

Meccanismi patogenetici della proteinuria glomerulare

M. Carraro¹, C. Zennaro^{1,2}

¹Dipartimento di Medicina Clinica e Neurologia, Scuola di Specializzazione in Nefrologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi, Trieste

²Renal Child Foudation, Genova

The pathogenetical mechanisms of glomerular proteinuria

Although the pathologic mechanisms responsible for glomerular proteinuria have not been completely clarified, yet, it has become evident that structural and functional abnormalities of podocytes play an early and important role. These data come from recent studies analyzing podocyte behaviour in cell culture, in-depth clinical researches, the application of survey techniques on isolated glomeruli, proteomic studies on particular aspects of circulating factors. For most glomerulopathies, whether primary or secondary, podocytes are often the first target for many pathogenetic mechanisms, which, unexpectedly, have the common characteristic of inducing tropism in podocytes. Hopefully, advances in glomerular podocyte research will better define clinical diseases, which we now classify according to a static description of the histological damage, thus perhaps mistaking causes and effects. (G Ital Nefrol 2006; 23: 459-70)

KEY WORDS: Proteinuria, Glomerular filtration barrier, Podocytes, Nephrotic syndrome

PAROLE CHIAVE: Proteinuria, Barriera di filtrazione glomerulare, Podocita, Sindrome nefrosica

Introduzione

È evidenza ben consolidata, ormai da molti anni, che la presenza e la persistenza di una significativa proteinuria sia tra i maggiori fattori predittivi di progressione dell'insufficienza renale verso l'uremia (1). È altrettanto ben noto come alla base di una rilevante proteinuria vi sia un'alterazione della barriera di filtrazione glomerulare, complessa e singolare struttura, il cui compito è quello di assicurare il costante fluire di acqua e microsoluti a formare la preurina trattenendo, all'interno del lume capillare, le macromolecole. Mentre la sua struttura e la sua funzione sono ben noti da tempo e numerosi sono i lavori scientifici dedicati a comprendere i meccanismi fisiopatologici delle sue alterazioni presenti sia in nefropatie primitive che secondarie, a tutt'oggi siamo ancora lontani dal possedere prove definitive sia sui diversi meccanismi di danno che sul distinto ruolo giocato, nei diversi quadri clinici caratterizzati da proteinuria glomerulare, dai vari componenti cellulari della barriera di filtrazione glomerulare. Per lungo tempo si è ritenuto che il maggior controllo al passaggio delle macromolecole proteiche nello spazio urinario fosse esercitato

dalla membrana basale glomerulare, ma, a partire dagli anni '90, questo ruolo di primo attore sembra essere stato acquisito dal podocita. Questa singolare cellula epiteliale, altamente specializzata, possiede molteplici attività intimamente correlate tra loro: la sua funzione di pericita, nel controllo delle elevate forze di distensione presenti sulla parete del capillare, accompagna la funzione di controllo della permeabilità alle proteine, esercitata da particolari strutture di filtro sottese tra contigui processi pedicellari, assieme ad un'attività di continua "pulizia" del filtro glomerulare, attuata con processi non ancora ben definiti, ed infine la funzione di sintesi e di controllo dei componenti della membrana basale glomerulare e della struttura endoteliale, attuata attraverso la sintesi di mediatori specifici (2). Pur tenendo a mente la presenza, nella struttura di filtrazione glomerulare, dell'endotelio e della membrana basale glomerulare, con cui per altro ha un costante rapporto di tipo dinamico, esistono molteplici conferme che delineano come il podocita sia il vero protagonista nella fisiopatologia della proteinuria glomerulare, sia nelle prime fasi dell'evento che nei successivi momenti di evoluzione e progressione del danno al parenchima renale.

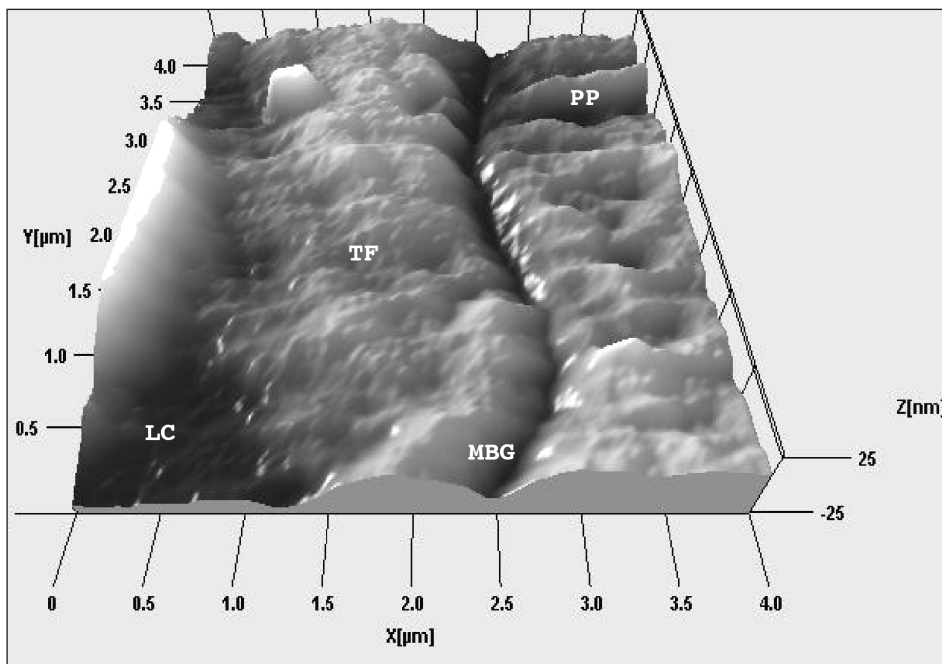


Fig 1 - Immagine topografica (scansione $4\mu\text{m}\times 4\mu\text{m}$) della barriera di filtrazione glomerulare da sezione semifine di preparato istologico di rene di ratto analizzata con tecnica microscopia a sonda (SNOM-Scanning near field optical microscopy modello TriA-SNOM A.P.E. Research). PP processi pedicellari; MBG membrana basale glomerulare; LC lume capillare; TF tappo filamentoso a livello endoteliale (dati in pubblicazione).

Nell'ambito di questa rassegna si è voluto descrivere il coinvolgimento della cellula podocitaria durante le prime fasi dell'insorgenza di alcune fra le più comuni patologie ad interesse glomerulare per evidenziare come in nefropatie che appaiono distinte sia per danno istologico sia per storia clinica, il podocita sembra essere sempre il primo bersaglio dell'insulto patogenetico.

La struttura filtrante glomerulare

La barriera di filtrazione glomerulare è una struttura complessa che si compone di tre strati: l'endotelio fenestrato, la membrana basale glomerulare e le cellule epiteliali viscerali, i podociti, dotati di fini digitazioni, i processi pedicellari, che si interconnettono attraverso strutture proteiche extracellulari: gli *slit diaphragms*. La sua funzione è quella di filtro molecolare consentendo il libero passaggio d'acqua e di piccole molecole e trattenendo all'interno del lume capillare le macromolecole proteiche.

Il controllo del passaggio delle macromolecole, attraverso il filtro glomerulare, ed in particolare il ruolo giocato in questa azione dai vari elementi della barriera di filtrazione, rimane ancora motivo di controversia così come non appare del tutto chiarito il rapporto selettività per carica elettrica, per taglia e forma delle macromolecole proteiche. In linea generale appare in ogni caso verosimile ritenere che, almeno per i quadri di evidente proteinuria glomerulare, il danno sia maggiormente correlabile ad alterazioni della selettività per dimensione delle proteine che è dimostrato associarsi sempre ad alterazioni a livello del podocita (2).

