

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Fisiopatologia dell'Insufficienza Renale

Ciclo XXVI

**ANTICORPI ANTI-PODOCITA:
COESISTENZA E CORRELAZIONI CLINICHE IN
PAZIENTI AFFETTI DA NEFROPATIA
MEMBRANOSA**

COORDINATORE:

Chiar.mo Prof. Carlo Buzio

TUTORE:

Chiar.mo Prof. Landino Allegri

DOTTORANDO:

Dott. Corrado Murtas

SOMMARIO

| | |
|--|----|
| INTRODUZIONE | 3 |
| EPIDEMIOLOGIA | 3 |
| ASPETTI CLINICI..... | 4 |
| ANATOMIA PATOLOGICA | 5 |
| MECCANISMI DI DANNO GLOMERULARE..... | 7 |
| Eziologia e patogenesi. MODELLI ANIMALI E LORO APPLICAZIONI..... | 9 |
| Eziologia e patogenesi. RECENTI SVILUPPI | 15 |
| Eziologia e patogenesi. COESISTENZA DI ANTICORPI E CORRELAZIONI CLINICHE | 22 |
| RAZIONALE DELLO STUDIO | 27 |
| MATERIALI E METODI | 29 |
| CONTROLLI SANI | 29 |
| PAZIENTI | 29 |
| TITOLAZIONE DEI CAMPIONI SIERICI ED URINARI | 30 |
| ANALISI DEI DATI | 31 |
| RISULTATI | 33 |
| ANDAMENTO CLINICO | 33 |
| ANTICORPI SIERICI | 34 |
| ANTICORPI URINARI..... | 35 |
| DISCUSSIONE | 37 |
| CONCLUSIONE..... | 42 |
| FIGURE..... | 44 |
| TABELLE | 47 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 51 |
| RINGRAZIAMENTI | 56 |

INTRODUZIONE

EPIDEMIOLOGIA

La nefropatia membranosa (NM) è la più frequente causa di glomerulopatia primitiva nell'adulto che si manifesta con sindrome nefrosica; essa costituisce infatti circa il 25-30% delle diagnosi effettuate su biopsie renali percutanee praticate per tale manifestazione clinica¹. La prevalenza della NM aumenta con l'età anagrafica del paziente, raggiungendo circa il 50% nei pazienti anziani nefrosici. È rara in età pediatrica: circa il 5% delle biopsie renali effettuate per sindrome nefrosica cortico-resistente è diagnostica per NM.

La NM viene considerata “secondaria” in circa il 25% dei casi. Numerosi sono i processi patogenetici associati, ma non è mai stata documentata la loro effettiva responsabilità nell'insorgenza della nefropatia. Tra di essi si ricordano: agenti infettivi (ad es. HBV, HCV, schistosomiasi), farmaci (ad es. FANS, penicillamina, sali d'oro, anticorpi monoclonali anti TNF), tossine (ad es. idrocarburi, formaldeide) e patologie sistemiche a genesi autoimmune (prevalentemente LES, ma anche GVHD, sindrome di Sjögren, tiroiditi, dermatite erpetiforme, sindrome di Guillain-Barré). Ancora più importante dal punto di vista della frequenza è la secondarietà a neoplasia solida: alcuni dati suggeriscono che il 10% dei pazienti con diagnosi di NM siano portatori di una neoplasia. E' quindi ormai prassi comune nella pratica clinica sottoporre i pazienti affetti da NM a screening oncologico approfondito.

La NM è più comune nel sesso maschile, con un rapporto M/F di 2:1, e la maggiore incidenza è tra la quarta e la sesta decade di vita.

Vi sono segnalazioni di casi di NM familiare. Sono comunque casi rari, in quanto la stragrande maggioranza delle NM risultano essere sporadiche¹⁻⁴.

ASPETTI CLINICI

La sindrome nefrosica con funzione renale normale è tipica della NM, essendo presente in circa i 4/5 dei pazienti all'esordio: tra questi, in circa il 30% dei casi, la proteinuria supera i 10 g/die. Negli altri casi, la proteinuria sub-nefrosica è la manifestazione d'esordio; è opinione comune che la NM abbia una lunga fase pre-clinica, quindi questo insieme di pazienti potrebbe essere considerato come un sottogruppo con diagnosi relativamente precoce. Rara è la macroematuria, mentre microematuria glomerulare è presente in circa il 40% dei casi.

Il decorso della NM primitiva è difficilmente prevedibile: si possono avere sia remissioni spontanee, sia stabilizzazioni prolungate, sia evoluzioni più o meno rapide verso l' insufficienza renale.

In oltre il 50% dei pazienti pediatrici con NM si ha una remissione spontanea della malattia, con sopravvivenza renale a 10 anni in oltre il 90% dei casi. La remissione spontanea è un fenomeno frequente anche nella popolazione adulta: il 25% dei casi va incontro a tale occorrenza entro 5 anni dalla diagnosi. Invece, circa la metà dei

pazienti, se non trattati, presenta nel tempo una evoluzione verso l'insufficienza renale.

Sono noti alcuni parametri clinico-laboratoristico-istologici associati a una prognosi peggiore. Questi possono essere utili per guidare l'approccio terapeutico: età avanzata, sesso maschile, razza caucasica, presenza di sindrome nefrosica, ipoalbuminemia severa, ipertensione, insufficienza renale, escrezione urinaria di IgG superiore ai 250 mg/die, escrezione urinaria di C5b-9 superiore ai 7 µg/ mg di creatinina, escrezione urinaria di beta2 microglobulina superiore a 0,5 µg/min, stadio istologico III-IV, riscontro anatomopatologico di sclerosi focale e/o significative lesioni tubulo-interstiziali^{1,3,4}.

ANATOMIA PATOLOGICA

La lesione istopatologica caratterizzante la NM è la presenza di depositi di immunocomplessi (IC) a livello della membrana basale glomerulare (MBG) in sede sub-epiteliale, ovvero posti tra la MBG ed i podociti.

Schematicamente, si possono distinguere le diverse lesioni glomerulari in base alla tempistica con cui compaiono e diventano rilevabili in microscopia: infatti, al danno e alla "attivazione" del podocita si succedono l'alterazione della barriera di filtrazione glomerulare, causata da alterazioni del citoscheletro dello stesso podocita, e, solo successivamente, l'alterazione morfologica della MBG che si ispessisce in maniera più spesso ordinata (formazione di "spine") ma talvolta e tardivamente irregolare.

La classificazione istopatologica consiste di quattro stadi.

Stadio I: i glomeruli appaiono normali in microscopia ottica (MO); solo con la colorazione tricromica di Masson, gli IC sono visibili come depositi fucsino-fili lungo il contorno esterno della MBG; all' immunofluorescenza (IF) sono individuabili piccoli e uniformi depositi granulari di IgG e C3. Alla microscopia elettronica (ME) i depositi si manifestano come sparsi, elettrondensi e in sede sub-epiteliale; non si evidenziano altre alterazioni della MBG.

Stadio II: in MO, soprattutto utilizzando le colorazioni argentiche, si possono apprezzare un diffuso ispessimento delle MBG e la presenza di "spine" argentofile ("spikes") che si proiettano, tra un deposito e l'altro, verso la regione sub-epiteliale. Le spikes rappresentano aree di iperproduzione disordinata di MBG e possono essere considerate come la "reazione disadattativa" del podocita alla presenza degli IC. All' IF i depositi granulari si mostrano più ampi e numerosi rispetto allo stadio precedente; la ME conferma la presenza di depositi elettrondensi e di proiezioni sub-epiteliali di MBG.

Stadio III: la MO mostra la fusione delle spine argentofile attorno ai depositi sub-epiteliali, che fa apparire la MBG come ulteriormente ispessita, "sdoppiata" e con aspetto a catenella. All'IF i depositi granulari si presentano grossolani e distribuiti irregolarmente lungo le membrane basali glomerulari; la ME conferma che i depositi elettrondensi sono incapsulati all' interno della membrana basale glomerulare; talvolta, i depositi possono apparire parzialmente elettronlucenti a causa di un iniziale processo di riassorbimento.

Stadio IV: le diverse tecniche di microscopia testimoniano il sovvertimento strutturale della membrana basale, ispessita e grossolanamente alterata, e la riduzione, se non addirittura la scomparsa, dei depositi granulari.

Per quanto riguarda la composizione degli immunodepositi, questa viene facilmente valutata mediante l'immunofluorescenza. E' noto che nelle forme primitive la classe predominante di immunoglobuline è la IgG₄, mentre nelle forme secondarie si possono riscontrare in percentuale maggiore o dominante anche IgG₁ e IgG₂.

Con il progredire della malattia tende a formarsi un infiltrato interstiziale di linfociti e monociti, che riflette l'entità e la durata della proteinuria. La degenerazione tubulare, la fibrosi interstiziale e la sclerosi glomerulare, sono poi tipici degli stadi tardivi della malattia, quando si è già manifestata clinicamente la perdita della funzionalità renale¹.

MECCANISMI DI DANNO GLOMERULARE

Il danno glomerulare, e la conseguente proteinuria, è provocato dalla presenza di IC in sede sub-epiteliale; la loro presenza attiva il meccanismo del complemento, portando alla formazione del "complesso di attacco alla membrana" (noto anche come C5b-9), che è il mediatore chiave del danno podocitario nella NM.

Le ipotesi formulate negli anni sui possibili meccanismi di formazione degli immunodepositi (ID) sono tre: la localizzazione in sede sub-epiteliale di antigeni esogeni grazie alla loro carica cationica e alle loro piccole dimensioni, e successiva

formazione di IC in situ; la deposizione di IC circolanti, anche attraverso la loro dissociazione in sede endoteliale e riassociazione in sede sub-epiteliale; la formazione di IC in situ, causata dalla presenza di anticorpi circolanti rivolti verso antigeni podocitari^{5,6}.

La totale assenza di ID mesangiali e sub-endoteliali e la possibilità di riprodurre le lesioni istologiche nel modello animale per mezzo di anticorpi rivolti verso proteine podocitarie, hanno fatto propendere uniformemente la comunità scientifica per la teoria della formazione in situ degli IC, secondaria alla produzione di anticorpi rivolti verso antigeni podocitari.

È invece probabile che, nella NM secondaria, il meccanismo prevalente sia la localizzazione a livello sub epiteliale di antigeni circolanti a livello sierico. A tale fenomeno seguirebbe la deposizione di anticorpi specifici circolanti ed il conseguente sviluppo degli ID.

La formazione di C5b-9 e il suo inserimento nella membrana podocitaria non causano la lisi della cellula ma la sua attivazione, mediata dall'internalizzazione (e successiva liberazione nello spazio urinario) del C5b-9 stesso, con conseguente modifica del citoscheletro e produzione anomala dei componenti della MBG.

È stato dimostrato che nel podocita esposto a concentrazioni sub-letali di C5b-9 si attivano una serie di geni responsabili della sintesi di citochine, fattori di crescita e proteasi.

L'attivazione della cellula epiteliale glomerulare fa sì che le sue principali funzioni ne risultino alterate. La disorganizzazione del citoscheletro porta direttamente ad una

disfunzione del diaframma di filtrazione: dati sperimentali dimostrano che, in associazione con una riorganizzazione del citoscheletro podocitario, avviene una massiva diminuzione dell'espressione di nefrina. Vista l'importanza riconosciuta a tale proteina nell'architettura della barriera di filtrazione glomerulare, è verosimile che quest'evento sia alla base della comparsa di proteinuria nella NM.

La tipica alterazione morfologica della MBG (la presenza delle caratteristiche "spine" attorno agli IC) è un evento sicuramente più tardivo dovuto alla produzione e liberazione di ROS e proteasi da parte del podocita attivato e alla sintesi eccessiva e sregolata dei normali componenti della MBG.

