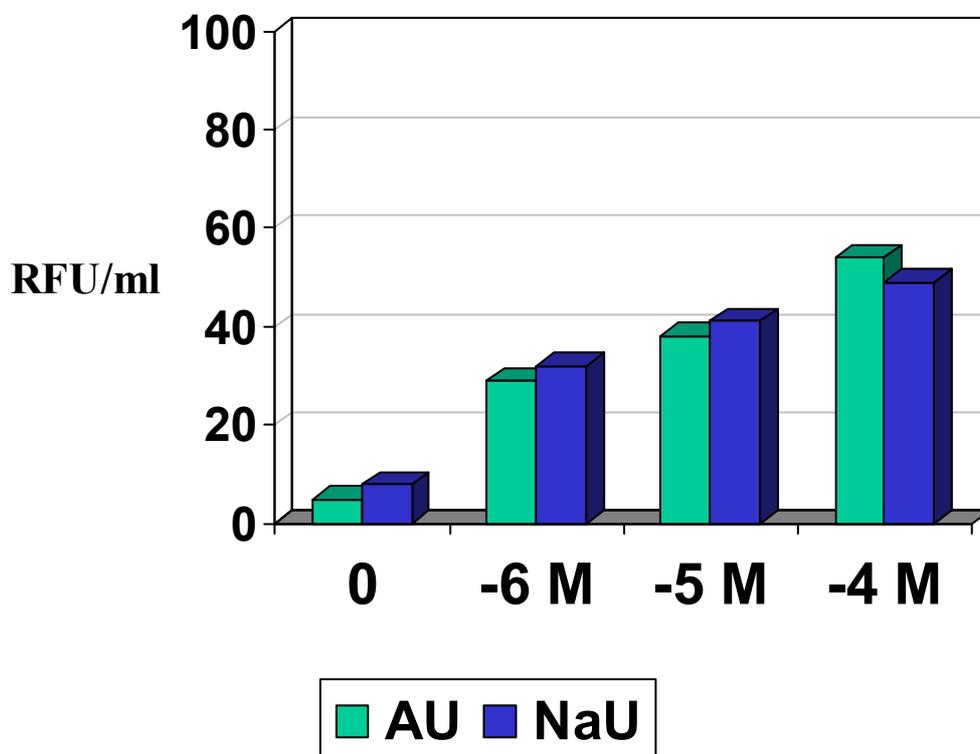
**Figura 11**

**EFFETTI DELL'AU SULLO STRESS OSSODATIVO IN CMU  
(Media  $\pm$  DS di RFU di n.12 esperimenti)**



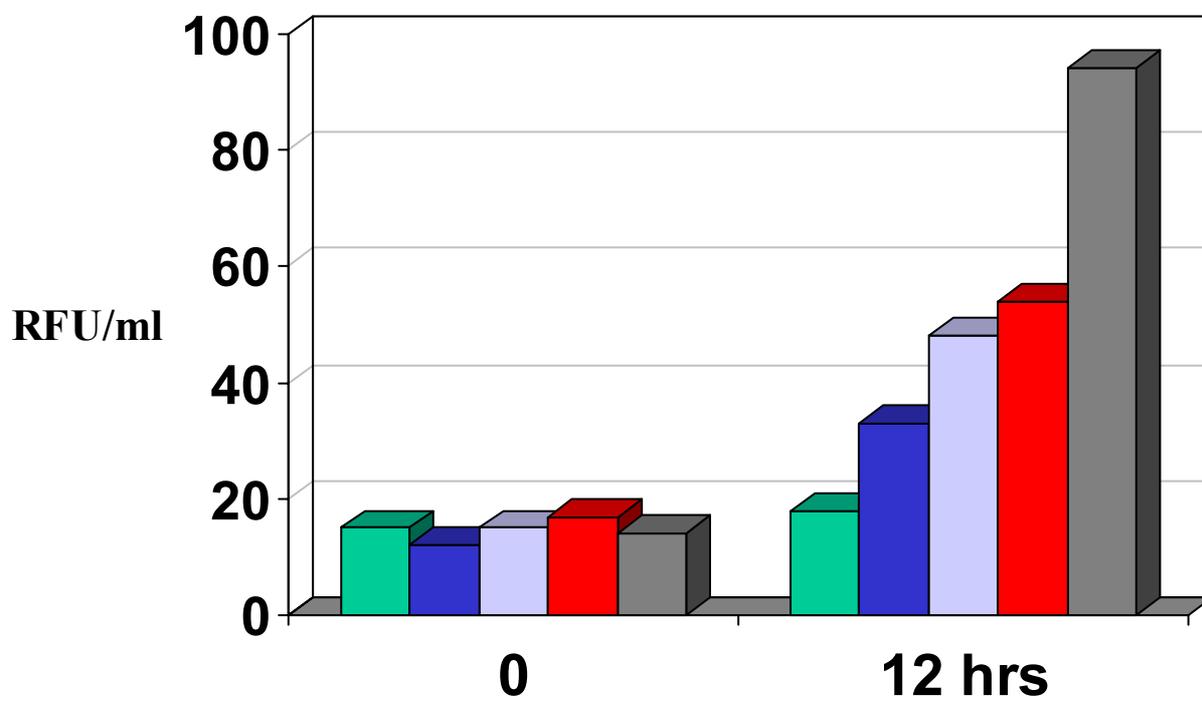