La cellula endoteliale

A livello glomerulare le cellule endoteliali presentano fenestrazioni con diametro da 70 a 100 nm, distribuite regolarmente, ma che non sembrano possedere diaframmi in grado di costituire una significativa barriera per le macromolecole (3) anche se recentemente è stata descritta la presenza, sul versante luminale dalla barriera endoteliale, di un "tappo filamentoso" (Fig. 1), con carica elettrica negativa e dello spessore di 90 nm, in grado di esercitare un primo ruolo di barriera (4). È interessante ricordare come recenti contributi dimostrino che mediatori, quali i fattori di crescita endoteliale (VEGF) e le angiopoietina (Ang), prodotti dai podociti, controllino in maniera significativa lo sviluppo dell'endotelio, l'integrità delle sue fenestrazioni e la sua funzione (5).

La membrana basale glomerulare

La membrana basale glomerulare è una componente acellulare, con uno spessore di 300-350 nm, che provvede ad un supporto strutturale della parete del capillare glomerulare. I suoi maggiori componenti sono un'isoforma della laminina, il collagene di tipo IV e vari proteoglicani, quali l'eparansolfato, l'agrina ed il perlecano. Per molti anni è stata considerata, per la sua caratteristica struttura e per l'espressione netta di carica elettrica negativa, la struttura glomerulare che offriva la maggior resistenza al passaggio dell'albumina e delle proteine ad alto peso molecolare. Le proprietà di *cross-linking* delle molecole di collagene provvedono a dare alla membrana basale le sue caratteristiche peculiari di elasticità ma veromil-

mente non contribuiscono alle proprietà di permselectività della barriera di filtrazione glomerulare. I maggiori componenti della membrana basale glomerulare vengono sintetizzati a livello del podocita e conseguentemente anomalie delle cellule viscerali si riflettono in un'alterazione delle struttura della membrana basale stessa (6).

Il podocita

Il podocita è una cellula epiteliale altamente specializzata e differenziata con un fenotipo normalmente quiescente. La cellula si compone di un corpo cellulare che protrude verso lo spazio urinario: nella struttura del corpo cellulare sono presenti il nucleo, l'apparato del Golgi, ed altri organelli citoplasmatici quali il reticolo endoplasmatico ed i mitocondri. Dal corpo cellulare si dipartono lunghi processi primari che terminano con digitazioni secondarie denominate processi pedicellari. I processi pedicellari sono ancorati alla membrana basale sottostante attraverso le integrine ed i distroglicani e tale meccanismo permette alla cellula di ancorarsi al "tuffi" capillare.

I processi pedicellari di podociti adiacenti si connettono attraverso delle *gap junction* altamente specializzate che vengono chiamati *slit diaphragms* (SD): quest'ultimi formano la maggior barriera per dimensione contro la fuoriuscita delle proteine dal lume capillare (7) facendo quindi del podocita il maggior protagonista nei meccanismi di controllo della filtrazione glomerulare alle macromolecole plasmatiche.

Il podocita è strutturalmente una cellula polarizzata: si possono riconoscere, in base alla diversa espressione di proteine di membrana, un dominio apicale, uno basale ed uno giunzionale che sono in contatto tra di loro direttamente o attraverso una complessa struttura citoscheletrica con la quale il podocita è in grado di modificare dinamicamente la propria forma ed allo stesso tempo mantenere staticamente la sua funzione. Il dominio giunzionale comprende le proteine del diaframma di filtrazione. La proteina cardine della struttura del SD è la nefrina, caratterizzata da un lungo dominio extracellulare che prende contatto con la molecola omologa del podocita adiacente e da un piccolo dominio intracellulare. Accanto al suo ruolo principale nel controllo del passaggio delle proteine, è in grado di iniziare, mediante la fosforilazione del dominio citoplasmatico, una cascata di segnali intracellulari in grado di promuovere un effetto antiapoptotico: controlla pertanto da un lato la filtrazione delle macromolecole e dall'altro promuove segnali intracellulari (8). La coda citoplasmatica della nefrina prende contatto con la podocina, proteina presente del *raft* lipidico della membrana cellulare, e con la CD2AP, proteina che si complessa con i filamenti di actina del citoscheletro.

Recenti studi dimostrano la presenza, in questo complesso di altre proteine quali Neph1, 2 e 3, FAT1 e 2, ZO-

1 e densina: tale struttura è quindi in contatto da una parte con la struttura citoscheletrica cellulare e dall'altra con un omologa struttura del pedicello adiacente. Dall'interazione tra due molecole di nefrina di due podociti adiacenti si forma lo SD, una struttura a cerniera, in grado di impedire il passaggio proteico attraverso meccanismi d'impedimento dimensionale, agendo come un setaccio molecolare (7).

Il dominio di membrana apicale dei podociti è carico negativamente, fenomeno dovuto alla presenza sulla superficie di proteine anioniche quali la podocalycsina, la podoplanina e la podoendina. Sembra che l'alta carica negativa possa rappresentare un meccanismo di blocco al passaggio delle molecole di albumina (anch'esse di carica negativa) e potrebbe coadiuvare il mantenimento degli spazi tra due corpi cellulari adiacenti (7).

Il dominio basale è coinvolto nell'ancoraggio della struttura alla membrana basale sottostante: molecole di $\alpha_3\beta_1$ integrina ed il complesso del distroglicano hanno la funzione, attraverso il contatto con le rispettive strutture della membrana basale, di mantenere l'intimo contatto tra cellula e membrana stessa (7).

Il contributo della genetica nella comprensione della struttura e del ruolo del podocita

Un contributo importante del ruolo predominante della cellula podocitaria nel mantenimento dell'integrità della struttura glomerulare, è stato dato dalle numerose ricerche che hanno dimostrato come una malformazione genica, che interessa geni che codificano per proteine podocitarie, sia riconosciuta nella maggior parte di gravi proteinurie glomerulari. Nell'ambito degli altri componenti della barriera di filtrazione glomerulare è stata descritta una sola alterazione a carico della membrana basale glomerulare, mutazione che interessa il gene codificante per la catena β_2 della laminina (9), e non sembrano essere state descritte mutazioni che portano ad alterazioni a livello dell'endotelio.

Tra le sindromi nefrosiche che compaiono unicamente per una mutazione genica è conosciuta la sindrome nefrosica di tipo finnico (CNF o NPHS1) (10). La nefrina è stata la prima proteina identificata come fondamentale componente strutturale dello SD e si ritrova espressa a livello renale unicamente nelle cellule podocitarie (11). Nella patologia finnica esiste la totale assenza di espressione di tale proteina, con conseguente assenza di SD a livello dei processi pedicellari: si assiste ad una proteinuria copiosa intrauterina, con nascita prematura a cui segue uno sviluppo di sindrome nefrosica subito dopo la nascita.

Ben 70 differenti mutazioni a carico del gene che codifica per la nefrina sono state descritte nei pazienti affetti da sindrome nefrosica (3) che possono portare, oltre ad un'alterazione strutturale della proteina, anche ad una modifica-

zione delle interazioni che intercorrono tra nefrina e le altre proteine podocitari.