La fibrosi interstiziale che compare nelle fasi più tardive della malattia è, invece, una risposta aspecifica delle cellule tubulari e del sistema del tubulo-interstizio agli effetti tossici e pro infiammatori provocati dalla proteinuria, soprattutto se duratura e consistente^{1, 7, 8}.

EZIOLOGIA E PATOGENESI. MODELLI ANIMALI E LORO APPLICAZIONI

I primi solidi progressi nella comprensione della patogenesi della NM sono stati possibili grazie agli esperimenti di Heymann ed al. nella seconda metà del ventesimo secolo⁹; essi riuscirono ad indurre in specie suscettibili di ratti (Lewis, Fisher) una glomerulopatia morfologicamente molto simile alla NM umana^{10, 11}.

Sperimentalmente, sono stati elaborati due modelli di nefrite di Heymann (HN): il modello attivo ed il modello passivo. Nel modello attivo, il primo descritto, si immunizzano i ratti con specifiche frazioni, omologhe o eterologhe, di estratto di antigeni dell'orletto a spazzola delle cellule del tubulo prossimale (note come Fx1A). Entro 3-4 settimane dall'immunizzazione si formano depositi elettrondensi in sede sub epiteliale glomerulare. La proteinuria si sviluppa nel 30-80% dei ratti entro 10 settimane¹². Questo modello aveva suggerito che i depositi sub-epiteliali potessero essere il risultato dell'intrappolamento glomerulare di IC circolanti, costituiti da Fx1A e relativi anticorpi.

Il modello passivo della nefrite di Heymann è invece indotto da una singola iniezione endovenosa di anti-Fx1A eterologhi (prodotti in pecore o conigli). Gli IC glomerulari si rendono visibili in pochi giorni e la proteinuria si sviluppa in tutti gli animali entro il quinto giorno. Dopo la fase "eterologa" si manifesta una fase "omologa", dove si sviluppano IgG di ratto dirette contro le IgG eterologhe, con un successivo incremento della proteinuria. Visti questo fenomeno e la rapidità di sviluppo della malattia, risulta evidente che il modello attivo è maggiormente simile alla NM umana; la Heymann passiva consentì quindi di ipotizzare che i depositi sub-epiteliali si potessero formare anche in assenza di IC circolanti¹².

L'antigene responsabile della nefrite di Heymann è stato dapprima identificato come una glicoproteina del p.m. di 330 kDa¹³; negli anni '90 questa è stata meglio tipizzata anche grazie alla clonazione del gene ed è stata chiamata megalina¹⁴.

La megalina ha un p.m. di circa 600 kDa ed è costituita da 4600 aminoacidi; fa parte della famiglia dei recettori per le LDL; possiede funzioni di endocitosi, legandosi ad un gran numero di molecole come il plasminogeno, la ferritina, il Ca, la vitamina B12, il PTH, e molte altre¹⁵. È spesso associata ad una proteina del peso molecolare di 44 kDa chiamata RAP (Receptor Associated Protein), che ha funzione prevalente di chaperone. La megalina è espressa in diversi tessuti umani, come nel ratto. Peculiarità fondamentale di tale specie è però la sua espressione anche a livello podocitario, nei recessi di membrana podocitaria (coated pits)¹⁵.

Nella nefrite di Heymann, quindi, gli anticorpi circolanti anti-megalina attraversano la membrana basale glomerulare e attaccano specifici epitopi della megalina esposta sulla membrana plasmatica podocitaria, formando così IC in situ. In particolare, il meccanismo precoce della formazione degli ID nella nefrite sperimentale di Heymann appare più complesso ed è stato estesamente studiato ed per la gran parte delucidato. L'antigene, nel caso specifico la megalina, tende a concentrarsi nella zona di membrana ove avviene il contatto con lo specifico anticorpo (nei cosiddetti "clathrin-coated pits"). Gli IC crescono in dimensioni e vengono a liberarsi nello spazio sub-epiteliale (fenomeno noto come "shedding") ove interagiscono con la MBG e da essa vengono trattenuti. Cicli ripetuti di tale concatenazione di eventi alimentano la formazione e la crescita degli ID sub-epiteliali. La comprensione del meccanismo di formazione degli ID nel ratto ha consentito di ipotizzare che la medesima cascata di eventi sia attiva anche nell'uomo. È noto inoltre che le cellule epiteliali glomerulari rispondono al danno immunomediato anche con un aumento

della sintesi e dell'espressione di megalina, creando un circolo vizioso che amplifica la risposta anticorpale e la deposizione di IC. Da notare, sempre in tale modello sperimentale, la presenza di IC composti da RAP ed anticorpi anti-RAP; tali IC contribuiscono probabilmente al danno podocitario, tuttavia l'iniezione di anti-RAP, seguendo il modello "passivo" della nefrite di Heymann, non induce un significativo danno glomerulare poiché gli immunodepositi elettrondensi vengono riassorbiti nel giro di qualche settimana^{12, 16}.

Altri gruppi di studio cercarono di creare modelli animali differenti, per provare ad identificare nuovi antigeni¹⁷. L'approccio sperimentale consisteva nel provocare delle lesioni istologiche analoghe alla NM utilizzando l'iniezione endovenosa di anticorpi diretti contro antigeni dell'orletto a spazzola del tubulo prossimale, selezionare quelli con reattività glomerulare, e definirne l'epitopo bersaglio^{18, 19}.

E' stato così possibile individuare una proteina del p.m. di 90 kDa, espressa non solo nell'orletto a spazzola ma anche sulla membrana delle cellule epiteliali ed endoteliali del glomerulo del ratto, e un' ampia distribuzione extra-renale (linfociti, endotelio dei capillari, epatociti..). Questa proteina è stata identificata come l' enzima dipeptidil-peptidasi IV (DPP IV)^{20, 21}. L' iniezione endovenosa di anticorpi anti-DPP IV porta nel ratto alla formazione di ID sub-epiteliali di breve durata: dopo 72 ore essi risultano quasi completamente scomparsi. Lo stesso modello è riproducibile anche nel topo, con la differenza che i depositi vengono rimossi più lentamente, e consentono lo sviluppo della fase omologa della risposta immune¹⁸⁻²⁰.

Nel coniglio l'uso di anticorpi monoclonali diretti contro l'orletto a spazzola ha portato all'identificazione di due antigeni di produrre un modello simile alla nefrite passiva di Heymann: la prima è stata ancora la DPP IV. La seconda proteina individuata è stata l'encefalinasasi (p.m. 85 kDa). Questa proteina, successivamente chiamata anche endopeptidasi neutra (NEP) presentava la stessa distribuzione renale di DPP IV. Tuttavia, i depositi glomerulari indotti dall'iniezione di Ab anti-encefalinasasi si sono dimostrati particolarmente labili, persistendo per meno di 24 ore^{11, 18, 22}.

Queste osservazioni hanno quindi permesso di identificare, oltre alla megalina, ulteriori antigeni coinvolti nella formazione degli ID glomerulari sub-epiteliali in diverse specie animali. La transitorietà di questi ID non è verosimilmente dovuta alle caratteristiche degli anticorpi ma probabilmente è correlata a proprietà intrinseche degli antigeni stessi, come il loro turn-over sulla membrana podocitaria e la loro affinità elettrostatica per la MBG.

Nell'uomo la megalina non è espressa a livello podocitario, escludendola di fatto da ogni possibile coinvolgimento nella patogenesi della NM²³. Sono invece presenti, con distribuzione analoga al rispettivo animale da esperimento (podociti e orletto a spazzola), due proteine identificate in modelli sperimentali di NM: la DPP IV e la NEP. Tuttavia non è stata mai riscontrata una chiara presenza di tali antigeni a livello degli ID sub epiteliali in casi di NM idiopatica^{11, 18, 21, 22}.

Nonostante il sostanziale fallimento del tentativo di esportare direttamente i dati sperimentali ottenuti nella nefrite di Heymann e nei suoi analoghi alla NM umana, gli

studi sull'animale sono stati di fondamentale importanza poiché hanno fornito valide indicazioni sul meccanismo di formazione degli IC e di deposizione degli ID. Rimane infine ammissibile che taluni di questi antigeni possano essere coinvolti nella patogenesi della NM: la transitorietà degli ID, e quindi l'incapacità di identificare l'antigene nell'uomo, non esclude infatti di per sé un loro ruolo nelle primissime fasi di malattia e nello sviluppo di una successiva reazione auto-immunitaria diretta contro differenti antigeni podocitari^{6, 8, 24}.

Il primo antigene identificato come responsabile di NM umana è stato la NEP, ritenuto antigene bersaglio in un caso di NM neonatale²⁵. A partire dal 2002 sono stati poi descritti, in una elegante serie di lavori, ulteriori tre casi di NM neonatale NEP-correlata, provenienti da due diverse famiglie. Il meccanismo patogenetico è un fenomeno di "allo-immunizzazione". Tutte le madri degli infanti descritti sono risultate infatti portatrici di deficit congenito di NEP, secondario a mutazione non senso del gene relativo (*MME*). Ciò, durante una prima gravidanza, induce la formazione di anticorpi anti-NEP a causa dell'esposizione dell'antigene a livello delle cellule del feto e del sinciziotrofoblasto. Le IgG materne, in una eventuale seconda gravidanza, attraversano quindi la placenta e si depositano a livello podocitario (dove la NEP è normalmente espressa), provocando una NM congenita nel bambino²⁵.

Pur essendo indiscutibile ed ampiamente dimostrato il coinvolgimento della NEP in tale rara forma di NM neonatale quale antigene bersaglio della risposta immune,

appare molto difficile che tali evidenze siano trasferibili nelle forme di NM sporadiche. Sono infatti finora falliti tutti i tentativi di dimostrarne la presenza a livello degli ID nei casi di NM idiopatica¹¹. Inoltre, in un recente studio portato avanti dal nostro gruppo di ricerca e che verrà discusso in maniera più approfondita in seguito, è stato dimostrato che il livello di autoanticorpi anti-NEP non differisce significativamente tra controlli sani e pazienti affetti da NM²⁶.

Comunque, nonostante sia estremamente limitata la possibilità che la NEP sia un antigene implicato nei casi di NM primitiva, i lavori del gruppo di Pierre Ronco hanno avuto dei meriti fondamentali. Hanno dimostrato, infatti, che gli stessi meccanismi studiati nei modelli sperimentali (p.es. l'attivazione del C5b-9 da parte degli IC) sono coinvolti nell'uomo: quindi, poiché un antigene possa essere considerato implicato nella patogenesi della NM, deve essere presente a livello degli ID, co-localizzando con le IgG ed il complemento. Ma soprattutto, la scoperta della NEP come antigene nella NM congenita, ha confermato che anche la NM umana è una "podocitopatia", ovvero che il podocita e le sue proteine di membrana offrono il bersaglio antigenico per la formazione "in situ" degli ID^{6, 21, 24, 27}.

EZIOLOGIA E PATOGENESI. RECENTI SVILUPPI

Un passo fondamentale per approfondire lo studio della patogenesi della NM è avvenuto in questi ultimi anni. Esso si è verificato grazie all'applicazione di nuove tecniche di microdissezione tissutale e analisi delle proteine. Queste nuove

tecnologie, dette “di proteomica”, hanno consentito di studiare direttamente la NM sui campioni umani, abolendo la necessità di modelli animali²⁸. Infatti, l’analisi dei campioni umani con le classiche tecniche istopatologiche (microscopia ottica, immunofluorescenza/immunoistochimica e microscopia elettronica) era resa difficile sia a causa delle piccole quantità di tessuti renali disponibili, sia a causa della conformazione anatomica. Infatti le strutture glomerulari, tubulari ed interstiziali sono molto vicine tra loro e il rischio di contaminazione tra diversi compartimenti è alto.

