



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
MEDICINA E CHIRURGIA

Tesi di laurea

**La glomerulonefrite membranosa pediatrica:
considerazioni anatomo-cliniche**

RELATORE

Ch.mo Prof. Valerio Gaetano Vellone

CORRELATORE

Egr. Dott. Gabriele Gaggero

CANDIDATO

Matteo Sammito

Anno Accademico 2025/2026

Abstract

La glomerulonefrite membranosa (GMN) è una frequente causa di sindrome nefrosica nell'adulto, ma risulta rara in età pediatrica. La GMN può essere primaria o secondaria, comunque caratterizzata da: deposito di immunocomplessi patologici nella membrana basale glomerulare, danno podocitario e proteinuria. Obiettivo dello studio è stato confrontare le caratteristiche cliniche e istopatologiche di una casistica monocentrica di GMN pediatrica e valutare il possibile ruolo di LGALS3BP quale biomarcatore del danno renale.

Materiali e Metodi: Sono stati analizzati retrospettivamente 24 pazienti pediatrici con GMN diagnosticata mediante biopsia renale presso l'IRCCS Istituto Giannina Gaslini tra il 2001 e il 2026. Sono stati raccolti dati clinici e laboratoristici e rivalutate le biopsie mediante microscopia ottica (stadiazione secondo Ehrenreich e Churg) e immunofluorescenza. Sono stati valutati IFTA, infiammazione interstiziale, depositi immuni ed espressione immunoistochimica di LGALS3BP nei diversi compartimenti renali, con validazione sperimentale su modello murino. Le analisi statistiche hanno utilizzato i test di Mann-Whitney, Fisher e Spearman.

Risultati: Il 70,8% delle biopsie apparteneva agli stadi I-II e il 29,2% agli stadi III-IV. Le forme secondarie presentavano stadi istologici più avanzati rispetto alle primitive ($p=0,0017$), maggiore espressione di IgA e più frequenti depositi di C1q. LGALS3BP risultava maggiormente espresso nelle forme secondarie ($p=0,004$) e correlava con lo stadio istologico ($\rho=0,703$; $p<0,001$), i depositi di IgA ($\rho=0,590$; $p=0,003$) e il danno tubulo-interstiziale cronico.

Conclusioni: La GMN pediatrica è una malattia rara ed eterogenea. LGALS3BP emerge come un promettente biomarcatore tissutale associato alla progressione istologica, al coinvolgimento vascolare e al danno tubulo-interstiziale, con potenziale utilità nella caratterizzazione biologica della malattia. Studi multicentrici sono necessari per confermarne il valore prognostico.

Indice

1. GLOMERULONEFRITE MEMBRANOSA	1
1.1 Definizione e eziologia	1
1.2 Epidemiologia	1
1.3 Patogenesi	2
1.4 Classificazione morfologica	2
1.5 Classificazione antigenica	3
1.6 Manifestazioni cliniche	4
1.7 Diagnosi, prognosi e trattamento	4
2 GLOMERULONEFRITE MEMBRANOSA IN ETÀ PEDIATRICA	5
2.1 Definizione	5
2.2 Epidemiologia	6
2.3 Eziologia	6
2.4 Patogenesi	7
2.5 Manifestazioni cliniche	7
2.6 Istopatologia	8
2.7 Diagnosi	9
2.8 Terapia	9
3. NEFRITE LUPICA	10
3.1 Definizione	10
3.2 Epidemiologia	10
3.3 Patogenesi	11
3.4 Manifestazioni cliniche	11
3.5 Istopatologia	12
3.6 Immunofluorescenza	14
3.7 Diagnosi	15
3.8 Trattamento e prognosi	15
4. LGALS3BP	16
4.1 Definizione	16
4.2 Struttura molecolare e ruolo di LGALS3BP	17
4.3 Espressione di LGALS3BP	19

4.4 Metodi di rilevazione e importanza clinica di LGALS3BP	20
5. RUOLO DELL'IMMUNOISTICHIMICA	21
5.1 Definizione di immunoistochimica (IHC).....	21
5.2 Tecniche e metodologie di IHC	21
5.3 Modelli di espressione di IHC	22
5.4 Vantaggi e svantaggi dell'IHC nelle biopsie renali	23
5.5 Utilizzo dell'IHC nella glomerulonefrite membranosa	24
5.6 Interpretazione di IHC	24
6. OBIETTIVO DELLO STUDIO	25
7. MATERIALI E METODI	26
7.1 Prelievo e allestimento dei vetrini	27
7.2 Immunoistochimica per LGALS3BP	30
7.3 Score LGALS3BP	35
7.4 Validazione su modello murino	38
8. RISULTATI	39
8.1 Risultati modello murino	39
8.2 Caratteristiche epidemiologiche della popolazione complessiva	41
8.3 Caratteristiche cliniche della popolazione in studio.....	43
8.4 Caratteristiche istopatologiche della casistica ed espressione di LGALS3BP	49
8.5 Espressione immunoistochimica di LGALS3BP.....	50
8.6 Correlazioni tra clinica, istopatologia ed espressione di LGALS3BP.....	52
9. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE	61
9.1 Commento epidemiologico	61
9.2 Interpretazione clinica	62
9.3 Caratteristiche istopatologiche della casistica	63
9.4 Interpretazione biologica	63
9.5 Sintesi interpretativa complessiva	64
9.6 Conclusioni.....	65
BIBLIOGRAFIA.....	66
RINGRAZIAMENTI.....	70