Mutazioni sono state riscontrate anche a carico del gene per la podocina. Nel topo *knock-out* si osserva, alla nascita, una severa proteinuria e la morte dopo pochi giorni; si dimostra quindi l'importanza di questa proteina transmembrana nel controllo della permeabilità glomerulare (12). Le alterazioni a carico del gene della podocina portano a forme di sindrome nefrosica congenita cortico-resistente identificata con l'acronimo NPHS2. Sono state descritte differenti mutazioni del gene e gli autori ipotizzarono come tali mutazioni potessero ritrovarsi anche in casi sporadici di sindrome nefrosica idiopatica steroide-resistente: consigliavano quindi di dare importanza ad una determinazione genetica nell'evidenziare d'un lato l'inutilità della terapia immunosoppressiva, in questi pazienti, e dall'altro nel confermare l'assenza, nei pazienti portatori di tale mutazione, di una recidiva di malattia dopo trapianto (13). In un lavoro più recente altri autori dimostrarono in pazienti con Glomerulosclerosi focale e segmentale ritenuta idiopatica, la presenza di mutazioni per il gene della podocina (NPHS2); la mutazione genica descritta era però accompagnata da un'alta attività, nel siero di pazienti, di un fattore capace di alterare la permeabilità glomerulare *in vitro*: due dei pazienti, giunti ad uremia terminale e trapiantati, dimostrarono recidiva di malattia responsiva al trattamento con plasmaferesi e con ciclofosfamide (14). Il lavoro suggeriva quindi che, a scatenare la malattia, non fosse sufficiente la sola alterazione genica.

Per quanto riguarda un'altra proteina podocitaria la CD2AP studi su topi *knock-out* per tale proteina dimostrano una mortalità alla sesta settimana di vita, mentre topi eterozigoti per tale gene presentano un accumulo di immunoglobuline a livello della membrana basale glomerulare. Da tali studi sembra che CD2AP sia coinvolta in meccanismi di endocitosi a livello della membrana plasmatica ed alterazioni geniche di tale proteina potrebbero essere coinvolte in un'alterata *clearance* podocitaria di proteine plasmatiche per un difetto di processi di endocitosi (15). Sono stati segnalati due pazienti con FSGS idiopatica in cui è stata riscontrata una mutazione in un solo allele cromosomico per quanto attiene il gene del CD2AP ed è stato quindi ipotizzato come un'alterazione di questo tipo possa svolgere un ruolo nell'aumentare la suscettibilità a sviluppare una nefropatia glomerulare.

Nel 1990 Schnabel et al. (16) evidenziarono l'espressione nel podocita di ZO-1 proteina ben nota quale componente delle *tight* e delle *adherens junctions* dimostrando un'interessante similitudine tra diversi sistemi di contatto intercellulare. Nel podocita questa proteina si localizza nel citoplasma in prossimità degli SD ove pare giocare un ruolo significativo nel collegare questa struttura con il citoscheletro della cellula ed in particolare con l'actina. In un modello animale di glomerulosclerosi (ratti MWF), Macconi et al. (17) dimostrarono come vi fosse una redistribu-

zione cellulare delle molecole di ZO-1 e come tale alterazione e la proteinuria negli animali venissero corrette dalla somministrazione di un'ACE-inibitore. Del tutto recentemente lo stesso gruppo ha dimostrato sperimentalmente come la dislocazione di ZO-1 e la riorganizzazione delle fibrille di F-actina siano legate all'azione sul podocita di infusione di Angiotensina II (18).

Test di verifica

1) Quale dei seguenti meccanismi è maggiormente responsabile della proteinuria glomerulare:

- Alterazione della permeabilità per carica elettrica delle proteine
- Alterazione della permeabilità per dimensione delle proteine
- Aumento della velocità del flusso intracapillare
- Riduzione della velocità del flusso intracapillare
- Volume glomerulare

2) Lo "slit diaphragm" è:

- Una struttura della cellula endoteliale
- Una struttura costituita da nefrina che connette i pedicelli adiacenti di diversi podociti
- Una struttura costituita, da più proteine che connettono due pedicelli adiacenti, che controlla la filtrazione delle proteine a peso molecolare eguale o superiore all'albumina
- Un costituente della membrana basale apicale
- Il sistema di contatto tra podocita e membrana basale glomerulare

3) Tra le nefropatie proteinuriche indotta da alterazioni geniche sono state descritte:

- Alterazioni della struttura endoteliale, della membrana basale glomerulare e del podocita
- Alterazioni della struttura endoteliale
- Solo alterazioni a carico del podocita
- Quasi solamente a carico della cellula podocitaria ed un'unica alterazione a carico della struttura della membrana basale glomerulare
- Alterazione solamente nell'espressione di nefrina e podocita.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet www.sin-italy.org/gin e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

Il coinvolgimento del podocita nelle più frequenti nefropatie glomerulari

Un'alterazione funzionale e strutturale del podocita è ben riconosciuta essere alla base di nefropatie proteinuriche, spesso con quadro clinico di sindrome nefrosica, tanto che

tali quadri possono essere denominati podocitopatie: questi sono i quadri della glomerulonefrite a lesioni minime (MCD) e della Glomerulosclerosi focale e segmentale (FSGS). Esistono però consistenti prove sperimentali e cliniche che fanno ritenere che una primitiva alterazione podocitaria possa essere alla base di molte altre nefropatie proteinuriche sia primitive che secondarie. Tratteremo di seguito il ruolo delle alterazioni podocitarie nelle forme più comuni di patologia glomerulare proteinurica.

Nefropatie primitive Glomerulopatia a lesioni minime

La glomerulopatia a lesioni minime (MCD) è il quadro istologico che più frequentemente si osserva associarsi al quadro clinico di sindrome nefrosica in età pediatrica. Esso si caratterizza dal punto di vista clinico per una tipica pronta risposta alla terapia steroidea. Non vi è dubbio che, in questa nefropatia, la cellula glomerulare bersaglio del danno e responsabile della comparsa di copiosa proteinuria, sia il podocita e ciò è perfettamente dimostrato dall'evidenza che l'unica alterazione strutturale a carico della struttura filtrante glomerulare sia un *effacement* del podocita con scomparsa delle fitta trama pedicellare. Nonostante negli ultimi 30 anni le ricerche, volte a chiarire il *primum movens* fisiopatologico di questa patologia, siano state molte a tutt'oggi il problema appare ben lungi dall'essere chiarito. Un dato consolidato appare essere il coinvolgimento dei linfociti *T-helper* con una risposta immune di tipo 2 (modulata in prevalenza da IL4 e IL13) (19). Alcune evidenze sperimentali dimostrano un collegamento tra questo tipo di risposta immune ed i podociti: l'infusione di IL4 è in grado di danneggiare il sistema di contatto transcellulare senza alterare la vitalità dei podociti (20), i podociti umani esprimono recettori per IL4 e IL13 (21) e le zone inoltre in cui si osserva l'*effacement* dei podociti dimostrano una riduzione nell'espressione di nefrina, quadro reversibile nella fase di remissione clinica della sindrome nefrosica (22). Si è ipotizzato che tale danno reversibile a livello del podocita possa essere causato dall'interazione con un fattore solubile, quale una chemochina od una linfocina, che potrebbe riconoscere particolari recettori a livello della membrana podocitaria (23): la cellula potrebbe rispondere all'attivazione con un'alterazione strutturale che potrebbe scomparire una volta che il fattore solubile sia scomparso dal circolo. Infatti, la nostra esperienza ci induce a credere che, nel caso di MCD, la presenza di un eventuale fattore permeabilizzante in circolo sia di breve durata e solo nelle primissime fasi della malattia, prima dell'evidente quadro di sindrome nefrosica. Impiegando il *test* della permeabilità glomerulare all'albumina (vedi paragrafo successivo) nei casi di MCD non è stata mai dimostrata una risposta positiva al *test*: in sindrome nefrosica conclamata il fattore di permeabilità scomparirebbe dal siero del paziente affetto da MCD.