**Figura 12**

**AU/Na INDUCONO ACCUMULO DI PEROSSINTRITO IN CMU IN COLTURA**



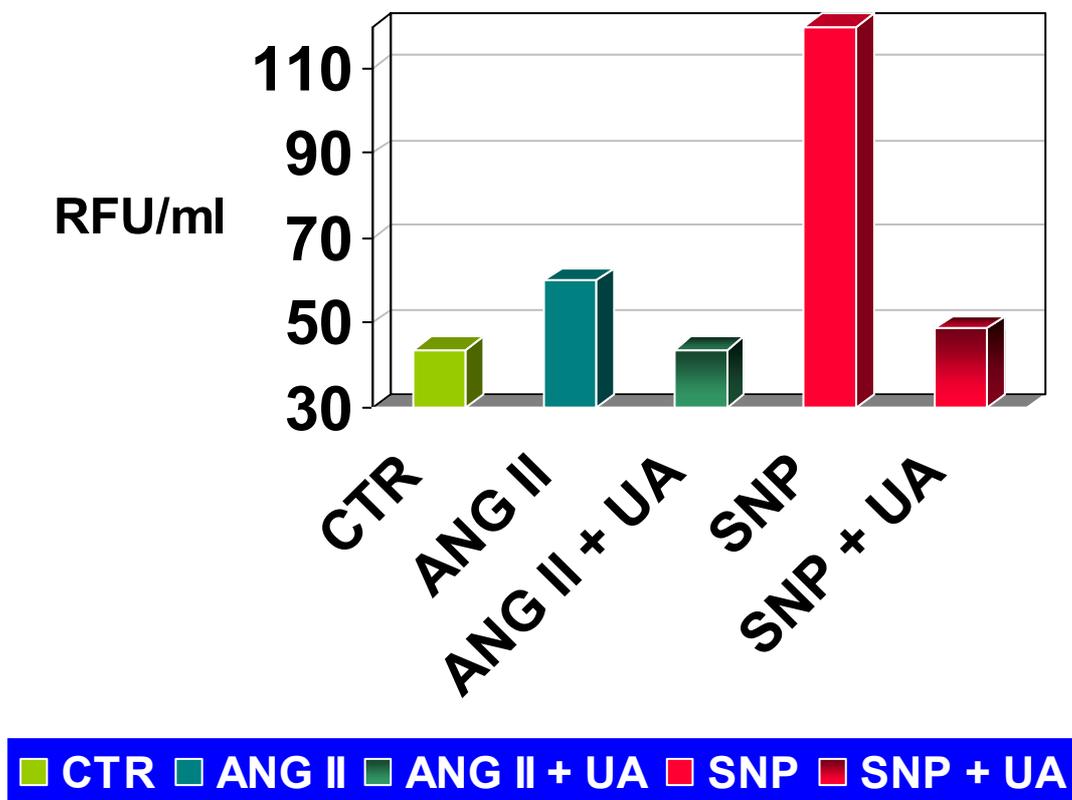
**Figura 13**

**EFFETTI DI AGENTI VASOATTIVI E DI AU SUL PEROSSINITRITO IN CMU IN COLTURA**



**Figura 14**

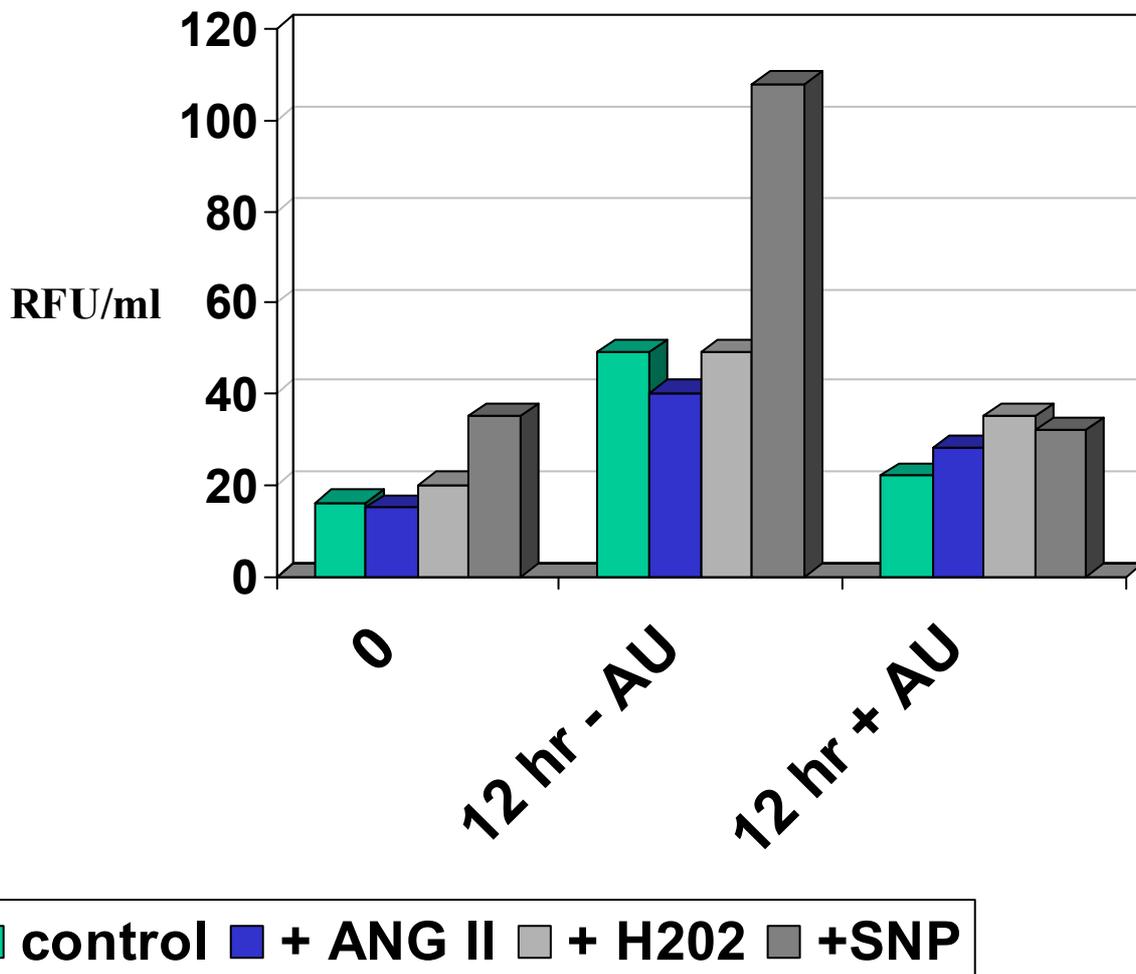