La microdissezione laser ha consentito una brillante risoluzione di questo problema²⁸. Ogni struttura del nefrone può essere precisamente isolata. I glomeruli così ottenuti vengono raccolti in gruppi omogenei. Gli anticorpi depositati vengono eluiti e, infine, la specificità di ogni singolo anticorpo viene definita attraverso tecniche di western-blot e elettroforesi bidimensionale accoppiate all’analisi degli spot mediante spettrometria di massa^{23, 28}.

Il primo antigene bersaglio, implicato nella patogenesi della NM idiopatica, è stato identificato nel 2009 dal gruppo di ricerca di Lawrence Beck e David Salant di Boston. Esso è il recettore della fosfolipasi A2 (PLA2r). Auto anticorpi anti-PLA2r sono stati riscontrati nei glomeruli e nel siero di pazienti affetti da NM.

Il PLA2r è costituzionalmente (ma non esclusivamente) espresso nella membrana dei podociti umani. Esso lega la fosfolipasi A2 circolante, ma il suo ruolo fisiologico non è stato ancora completamente svelato. Nella loro serie di esperimenti, Beck e coll. hanno identificato anticorpi sierici circolanti anti-PLA2r con la metodica del western blot (WB), utilizzando come antigeni immobilizzati estratti di glomeruli normali. I

glomeruli sono stati isolati, non attraverso la microdissezione laser (LCM), ma utilizzando un sistema di “setacciamento” graduale. In seguito sono state estratte le proteine glomerulari, sono state rimosse le IgG e infine l’estratto glomerulare è stato sottoposto ad elettroforesi e trasferito su nitrocellulosa. Qui sono state identificate le bande reagenti con le IgG sieriche dei pazienti, che sono poi state analizzate con la spettrometria di massa (MS). Gli autori hanno confermato tali riscontri sia testando il siero dei pazienti contro la PLA2r ricombinante sia identificando la medesima banda attraverso un anticorpo anti-PLA2r umana presente in commercio. E’ utile sottolineare che le condizioni sperimentali sono estremamente importanti per identificare tali anticorpi: le reazioni devono avvenire in condizioni non-denaturanti, indicando quindi che gli epitopi patogenetici anti-PLA2r sono probabilmente di tipo conformazionale^{27, 29}.

Per ottenere conferma al primo riscontro, gli autori, successivamente, hanno rimosso le IgG glomerulari depositate nei pazienti affetti da NM mediante eluzione acida e successivamente le hanno sottoposte a WB in maniera analoga a quanto fatto con le IgG sieriche. Si è evidenziata così la presenza IgG anti-PLA2r depositate nei glomeruli.

Infine, sezioni istologiche sono state valutate con microscopia confocale: si è verificata la co-localizzazione di PLA2r e IgG, confermando come il PLA2r sia considerabile come antigene implicato nella patogenesi della NM.

Ulteriori lavori collaborativi, prodotti dal medesimo gruppo di ricerca o da gruppi indipendenti, hanno confermato sostanzialmente i dati. I controlli sani sono sempre

risultati negativi, mentre la percentuale di positività nella NM idiopatica è di circa il 50-80%^{27, 30, 31}. L'isotipo prevalente, come prevedibile, è risultato IgG₄, riscontrabile sostanzialmente in tutti i pazienti positivi; anche le altre sottoclassi sono riscontrabili, ma in percentuali minori³². I livelli sierici sono molto variabili, tuttavia data la negatività nei controlli normali, ogni positività per anti-PLA2r può essere considerata patologica. Dopo il primo lavoro, due tecniche di titolazione degli anti-PLA2r sono stati sviluppati: il WB (la tecnica originalmente usata da Beck) e una tecnica di immunofluorescenza indiretta su cellule transfettate per iperesprimere PLA2r³³. Se testate negli stessi pazienti, i risultati che forniscono sono sovrapponibili²⁶. Recentemente è stato sviluppato anche un test ELISA, molto promettente in termini di praticità e riproducibilità³⁴.

Considerando nel loro insieme tutti gli studi finora pubblicati che hanno valutato gli anticorpi anti-PLA2r nella NM, i risultati sono ben riproducibili. E' quindi possibile considerare tali anticorpi implicati nella maggior parte dei casi di NM (*Tabella 1*). La percentuale di positività è comparabile nei pazienti reclutati prima di ogni trattamento immunosoppressivo e nei pazienti testati durante il follow-up (ma se analizzati in una fase di recidiva della malattia).

Anche il nostro gruppo di ricerca ha trovato una positività di circa il 60% in una popolazione di 186 affetti da NM reclutati alla diagnosi; tale lavoro, pur non limitandosi alla titolazione degli anti-PLA2r, risulta al momento il più numeroso gruppo omogeneo di pazienti mai titolato per anti-PLA2r²⁶.

La specificità degli anticorpi anti-PLA2r nel distinguere le forme idiopatiche dalle secondarie è stata estensivamente indagata da un gruppo cinese³¹ e successivamente da dei ricercatori tedeschi³². Anche altri case-reports o piccole serie sono disponibili in letteratura^{33, 35-38}. Per quanto noto al momento, 123 pazienti con NM secondaria sono stati testati e solo 9 sono risultati positivi per anti-PLA2r circolanti (specificità del 93%). Quindi anche questi dati sembrano solidi e potrebbe essere ragionevole inserire la titolazione degli anti-PLA2r nella pratica clinica per aiutare a distinguere forme primitive e forme secondarie della NM.

Anche proteine non presenti normalmente sulla membrana podocitaria possono essere neo-espressi dal podocita in condizioni patologiche e diventare bersaglio della risposta autoimmunitaria nei pazienti affetti da NM. Gli studi portati avanti dal nostro gruppo di ricerca, ed inizialmente pubblicati pochi mesi dopo il primo lavoro del gruppo di Boston, hanno dimostrato che almeno tre ulteriori proteine, la aldoso reduttasi (AR), la superossido dismutasi 2 (SOD2) e l'alfa enolasi (AENO) si comportano come auto-antigeni nella NM^{29, 39}. Il loro ruolo esatto nella patogenesi della NM è attualmente oggetto di dibattito in ambito scientifico^{40, 41} e verrà brevemente discusso più avanti.

AR è un enzima citoplasmatico implicato nella formazione di zuccheri ridotti che contribuisce al mantenimento di gradienti osmotici transmembrana. AR inoltre catalizza la trasformazione delle aldeidi generate durante l'ossidazione di acidi insaturi. E' inoltre stata descritta una sua funzione nei meccanismi di risposta allo

stress ossidativo, qualora gli altri sistemi antiossidanti risultino saturati. La normale localizzazione di AR nel tessuto renale è a livello del citoplasma delle cellule tubulari della midollare, mentre è assente nelle cellule glomerulari²⁹.

SOD2 è un enzima mitocondriale che opera per la protezione della cellula dalle sostanze ossidanti. Catalizza la dismutazione dello ione superossido ad acqua ossigenata ed ossigeno molecolare (da cui anche la sua localizzazione nella matrice mitocondriale per "catturare" i superossidi provenienti dalle parziali riduzioni dell'ossigeno nel complesso IV). A livello renale SOD2 è normalmente espressa nelle cellule tubulari, soprattutto a livello della corticale, e il suo ruolo noto è di preservarle durante il danno indotto da eventi di ischemia/riperfusione²⁹.

AENO è un enzima ubiquitario, prevalentemente citosolico, che costituisce il penultimo passaggio della glicolisi (conversione del 2-fosfoglicerato in fosfoenolpiruvato). E' stata anche descritta, nell'endotelio e nelle cellule ematiche circolanti, una forma di superficie che appare agire come recettore ed attivatore del plasminogeno. A livello renale è ben nota la sua presenza nei citoplasmi tubulari; non rilevabile, in condizioni normali, nei glomeruli. Anticorpi diretti contro AE (in forma nativa o legata alla citrullina) sono stati descritti in numerose patologie autoimmuni (vasculiti, malattie infiammatorie intestinali, colangite sclerosante primitiva, LES, artrite reumatoide, ...), senza, tuttavia, un effettivo riscontro di patogenicità^{39, 41, 42}.

Inoltre, nella risposta umorale allo *S. pneumoniae* sono stati identificati anticorpi anti-AE di tale specie, con alta possibilità di epitopi cross-reattivi con l'enzima umano⁴³.

Il metodo sperimentale che ha portato all'identificazione di tali antigeni come implicati nella patogenesi della NM è simile, ma non identico, a quello usato dal gruppo di Beck e coll. Alcune tecniche di proteomica differiscono, mentre molti esperimenti sono sostanzialmente comuni. Ad esempio il test di conferma è lo stesso: la microscopia confocale è stata scelta da entrambi i gruppi per validare i dati ottenuti con la proteomica. Anche AR, SOD2 e AENO co-localizzano con le IgG depositate nella NM^{28, 29, 39}. Inoltre, il nostro gruppo ha ulteriormente confermato il dato, andando a dimostrare, attraverso l'immuno-elettronmicroscopia la presenza dell'antigene all'interno degli immunodepositi, oltre che sulla membrana del podocita. Al momento non è disponibile nessuna immagine di microscopia elettronica riguardante l'esatta localizzazione della PLA2r negli immunodepositi.

Nell'identificare AR, SOD2 e AENO il punto di partenza è stata la separazione e purificazione dei glomeruli dei pazienti mediante la LCM; su tali campioni è stata messa in atto l'eluzione acida delle IgG depositate. Inoltre, invece del semplice WB, è stata utilizzata l'elettroforesi bidimensionale: questa tecnica permette una migliore differenziazione tra le proteine, consentendo una più sicura identificazione degli spot mediante la MS. Infine, è diverso anche l'antigene immobilizzato utilizzato per valutare il bersaglio della risposta immune: estratti di membrana di podociti umani in coltura, in sostituzione di estratti proteici di glomeruli normali.

E' possibile che tali differenze tecniche possano spiegare il perché due gruppi di ricerca, lavorando in modo sovrapponibile, abbiano identificato e validato antigeni diversi. Infatti, ad esempio, il podocita in coltura è comunque sottoposto ad un certo

grado di “stress”, quindi risulta parzialmente “attivato” rispetto ai podociti in condizioni normali. Questa “attivazione” porta la cellula ad esprimere in maniera anomala alcune proteine, sia quantitativamente che come localizzazione cellulare. Questo, paradossalmente, porta ad ottenere una situazione più simile a quella del podocita coinvolto dai processi patologici della NM. Inoltre, nella elettroforesi bidimensionale utilizzata dal nostro gruppo di ricerca non sarebbe stato possibile identificare anche il PLA2r quale antigene bersaglio. Infatti possono essere identificate solo proteine di peso molecolare variabile tra 20 e 150 kDa; il PLA2r ha un peso molecolare di 180 kDa. Va infine sottolineato che lo stesso metodo combinato, basato su elettroforesi bidimensionale e MS, ha portato ad ipotizzare numerosi altri antigeni bersaglio (*Figura 1*); al momento però solo AR, SOD2 e AENO sono stati validati e sono considerati antigeni bersaglio nella NM^{23, 39}.

EZIOLOGIA E PATOGENESI. COESISTENZA DI ANTICORPI E CORRELAZIONI CLINICHE

E' evidente che i differenti autoanticorpi identificati possano coesistere nello stesso soggetto. Tuttavia, l'eterogeneità degli antigeni non necessariamente si traduce in complessità irriducibile: i dati sui diversi anticorpi nella NM risultano infatti complementari e sicuramente non si contrappongono reciprocamente.