1. GLOMERULONEFRITE MEMBRANOSA

1.1 Definizione e eziologia

La glomerulonefrite membranosa ¹⁻⁶ (GMN), o nefropatia membranosa, è una malattia renale caratterizzata da un ispessimento della membrana basale dei glomeruli, cioè delle strutture del rene che filtrano il sangue. La causa principale è il deposito di immunocomplessi (anticorpi e antigeni) sulla parete dei glomeruli, che altera la filtrazione renale e provoca perdita di proteine nelle urine.

La GMN è tradizionalmente suddivisa in due grandi categorie. Le forme primitive (pGMN) ⁷⁻⁹, dette anche idiopatiche, sono condizioni organo-specifiche autoimmuni in cui gli autoanticorpi riconoscono antigeni espressi sulla superficie dei podociti o nella membrana basale glomerulare (MBG) stessa. Le forme secondarie (sGMN) si sviluppano in associazione a patologie sistemiche, tra cui il Lupus Eritematoso Sistemico (LES), infezioni virali croniche (HBV, HCV), farmaci, e meno frequentemente neoplasie e altre malattie autoimmuni.

1.2 Epidemiologia

La GMN è responsabile di circa il 20% delle sindromi nefrosiche negli adulti, con un picco di incidenza in età compresa tra 30 e 50 anni e un rapporto maschi/femmine di 2:1. È rara nell'infanzia ed è di gran lunga la causa più comune di sindrome nefrosica nell'anziano. Nei pazienti in età pediatrica la sua incidenza è notevolmente inferiore rispetto agli adulti e la prevalenza relativa delle forme secondarie è più alta: fino al 60–70% delle GMN risulta associata a una malattia di base, di cui il LES è di gran lunga la più comune.

1.3 Patogenesi

Nella pGMN la patogenesi è mediata da autoanticorpi circolanti che riconoscono antigeni specifici sulla membrana apicale dei podociti. Il legame anticorpo-antigene in situ genera immunocomplessi subepiteliali che attivano il complemento attraverso la via classica; il complesso di attacco alla membrana (MAC, C5b-9) inseritosi nella MBG provoca la disfunzione podocitaria, la perdita della barriera di filtrazione e la conseguente proteinuria nefrosica. Il risultato finale è la formazione dei caratteristici 'spikes' e delle proiezioni argentofile alla colorazione PASM.

Nelle sGMN associata al LES, la patogenesi è più complessa: gli immunocomplessi coinvolgono autoanticorpi anti-dsDNA, anti-nucleosomi, anti-C1q e altri autoanticorpi sistemici che si depositano nella MBG versante sub endoteliale prevalentemente attraverso meccanismi di intrappolamento circolante e di deposito in situ, con attivazione del complemento e risposta infiammatoria sistemica.

1.4 Classificazione morfologica

La classificazione morfologica delle GMN, proposta da Ehrenreich e Churg ¹⁰ nel 1968 e tuttora utilizzata in abbinamento alla classificazione dell'International Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN/RPS), prevede quattro stadi in base all'entità e alla distribuzione dei depositi e delle alterazioni della MBG:

- *Stadio I*: depositi elettrendensi subepiteliali isolati, assenza di variazioni rilevabili alla microscopia ottica con colorazioni standard; la PASM evidenzia solo una lieve irregolarità della MBG.

- *Stadio II*: ispessimento diffuso della MBG con comparsa di proiezioni argentofile ('spikes') tra i depositi; all'immunofluorescenza i depositi IgG e C3 appaiono granulari lungo le anse capillari. È lo stadio più spesso riscontrato alla diagnosi.

- *Stadio III*: fusione degli spikes attorno ai depositi, con intramembranazione degli immunocomplessi; la MBG assume un aspetto lacunare o “a traforo” alla PASM.
- *Stadio IV*: sclerosi glomerulare con rimpiazzamento dei depositi da parte di matrice, riduzione della cellularità e fibrosi tubulo-interstiziale progressiva.

È importante sottolineare che questa stadiazione descrive l'evoluzione morfologica ma non ha valore predittivo diretto sull'outcome renale, che dipende in misura maggiore dalla risposta alla terapia immunosoppressiva. Alcune analisi pubblicate indicano che il grado di atrofia tubulare o quello di fibrosi interstiziale sono più predittivi della progressione rispetto allo stadio della malattia glomerulare.