Glomerulosclerosi focale e segmentale

Non esiste forse miglior esempio di alterazione istopatologica, quale la Glomerulosclerosi focale e segmentale (FSGS), a dimostrare come quanto osserviamo alla biopsia renale non esprima di per sé una malattia ma un evento abbastanza tardivo che può derivare da diversi momenti patogenetici. La diagnosi istologica apparirebbe quindi come un grande "contenitore" comune di diverse malattie spesso non ben chiarite dal punto di vista fisiopatologico. Tralasciando per ora i quadri di FSGS da riduzione relativa o assoluta della massa nefrosica in cui i meccanismi di danno sembrano *in primis* risiedere in un aumento della pressione intraglomerulare, tratteremo di seguito quei quadri di FSGS che sono caratterizzati, dal punto di vista clinico da sindrome nefrosica steroideo-resistente e con frequente recidiva di malattia post-trapianto. Quest'ultimo aspetto, oltre a stimolare rilevanti considerazioni fisiopatologiche, ha sicuramente un significativo impatto clinico se consideriamo come la recidiva di patologia, per solito precoce, si osservi all'incirca nel 30% dei pazienti uremici per FSGS e che essa condizioni pesantemente la sopravvivenza del *graft*.

Dal punto di vista fisiopatologico la presenza di un alto tasso di recidiva, la remissione della recidiva di malattia dopo trattamenti di plasmateresi ed immunoadsorbimento (purtroppo osservazioni su pochi casi), la segnalazione di assenza di malattia in rene FSGS trapiantato in paziente non FSGS e la presenza di proteinuria e sindrome nefrosica temporanea in neonato da madre FSGS, ha fatto ritenere verosimile la presenza di un fattore umorale in grado di danneggiare irreversibilmente la cellula bersaglio della FSGS: il podocita. Un sistema indiretto di valutazione della presenza di un ipotetico fattore umorale è stato proposto negli anni '90 da Virginia Savin ed in seguito applicato anche da altri ricercatori. Dal punto di vista clinico tale indagine denominata Palb (studio della Permeabilità glomerulare all'albumina), ha dimostrato un suo ruolo sia nel predire quali tra i pazienti con FSGS, candidati a trapianto, avessero maggior probabilità di sviluppare recidiva di malattia (24, 25), che nell'evidenziare l'efficacia del trattamento plasmateretico (14). Dal punto di vista sperimentale il test è stato impiegato con l'intento di individuare e caratterizzare l'ipotetico singolo fattore responsabile del caratteristico quadro clinico della FSGS. Dantal et al. (67) suggerirono che tale fattore potesse essere legato ad un'immunoglobulina ma non essere di per sé un'immunoglobulina. Sharma et al. (68) descrissero un candidato con un peso molecolare attorno ai 30-50 kDa ma escludevano che avesse proprietà proteasiche (69). In questi studi gli Autori sono sempre partiti dal presupposto che il meccanismo di alterazione sierico implicato nell'insorgenza della FSGS e nei meccanismi di recidiva post-trapianto, fosse da attribuire ad un unico fattore la cui presenza era evidenziabile tramite il *test* Palb: questo ha portato ad identificare l'indagine come indiretta informazione della presenza

di tale fattore denominato fattore di permeabilità o PF specifico per tale patologia.

Ad oggi invece possiamo affermare che a determinare la patogenesi della Glomerulosclerosi Focale e Segmentale partecipano diversi meccanismi, a livello sierico, che portano alla liberazione e/o attivazione di fattori circolanti di permeabilità in grado di alterare la barriera di filtrazione glomerulare una volta giunti a contatto con la struttura del glomerulo. La cellula bersaglio dei fattori di permeabilità è nuovamente il podocita: il siero dei pazienti affetti da FSGS, che hanno dimostrato la capacità di alterare la permeabilità glomerulare *in vitro* (Palb), sono in grado di modificare l'espressione della nefrina e della podocita in colture di podociti umani (27).

Nei meccanismi di alterazione della permeabilità glomerulare all'albumina sono risultate coinvolte alcune proteine plasmatiche (26): proteine come l'albumina ma anche la clusterina hanno a livello circolante molteplici funzioni. La loro identificazione, come proteine in grado di alterare *in vitro* la permeabilità glomerulare all'albumina, sembra indicare un loro ipotetico ruolo *carriers* dei fattori di permeabilità. Recentemente si è dimostrato come l'albumina sierica, dei pazienti caratterizzati da una FSGS in fase attiva, presenti delle specifiche variazioni di mobilità probabilmente correlate con variazioni della carica positiva in specifici residui amminici (70): l'alterazione dell'albumina potrebbe associarsi ad un'attivazione/liberazione dei fattori di permeabilità mediante un'attività proteasica anomala presente nel siero dei pazienti (71).

Al quadro che viene delineato vanno aggiunte le evidenze che dimostrano l'esistenza di alcuni fattori inibitori nel siero dei soggetti normali (28) ma che sembrano essere ipoespresse in pazienti affetti da FSGS. In corso di proteinuria inoltre si assiste ad una perdita di fattori protettivi attraverso le urine e questo porta ad ipotizzare che lo stato di malattia venga determinato da uno sbilanciamento nell'equilibrio, fisiologicamente mantenuto tra fattori permeabilizzanti, trasportatori plasmatici e fattori inibenti (29). L'ipotesi che, sostanze normalmente presenti, ipoespresse o perdute con le urine nefrosiche possano cooperare nel mantenere l'integrità del podocita, è stata di recente confermata in podociti umani isolati (30).

Incomincia quindi a delinearsi l'idea che, a scatenare gli eventi coinvolti, a livello sierico, nella patogenesi della FSGS non sia l'esistenza di uno specifico e singolo fattore, ma che esista un'alterazione di un complesso sistema umorale che si potrebbe definire come "il sistema di controllo umorale alla permeabilità glomerulare alle proteine".

Nefropatia membranosa

La nefropatia membranosa (GM) è, come ben noto, la più frequente nefropatia glomerulare dell'età adulta ed è la più frequente causa, nell'adulto e nell'anziano, di sindrome

nefrosica. Si caratterizza, dal punto di vista morfologico, per la presenza di depositi di immunocomplessi sul versante subepiteliale della membrana basale glomerulare e dal punto di vista clinico per la comparsa di significativa proteinuria.

E dimostrato come il bersaglio nella patogenesi della GM sia nuovamente il podocita. L'immunocomplesso si deposita tra la membrana basale ed il podocita escludendo il coinvolgimento di interazioni con le cellule infiammatorie circolanti: è capace di perturbare, attraverso meccanismi dipendenti dal complemento, la struttura podocitaria. Numerosi studi sperimentali ed attente osservazioni cliniche assegnano il ruolo cardine alla porzione terminale della cascata complementare C5b-9. A livello cellulare il complesso si inserisce nel doppio strato lipidico della membrana: mentre nelle cellule non nucleate, quali gli eritrociti, provoca la lisi, nelle cellule nucleate, quali il podocita, viene internalizzato, induce un'attivazione cellulare e successivamente viene estruso nello spazio urinario comparso infine nelle urine. La gravità di malattia in termini di proteinuria, funzione renale e prognosi appare correlata alla presenza urinaria di C5b-9 (31-34).

A livello podocitario numerosi sono i meccanismi di danno del complesso C5b-9 descritti che vanno ben oltre ad una transitoria alterazione a livello della membrana, inducendo nella cellula una risposta attiva al contatto con il complesso (35). Esiste un aumento di produzione di radicali liberi dell'ossigeno (36), molecole in grado di per sé di indurre un'alterazione della permeabilità glomerulare (29, 37, 38); si assiste ad un aumento d'espressione di proteasi che, coadiuvate dalla presenza di radicali liberi, vengono verosimilmente ritenute responsabili del danno a livello della MBG (39). A livello dello SD si dimostra come il C5b-9 sia in grado di provocare una deconnessione fra la nefrina e il citoscheletro con conseguente perdita di espressione della proteina e conseguente comparsa di proteinuria (40-43).