**STRESS OSSIDATIVO IN CMU IN COLTURA: AU vs AGENTI VASOATTIVI**



**Figura 15**

**EFFETTI DELL'ACIDO URICO SU PEROSSINITRITO INDOTTO DA AGENTI VASOATTIVI IN CMU IN COLTURA**

**pH EXTRACELLULARE FINALE 5.5**



**Figura 16**

**EFFETTI DELL'ACIDO URICO SU PEROSSINITRITO INDOTTO DA AGENTI VASOATTIVI IN CMU IN COLTURA**

**pH EXTRACELLULARE FINALE 7.2**

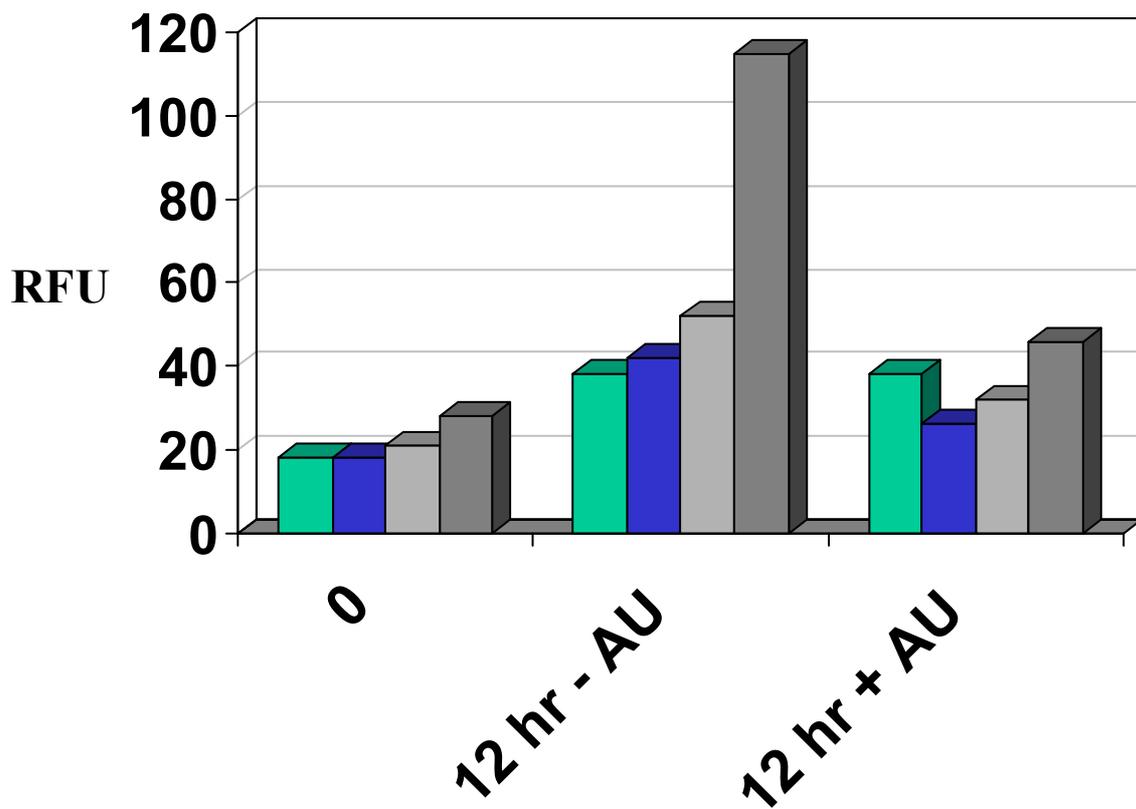
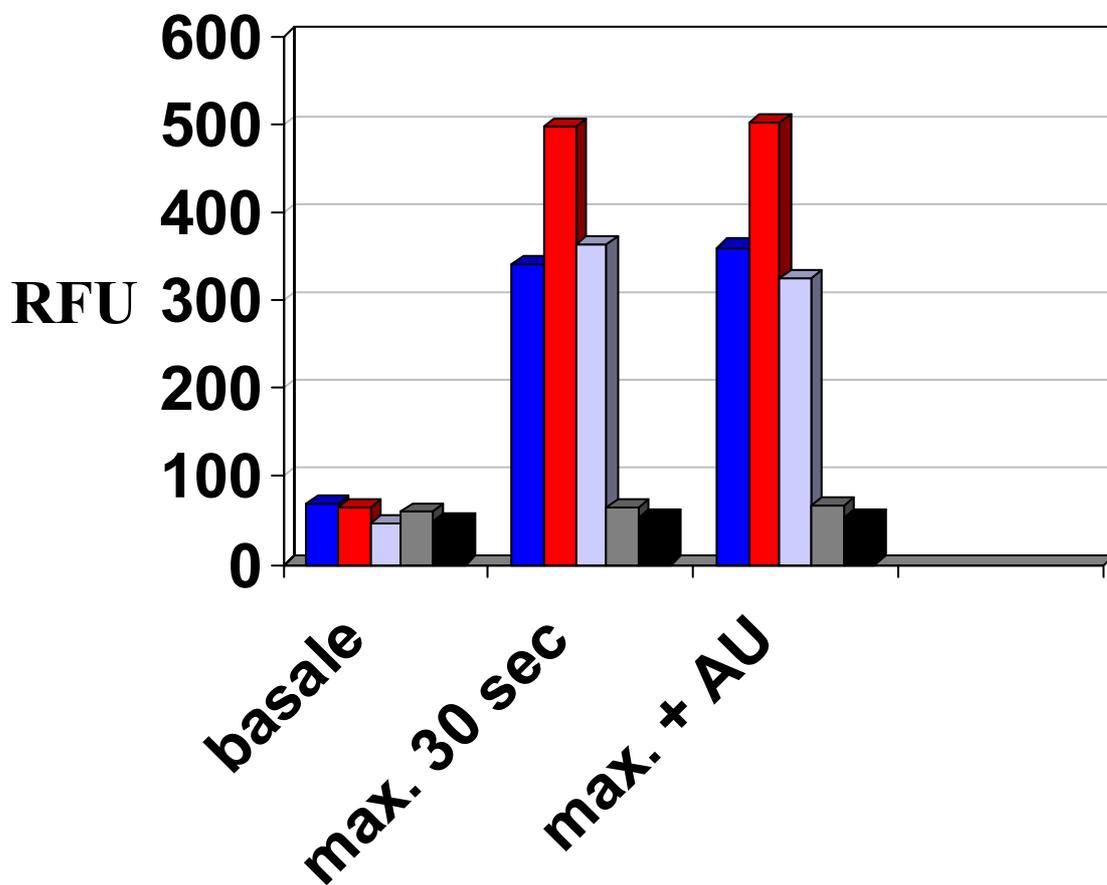