1.5 Classificazione antigenica

La scoperta dei principali antigeni target ha rivoluzionato l'approccio diagnostico e terapeutico della GMN primitiva ¹¹⁻¹⁶. Il recettore della fosfolipasi A2 di tipo M (PLA2R) ¹⁷ è il principale antigene nelle pGMN dell'adulto, rilevabile in circa il 70% dei casi. THSD7A ¹⁸⁻¹⁹ (thrombospondin type-1 domain-containing 7A) è il secondo antigene per frequenza (~3–5%). Più recentemente sono stati descritti NELL1 ²⁰ (neural epidermal growth factor-like 1), presente in circa il 5% delle pGMN PLA2R-negative, e protocadherina (PCDH7). Nella sGMN sono invece più frequenti una serie di antigeni tra cui Exostosin 1 e 2 (EXT1 e EXT2) ²¹⁻²², NCAM-1 (Neural Cell Adhesion Molecule 1) e altri.

La Semaforina 3B ²³ (SEMA3B) rappresenta un antigene di particolare rilevanza in età pediatrica: identificata per la prima volta da Sethi e colleghi nel 2020 tramite spettrometria di massa su biopsie PLA2R-negative, è stata successivamente descritta come il principale antigene nella GMN ad esordio precoce (al di sotto dei 2 anni di vita) nei bambini.

1.6 Manifestazioni cliniche

Le manifestazioni cliniche della glomerulonefrite membranosa derivano principalmente dalla perdita di proteine attraverso il filtro glomerulare. Manifestazione principale è la sindrome nefrosica, la cui presentazione più tipica comprende:

- Proteinuria massiva ($>3,5$ g/24 h)
- Ipoalbuminemia
- Edemi declivi, periorbitari, fino ad anasarca nei casi severi
- Iperlipidemia
- Lipiduria

L'80% dei pazienti affetti da GNM presenta sindrome nefrosica e proteinuria non selettiva. La microematuria si osserva meno comunemente.

1.7 Diagnosi, prognosi e trattamento

La diagnosi²⁴⁻²⁵ di GMN richiede la biopsia renale con valutazione in microscopia ottica, immunofluorescenza e microscopia elettronica. Il dosaggio sierico degli anticorpi anti-PLA2R è parte integrante dell'iter diagnostico.

Le remissioni spontanee si possono osservare nel 20-33% dei pazienti e spesso avvengono tardi; ciò rende difficili le decisioni riguardo al trattamento. Livelli bassi o assenti di autoanticorpi anti-PLA2R sono utili per predire remissioni spontanee o correlate al trattamento. Un terzo dei pazienti continua a soffrire di sindrome nefrosica ricorrente, ma mantiene una funzione renale normale, mentre approssimativamente un altro terzo dei pazienti va incontro a insufficienza renale o al decesso per le complicanze provocate dalla sindrome nefrosica. Il sesso maschile, l'età avanzata, l'ipertensione e la persistenza di proteinuria sono associati alla prognosi peggiore. Sebbene le complicanze trombotiche rappresentino una caratteristica di tutte le sindromi nefrosiche, nella GNM si ha l'incidenza più elevata di trombosi delle vene renali, embolia polmonare e trombosi venosa profonda.

La profilassi anticoagulante è controversa, ma è stata raccomandata nei pazienti con proteinuria severa o prolungata in assenza di fattori di rischio per lo sviluppo di emorragie.

Oltre al trattamento di edema, dislipidemia e ipertensione, è raccomandato l'impiego di inibitori del sistema renina-angiotensina. Per i pazienti affetti da GNM primitiva e da proteinuria persistente ($> 3 \text{ g/24 h}$) è raccomandata anche la terapia con farmaci immunosoppressori. La scelta dei farmaci immunosoppressori per la terapia è controversa, ma le raccomandazioni attuali sono per il trattamento con steroidi e ciclofosfamide, clorambucil, micofenolato mofetile o ciclosporina o rituximab, un anticorpo anti-CD20 diretto contro i linfociti B.

2. GLOMERULONEFRITE MEMBRANOSA IN ETÀ PEDIATRICA

2.1 Definizione

La glomerulonefrite membranosa (GNM), o nefropatia membranosa, è una malattia glomerulare caratterizzata dall'ispessimento diffuso della membrana basale glomerulare dovuto al deposito di immunocomplessi sul versante subepiteliale dei capillari glomerulari.

In età pediatrica rappresenta una causa relativamente rara di sindrome nefrosica rispetto all'adulto. Può presentarsi come:

- Forma primaria (idiopatica): associata ad autoanticorpi diretti contro antigeni podocitari.
- Forma secondaria: correlata a infezioni, malattie autoimmuni, farmaci o neoplasie.

La malattia comporta alterazione della barriera di filtrazione glomerulare con conseguente proteinuria.