L'ispessimento della membrana basale glomerulare con la formazione degli "spikes", caratteristici della fase 2 della GM e ben evidenti alla microscopia ottica, sono legati essenzialmente alla deposizione di collagene di tipo IV e di laminina prodotte dalla cellula podocitaria: studi *in vitro* su podociti umani in coltura hanno dimostrato come l'incubazione con il C5b-9, porti ad un aumento di produzione di laminina e collagene IV (44).

La nefropatia ad IgA

La nefropatia da depositi di IgA rappresenta la più comune nefropatia in età pediatrica e nei giovani adulti. L'istologia evidenzia dei depositi di IgA a livello mesangiale con comparsa di sclerosi glomerulare ed alterazioni a livello tubulointestiziale. Clinicamente il danno istologico si associa ad un'ematuria con proteinuria di variabile entità.

Il danno a livello podocitario potrebbe essere dato dal complesso C5b-9, formatosi a livello mesangiale, che riesce a raggiungere il podocita mediante il filtrato primario, alterando verosimilmente la struttura citoscheletrica basata sull'actina. L'alterazione strutturale potrebbe non causare la morte cellulare *in situ* ma sarebbe sufficiente per provocare il distacco della cellula podocitaria: è stata dimostrata, infatti, la presenza di un podocitopenia nei pazienti affetti da nefropatia IgA.

Seppur ben evidente un'aumento dell'area mesangiale dovuta a deposizione di matrice ed un aumento della cellularità, è da notare come sia la diminuzione del GFR che la frequenza di sclerosi totale si correlino solamente con la diminuzione del numero dei podociti a livello della barriera di filtrazione glomerulare (45) dimostrando come il ruolo di quest'ultimo nella progressione della patologia sia importante. I podociti rimasti adesi alla membrana basale dimostrano un'alterazione dell'espressione di protoncogeni come Bcl-2. La variazione dell'espressione di Bcl-2 porta da una parte all'apoptosi della cellula podocitaria e dall'altra è in grado di attivare, attraverso mediatori specifici, le cellule mesangiali in quiescenza: l'alterazione podocitaria e la concomitanza proliferazione mesangiale si complessano nella formazione della sclerosi (46).

Test di verifica

1) Nella Glomerulopatia a lesioni minime:

- Non esiste coinvolgimento di tipo immunologico
- Non vi è alterazioni nell'espressione podocitaria di nefrina
- Un precoce momento fisiopatologico appare legato al coinvolgimento dei linfociti *T-helper* con risposta immune di tipo 1
- Il primo momento fisiopatologico appare legato al coinvolgimento del sistema complementare
- Un precoce momento fisiopatologico appare legato al coinvolgimento dei linfociti *T-helper* con risposta immune di tipo 2

2) Nei pazienti con forma "primitiva" di Glomerulosclerosi focale e segmentale che giunti all'uremia subiscono trapianto la probabilità di recidiva di malattia è:

- Rara, tardiva e non si correla con la sopravvivenza del *graft*
- Evento costante così da sconsigliare il trapianto
- Precoce e presente nel 10% dei casi
- Solitamente precoce, presente nel 30% circa dei casi e responsabile di riduzione della sopravvivenza del *graft*
- Osservata nel 50-60% dei casi

3) La glomerulopatia membranosa:

- Esprime una patologia limitata all'alterazione strutturale della membrana basale glomerulare
- Non si caratterizza che tardivamente per alterazione a carico dei podociti
- Non presenta podocitaria

- E legata ad un'alterazione, indotta verosimilmente dal complesso terminale C5b-9 del complemento a livello del podocita
- Presenta podocitura che è dovuta al distacco delle cellule dalla membrana basale glomerulare a causa delle alterazioni strutturali della membrana stessa.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet www.sin-italy.org/gin e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

Nefropatie secondarie

Nefropatia diabetica

Tra i pazienti nefrologici che arrivano all'insufficienza renale cronica i pazienti diabetici rappresentano il numero maggiore. La complicanza renale in corso di diabete si manifesta nei primi stadi con una microalbuminuria: il 41% della popolazione diabetica è caratterizzata da una prevalenza di microalbuminuria che insorge nei primi 5 anni dalla diagnosi (72). Dalla situazione di microalbuminuria, si passa quindi alla comparsa di proteinuria persistente che può trasformarsi in un quadro di franca sindrome nefrosica.

In passato si è ipotizzato come l'alterazione a livello renale in corso di diabete fosse a carico dell'asse mesangiale e della membrana basale glomerulare. Il danno mesangiale, attraverso il deposito di matrice con riduzione della superficie capillare filtrante, responsabile nei meccanismi di progressiva perdita della filtrazione glomerulare e della conseguente progressione dell'insufficienza renale, non sembra essere ad oggi la principale causa della proteinuria. Neppure l'ispessimento della membrana basale glomerulare, con riduzione della concentrazione di proteoglicani con carica negativa, potrebbe essere considerato come meccanismo implicato nelle prime fasi della nefropatia diabetica; tale evento è infatti ben documentabile solo nelle fasi avanzate della nefropatia dopo la comparsa di microalbuminuria (47).

Considerando come l'endotelio fenestrato non sembra essere coinvolto nei meccanismi di alterazione della nefropatia diabetica, è ovvio porre l'attenzione, anche in tale patologia, alla cellula podocitaria. È infatti da molti anni nota un'alterazione strutturale dei podociti in corso di malattia diabetica (48) e più recentemente si è documentata una modificazione (aumento della larghezza) dei processi pedicellari, osservando le strutture glomerulari nelle biopsie dei pazienti microalbuminurici e dimostrando una correlazione diretta significativa tra alterazione dei pedicelli ed "*albumin excretion rate*" (49).

Una perdita di podociti a livello della struttura di filtra-

zione glomerulare, podocitopenia (50), con conseguente perdita a livello urinario (51) è stata riscontrata sia in pazienti diabetici di tipo 1 che di tipo 2 (50): si riscontra un aumento della superficie cellulare dei podociti rimasti adesi, meccanismo dimostrato essere di compensazione nel tentativo di ricoprire la membrana basale rimasta denudata (51). In una popolazione di pazienti con diabete mellito di tipo 2 la podocitopenia si presenta nei soggetti affetti da microalbuminuria e proteinuria manifesta ed è assente nei pazienti normoalbuminurici: il trattamento con ACE-inibitori è in grado di ridurre significativamente la perdita podocitaria (52).

Il danno a livello podocitario è considerabile quindi come l'insulto causale della nefropatia diabetica o solamente un effetto tardivo dell'insorgenza della complicanza renale in corso di diabete? Numerosi recenti contributi sembrano assegnare un ruolo principale al podocita proprio come responsabile dell'inizio della nefropatia diabetica.

Studi su un modello animale di diabete tipo 1 hanno evidenziato come un'alterazione della permeabilità glomerulare all'albumina si osservi già nelle prime giornate dopo l'induzione del diabete e questa alterazione precede l'iperfiltrazione glomerulare, la comparsa di proteinuria e l'ipertrofia glomerulare (53). Studi eseguiti su pazienti con nefropatia diabetica (prevalentemente pazienti con diabete tipo 2) hanno dimostrato una significativa riduzione nell'espressione extracellulare di nefrina ed evidenziato il ruolo di tale alterazione come momento causale della proteinuria (54). Altre proteine collegate al sistema di contatto transpedicellare sono state studiate in modelli animali di diabete tipo 1 e tipo 2: si è dimostrata una precoce riduzione ed una delocalizzazione a livello dei podociti di ZO-1, proteina fondamentale per i meccanismi di giunzione transcellulare ed implicata nell'integrità dello SD (55). L'espressione della podocalyxina, proteina podocitaria del dominio apicale, è virtualmente soppressa dall'incubazione di cellule podocitarie coltivate in alte concentrazioni di glucosio: la sua espressione risulta ridotta nei modelli animali di diabete indotto da streptozotocina (56). Numerosi studi dimostrerebbero un probabile ruolo dell'angiotensina nell'induzione dell'alterazione del podocita: a conferma di tale ipotesi gli ACE-inibitori sono in grado di ridurre le alterazioni a carico dei pedicelli nel modello animale di diabete indotto da streptozotocina, effetto non evidenziabile con l'impiego di inibitori recettoriali per l'endotelina (57, 58). L'ACE-inibitore sembra avere un effetto diretto verso la riduzione dell'espressione della nefrina indotta nel modello animale, effetto che non si osserva con l'impiego di un inibitore della produzione di prodotti avanzati di glicolazione (AGE) (59). Nello stesso modello di induzione di nefropatia diabetica l'ACE-inibitore impediva lo sviluppo di alterazione della permeabilità glomerulare all'albumina a dosi più basse rispetto a quelle efficaci sulla pressione arteriosa sistemica e sul controllo del GFR (60).