Figura 17

**EFFETTI DELL'ACIDO URICO SU PEROSSINITRITO INDOTTO DA AGENTI VASOATTIVI IN CMU IN COLTURA**

**RUOLO DEL Ca<sup>2+</sup> INTRACELLULARE**



■ U46619 ■ ANG II ■ 10 mM Ca ■ SNP ■ NONOato

## **Bibliografia**

1. Rafey MA, Lipkowitz MS, Leal-Pinto E, Abramson RG. Uric acid transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12:511-6.
2. Johnson RJ, Kivlighn SD, Kim YG, Suga S, Fogo AB. Reappraisal of the pathogenesis and consequences of hyperuricemia in hypertension, cardiovascular disease, and renal disease. *Am J Kidney Dis* 1999; 33:225-34.
3. Watanabe S, Kang DH, Feng L et al. Uric acid, hominoid evolution, and the pathogenesis of salt-sensitivity. *Hypertension* 2002; 40:355-60.
4. Johnson RJ, Segal MS, Srinivas T et al. Essential hypertension, progressive renal disease, and uric acid: a pathogenetic link? *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:1909-19.
5. Hediger MA, Johnson RJ, Miyazaki H, Endou H. Molecular physiology of urate transport. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20:125-33.
6. Arrambide K, Toto RD. Tumor lysis syndrome. *Semin Nephrol* 1993; 13:273-80.
7. Cairo MS, Bishop M. Tumor lysis syndrome: new therapeutic strategies and classification. *Brit J Haematol* 2004; 127:3-11.
8. Peronato G. Purine metabolism and hyperuricemic states. *Contrib Nephrol* 1995; 147:1-21.

9. Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol* 2004; 555:589-06.
10. Ten Harkel AD, Kist-Van Holthe JE, Van Weel M et al. Alkalinization and the tumor lysis syndrome. *Med Pediatr Oncology* 1998; 31:27-8.
11. Simmonds HA, Sabota AS, Van Acker KJ. Adenine Phosphoribosyltransferase deficiency and 2,8-dihydroxyadenine lithiasis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic basis of inherited disease*, 6<sup>th</sup> ed. New York: Mc Graw-Hill, 1989:1029-44.
12. Edvardsson V, Palsson R, Olafsson I, Hjaltadottir G, Laxdal T. Clinical features and genotype of adenine phosphoribosyltransferase deficiency in Iceland. *Am J Kidney Dis* 2001; 38: 473-480.
13. Imaoka T, Kusuhara H, Adachi-Akahane S, et al. The renal-specific transporter mediates facilitative transport of organic anions at the brush border membrane of mouse renal tubules. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:2012-22.
14. Habu Y, Yano I, Okuda M, Fukatsu A, Inui K. Restored expression and activity of organic ion transporters rOAT1, rOAT3 and rOCT2 after hyperuricemia in the rat kidney. *Biochem Pharmacol* 2005; 69:993-99.
15. Van Aubel RA, Smeets PH, van den Heuvel JJ, Russel FG. Human organic anion transporter MRP4 (ABCC4) is an efflux pump for the purine end metabolite urate with multiple allosteric substrate binding sites. *Am J Physiol (Renal Physiol)* 2005; 288:F327-33.

16. Mazzali M, Hughes J, Kim YG et al. Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism. *Hypertension* 2001; 38:1101-06.
17. Mazzali M, Kanellis J, Han L et al. Hyperuricemia induces a primary renal arteriolopathy in rats by a blood pressure-independent mechanism. *Am J Physiol (Renal Physiol)* 2002; 282:F991-97.
18. Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Santamaria J et al. Mild hyperuricemia induces vasoconstriction and maintains glomerular hypertension in normal and remnant kidney rats. *Kidney Int* 2005; 67:237-47.
19. Feig DI, Nakagawa T, Karumanchi SA et al. Hypothesis: Uric acid, nephron number, and the pathogenesis of essential hypertension. *Kidney Int* 2004; 66:281-87.
20. Kang DH, Finch J, Nakagawa T et al. Uric acid, endothelial dysfunction and pre-eclampsia: searching for a pathogenetic link. *J Hypertens*. 2004; 22:229-35.
21. Johnson RJ, Rideout BA. Uric acid and diet--insights into the epidemic of cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2004; 350:1071-73.
22. Johnson RJ, Feig DI, Herrera-Acosta J, Kang DH. Resurrection of uric acid as a causal risk factor in essential hypertension. *Hypertension*. 2005; 45:18-20.
23. Johnson RJ, Kang DH, Feig D et al. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? *Hypertension*. 2003; 41:1183-90.

24. Scolari F, Caridi G, Rampoldi L et al. Uromodulin storage diseases: clinical aspects and mechanisms. *Am J Kidney Dis.* 2004; 44:987-99.
25. Kanellis J, Watanabe S, Li JH et al. Uric acid stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase-2. *Hypertension* 2003; 41:1287-93.
26. Kim YG, Huang XR, Suga S et al. Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in experimental uric acid nephropathy. *Mol Med* 2000; 6:837-48.
27. Perlstein TS, Gumieniak O, Hopkins PN et al. Uric acid and the state of the intrarenal renin-angiotensin system in humans. *Kidney Int* 2004; 66:1465-70.
28. Johnson RJ, Tittle S, Cade JR, Rideout BA, Oliver WJ. Uric acid, evolution and primitive cultures. *Semin Nephrol* 2005; 25:3-8.
29. Kanellis J, Nakagawa T, Herrera-Acosta J et al. A single pathway for the development of essential hypertension. *Cardiol Rev* 2003; 11:180-96.
30. Squadrito GL, Cueto R, Splenser AE et al. Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Arch Biochem Biophys* 2000; 376:333-37.
31. Nieto FJ, Iribarren C, Gross MD, Comstock GW, Cutler RG. Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis? *Atherosclerosis* 2000; 148:131-39.