2.2 Epidemiologia

La glomerulonefrite membranosa è rara nei bambini e rappresenta circa il 1–7% delle biopsie renali pediatriche effettuate per sindrome nefrosica.

È più frequente negli adolescenti rispetto ai bambini piccoli e vi è una leggera prevalenza nel sesso maschile. L'incidenza è nettamente inferiore rispetto alla popolazione adulta. La forma primaria è meno comune nei bambini rispetto agli adulti, le forme secondarie sono relativamente più frequenti.

Le GMN pediatriche sono più spesso associate a condizioni immunologiche sistemiche, collegate a lupus o altre connettiviti.

Uno degli aspetti più importanti della GMN pediatrica è la maggiore proporzione di forme secondarie.

La nefrite lupica è una delle principali cause di GMN secondaria nel bambino. Nel lupus pediatrico il coinvolgimento renale è molto frequente, tende a essere più aggressivo rispetto all'adulto.

2.3 Eziologia

La forma primaria è dovuta a una risposta autoimmune contro antigeni ¹⁶ espressi dai podociti. Tra gli antigeni maggiormente coinvolti, particolarmente importante in età pediatrica è la Semaforina 3B (SEMA3B).

Nel paziente pediatrico PLA2R è meno dominante rispetto all'adulto.

Le cause secondarie comprendono infezioni (HBV, HCV), malattie autoimmuni (LES), farmaci (FANS, penicillina), neoplasie (rare in età pediatrica ma possibili).

2.4 Patogenesi

La patogenesi della glomerulonefrite membranosa si basa su un danno immunomediato del podocita.²⁵ Meccanismo immunologico:

1. Produzione di autoanticorpi contro antigeni podocitari.
2. Formazione di immunocomplessi in situ sulla superficie subepiteliale.
3. Attivazione del complemento, soprattutto attraverso la via lectinica e alternativa.
4. Formazione del complesso di attacco alla membrana (C5b-9).
5. Danno podocitario con alterazione del citoscheletro e aumento della permeabilità glomerulare.
6. Comparsa di proteinuria.

L'attivazione del complemento è centrale nella patogenesi, in quanto altera la membrana podocitaria.

Il deposito progressivo di immunocomplessi determina ispessimento della membrana basale con formazione di “spikes” visibili con colorazioni argentiche.

2.5 Manifestazioni cliniche

La presentazione clinica è variabile.²⁶

La sindrome nefrosica è la modalità più comune di esordio e comprende:

- Proteinuria massiva
- Ipoalbuminemia
- Edema
- Iperlipidemia

Alcuni pazienti presentano proteinuria non nefrosica scoperta casualmente.

L'ematuria è più frequentemente microscopica, raramente macroscopica.

In una minoranza dei casi è presente ipertensione. L'insufficienza renale è generalmente assente all'esordio nei bambini, ma possibile nelle forme severe o progressive.

Nelle forme secondarie possono comparire sintomi correlati alla patologia sottostante come rash cutaneo nel lupus, epatopatia nelle infezioni virali, artralgie o febbre.

2.6 Istopatologia

La biopsia renale rappresenta il gold standard diagnostico. In microscopia ottica si osserva un ispessimento diffuso delle pareti capillari glomerulari, con formazione di "spikes" della membrana basale.

L'immunofluorescenza mostra depositi granulari di IgG lungo la membrana basale glomerulare.

La microscopia elettronica evidenzia depositi elettrondensi subepiteliali, fusione dei pedicelli podocitari e ispessimento della membrana basale.

Come la GMN dell'adulto, è suddivisa in 4 stadi istologici secondo Ehrenreich e Churg:

1. Piccoli depositi subepiteliali
2. Formazione degli spikes
3. Inglobamento dei depositi nella membrana
4. Sclerosi glomerulare avanzata

2.7 Diagnosi

La diagnosi si basa su dati clinici, laboratoristici e istologici.

Per quanto riguarda gli esami di laboratorio, si può osservare nelle urine proteinuria elevata e possibile ematuria, agli esami ematici ipoalbuminemia e ipercolesterolemia.

La funzionalità renale è generalmente conservata.

In età pediatrica può essere utile la ricerca di anticorpi anti-semaforina 3B.

La biopsia renale è fondamentale per confermare la diagnosi, distinguere tra forme primitive e secondarie, e definire il grado di danno.

2.8 Terapia

Il trattamento dipende dalla gravità clinica e dall'eziologia.

La terapia conservativa è indicata nei casi lievi o con remissione spontanea e comprende: restrizione sodica, diuretici per edema, ACE-inibitori o ARB per ridurre la proteinuria e controllo della pressione arteriosa.

La terapia immunosoppressiva, invece, è indicata nei casi persistenti, nefrosici severi e con deterioramento renale. I farmaci utilizzati sono:

- Corticosteroidi
- Ciclofosfamide
- Calcineurino-inibitori (ciclosporina, tacrolimus)
- Micofenolato mofetile
- Rituximab

Per le forme secondarie il trattamento prevede la cura della causa sottostante (terapia antivirale, trattamento del lupus, sospensione del farmaco responsabile).