Appare quindi verosimile ipotizzare per il podocita un

ruolo di primo piano nella genesi della nefropatia diabetica. Risulta peraltro non del tutto chiarito il meccanismo attraverso cui il podocita viene inizialmente coinvolto: meccanismi quali l'iperfiltrazione, l'ipertensione sistemica o la produzione di AGE, eventi che senza dubbio concorrono a peggiorare la situazione a livello podocitario, non possano essere chiamati in causa come iniziali responsabili del danno.

A questo punto è forse utile valutare se le alterazioni proprie della malattia diabetica, ossia l'iperglicemia e l'assenza di insulina endogena (come nel diabete di tipo 1) o la resistenza periferica all'insulina (come nel diabete di tipo 2), siano direttamente in grado di alterare la funzione del podocita. Esistono lavori in tale ambito che suggeriscono tale evenienza: in un recente studio si è dimostrato come il podocita sia l'unica cellula della barriera di filtrazione glomerulare sensibile all'azione dell'insulina, comportamento del tutto simile ad altre cellule classicamente insulino-sensibili quali il miocita e l'adipocita. L'aumento insulino-dipendente nell'ingresso cellulare del glucosio è mediato dall'azione di specifici trasportatori, quali GLUT1 e GLUT4 che richiedono, per la loro attività, l'integrità del citoscheletro podocitario (61).

Anche l'iperglicemia di per se sembra riacquistare un ruolo significativo nell'indurre la nefropatia diabetica: un recente studio dimostra come, almeno per modelli murini di diabete tipo 1 e tipo 2, l'iperglicemia induca un significativo aumento dei fenomeni apoptotici a livello podocitario attraverso meccanismi ROS (*reactive oxygen species*) dipendenti (62) i cui effetti possono essere prevenuti dall'azione antiossidante dell'acido α -lipoico (62).

Nefropatie con ipertensione glomerulare

Una significativa proteinuria, peraltro quasi sempre di entità inferiore al *range* nefrosico, si osserva in diverse situazioni accomunate da ipertensione glomerulare. Tra tali quadri, che si caratterizzano dal punto di vista istopatologico per la presenza di una glomerulosclerosi focale e segmentale, riconosciamo la nefropatia ipertensiva, l'agenesia o l'ipoplasie renale monolaterale, il *remnant kidney* successivo a nefrectomia unilaterale, l'obesità, la nefropatia da reflusso, l'oligomeganefronia. In queste situazioni il podocita risulta essere primitivamente interessato in seguito a meccanismi di "stiramento" e di iperfiltrazione indotta dall'incremento della pressione idrostatica all'interno del capillare glomerulare (63). La precedente affermazione è avvalorata da consolidate esperienze sperimentali quali un'ablazione subtotale del parenchima renale, sia nei ratti *Fawn-hooded* spontaneamente ipertesi che nei ratti obesi (*fa/fa*) Zucker (2). In questi modelli i podociti non risultano in grado di mantenere la loro tipica struttura ed invariabilmente si osservavano un'ipertrofia cellulare, l'*effacement* dei processi pedicillari, la formazione di pseudocisti, un sovraccarico citoplasmatico di vescicole di riassorbimento

ed infine un distacco dalla membrana basale glomerulare. Quest'ultimo evento che conduce al distacco di podociti ed alla conseguente podocitopenia (va ricordato come tali cellule non possiedono la caratteristica di una rigenerazione riparativa), innesca un circolo vizioso: le cellule residue, infatti, hanno come unico meccanismo di compenso quello dell'ipertrofia con ulteriore aumento della trazione di tipo meccanico. Nelle fasi successive del danno le cellule non sono più in grado di rivestire completamente la membrana basale glomerulare e esistono quindi zone di membrana denudata ove in seguito si formeranno adesioni con l'epitelio parietale della capsula glomerulare (2). Uno dei punti cruciali di questa cascata fisiopatologica è sicuramente la modificazione della struttura del citoscheletro podocitario: studi su cellule isolate dimostrano come la tensione meccanica alteri l'organizzazione citoplasmatica della F-actina e induca, in modo del tutto peculiare e diverso rispetto a quanto avviene per le cellule endoteliali, mesangiali e muscolari lisce ad un'ipertrofia cellulare (64). Lo *stress* meccanico non è solo in grado di indurre alterazioni della struttura podocitaria ma modifica anche l'attività biologica della cellula. In podociti immortalizzati lo stiramento meccanico induce un *up-regulation* dei recettori AT1 e della produzione di angiotensina II (65). Tra i diversi effetti che l'angiotensina II esercita sui podociti ricordiamo come essa sia in grado di delocalizzare ZO1, proteina che appare avere un ruolo rilevante nell'integrità funzionale e strutturale dello SD (17). Un ulteriore effetto dell'angiotensina sul podocita si esercita inibendo la produzione da parte della cellula di mediatori, quali VEGF-A ed Angiopoietina-1, che risultano cruciali per l'integrità funzionale dell'endotelio glomerulare (66). Il ruolo di cooperazione tra elevati livelli di angiotensina II ed ipertensione glomerulare è stato anche valutato su diversi modelli di ipertensione sperimentale studiando l'alterazione della permeabilità glomerulare all'albumina o Palb. In questo studio si è notato in particolare come, nel modello "two kidney one clip", la Palb risultasse significativamente alterata nei glomeruli ottenuti dal rene intatto, mentre nei glomeruli del rene sclerotico essa risultasse normale (67).

Test di verifica

1) La nefropatia diabetica:

- Si caratterizza nelle sue prime fasi per la comparsa di iperfiltrazione glomerulare che causa microalbuminuria ed in seguito proteinuria
- Riconosce come primo momento patogenetico il ruolo svolto dagli AGE
- Coinvolge molto precocemente i podociti poiché essi sono sensibili all'azione dell'insulina e dell'iperglicemia
- Coinvolge il podocita tardivamente dopo l'espansione della matrice mesangiale
- Non è caratterizzata da podocitopenia

2) Nelle nefropatie da ipertensione glomerulare:

- Il danno al podocita è collegato all'ischemia
- Il danno al podocita è, in prima istanza, da correlare a meccanismi di "stiramento" e di iperfiltrazione indotti dall'aumento della pressione idrostatica intracapillare
- Non vi è podocitopenia
- Il danno podocitario è tardivo
- Il danno podocitario è in prima istanza legato a distacco della cellula dalla membrana basale glomerulare

3) Il test della permeabilità glomerulare all'albumina (Palb) rivela:

- La presenza del fattore di permeabilità presente in tutte le nefropatie proteinuriche
- La presenza del fattore di permeabilità tipico della nefropatia a lesioni minime e della Glomerulosclerosi focale e segmentale
- La presenza del fattore di permeabilità presente nella Glomerulosclerosi focale e segmentale
- La presenza di un'alterazione complessa di un sistema circolante di controllo della permeabilità glomerulare alle proteine evidenziata per ora caratteristicamente nella Glomerulosclerosi focale e segmentale che recidiva dopo trapianto renale
- La misura del danno a livello endoteliale.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet www.sin-italy.org/gin e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