L'importanza della valutazione di tutti gli autoanticorpi noti è stata sottolineata da un recente lavoro pubblicato dal nostro gruppo di ricerca²⁶. Alti livelli autoanticorpali

sono stati identificati in una coorte di 186 pazienti affetti da NM, reclutati alla diagnosi in quattro centri di Nefrologia italiani. Per la titolazione degli anti-PLA2r è stata usata la metodica del WB (associata con il kit commerciale in immunofluorescenza indiretta), mentre per gli anti-AR, -SOD2 e -AENO è stato utilizzato il dot blot. Anche per gli anticorpi diretti contro antigeni citoplasmatici, l'isotipo prevalente è risultato IgG₄, che sono risultate elevate in una significativa percentuale dei pazienti: 34% AR, 28% SOD2 e 43% AENO. IgG₄ contro tali antigeni sono state anche titolate in popolazioni di controlli patologici (pazienti affetti da glomerulosclerosi focale e segmentaria e da nefropatia di Berger) dove sono risultate essere addirittura inferiori rispetto ai controlli sani. Non è facile trovare una spiegazione univoca a questo riscontro, tuttavia è ipotizzabile che la proteinuria, la perdita aspecifica di proteine, ne sia la causa. Quindi la forte positività sierica anticorpale che si riscontra in pazienti affetti da NM, pur in presenza di forte proteinuria, rafforza l'idea che la formazione di tali anticorpi sia un meccanismo NM-specifico legato alla neo-espressione podocitaria degli antigeni.

Sempre dallo studio della coorte italiana, è emerso che il titolo anticorpale risulta correlato reciprocamente tra le varie specificità. Inoltre, la maggior parte dei pazienti positivi per anti-PLA2r è risultata positiva per almeno uno tra anti-AR, -SOD2 e -AENO. Oltre il 50% dei pazienti ha almeno due positività. Solo 37 pazienti sono risultati essere completamente negativi, rappresentando circa il 20% di tutta la popolazione di NM alla diagnosi. Questi pazienti possono avere anticorpi non ancora identificati diretti contro strutture podocitarie³⁹, oppure potrebbero essere affetti da

una forma di NM secondaria non correttamente classificata³². Infine, potrebbero invece essere in una fase di “remissione immunologica” precedente alla fase di remissione clinica classicamente definita⁴⁴.

Sempre nella coorte italiana²⁶, è stata valutata la presenza di una eventuale associazione tra i livelli anticorpali sierici e i parametri clinici. I risultati non hanno mostrato alcuna correlazione alla diagnosi della NM tra anti-PLA2r, anti-AR, anti-SOD2, anti-AENO con proteinuria, funzione renale e i livelli di albumina sierica. Tale riscontro è coerente con altri lavori basati sulla valutazione del solo anti-PLA2r^{27, 32, 45}. Unica eccezione sono i riscontri di un gruppo di ricercatori franco-olandese^{34, 46}, dove però la correlazione tra titolo anti-PLA2r e concomitante proteinuria diventa significativa solo dopo aver corretto il titolo anticorpale per la frazione di escrezione delle IgG³⁴; tale manipolazione, pur avendo qualche base razionale, viene a correlare la proteinuria con un valore che è, di per se, funzione della proteinuria stessa (ovvero la frazione di escrezione delle IgG). Nonostante queste ultime evidenze, la globalità della letteratura disponibile non supporta un legame diretto tra titolo autoanticorpale e proteinuria. Ancora meno dati sono disponibili e convincenti per quanto riguarda la capacità di una singola specificità anticorpale di anticipare l’andamento clinico della NM. Gli anti-PLA2r potrebbero avere qualche correlazione in termini di “clearance dell’anticorpo”: un outcome positivo sarebbe correlato a una negativizzazione del titolo anticorpale spontanea o dopo terapia⁴⁵. Questa ipotesi rimane interessante, ma appare comunque di scarsa applicabilità pratica poiché sono presenti dei pazienti che si discostano da tale

andamento. Si riscontrano pazienti senza anticorpi circolanti ma sindrome nefrosica in fase florida, ma soprattutto pazienti negativi per anti-PLA2r che continuano ad avere proteinuria elevata. Questo implica che la correlazione tra anticorpi e andamento clinico non è di tipo lineare, ma vi devono essere implicati molti fattori non ancora noti.

Utilizzando una regressione lineare, il nostro gruppo di ricerca ha riscontrato una debole associazione tra anti-AR e anti-AENO alla diagnosi e, rispettivamente, proteinuria e albuminemia dopo un anno²⁶. Al momento tale riscontro, come quelli evidenziati tra anti-PLA2r e parametri clinici, appare di difficile utilizzo e meritevole comunque di ulteriori riscontri.

Infatti, i risultati di quello che fin ora è lo studio più numeroso di pazienti affetti da NM²⁶, mettono in dubbio l'esistenza di una correlazione tra il singolo anticorpo e i parametri clinici, ma indicano chiaramente che l'unico sottogruppo di pazienti con una migliore prognosi a un anno (proteinuria inferiore e più alta probabilità di remissione completa) è quello definito dalla completa negatività anticorpale al momento della biopsia renale. Ciò indica inoltre indirettamente che potrebbe essere presente un coinvolgimento di tutti gli anticorpi noti nella patogenesi della NM.

Quindi la valutazione di tutto il pannello anticorpale alla diagnosi potrebbe fornire ai clinici la migliore informazione circa la prognosi del paziente. Questo concetto però necessita di ulteriori conferme in coorti differenti di pazienti, prima di poter essere proposto ed ottenere il consenso della comunità scientifica. In tale valutazione sarà

anche necessario un accurato studio del rapporto costi/benefici, considerato che la titolazione di quattro specificità anticorpali non è operazione priva di significativo impegno economico. La necessità di procedere con l'approfondimento dell'argomento è già presente in ambito scientifico: sono attualmente in fase di reclutamento numerosi trials terapeutici sulla NM che verranno associati alla titolazione di uno o più anticorpi anti-podocita.

RAZIONALE DELLO STUDIO

Gli studi degli ultimi anni hanno quindi descritto alcuni antigeni podocitari come implicati nella patogenesi della NM. Questo ha portato ad ipotizzare l'utilizzo dei rispettivi anticorpi come potenziali biomarcatori di malattia o della sua attività. Al momento l'evidenza del coinvolgimento patogenetico di tali anticorpi è abbastanza forte (pressoché 1000 pazienti valutati per anti-PLA2r - *Tabella 1* - e 186 per tutti gli anticorpi noti), tuttavia è ancora poco conosciuto il loro comportamento nel decorso della malattia e, soprattutto, dopo la terapia immunosoppressiva.

Al momento, si conosce l'andamento degli anticorpi anti-PLA2r prima e dopo di un trattamento specifico in circa 60 pazienti^{33, 45-47}. In questi studi, piccole coorti di pazienti sono stati sottoposti a schemi terapeutici variabili (ma spesso comprendenti il rituximab) e hanno mostrato outcome clinici e variazioni dei titoli anticorpali estremamente discordanti. Globalmente, i dati di follow-up disponibili indicano che la terapia immunosoppressiva è efficace nel ridurre gli anticorpi anti-podocita nei pazienti affetti da NM. Tuttavia, le evidenze sono ancora insufficienti per trarre alcuna solida conclusione e per produrre delle raccomandazioni cliniche sull'argomento. La prima limitazione è infatti, come detto, che i dati sono limitati a pazienti trattati con rituximab, e non è noto sull'effetto di altri protocolli immunosoppressivi utilizzati comunemente nella NM. Secondariamente, tale valutazione è stata prodotta solo per quanto riguarda gli anti-PLA2r, nulla è noto sugli anticorpi diretti contro antigeni citoplasmatici podocitari.

Infine, nessun gruppo di ricerca ha ancora valutato l'escrezione urinaria di tali anticorpi. Sebbene molti fattori possano condizionarla e rendere la valutazione poco affidabile, ulteriori e preziose valutazioni sulla patogenesi della NM potrebbero derivare da questa analisi.

Per tentare di iniziare a rispondere a tali questioni aperte, si è proceduto alla titolazione seriata, sierica ed urinaria, degli anticorpi diretti contro antigeni podocitari (anti-PLA2r, anti-AR, anti-SOD2, anti-AENO) in una piccola coorte di 22 pazienti affetti da NM, trattati con lo "Schema di Ponticelli" come prima opzione terapeutica^{48, 49}.

MATERIALI E METODI

CONTROLLI SANI

I campioni urinari da utilizzare come controlli sono stati 22. Essi sono stati raccolti da soggetti sani, che avessero eseguito negli ultimi sei mesi esame delle urine ed esami di funzionalità renale risultati come normali.

PAZIENTI

Sono stati reclutati pazienti affetti da NM, afferenti al reparto di Nefrologia dell'Azienda Ospedaliero-universitaria di Parma, al momento della biopsia renale, prima dell'inizio di qualsiasi terapia immunosoppressiva. Tali pazienti erano stati inizialmente reclutati per far parte di uno studio, recentemente pubblicato²⁶. Lo studio era stato approvato dal Comitato Etico dell'Istituto Giannina Gaslini (Genova); il protocollo originale è inserito nel registro EudraCT (2011-003942-41).

I criteri di arruolamento sono stati: 1) diagnosi istopatologica di NM; 2) markers immunologici e virali (HBsAg, anti-HIV) negativi; 3) nessun dubbio clinico relativo ad una possibile secondarietà della NM; 4) assenza di anamnesi positiva per precedente uso di farmaci immunosoppressivi.

Nel gruppo di tali pazienti, sono stati scelti 22 individui che siano stati trattati con il classico "Ciclo di Ponticelli"⁴⁸. Come farmaco citostatico (che viene usato nei mesi 2,4 e 6) è stato usato o il chlorambucil (0,2 mg/kg/die) o la ciclofosfamide (2,5

mg/kg/die). Tale scelta era operata in piena libertà dal clinico che aveva in cura il paziente. Due tra i pazienti trattati con chlorambucil (paziente 10 e 11 - *Tabella 2*) hanno dovuto interrompere il ciclo al secondo ed al quarto mese, rispettivamente, a causa di una profonda leucopenia. Dopo il rientro dei leucociti a valori di normalità, sono stati entrambi trattati con ciclosporina A (4 mg/kg/die) e basse dosi di steroide. La raccolta dei dati clinici e dei campioni biologici (siero ed urine) è stata programmata dopo 1 e dopo 2 anni dalla biopsia renale. Dopo un anno (T12), i dati clinici sono risultati disponibili per tutti i pazienti, mentre 4 di essi non hanno raccolto il siero. Dopo due anni (T24) 2 pazienti sono risultati mancanti al follow-up (assenti sia i dati clinici che i campioni biologici), mentre per 3 non è risultato disponibile il siero. Ricapitolando, a un anno erano disponibili i dati clinici di tutti e 22 i pazienti e i campioni di siero di 20 pazienti. A due anni i dati clinici di 20 pazienti e il siero di 16 di loro. Va sottolineato che di ogni paziente arruolato sono risultati disponibili almeno due campioni di siero.

Per quanto riguarda i campioni di urine (una aliquota di una raccolta delle 24 ore), sono stati raccolti e analizzati 21 campioni basali, 17 raccolti dopo un anno e 12 dopo due anni.

TITOLAZIONE DEI CAMPIONI SIERICI ED URINARI

Tutti gli esperimenti di titolazione degli anticorpi sono stati condotti presso il Laboratorio di Fisiopatologia dell'Uremia dell'Istituto Giannina Gaslini (Genova).