La prognosi nei bambini è spesso migliore rispetto agli adulti. Talvolta evolve verso una remissione spontanea, frequente la remissione con terapia. Recidive e progressione a insufficienza renale cronica nei casi più severi.

3. NEFRITE LUPICA

3.1 Definizione

La nefrite lupica²⁷ è uno spettro di lesioni immunomediate, legate alla formazione di immunocomplessi, nei pazienti affetti da Lupus Eritematoso Sistemico (LES).

Le manifestazioni renali del LES sono estremamente eterogenee e possono interessare alcuni o tutti i compartimenti renali, quindi i glomeruli, i tubuli, l'interstizio e i vasi.

3.2 Epidemiologia

Il coinvolgimento renale si verifica nell'80% dei pazienti pediatrici con LES, con una frequenza significativamente maggiore rispetto agli adulti (60%). I pazienti di sesso femminile, intorno alla terza decade, di origine africana, asiatica e ispanica sono più frequentemente affetti e presentano quadri più aggressivi. Generalmente i primi segni e sintomi di coinvolgimento renale compaiono circa 3-5 anni dopo la manifestazione dei primi sintomi tipici del lupus.

Il coinvolgimento del rene è particolarmente frequente e precoce nei pazienti pediatrici con LES, nei quali la malattia tende a evolvere verso un quadro di nefrite.

3.3 Patogenesi

Il danno renale ha un'origine multifattoriale, in cui coesiste una predisposizione genetica, l'esposizione a fattori ambientali e una alterata attivazione del sistema immunitario.²⁸ La nefrite lupica deriva dalla deposizione di immunocomplessi circolanti che attivano la cascata del complemento provocando danni mediati dal complemento, infiltrazione leucocitaria, attivazione dei fattori procoagulanti e rilascio di diverse citochine.

Gli anticorpi circolanti anti-dsDNA, anti-nucleosomi e anti-C1q formano immunocomplessi in circolazione o si legano in situ ad antigeni glomerulari, con attivazione della via classica del complemento, instaurando un circolo che si auto-mantiene.

La progressione, quindi, del danno renale è influenzata da diversi meccanismi cellulari e molecolari, come la deposizione di immunocomplessi, l'attivazione del complemento e la disregolazione delle citochine.

Una approfondita conoscenza di questi meccanismi è fondamentale per sviluppare trattamenti terapeutici sempre più specifici e più efficaci (target-mirati).

3.4 Manifestazioni cliniche

Le manifestazioni cliniche, il decorso della malattia e il trattamento della nefrite lupica sono strettamente legati alla patologia renale. Il segno clinico più comune di malattia renale è la proteinuria, ma possono essere presenti anche ematuria, ipertensione, vari gradi di insufficienza renale e sedimento urinario con cilindri eritrocitari.

Le manifestazioni cliniche renali sono dei predittori abbastanza accurati circa la classe e l'attività delle lesioni renali valutate in seguito alla biopsia.

3.5 Istopatologia

La nefrite lupica, dal punto di vista anatomopatologico, può essere suddivisa in sei classi secondo la più recente classificazione ISN/RPS (International Society of Nephrology/Renal Pathology Society) del 2018.²⁹⁻³⁰

La nefrite lupica ha la capacità di potersi riattivare nel tempo o passare da una classe all'altra spontaneamente o dopo trattamento. Per questo è consigliato ripetere la biopsia nel caso in cui ci sia una sostanziale variazione dal punto di vista clinico (es. peggioramento improvviso della proteinuria e/o dell'ematuria).

Classe I = Glomerulonefrite a lesioni minime

Sono caratterizzate dalla presenza di glomeruli normali alla microscopia ottica, mentre all'immunofluorescenza si evidenziano depositi a livello mesangiale, i quali tendono a essere piccoli e ad avere una distribuzione segmentale/globale.

Alla microscopia elettronica, sempre a livello mesangiale, sono presenti piccoli depositi elettro-densi.

Classe II = Nefrite lupica proliferativa mesangiale

Si ha ipercellularità mesangiale e/o espansione della matrice mesangiale, visibile alla microscopia ottica.

In immunofluorescenza si evidenziano depositi mesangiali globali di immunocomplessi, soprattutto IgG. Inoltre, ci possono essere rari depositi anche a livello subepiteliale e subendoteliale.

Classe III = Nefrite lupica focale

Glomerulonefrite con ipercellularità endocapillare segmentale e/o globale, che coinvolge meno del 50% dei glomeruli totali. Presenta depositi di immunocomplessi subendoteliali, con o senza lesioni mesangiali.

Secondo la classificazione ISN/RPS, questa classe viene ulteriormente suddivisa in tre sotto- gruppi, in base alla attività o cronicità delle lesioni.