Conclusioni

La presenza e la persistenza di proteinuria glomerulare sono tra i maggiori responsabili dell'evoluzione verso l'uremia terminale sia nelle forme di nefropatia primitive che secondarie. I meccanismi d'insorgenza della proteinuria non sono ancora del tutto conosciuti ma appare verosimile dichiarare il ruolo preponderante che ha la cellula podocitaria sin dalle prime fasi nelle più frequenti patologie glomerulari. Si ipotizza inoltre, almeno per alcune nefropatie, la presenza di un sistema umorale complesso di controllo della permeabilità glomerulare alle proteine e tale sistema ha anch'esso, come prima controparte strutturale il podocita. È proprio il miglioramento delle conoscenze di fisiopatologia, l'"arma" che potrà guidare i nefrologi negli anni futuri in terapie sempre più specifiche e precoci con l'intento di combattere, non solo la proteinuria, ma anche i meccanismi, ad essa correlati e collegati, di progressione del danno sino alla sclerosi: la scommessa ad oggi più affascinante è quella di riuscire a comprendere tutti i meccanismi fisiopatologici al fine di consentire la regressione della glomerulosclerosi stessa.

Riassunto

Nei meccanismi patogenetici della proteinuria glomerulare, ancora non completamente chiariti, appare sempre più rilevante e precoce il ruolo svolto dalle alterazioni funzionali e strutturali della cellula podocitaria. A queste considerazioni hanno condotto negli ultimi anni i lavori eseguiti su colture cellulari, le sempre più attente ricerche cliniche, l'applicazione di tecniche di valutazione su glomeruli isolati e gli studi di proteomica sugli aspetti peculiari delle proteine circolanti. In molte delle nefropatie glomerulari che più di frequente s'incontrano in clinica, siano esse primitive o secondarie, il podocita assume il ruolo di primo bersaglio di meccanismi patogenetici tra loro talora diversi ma spesso, anche inaspettatamente, comuni. Il progredire degli studi nel campo della fisiopatologia delle nefropatie glomerulari riuscirà a meglio definire quadri clinici che ad oggi classifichiamo ancora con una statica descrizione di un danno istologico confondendo la causa con l'effetto.

Ringraziamenti

Un sentito ringraziamento alla Prof.ssa Rosanna Gusmano (*Renal Child Foundation*, Istituto G. Gaslini, Genova) per avere sempre supportato in questi anni la nostra ricerca. Un particolare ringraziamento alla Dr.ssa Mary Artero per esserci stata sempre vicina con suggerimenti e consigli.

Indirizzo degli Autori:

Dr. Michele Carraro

Dipartimento di Medicina Clinica e Neurologia

Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Trieste

Ospedale di Cattinara

Strada di Fiume, 447

34149 Trieste

e-mail: m.carraro@fmc.inits.it

Bibliografia

1. Ruggerenti P, Perna A, Mosconi L & On Behalf of The "Gruppo Italiano Di Studi Epidemiologici In Nefrologia" (GISEN) et al. Urinary protein excretion rate is the best independent predictor to ESRF in non-diabetic chronic nephropathies. *Kidney Int* 1998; 57: 1209-16.
2. Pavenstränd H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; 83: 253-307.
3. Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary Proteinuria Syndromes and Mechanisms of Proteinuria. *N Eng J Med* 2006; 354: 1387-401.
4. Rostgaard J, Qvortrup K. Sieve plugs in fenestrae of glomerular capillaries-sites of the filtration? *Cells Tissues Organs* 2002; 170: 132-8.
5. Satchell SC, Anderson KL, Mathieson PW. Angiopoietin 1 and vascular endothelial growth factor modulate human glomerular endothelial cell barrier properties. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 566-74.
6. Mathieson M. The cellular basis of albuminuria. *Clinical Science* 2004; 107: 533-8.
7. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2006; 69: 2131-47.
8. Verma R, Wharram B, Kovari I, et al. Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephrin. *J Biol Chem* 2003; 278(23): 20716-23. Erratum in: *J Biol Chem* 2005; 280(28): 26640.
9. Zenker M, Aigner T, Wendler O, et al. Human laminin B₂ deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and eye abnormalities. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 2625-32.
10. Kestilä M, Lenkkeri U, Monnikko M, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein-nephrin in mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; 1:1-20.
11. Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, et al. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 792-7.
12. Roselli S, Gribouval O, Boute N, et al. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am J Pathol* 2002; 160: 131-9.
13. Boute N, Gribouval O, Roselli S, et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephritic syndrome. *Nat Genet* 2000; 24: 349-54.
14. Carraro M, Caridi G, Bruschi M, et al. Serum glomerular permeability activity in patients with podocin mutations (NPHS2) and steroid resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1946-52.
15. Kim JM, Wu H, Green G, et al. CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science* 2003; 300: 1298-300.
16. Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG. The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol* 1990; 111: 1255-63.
17. Macconi D, Ghilardi M, Bonassi ME, et al. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on glomerular basement membrane permeability and distribution of zonula occludens-1 in MWF rats. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 477-89.
18. Macconi D, Abbate M, Morigi M, et al. Permeable dysfunction of podocyte-podocyte contact upon angiotensin II unravels the molecular target for renoprotective intervention. *Am J Pathol* 2006; 168: 1073-85.
19. Sahali D, Pawlak A, Valanciūtė A, et al. A novel approach to investigation of the pathogenesis of active minimal-change nephritic syndrome using subtracted cDNA library screening. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1238-47.
20. Coers W, Vos JT, van der Meide PH, van der Horst ML, Huitema S, Weening JJ. Interferon-gamma (IFN- γ) and IL4 expressed during mercury-induced membranous nephropathy are toxic for cultured podocytes. *Clin Exp Immunol* 1995; 102: 297-307.
21. Parry RG, Gillespie KM, Mathieson PW. Effect of type 2 cytokines on cultured human glomerular epithelial cells. *Exp Nephrol* 2000; 9: 275-83.
22. Wernerson A, Dunér F, Pettersson E, et al. Altered ultrastructural distribution of nephrin in minimal change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 70-6.
23. Mathieson PW. What has the immune system got against the glomerular podocytes? *Clin Exp Immunol* 2003; 134: 1-5.
24. Savin VJ, Sharma R, Sharma M, et al. Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent ocular segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 878-83.