Anti-AR, Anti-SOD2, Anti-AENO. Le IgG₄ dirette contro AR, SOD2 e AENO presenti nel siero e nelle urine sono state valutate con la metodica del dot blot come descritto in precedenza^{26, 29, 39}. E' stato applicato il medesimo protocollo per siero ed urine, con l'unica differenza che i sieri da analizzare sono stati diluiti nella soluzione tampone 1:100, mentre le urine sono state diluite 1:10.

Anti-PLA2r. Gli anticorpi sierici ed urinari IgG₄ anti-PLA2r sono stati titolati attraverso una metodica di Western Blot, utilizzando come antigeni estratti proteici di membrana podocitaria separati attraverso un'elettroforesi monodimensionale. Il nostro metodo, per quanto riguarda la titolazione sierica è stato recentemente descritto²⁹ e validato²⁶ rispetto al test in immunofluorescenza indiretta presente in commercio (Euroimmun, Lubecca, Germania). Anche in questo caso, i sieri sono stati diluiti 1:100, mentre le urine sono state diluite 1:10.

ANALISI DEI DATI

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Il metodo della correlazione per ranghi di Spearman è stato usato per paragonare reciprocamente le variabili prive di distribuzione normale. Il test non parametrico U di Mann-Whitney è stato utilizzato per valutare ciascuna variabile priva di distribuzione normale in popolazioni diverse.

Per quanto riguarda gli anticorpi titolati attraverso la metodica del dot blot, la “positività” è stata considerata come precedentemente descritto ²⁶. Brevemente, un titolo anticorpale è stato considerato “positivo” se eccedente il 95° percentile dei livelli titolati nella popolazione di controlli sani.

RISULTATI

ANDAMENTO CLINICO

Tra i 22 pazienti arruolati, 13 sono stati trattati con ciclofosfamide e 9 con chlorambucil come immunosoppressore. Non è stata rilevata alcuna differenza significativa tra i due gruppi in termini di dati clinici all'esordio o nel follow-up.

Al momento della biopsia, i pazienti presentavano una proteinuria molto alta (*Tabella 2*), con un valore mediano al di sopra del range nefrosico (3,5 g/die). Dopo un anno, la terapia è risultata essere efficace nel ridurre la proteinuria (mediana 1,5 g/die). Al termine dello studio, la maggior parte dei pazienti aveva raggiunto un valore di proteinuria vicino alla normalità (mediana 0,4 g/die).

Analizzando i dati in termini di remissione completa (RC: proteinuria < 0,3 g/die), remissione parziale (RP: proteinuria < 3,5 g/die ma > 0,3 g/die) o non risposta (NR: proteinuria > 3,5 g/die), dopo un anno 6 pazienti erano in RC, 12 in RP e 4 erano ancora NR. Al termine dello studio (20 pazienti disponibili), 9 pazienti hanno raggiunto la RC (5 lo erano già dopo dodici mesi, mentre 4 hanno ottenuto una ulteriore riduzione della proteinuria nel tempo) e 7 erano in RP. Dei 4 pazienti con proteinuria in range nefrosico dopo 24 mesi dalla biopsia, 2 la avevano anche dopo un anno dalla diagnosi, mentre 2 hanno avuto una recidiva di malattia.

Globalmente, quindi, si può affermare che lo "Schema di Ponticelli" si è confermato un trattamento efficace nel trattamento della NM, con un tasso di remissione di circa l'80% dopo 2 anni dalla diagnosi.

ANTICORPI SIERICI

Tutti gli anticorpi testati (anti-PLA2r, anti-AR, anti-SOD2, anti-AENO), sono risultati globalmente elevati (*Figura 2*). Valutando la situazione al momento della diagnosi, in termini di singola positività anticorpale, 10 pazienti sono risultati essere positivi per AR (45%), 15 per SOD2 (68%), 9 per AENO (41%) e 16 per PLA2r (73%); tali valori sono in linea con i precedenti riscontri ²⁶. Solo un paziente è risultato completamente negativo, mentre 3 pazienti hanno presentato positive tutte le specificità. Una positività multipla (più di un anticorpo positivo) è lo status immunologico più frequente, infatti solo tre pazienti hanno mostrato un singolo anticorpo positivo (*Tabella 2*).

I livelli anticorpali non sono risultati essere correlati tra di loro, né con alcun parametro clinico valutato al medesimo momento della titolazione anticorpale stessa. Dopo un anno, in termini di valutazione globale della popolazione, il titolo medio degli anti-SOD2, anti-AENO e anti-PLA2r è risultato nettamente ridotto (- 87%), rimanendo poi sostanzialmente stabile al termine dello studio (*Figura 2*). Gli anticorpi anti-AR, invece, hanno mostrato un andamento differente, con un decremento più lento, ma costante (-16% a un anno e -42% a due anni).

La terapia è risultata essere efficace anche in termini di riduzione del numero di positività (*Tabella 2*). Come già specificato, il livello soglia considerato “positivo” è stato il medesimo stabilito ed utilizzato in nostro precedente lavoro ²⁶. Tutti i pazienti negativi per anti-PLA2r all’inizio dello studio, lo sono rimasti anche nel follow-up, mentre qualche nuova positivizzazione è avvenuta per gli altri anticorpi. Nessuna

correlazione è risultata essere evidente tra lo status di positività per anti-AENO e anti-PLA2r e l'andamento clinico. Invece, nessun paziente che ha raggiunto la RC è risultato essere positivo per anti-AR e/o anti-SOD2. Questi ultimi anticorpi sono invece risultati essere positivi in circa il 25-50% dei pazienti in RP e nel 50% dei pazienti non responsivi (*Tabella 3*).

La remissione completa si è associata alla negativizzazione di tutto il pannello anticorpale in 3 e 5 pazienti, rispettivamente a 1 e 2 anni. Due differenti coppie di soggetti erano in RC, nonostante la presenza di una positività anticorpale (anti-PLA2r o anti-AENO). I pazienti NR dopo un anno di osservazione avevano tutti almeno un anticorpo circolante, mentre al termine dello studio un paziente ancora nefrosico è risultato essere negativo per tutto il pannello. Un altro NR presentava positività isolata anti-AR, mentre in un terzo si è riscontrata positività multipla per anti-AR, SOD2 e PLA2r (*Tabella 2*).

ANTICORPI URINARI

Nei controlli sani tutti gli anticorpi anti-podocita sono risultati essere sostanzialmente negativi. Nei pazienti affetti da NM, invece hanno mostrato delle concentrazioni variabili, ma comunque rilevabili. Per minimizzare le variazioni dovute alla possibile differenza di diluizione urinaria, i titoli anticorpali sono stati corretti per la creatininuria. I livelli urinari di anti-AR, anti-SDO2 ed anti-AENO non si sono sostanzialmente modificati nel corso della malattia. Gli anti-PLA2r si sono invece

ridotti; la loro riduzione è risultata essere correlata alla concomitante riduzione del titolo sierico, ma non alla proteinuria (*Figura 3*).

Valutando insieme la cinetica degli anticorpi sierici ed urinari, si sono potuti osservare comportamenti differenti per ogni anticorpo che hanno sostanzialmente confermato la valutazione dei soli anticorpi urinari. In particolare, si è confermato che gli anti-PLA2r, pur essendo i titoli sierici ed urinari strettamente correlati, non sembrano essere in relazione con l'andamento clinico, risultando, ad esempio, estremamente ridotti anche nei pazienti persistentemente nefrosici. Anche per gli altri anticorpi una relazione tra titoli sierici, urinari ed andamento clinico non appare evidente dall'analisi dei dati ottenuti.

DISCUSSIONE

La recente definizione di autoanticorpi diretti contro antigeni podocitari come implicati nella patogenesi della NM è stato un progresso notevole per le conoscenze nefrologiche⁵⁰. Numerosi studi hanno confermato e continuano a confermare i risultati degli studi preliminari. Soprattutto per gli anticorpi anti-PLA2r c'è crescente consenso della comunità scientifica: il PLA2r è presumibilmente l'antigene più importante ed è probabile che il dosaggio di tali anticorpi possa trovare uno spazio nel processo diagnostico della NM, a causa del suo elevato valore predittivo positivo e della sua bassa percentuale di positività nelle forme secondarie di NM⁴⁴. Tuttavia, una importante quota di pazienti affetti da NM idiopatica risulta essere anti-PLA2r negativa, nonostante una presentazione clinico-istologica ed un outcome completamente sovrapponibile ai pazienti anti-PLA2r positivi^{26, 34, 45}. Inoltre, una correlazione tra titolo anti-PLA2r e decorso della malattia è stato proposto e valutato in diversi articoli; però il livello di evidenza rimane molto scarso a causa di risultati conflittuali tra lavori simili^{26, 32, 46}, associazioni deboli³⁴ e comunque a causa della notevole percentuale di pazienti anti-PLA2r negativi²⁷.

Il nostro gruppo di ricerca ha recentemente proposto che la valutazione degli anticorpi anti antigeni citoplasmatici del podocita (AR, SOD2, AENO) possa colmare qualcuna delle limitazioni dovute alla valutazione del solo anti-PLA2r, offrendo potenzialmente uno strumento migliore per la valutazione dei pazienti e loro stratificazione del rischio²⁶. Per testare la nostra ipotesi, è stato messo a punto questo

lavoro che aveva come obiettivo di valutare nel tempo i cambiamenti di tutti gli anticorpi noti, prima e dopo l'utilizzo del "Ciclo di Ponticelli", uno schema terapeutico immunosoppressivo universalmente adottato nella NM e altamente standardizzato. Nel medesimo gruppo di pazienti, è stato anche valutato il livello urinario degli stessi anticorpi. Questo lavoro presenta quindi notevoli elementi di novità rispetto alla letteratura disponibile e i risultati ottenuti potrebbero essere spunto per ulteriori e più approfondite valutazioni.

Guardando complessivamente i risultati, viene confermato che i livelli autoanticorpali nella NM tendono a diminuire dopo la terapia, in concomitanza con una riduzione della proteinuria. Tuttavia, quello che sembra evidente esaminando i dati in generale, diventa incerto guardando l'andamento del singolo paziente o del singolo anticorpo.

Gli anti-PLA2r confermano, in un certo qual modo, la loro alta specificità³¹, non essendosi verificata alcuna positivizzazione tardiva. Tuttavia essi sembrano declinare dopo la terapia anche nei pazienti che non mostrano una risposta clinica o che presentano una recidiva di proteinuria. Questo aspetto rende l'utilizzo di tali anticorpi come biomarkers molto discutibile e non privo di rischi.

Anche gli anticorpi diretti contro antigeni citoplasmatici podocitari (AR, SOD2, AENO), non presentano una evidente associazione con l'outcome. Gli anti-AENO, in particolare hanno un andamento molto difficile da giustificare, e comunque non sembrano presentare nessun legame con l'attività di malattia. La riduzione di anti-AR e anti-SOD2 dopo il trattamento, invece, sembra essere più correlato all'attività di malattia. Infatti, nella nostra piccola coorte, nessun soggetto che ha raggiunto la

remissione completa mantiene anticorpi circolanti diretti contro la AR e la SOD2. Tale concetto appare più importante se formulato diversamente: nessun paziente con anticorpi circolanti diretti contro AR e SOD2 ha ottenuto una remissione completa di malattia.

Per tali motivi, sembra evidente che valutare il pannello anticorpale completo, invece che un singolo anticorpo, possa essere il modo più accurato di valutare la presenza di eventuali correlazioni tra autoanticorpi e decorso della malattia. I numeri valutati in questo lavoro infatti, sono certamente troppo piccoli per raggiungere qualsivoglia solida conclusione, tuttavia possono essere considerati come valida base per progettare dei nuovi studi mirati ad approfondire la patogenesi della NM e a cercare una eventuale possibilità di predire l'andamento della malattia sulla base dei titoli dei diversi autoanticorpi.