Classe IV = Nefrite lupica diffusa

Glomerulonefrite con ipercellularità endocapillare segmentale e/o globale, che coinvolge più del 50% dei glomeruli totali.

Come per la classe III, anche in questo caso si differenziano lesioni attive dalle croniche.

Sono tipici i depositi a “fili di ferro” e si possono riscontrare necrosi fibrinoide e corpi ematossinofili.

Classe V = Nefrite lupica membranosa

Ispessimento della membrana basale diffuso ed irregolare con immunodepositi mesangiali, subepiteliali ed intermembranosi.

Il 60% dei pazienti si presenta con sindrome nefrosica o con quantità minori di proteinuria. I pazienti con nefrite lupica di classe V, come i pazienti affetti da nefropatia membranosa idiopatica, sono predisposti alla trombosi delle vene renali e ad altre complicazioni trombotiche. Una minoranza di pazienti affetti dalla malattia di classe V si presenta con ipertensione e disfunzione renale.

Classe VI = Nefrite lupica sclerosante

Più del 90% dei glomeruli presenta sclerosi globale senza residuo di lesioni attive. Inoltre ci saranno grave atrofia tubulare, fibrosi interstiziale, infiammazione e aterosclerosi. Rappresenta la fase finale (end stage) del danno renale prodotto dalla malattia e, in quanto irreversibile, necessita del trattamento dialitico. A livello di gruppo, il 20% circa dei pazienti con nefrite lupica raggiunge l'ultimo stadio della patologia renale, che richiede la dialisi o il trapianto.

In questa fase la sierologia tipica del LES è negativa/inattiva.

In generale, nella nefrite lupica, oltre al coinvolgimento glomerulare, ci potranno essere lesioni anche a livello tubulare, interstiziale e vascolare.

3.6 Immunofluorescenza

La nefrite lupica all'immunofluorescenza è caratterizzata da depositi di immunocomplessi a livello glomerulare, tubulare, interstiziale e vascolare. Nella quasi totalità dei casi questi sono IgG, più di rado IgA e IgM.

Si parla di aspetto "full house" quando si ha positività per IgG, IgA, IgM, C3, C1q e per le catene kappa e lambda.

Il C3 e il C1q del complemento sono presenti in oltre l'80% dei pazienti affetti da lupus, soprattutto a livello extra-glomerulare, sulla capsula del Bowman, nell'interstizio e sulla membrana basale delle arterie.

L'immunofluorescenza ha soprattutto un aspetto granulare subepiteliale, intramembranoso, subendoteliale e mesangiale.

3.7 Diagnosi

Per diagnosticare³¹ un quadro di nefrite lupica nei pazienti pediatrici affetti da LES è importante un approccio multiplo che prevede la valutazione di:

- Segni e sintomi clinici,
- Esami di laboratorio,
- Imaging (es. ecografia),
- Esame istologico (biopsia renale).

Quest'ultimo risulta di fondamentale importanza, da un punto di vista prognostico, per decidere il trattamento più adeguato e soprattutto per valutare l'andamento della lesione nel tempo.

Le manifestazioni extrarenali del lupus sono importanti per stabilire una diagnosi certa di LES, dal momento che le anomalie sierologiche associate alla nefrite lupica, per quanto comuni, non hanno significato diagnostico. La presenza di anticorpi anti-DNA a doppia elica che fissano il complemento è il reperto meglio correlato alla presenza di malattia renale.

3.8 Trattamento e prognosi

Oggi giorno lo scopo principale del trattamento³¹ è quello di ridurre l'attività della malattia e quindi il danno renale dato dall'attivazione acuta del sistema immunitario, preservare la funzionalità renale e migliorare l'outcome del paziente e prevenire la comparsa di complicanze.

Il trattamento si basa sull'utilizzo di corticosteroidi e immunosoppressori sia in acuto che in mantenimento, con combinazioni e a dosi differenti.

È fondamentale monitorare il paziente nel tempo per stabilire il corretto funzionamento della terapia, modificare eventualmente il piano terapeutico e agire precocemente in caso di progressione o complicanze di danno renale.

Dal punto di vista prognostico³¹ l'andamento della malattia è influenzato da diversi fattori, come la gravità della malattia stessa, la risposta alla terapia e la presenza di comorbidità. L'ipocomplementemia è comune in pazienti affetti da nefrite lupica acuta (70-90%) e livelli del complemento in declino possono preannunciare una riacutizzazione.

In ogni caso una diagnosi precoce e un trattamento adeguato sono fondamentali per tenere sotto controllo la malattia, prevenire ulteriori complicanze e migliorare la vita del paziente.