25. Dall'Amico R, Ghiggeri G, Carraro M, et al. Prediction and treatment of recurrent focal segmental glomerulosclerosis after renal transplantation in children. *Am J Kidney Dis* 1999; 34: 1048-55.
26. Musante L, Candiano G, Bruschi M, et al. Characterization of plasma factors that alter the permeability to albumin within isolated glomeruli. *Proteomics* 2002; 2: 197-205.
27. Doublier S, Musante L, Lupia E, et al. Direct effect of plasma permeability factors from patients with idiopathic FSGS on nephrin and podocin expression in human podocytes. *Int J Mol Med* 2005; 16: 49-58.
28. Candiano G, Musante L, Carraro M, et al. Apolipoproteins prevent glomerular albumin permeability induced in vitro by serum from patients with focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 143-50.
29. Carraro M, Zennaro C, Candiano G, et al. Nephrotic urine prevents increased rat glomerular albumin permeability induced by serum from the same patient with idiopathic nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 689-93.
30. Coward RJM, Foster RR, Patton D, et al. Nephrotic plasma alters slit diaphragm-dependent signaling and translocates nephrin, podocin, and CD2 associated protein in cultured human podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 629-37.
31. Brechley PE, Coupes B, Short CD, O'Donoghue DJ, Ballarie FW, Mallick NP. Urinary C3dg and C5b-9 indicate active immune disease in human membranous nephropathy. *Kidney Int* 1993; 41: 933-7.
32. Couper BM, KonSP, Brechley PE, Short CD, Mallick NP. The temporal relationship between urinary C5b-9 and C3dg and clinical parameters in human membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 1993; 8: 397-401.
33. Matsuo S, Morita Y, Yuzawa Y, Maruyama S. Urinary membrane attach complex (MAC) is a potent predictor of poor renal outcome in proteinuric glomerular diseases (Abst). *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 328A.
34. Fosbrink M, Niculescu F, Rus H. The role of c5b-9 terminal complement complex in activation of the cell cycle and transcription. *Immunol Res* 2005; 31: 37-46.
35. Neale TJ, Ullrich R, Ojha P, Poczewski H, Verhoeven AJ, Kerjaschi D. Reactive oxygen species and neutrophil respiratory burst cytochrome b558 are produced by kidney glomerular cells in passive Heymann nephritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3645-9.
36. Kerjaschki D, Neale TJ. Molecular mechanisms of glomerular injury in rat experimental membranous nephropathy (Heymann nephritis). *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 2518-26.
37. Sharma S, Khama A, Sharma M, Savin VJ. Transforming growth factor- β 1 increases albumin permeability of isolated rat glomeruli via hydroxyl radicals. *Kidney Int* 2000; 58: 131-6.
38. Nangaku M, Shankland SJ, Couser W. Cellular response to injury in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1195-204.
39. Yuan H, Takeuchi E, Taylor GA, McLaughlin M, Brown D, Salant DJ. Nephrin dissociates from actin, and its expression is reduced in early experimental membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 946-56.
40. Saran AM, Yuan H, Takeuchi E, McLaughlin M, Salant DJ. Complement mediates nephrin redistribution and actin dissociation in experimental membranous nephropathy. *Kidney Int* 2003; 64: 2072-8.
41. Doublier S, Ruotsalainen V, Salvadio G. Nephrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephritic syndrome. *Am J Pathol* 2001; 158: 1723-31.
42. Nakatase T, Koike H, Han GD, Suzuki K, et al. Nephrin and podocin dissociate at the onset of proteinuria in experimental membranous nephropathy. *Kidney Int* 2005; 67: 2239-53.
43. Minto AW, Kalluri R, Togawa M, Bergijk EC, Killen PD, Salant DJ. Augmented expression of glomerular basement membrane specific type IV collagen isoforms (α 3- α 5) in experimental membranous nephropathy. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110: 207-17.
44. Lemley KV, Lafayette RA, Safai M, et al. Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy. *Kidney Int* 2002; 61: 1475-85.
45. Qiu LQ, Sinniah R, I-Hong Hsu S. Downregulation of Bcl-2 by podocytes is associated with progressive glomerular injury and clinical indices of poor renal prognosis in human IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 79-90.
46. Vernier RL, Steffes MW, Sisson-Ross S, Mauer SM. Heparan sulphate proteoglycan in the glomerular basement membrane in type 1 diabetes mellitus. *Kidney Int* 1992; 41: 1070-80.
47. Ellis EN, Steffes MW, Chavers B, Mauer SM. Observation of glomerular epithelial cell structure in patients with type 1 diabetes mellitus. *Kidney Int* 1987; 32: 736-41.
48. Berg UB, Torbjornsdotter TB, Jaremco G, Thalme B. Kidney morphological changes in relation to long-term renal function and metabolic control in adolescents with IDDM. *Diabetologia* 1998; 41: 1047-56.
49. Steffes MW, Schmidt D, McCrery R, Basgen JM. Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients. *Kidney Int* 2001; 59: 2104-13.
50. Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, et al. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 1997; 99: 342-8.
51. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, et al. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1379-83.
52. Carraro M, Mancini W, Artero M, et al. Albumin permeability in isolated glomeruli in incipient experimental diabetes mellitus. *Diabetologia* 2000; 43: 235-410.
53. Benigni A, Gagliardini E, Tomasoni S, et al. Selective impairment of gene expression and assembly of nephrin in human diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2004; 65: 2193-200.
54. Rincon-Choles H, Vasylyeva TL, Pergola PE, et al. ZO-1 expression and phosphorylation in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2006; 55: 894-900.
55. Economou CG, Kitsiou PV, Tzinia AK, et al. Enhanced podocalyxin expression alters the structure of podocyte basal surface. *J Cell Sci* 2004; 117: 3281-94.
56. Mifdud SA, Allen TJ, Bertram JF, Hulthen, et al. Podocyte foot process broadening in experimental diabetic nephropathy: amelioration with renin-angiotensin blockade. *Diabetologia* 2001; 44: 878-82.
57. Gross ML, El-Shakmak A, Szabo A, et al. ACE-inhibitors but non endothelin receptor blockers prevent podocyte loss in early diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2003; 46: 856-68.
58. Kelly DJ, Aaltonen P, Cox AJ, et al. Expression of the slit-diaphragm protein, nephrin, in experimental diabetic nephropathy: differing effects of anti-proteinuric therapies. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 1327-32.
59. Fabris B, Candido R, Carraro M, et al. Modulation of incipient glomerular lesions in experimental diabetic nephropathy by hypotensive and subhypotensive dosages of an ACE Inhibitor. *Diabetes* 2001; 50: 2619-24.
60. Coward RJM, Welsh GI, Yang J, et al. The human glomerular podocyte is a novel target for insulin action. *Diabetes* 2005; 54: 3095-102.
61. Susztak K, Raff AC, Schiffer M, Böttinger EP. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes* 2006; 55: 225-33.
62. Siu B, Saha J, Smoyer WF, Sullivan KA, Brosius III FC. Reduction in podocyte density as a pathologic feature in early diabetic nephropathy in rodents: prevention by lipoic acid treatment. *BCM Nephrology* 2006; 15; 7: 6.
63. Endlich N, Kress KR, Reiser J, et al. Podocytes respond to mechanical stress in vitro. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 413-22.
64. Durvasula RV, Petermann AT, Hiromura K, et al. Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. *Kidney Int* 2004; 65: 30-9.
65. Fogo A. Can glomerulosclerosis be reversed? *Nature Clinical Practice Nephrology* 2006; 2: 290-1.

66. Candido R, Carraro M, Fior F, et al. Glomerular permeability defect in hypertension is dependent on renin angiotensin system activation. *Am J Hypertens* 2005; 18: 844-50.
67. Dantal J, Bigot E, Bogers W, et al. Effect of plasma protein adsorption on protein excretion in kidney-transplant recipients with recurrent nephrotic syndrome. *N Engl J Med* 1994; 330: 7-14.
68. Sharma M, Sharma R, McCarthy ET, Savin VJ. "The FSGS factor:" enrichment and in vivo effect of activity from focal segmental glomerulosclerosis plasma. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 552-61.
69. Musante L, Candiano G, Zennaro C, et al. Humoral permeability factors in the nephrotic syndrome: a compendium and prospectus. *J Nephrol* 2001; (Suppl 4): S48-50. Review.
70. Bruschi M, Musante L, Candiano G, et al. Transitions of serum albumin in patients with glomerulosclerosis 'in vivo' characterization by electrophoretic titration curves. *Electrophoresis* 2006; 27: 2960-9.
71. Carraro M, Zennaro C, Artero M, et al. The effect of proteinase inhibitors on glomerular albumin permeability induced in vitro by serum from patients with idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 1969-75.
72. Sheth JJ. Diabetes, microalbuminuria and hypertension. *Clin Exp Hypertens* 1999; 21: 61-8. Review.