In questo piccolo studio è stata inoltre valutata per la prima volta l'escrezione urinaria degli anticorpi anti-podocita nella NM. I risultati raggiunti, benché interlocutori, sembrano essere promettenti, anche se è noto che molti fattori aspecifici e sicuramente in gran parte incalcolabili, possano alterarne la misurazione. La presenza di anticorpi nelle urine è infatti certamente legata alla produzione di autoanticorpi, quindi all'attività di malattia (questo è dimostrato dalla negatività degli anticorpi urinari nei controlli sani). Tuttavia, il livello anticorpale urinario può essere anche funzione dell'entità del danno alla membrana basale glomerulare, della capacità di riassorbimento tubulare e anche della presenza di siti antigenici liberi a

livello podocitario. Inoltre, gli anticorpi potrebbero non essere rilevabili nelle urine nelle fasi precoci della malattia poiché ancora completamente intrappolati nello spazio sub-epiteliale. Contrariamente a quanto, invece, potrebbe succedere tardivamente: normalizzata la loro presenza nel siero, potrebbero essere rilevati nelle urine a causa di un rilascio passivo dagli immunodepositi ancora presenti in un glomerulo in fase di guarigione. Infine, bisogna anche considerare le importanti variazioni di pH che avvengono fisiologicamente nelle urine: la struttura anticorpale potrebbe risentirne e quindi interferire con la corretta titolazione.

Nonostante, però, tutte le perplessità espresse, va evidenziato che il livello anticorpale è nettamente elevato nei pazienti affetti da NM rispetto ai controlli normali. Questa costituisce una buona base che potrebbe suggerire di approfondire l'utilità di una loro titolazione valutandone l'impatto in coorti più numerose di pazienti.

Infine, lo studio di questa piccola coorte, consente anche di trarre qualche conclusione di tipo farmacologico-terapeutico. Infatti, viene confermata la nota efficacia del "Ciclo di Ponticelli" sul decorso della NM^{48, 49} e viene mostrata, per la prima volta, la sua efficacia nel ridurre il titolo degli anti-PLA2r e degli altri anticorpi anti-podocita. Tale valutazione sugli autoanticorpi circolanti era stata infatti finora effettuata solo durante protocolli terapeutici basati sull'uso del rituximab^{45, 47}. E' quindi ora possibile affermare che il Ciclo di Ponticelli e il rituximab hanno effetti comparabili sugli anticorpi circolanti e sull'andamento clinico; quindi la scelta

terapeutica andrebbe effettuata sulla base di costi ed effetti collaterali, piuttosto che basandosi su una ipotetica, e non dimostrata, maggiore efficacia sui livelli anticorpali⁴⁹.

CONCLUSIONE

Lo studio qui presentato, basato sulla titolazione sierica ed urinaria dei nuovi anticorpi in pazienti affetti da NM prima e dopo uno schema terapeutico standardizzato e largamente diffuso, conferma sostanzialmente i risultati di precedenti pubblicazioni sull'argomento. Viene ancora una volta suggerito che, alla base della patogenesi della NM, vi sia la presenza di una complessa rete autoanticorpale, probabilmente ancora non completamente delucidata. Non viene invece ancora completamente chiarito se la valutazione del pannello anticorpale completo possa offrire dei reali vantaggi dal punto di vista clinico, appare tuttavia evidente che ogni singola specificità possa essere utile nel completare il quadro clinico-anticorpale del singolo paziente. Nessun paziente con anti-AR ed anti-SOD2 circolanti ha raggiunto dopo terapia la remissione completa, mentre gli anti-PLA2r hanno mostrato di ridursi anche nei pazienti persistentemente non responsivi alla terapia e gli anti-AENO non hanno mostrato alcun tipo di correlazione intellegibile con la proteinuria.

Non sussistendo alcun ostacolo di tipo razionale, meccanicistico o patogenetico che possa suggerire una scarsa importanza degli anticorpi diretti contro antigeni citoplasmatici del podocita^{40, 41}, anzi, potendo essi fornire una motivazione ad alcune delle caratteristiche peculiari della NM come, ad esempio, la maggiore incidenza di trombosi venose (giustificabile attraverso l'interazione tra anticorpi anti-AENO e il recettore del plasminogeno⁴¹), rimane valida l'ipotesi che la misurazione del

completo pannello anticorpale sia l'approccio più promettente da valutare in coorti più ampie di pazienti. Ciò per verificare se esista la possibilità di prevedere l'outcome di malattia e, comunque, per approfondire le conoscenze sulla patogenesi della NM. Progettare studi multicentrici sulla NM che, contrariamente all'evidenza disponibile, si propongano di titolare un singolo anticorpo appare invece un atteggiamento, al momento, arbitrario e basato su logiche pregiudiziali e, probabilmente, puramente commerciali. Infatti, solo dopo aver dimostrato l'inutilità della valutazione anticorpale estesa, l'approccio basato sulla singola specificità potrebbe essere giustificato e razionale.

FIGURE

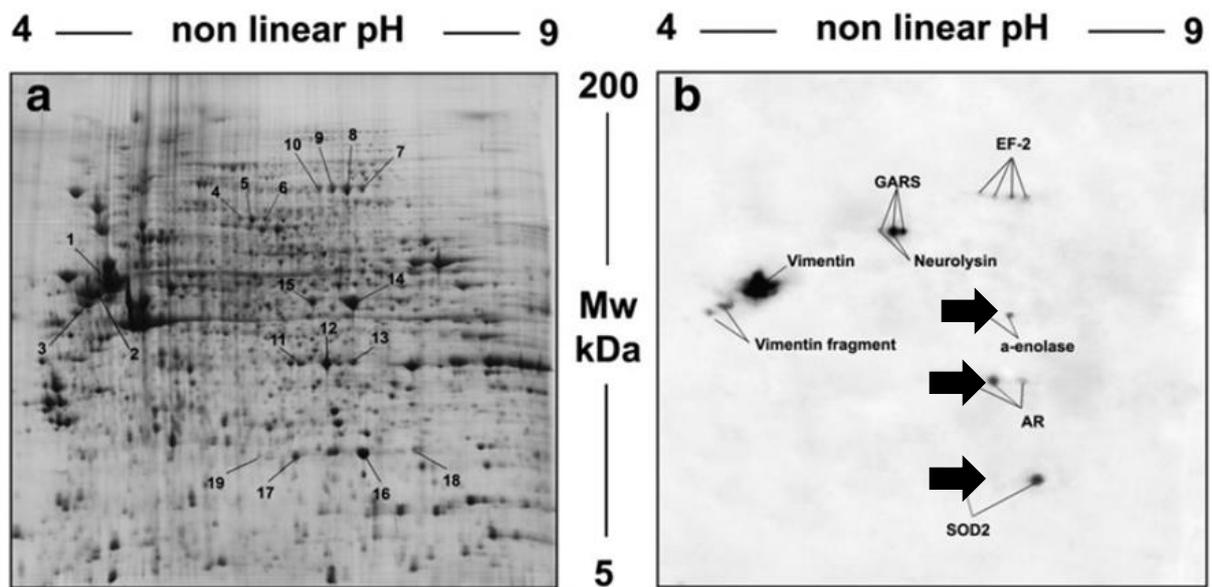


Figura 1. Bersagli antigenici degli anticorpi depositati nei glomeruli dei pazienti affetti da *NM idiopatica*. Elettroforesi bidimensionale. A sinistra mappa, rilevata con colorazione argentea, dell'estratto di membrana di podociti in coltura rappresentativa dei potenziali bersagli antigenici rilevabili. A destra, lo stesso antigene immobilizzato è stato incubato con eluati glomerulari di *NM* e rilevato con anticorpo secondario HRP-coniugato diretto contro IgG umane. Le frecce indicano gli spot di AR, SOD2 e AENO. Modificato da ³⁹.

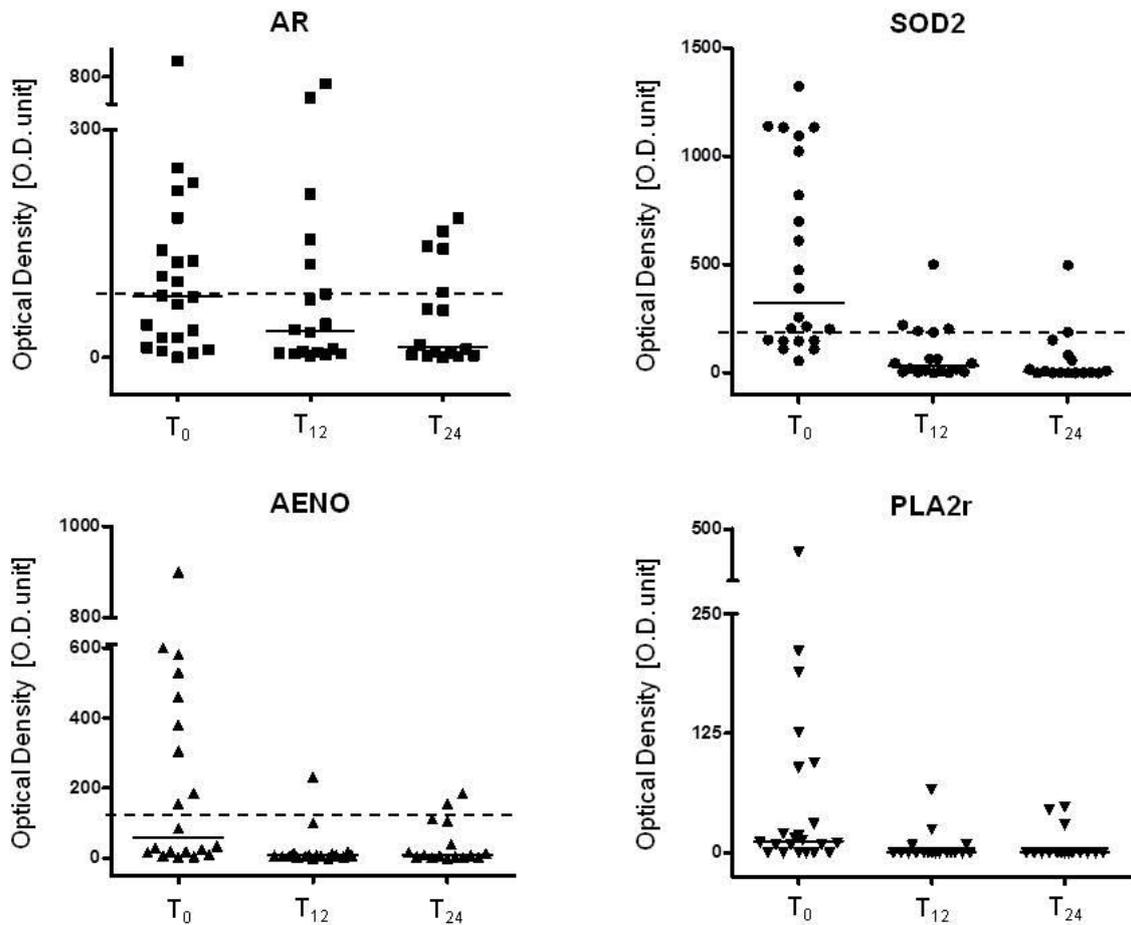


Figura 2. Livelli sierici degli anticorpi anti-podocita durante il decorso dello studio. La linea tratteggiata per AR, SOD2 e AENO indica il limite di positività per il singolo anticorpo. La linea continua indica il valore mediano per singolo anticorpo e singolo timepoint. T12: valutazione ad un anno di distanza dalla diagnosi istologica. T24: valutazione a due anni di distanza dalla diagnosi istologica. O.D. unità arbitraria di densità ottica.