4. LGALS3BP

4.1 Definizione

LGALS3BP³² (lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein) è un gene che codifica per un membro della famiglia delle proteine leganti la galectina, in particolare per la proteina solubile legante la lectina, galectina-3. Questa proteina è coinvolta in innumerevoli processi fisiologici e patologici, nei meccanismi di adesione cellulare, di migrazione cellulare, di attivazione di pathway intracellulari e nella funzione cellulare stessa. Originariamente è stata identificata e studiata principalmente nel contesto della trasformazione neoplastica nella progressione del cancro. Tuttavia, l'espressione di LGALS3BP si è visto essere aumentata anche in corso di infezioni batteriche o virali e dalla presenza di numerose molecole coinvolte nel processo infiammatorio, come IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α .

4.2 Struttura molecolare e ruolo di LGALS3BP

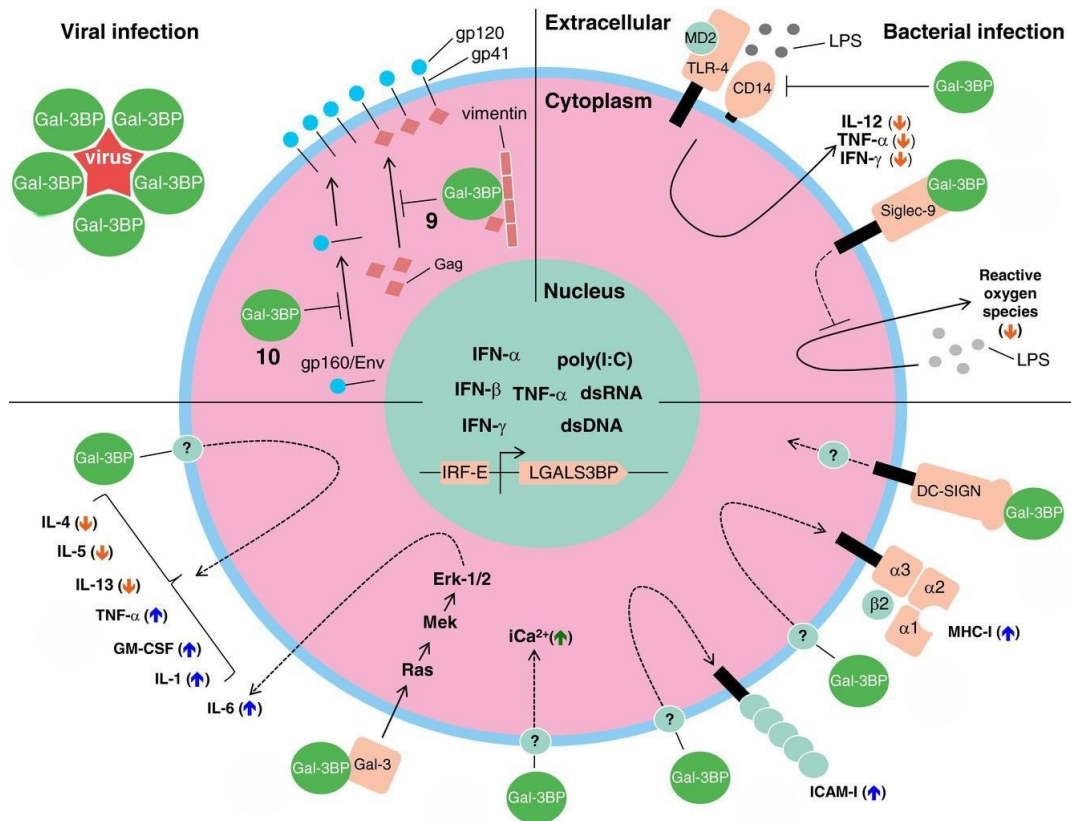
Il gene LGALS3BP, conosciuto anche come Mac-2BP (Mac-2-binding protein), è una glicoproteina formata da multipli domini, che comprendono una regione N-terminale ricca in proline, un dominio collagene-like e una regione C-terminale che presenta il dominio legante la galattina-3. È formato da 585 aminoacidi ed è localizzato negli uomini sul cromosoma 17 (17q25.3); ogni componente strutturale del gene gioca un ruolo fondamentale nel processo di interazione tra le diverse componenti della matrice extracellulare e i rispettivi recettori cellulari, stabilendo i comportamenti cellulari.

La proteina che ne deriva si localizza soprattutto a livello della matrice extracellulare, ma anche nel citoplasma e nel nucleo.

Le galectine sono una famiglia di proteine che hanno una affinità per i beta-galattoside e sono implicate in numerose funzioni cellulari:

- Meccanismi di apoptosi,
- Meccanismi di adesione cellulare integrine-mediati
- Attivazione dell'immunità innata
- Regolazione delle cellule-T
- Stimolazione delle difese immunitarie contro le cellule tumorali e i virus (azione anti- batterica e anti-fungina)

Nella figura seguente sono indicati i principali meccanismi d'azione della proteina LGALS3BP durante i processi infiammatori.



All'interno del nucleo sono indicate le molecole note in grado di indurre la trascrizione di LGALS3BP, ovvero l'Interferone e il TNF- α .