32. Hink HU, Santanam M, Dikalov S et al. Peroxidase properties of extracellular superoxide dismutase: role of uric acid in modulating in vivo activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1402-08.
33. Tuttle KR, Short RA, Johnson RJ. Sex differences in uric acid and risk factors for coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2001; 87:1411-14.
34. Kanellis J, Feig DI, Johnson RJ. Does asymptomatic hyperuricaemia contribute to the development of renal and cardiovascular disease? An old controversy renewed. *Nephrology (Carlton)*. 2004; 9:394-99.
35. Short RA, Johnson RJ, Tuttle KR. Uric acid, microalbuminuria and cardiovascular events in high-risk patients. *Am J Nephrol* 2005; 25:36-44.
36. Kang DH, Nakagawa T, Feng L et al. A role for uric acid in the progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:2888-97.
37. Kang DH, Nakagawa T. Uric acid and chronic renal disease: possible implication of hyperuricemia on progression of renal disease. *Semin Nephrol* 2005; 25:43-49.
38. Short RA, Tuttle KR. Clinical evidence for the influence of uric acid on hypertension, cardiovascular disease, and kidney disease: a statistical modeling perspective. *Semin Nephrol* 2005; 25:25-31.
39. Iseki K, Ikemiya Y, Inoue T, Iseki C, Kinjo K, Takishita S. Significance of hyperuricemia as a risk factor for developing ESRD in a screened cohort. *Am J Kidney Dis* 2004; 44:642-50.

40. Cameron JS, Simmonds HA. Hereditary hyperuricemia and renal disease. *Semin Nephrol* 2005;25:9-18.
41. Beck L. Requiem for gouty nephropathy. *Kidney Int* 1986; 30:280-87.
42. Culeton BF, Larson MG, Kannel WB, Levy D. Serum uric acid and risk of cardiovascular disease and mortality: the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med* 1999; 31:7-13.
43. Myllymaki J, Honkanen T, Syrjanen J et al. Uric acid correlates with the severity of histopathological parameters in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20:89-95.
44. Mazzali M, Kim YG, Suga S, et al. Hyperuricemia exacerbates chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation* 2001; 71:900-05.
45. Mazzali M. Uric acid and transplantation. *Semin Nephrol* 2005; 25:50-5.
46. Johnson RJ, Herrera-Acosta J, Schreiner GF, Rodriguez-Iturbe B. Subtle acquired renal injury as a mechanism of salt-sensitive hypertension. *N Engl J Med* 2002; 346:913-23.
47. Khosla UM, Zharikov S, Finch JL et al. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney Int* 2005; 67:1739-1742.
48. Waring WS, Webb DJ, Maxwell SRJ. Effect of local hyperuricemia on endothelial function in the human forearm vascular bed. *Br J Clin Pharmacol* 2000; 49:511.

49. Rao GN, Corson MA, Berk BC. Uric acid stimulates vascular smooth muscle cell proliferation by increasing platelet derived growth factor A-chain expression. *J Biol Chem* 1991; 266:8604-8608.
50. Menè P, Simonson MS, Dunn MJ. Physiology of the mesangial cell. *Physiol Rev* 1989; 69:1347-1423.
51. Menè P, Teti A, Pugliese F, Cinotti GA. Calcium-release-activated calcium influx in cultured human mesangial cells. *Kidney Int* 1994; 46:122-128.
52. Menè P, Pugliese F, Cinotti GA. Regulation of capacitative calcium influx in cultured human mesangial cells: roles of protein kinase C and calmodulin. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7:983-990.
53. Menè P, Pugliese F, Faraggiana T, Cinotti GA. Identification and characteristics of a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in cultured human mesangial cells. *Kidney Int* 1990; 38:1199-1205.
54. Williams DA, Fay FS. Intracellular calibration of the fluorescent calcium indicator fura-2. *Cell Calcium* 1990; 11:75-83.
55. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260:3440-3450.
56. Bergling S, Dolmetsch R, Lewis RS, Keizer J. A fluorometric method for estimating the calcium content of internal stores. *Cell Calcium* 1998; 23:251-259.