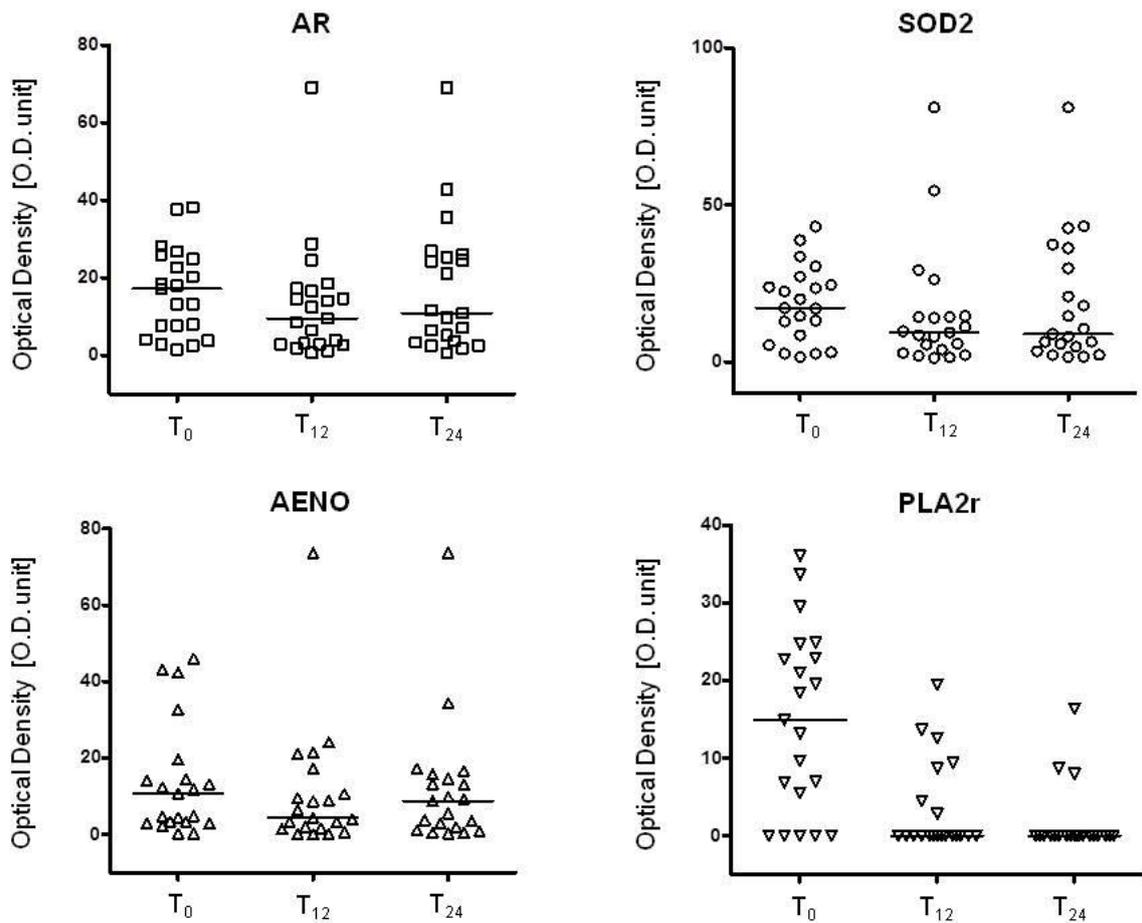


Figura 3. Livelli urinari degli anticorpi anti-podocita durante il decorso dello studio. La linea continua indica il valore mediano per singolo anticorpo e singolo timepoint. T12: valutazione ad un anno di distanza dalla diagnosi istologica. T24: valutazione a due anni di distanza dalla diagnosi istologica. O.D. unità arbitraria di densità ottica.

TABELLE

| Autore | Metodo | Pazienti | Positivi (%) | Isotipo IgG |
|--|---------------|-----------------|---------------------|--------------------|
| <i>Titolazione di anti-PLA2r alla diagnosi</i> | | | | |
| Debiec³⁰ | WB/IF | 42 | 24 (57) | IgG totali |
| Hofstra³⁴ | IF/ELISA | 117 | 82 (70) | IgG ₁₋₄ |
| Hoxha³² | IF | 73 | 61 (84) | IgG ₁₋₄ |
| Murtas²⁶ | WB/IF | 186 | 111 (60) | IgG ₄ |
| Oh⁵¹ | WB | 100 | 69 (69) | IgG ₄ |
| Svobodova⁵² | IF | 20 | 14 (70) | IgG totali |
| Timmermans⁵³ | WB | 91 | 64 (70) | IgG ₄ |
| | | 629 | 425 (68) | |
| <i>Titolazione di anti-PLA2r nel decorso di malattia</i> | | | | |
| Beck²⁷ | WB | 35 | 25 (71) | IgG ₄ |
| Beck⁴⁵ | WB | 37 | 26 (70) | IgG ₁₋₄ |
| Cravedi⁵⁴ | WB | 4 | 4 (100) | IgG ₄ |
| Hofsra⁴⁶ | WB | 18 | 14 (78) | IgG ₄ |
| Hoxha³³ | IF | 100 | 52 (52) | IgG totali |
| Kanigicherla⁵⁵ | ELISA | 90 | 42 (47) | IgG ₁₋₄ |
| Michel⁴⁷ | IF | 10 | 10 (100) | IgG totali |
| Qin³¹ | WB | 81 | 53 (65) | IgG ₁₋₄ |
| Svobodova⁵² | IF | 45 | 12 (27) | IgG totali |
| | | 420 | 238 (57) | |
| TOTALE | | 1049 | 664 (63) | |

Tabella 1. Percentuali di positività per anti-PLA2r in pazienti affetti da NM. Sono elencati i principali studi pubblicati su giornali scientifici con metodica di “revisione tra pari”. Dati aggiornati al settembre 2013.

| # | Diagnosi | | | | | T12 | | | | | T24 | | | | |
|----|---------------------|-----|------|------|-------|---------|-----|------|------|-------|---------|-----|------|------|-------|
| | Proteinuria (g/die) | AR | SOD2 | AENO | PLA2r | Outcome | AR | SOD2 | AENO | PLA2r | Outcome | AR | SOD2 | AENO | PLA2r |
| 1 | 6,8 | Pos | Pos | 0 | Pos | RC | - | - | - | - | RC | 0 | 0 | 0 | Pos |
| 2 | 5,0 | Pos | Pos | 0 | 0 | NR | Pos | Pos | 0 | 0 | - | - | - | - | - |
| 3 | 12,0 | 0 | 0 | Pos | Pos | RP | 0 | Pos | 0 | 0 | NR | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 10,0 | 0 | Pos | Pos | Pos | RP | - | - | - | - | RP | 0 | 0 | 0 | Pos |
| 5 | 11,0 | Pos | Pos | 0 | 0 | NR | - | - | - | - | NR | Pos | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 6,0 | 0 | 0 | Pos | Pos | RC | 0 | 0 | 0 | Pos | RP | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 5,0 | Pos | Pos | 0 | 0 | RP | 0 | Pos | 0 | 0 | RP | - | - | - | - |
| 8 | 28,0 | Pos | Pos | Pos | Pos | RP | - | - | - | - | RP | Pos | Pos | Pos | 0 |
| 9 | 6,4 | 0 | Pos | 0 | Pos | RP | 0 | 0 | 0 | 0 | RP | Pos | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 6,0 | 0 | Pos | 0 | Pos | RP | Pos | 0 | 0 | 0 | RP | Pos | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 9,0 | Pos | 0 | Pos | Pos | RP | Pos | 0 | 0 | Pos | NR | Pos | Pos | 0 | Pos |
| 12 | 9,8 | 0 | Pos | 0 | 0 | RP | Pos | 0 | 0 | 0 | RC | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 2,8 | 0 | 0 | 0 | Pos | RP | Pos | Pos | 0 | 0 | RC | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 13,0 | 0 | Pos | 0 | 0 | RP | Pos | 0 | 0 | 0 | RP | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 3,0 | Pos | Pos | Pos | Pos | RP | 0 | 0 | 0 | 0 | RC | 0 | 0 | Pos | 0 |
| 16 | 7,6 | 0 | Pos | 0 | Pos | RC | 0 | 0 | 0 | 0 | RC | - | - | - | - |
| 17 | 2,7 | 0 | Pos | 0 | Pos | RC | 0 | 0 | 0 | 0 | RC | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 6,5 | Pos | Pos | Pos | Pos | RC | 0 | 0 | 0 | 0 | RC | - | - | - | - |
| 19 | 2,0 | 0 | Pos | 0 | Pos | RP | 0 | 0 | 0 | 0 | RC | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 7,8 | 0 | 0 | 0 | 0 | RC | 0 | 0 | Pos | 0 | RC | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 9,8 | Pos | 0 | Pos | Pos | NR | 0 | 0 | 0 | Pos | NR | - | - | - | - |
| 22 | 12,0 | Pos | 0 | Pos | Pos | NR | 0 | 0 | 0 | Pos | - | - | - | - | - |

Tabella 2. *Valutazione seriata in termini di andamento clinico e positività anticorpale per singolo paziente.* T12: valutazione ad un anno di distanza dalla diagnosi istologica. T24: valutazione a due anni di distanza dalla diagnosi istologica. Pos: positivo. 0: negativo. -: dato non disponibile. RC: remissione completa (proteinuria < 0,3 g/die). RP: remissione parziale (proteinuria < 3,5 g/die). NR: non responsivo (proteinuria > 3,5 g/die).

| | n | AR | SOD2 | AENO | PLA2r |
|---------------|-----------|-----------|-------------|-------------|--------------|
| RC | | | | | |
| T12 | 5 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| T24 | 7 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Totale | 12 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| RP | | | | | |
| T12 | 10 | 5 | 3 | 0 | 1 |
| T24 | 6 | 3 | 1 | 1 | 1 |
| Totale | 16 | 8 | 4 | 1 | 2 |
| NR | | | | | |
| T12 | 3 | 1 | 1 | 0 | 2 |
| T24 | 3 | 2 | 1 | 0 | 1 |
| Totale | 6 | 3 | 2 | 0 | 3 |

Tabella 3. Riassunto dei dati ordinati per positività anticorpale e outcome ai diversi momenti di valutazione. T12: valutazione ad un anno di distanza dalla diagnosi istologica. T24: valutazione a due anni di distanza dalla diagnosi istologica. RC: remissione completa (proteinuria < 0,3 g/die). RP: remissione parziale (proteinuria < 3,5 g/die). NR: non responsivo (proteinuria > 3,5 g/die). Solo i pazienti con sia disponibilità di dati clinici che titolazione anticorpale per singolo time point sono stati inclusi in questa tabella. Nessun paziente con anticorpi anti-AR o anti-SOD2 circolanti ha raggiunto la remissione completa.

BIBLIOGRAFIA

1. Allegri L. "Le Glomerulonefriti" in: *Medicina Clinica, Basi Biologiche Diagnostica Terapia*. C.G. Edizioni Medico Scientifiche, 2004.
2. Taal MW, Brenner BM, Rector FC. *Brenner & Rector's the kidney*. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2012.
3. Floege J, Johnson RJ, Feehally J. *Comprehensive clinical nephrology*. 4th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2010.
4. Geary DF, Schaefer F. *Comprehensive pediatric nephrology*. Philadelphia, PA: Mosby/Elsevier; 2008.
5. Adler S, Baker PJ, Pritzl P, Couser WG. Detection of terminal complement components in experimental immune glomerular injury. *Kidney Int*. 1984; 26(6): 830-7.
6. Glasscock RJ. Human idiopathic membranous nephropathy--a mystery solved? *N Engl J Med*. 2009; 361(1): 81-3.
7. Nangaku M, Shankland SJ, Couser WG. Cellular response to injury in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16(5): 1195-204.
8. Kerjaschki D. Pathomechanisms and molecular basis of membranous glomerulopathy. *Lancet*. 2004; 364(9441): 1194-6.
9. Heymann W, Hackel DB, Harwood S, Wilson SG, Hunter JL. Production of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvants and rat kidney suspensions. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)*. 1959; 100(4): 660-4.
10. Beck LH, Jr., Salant DJ. Membranous nephropathy: recent travels and new roads ahead. *Kidney Int*. 2010; 77(9): 765-70.
11. Ronco P, Debiec H. Target antigens and nephritogenic antibodies in membranous nephropathy: of rats and men. *Semin Immunopathol*. 2007; 29(4): 445-58.
12. Cybulsky AV, Quigg RJ, Salant DJ. Experimental membranous nephropathy redux. *American journal of physiology*. 2005; 289(4): F660-71.
13. Kerjaschki D, Farquhar MG. The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982; 79(18): 5557-61.

14. Saito A, Pietromonaco S, Loo AK, Farquhar MG. Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(21): 9725-9.
15. Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3(4): 256-66.
16. Farquhar MG, Saito A, Kerjaschki D, Orlando RA. The Heymann nephritis antigenic complex: megalin (gp330) and RAP. *J Am Soc Nephrol*. 1995; 6(1): 35-47.
17. Ronco P, Allegri L, Brianti E, Chatelet F, Van Leer EH, Verroust P. Antigenic targets in epimembranous glomerulonephritis. Experimental data and potential application in human pathology. *Appl Pathol*. 1989; 7(2): 85-98.
18. Allegri L. Antigens in experimental models of membranous nephropathy: are they involved in human disease? *Nephrol Dial Transplant*. 1997; 12(9): 1801-4.
19. Allegri L, Celendo MT, Savazzi G, Garini G, Carnevali ML. [Etiopathogenesis of membranous nephropathy: is there a correlation between experimental and human pathology?]. *Ann Ital Med Int*. 1989; 4(4): 386-95.
20. Allegri L, Celendo MT, Ferrari C, Savazzi G, Ronco P, Verroust P. Role of a 90-kD glycoprotein in Heymann's nephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 1990; 5 Suppl 1: 60-2.
21. Ronco P, Debiec H. Podocyte antigens and glomerular disease. *Nephron Exp Nephrol*. 2007; 107(2): e41-6.
22. Assmann KJ, van Son JP, Dijkman HB, Koene RA. A nephritogenic rat monoclonal antibody to mouse aminopeptidase A. Induction of massive albuminuria after a single intravenous injection. *J Exp Med*. 1992; 175(3): 623-35.
23. Murtas C, Ravani P, Ghiggeri GM. New insights into membranous glomerulonephritis: from bench to bedside. *Nephrol Dial Transplant*. 2011; 26(8): 2428-30.
24. Glasscock RJ. The pathogenesis of idiopathic membranous nephropathy: a 50-year odyssey. *Am J Kidney Dis*. 2010; 56(1): 157-67.
25. Debiec H, Guignonis V, Mougnot B, Decobert F, Haymann JP, Bensman A, et al. Antenatal membranous glomerulonephritis due to anti-neutral endopeptidase antibodies. *N Engl J Med*. 2002; 346(26): 2053-60.
26. Murtas C, Bruschi M, Candiano G, Moroni G, Magistrini R, Magnano A, et al. Coexistence of different circulating anti-podocyte antibodies in membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012; 7(9): 1394-400.

27. Beck LH, Jr., Bonegio RG, Lambeau G, Beck DM, Powell DW, Cummins TD, et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med.* 2009; 361(1): 11-21.
28. Murtas C, Bruschi M, Carnevali ML, Petretto A, Corradini E, Prunotto M, et al. In vivo characterization of renal auto-antigens involved in human auto-immune diseases: the case of membranous glomerulonephritis. *Proteomics Clin Appl.* 2011; 5(1-2): 90-7.
29. Prunotto M, Carnevali ML, Candiano G, Murtas C, Bruschi M, Corradini E, et al. Autoimmunity in membranous nephropathy targets aldose reductase and SOD2. *J Am Soc Nephrol.* 2010; 21(3): 507-19.
30. Debiec H, Ronco P. PLA2R autoantibodies and PLA2R glomerular deposits in membranous nephropathy. *N Engl J Med.* 2011; 364(7): 689-90.
31. Qin W, Beck LH, Jr., Zeng C, Chen Z, Li S, Zuo K, et al. Anti-phospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2011; 22(6): 1137-43.
32. Hoxha E, Kneissler U, Stege G, Zahner G, Thiele I, Panzer U, et al. Enhanced expression of the M-type phospholipase A2 receptor in glomeruli correlates with serum receptor antibodies in primary membranous nephropathy. *Kidney Int.* 2012; 82(7): 797-804.
33. Hoxha E, Harendza S, Zahner G, Panzer U, Steinmetz O, Fechner K, et al. An immunofluorescence test for phospholipase-A(2)-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2011; 26(8): 2526-32.
34. Hofstra JM, Debiec H, Short CD, Pelle T, Kleta R, Mathieson PW, et al. Antiphospholipase A2 receptor antibody titer and subclass in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2012; 23(10): 1735-43.
35. Chakera A, Lasserson D, Beck LH, Jr., Roberts IS, Winearls CG. Membranous nephropathy after use of UK-manufactured skin creams containing mercury. *QJM.* 2011; 104(10): 893-6.
36. Fervenza FC, Downer G, Beck LH, Jr., Sethi S. IgG4-related tubulointerstitial nephritis with membranous nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 2011; 58(2): 320-4.
37. Gunnarsson I, Schlumberger W, Ronnelid J. Antibodies to M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) and membranous lupus nephritis. *Am J Kidney Dis.* 2012; 59(4): 585-6.
38. Knehtl M, Debiec H, Kamgang P, Callard P, Cadranel J, Ronco P, et al. A case of phospholipase A(2) receptor-positive membranous nephropathy preceding sarcoid-

associated granulomatous tubulointerstitial nephritis. *Am J Kidney Dis.* 2011; 57(1): 140-3.

39. Bruschi M, Carnevali ML, Murtas C, Candiano G, Petretto A, Prunotto M, et al. Direct characterization of target podocyte antigens and auto-antibodies in human membranous glomerulonephritis: Alfa-enolase and borderline antigens. *J Proteomics.* 2011; 74(10): 2008-17.

40. Murtas C, Allegri L, Ghiggeri GM. Circulating antipodocyte antibodies in membranous nephropathy: new findings. *Am J Kidney Dis.* 2013; 62(1): 12-5.

41. Ronco P, Debiec H, Imai H. Circulating antipodocyte antibodies in membranous nephropathy: pathophysiological and clinical relevance. *Am J Kidney Dis.* 2013; 62(1): 16-9.

42. Pratesi F, Moscato S, Sabbatini A, Chimenti D, Bombardieri S, Migliorini P. Autoantibodies specific for alpha-enolase in systemic autoimmune disorders. *J Rheumatol.* 2000; 27(1): 109-15.

43. Terrier B, Degand N, Guilpain P, Servettaz A, Guillevin L, Mouthon L. Alpha-enolase: a target of antibodies in infectious and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2007; 6(3): 176-82.

44. Herrmann SM, Sethi S, Fervenza FC. Membranous nephropathy: the start of a paradigm shift. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2012; 21(2): 203-10.

45. Beck LH, Jr., Fervenza FC, Beck DM, Bonegio RG, Malik FA, Erickson SB, et al. Rituximab-induced depletion of anti-PLA2R autoantibodies predicts response in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2011; 22(8): 1543-50.

46. Hofstra JM, Beck LH, Jr., Beck DM, Wetzels JF, Salant DJ. Anti-phospholipase A(2) receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011; 6(6): 1286-91.

47. Michel PA, Dahan K, Ancel PY, Plaisier E, Mojaat R, De Seigneux S, et al. Rituximab treatment for membranous nephropathy: a French clinical and serological retrospective study of 28 patients. *Nephron Extra.* 2011; 1(1): 251-61.

48. Ponticelli C, Zucchelli P, Imbasciati E, Cagnoli L, Pozzi C, Passerini P, et al. Controlled trial of methylprednisolone and chlorambucil in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med.* 1984; 310(15): 946-50.

49. Waldman M, Austin HA, 3rd. Treatment of idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2012; 23(10): 1617-30.

50. Makker SP, Tramontano A. Idiopathic membranous nephropathy: an autoimmune disease. *Semin Nephrol.* 2011; 31(4): 333-40.

51. Oh YJ, Yang SH, Kim DK, Kang SW, Kim YS. Autoantibodies against phospholipase A2 receptor in Korean patients with membranous nephropathy. *PLoS One*. 2013; 8(4): e62151.
52. Svobodova B, Honsova E, Ronco P, Tesar V, Debiec H. Kidney biopsy is a sensitive tool for retrospective diagnosis of PLA2R-related membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2013; 28(7): 1839-44.
53. Timmermans SA, Ayalon R, van Paassen P, Beck LH, Jr., van Rie H, Wirtz JJ, et al. Anti-phospholipase A2 receptor antibodies and malignancy in membranous nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 2013; 62(6): 1223-5.
54. Cravedi P, Abbate M, Gagliardini E, Galbusera M, Buelli S, Sabadini E, et al. Membranous nephropathy associated with IgG4-related disease. *Am J Kidney Dis*. 2011; 58(2): 272-5.
55. Kanigicherla D, Gummadova J, McKenzie EA, Roberts SA, Harris S, Nikam M, et al. Anti-PLA2R antibodies measured by ELISA predict long-term outcome in a prevalent population of patients with idiopathic membranous nephropathy. *Kidney Int*. 2013; 83(5): 940-8.

RINGRAZIAMENTI

- Questa tesi di dottorato la dedico, spudoratamente, a me stesso. Nel lontano settembre 1986, in una cittadina dell'ovest della Sardegna, come piccolo bambino iniziavo l'avventura nel sistema educativo. Ora, cresciuto e arrivato al gradino più alto dell'istruzione italiana dopo aver studiato e lavorato in diverse città del Paese, posso finalmente dire a Mamma e Papà: "Ho finito di fare i compiti!".
- Un ringraziamento speciale a mia moglie Claudia, che mi ha aiutato e sostenuto pazientemente, rubando a se stessa ed ai suoi impegni di studio, di lavoro e familiari tempo prezioso da regalarmi e dedicarmi.
- E' forse scontato, ma dovuto, ringraziare tutte le persone che hanno contribuito alla realizzazione del lavoro presentato in questa tesi e di tutti i lavori scientifici che ho avuto la fortuna di pubblicare. La ricerca è collaborazione e condivisione, ed io non sono stato altro che un piccolo ingranaggio di una grande e volenterosa organizzazione.
- Grazie di cuore al Professor Landino Allegri: il "mio professore", che mi ha accompagnato in tutto il percorso universitario. Il sistema educativo è articolato in modo tale che il discente abbia tante autorevoli figure cui riferirsi e da cui trarre il meglio. Tuttavia, è evidente che chi mi ha fatto appassionare ed inserito nel mondo della ricerca, chi mi insegnato il rigore nella professionalità medica e chi mi ha trasmesso metodo nell'analisi scientifica ha avuto un ruolo fondamentale ed insostituibile nella mia formazione accademica.