Inoltre:

1. LGALS3BP extracellulare induce o sopprime la secrezione di citochine;
2. LGALS3BP extracellulare induce la secrezione di IL-6, che porta all'attivazione di pathway pro-infiammatori;
3. LGALS3BP extracellulare induce la mobilizzazione del Ca²⁺;
4. LGALS3BP extracellulare aumenta la quantità di ICAM-I sulla superficie cellulare, favorendo l'adesione cellula-cellula;
5. LGALS3BP extracellulare aumenta la quantità di MHC-I sulla superficie cellulare, quindi interagisce nella modulazione dell'immunità adattativa (attivazione dei linfociti T);

6. LGALS3BP extracellulare interagisce con DC-SIGN, sopprimendo la maturazione delle cellule dendritiche (cellule APC) e la differenziazione dei fibroblasti;
7. LGALS3BP extracellulare è coinvolto nelle infezioni batteriche, inibendo la produzione di citochine indotta da LPS (componente dello strato esterno della parete cellulare dei batteri Gram-negativi, in grado di suscitare forti risposte immunitarie);
8. LGALS3BP intracellulare è coinvolto nelle infezioni virali, in particolare da HIV, dove riduce la quantità di HIV Gag sulla membrana plasmatica attraverso l'interazione con la vimentina; inoltre l'LGALS3BP extracellulare si associa ai virus riducendone il potere infettivo.

Quindi, LGALS3BP è coinvolto centralmente nell'attivazione del sistema immunitario, regolando l'ambiente infiammatorio e l'attivazione delle cellule immunitarie. È responsabile dell'attivazione dei macrofagi e dei neutrofili, favorisce l'attivazione dei linfociti T e delle cellule Natural-Killer, e gioca un ruolo fondamentale nella produzione delle citochine e attivazione dei pathway pro-infiammatori.³³

4.3 Espressione di LGALS3BP

La molecola LGALS3BP è espressa in molti tessuti come il rene, il fegato, il polmone e il cuore. Nel tessuto renale sano l'espressione è presente a livello del tubulo prossimale (citoplasma e lume), con livelli modesti nei compartimenti glomerulari e interstiziali. In condizioni patologiche, e in particolare nelle glomerulonefriti autoimmuni, l'espressione risulta significativamente aumentata.

Di particolare interesse è la sua presenza nei pazienti pediatrici affetti da glomerulonefrite membranosa, nei quali i livelli elevati di espressione nei glomeruli renali e nei tubuli evidenziano il suo potenziale come biomarcatore per il monitoraggio della progressione e della gravità della malattia.

Dati ottenuti su modello murino, hanno dimostrato che i reni di topi con nefrite lupica conclamata mostrano un'immuno-espressione di LGALS3BP nettamente superiore rispetto ai reni di topi sani della stessa linea, confermando il ruolo patogenetico della proteina nella fase attiva della glomerulonefrite autoimmune.

4.4 Metodi di rilevazione e importanza clinica di LGALS3BP

La rilevazione dell'espressione di LGALS3BP nei campioni di tessuto impiega comunemente l'immunoistochimica (IHC).

Questa tecnica sfrutta specifici anticorpi che si legano a LGALS3BP, consentendo la visualizzazione e la quantificazione della sua espressione nelle biopsie renali. Inoltre, si possono effettuare anche metodi aggiuntivi come il Western Blotting e il test di immunoassorbimento enzimatico (ELISA), utili soprattutto nell'analisi di LGALS3BP nei fluidi biologici, come il plasma.

Per la ricerca dell'espressione di LGALS3BP nel tessuto renale dei pazienti affetti da glomerulonefrite membranosa è stato utilizzato l'anticorpo Mac-2BP. È un anticorpo monoclonale di origine murina, ottenuto contro una sequenza di aminoacidi che codificano per la proteina LGALS3BP comune ai topi e agli umani. Prima di procedere alla colorazione delle biopsie renali l'anticorpo deve essere testato su un frammento di prostata sana di un individuo adulto, utilizzato come controllo positivo.

5. RUOLO DELL'IMMUNOISTOCIMICA

5.1 Definizione di immunoistochimica (IHC)

L'immunoistochimica (IHC) è una tecnica ancillare ampiamente utilizzata che consente il rilevamento e la localizzazione di un'ampia varietà di antigeni in diversi tipi di tessuti, attraverso l'utilizzo di anticorpi antigene-specifici. Essa sfrutta la capacità degli anticorpi di legarsi in modo specifico a determinati antigeni, consentendo in tal modo di visualizzarne la distribuzione e localizzazione nei campioni biologici.

Questa tecnica viene utilizzata nei laboratori di ricerca e di anatomia patologica per:

- Lo studio, la classificazione e la localizzazione di neoplasie;
- Discriminare proliferazioni cellulari benigne e maligne;
- Identificare diverse popolazioni cellulari con origine comune e definirne le differenze funzionali;
- Ricercare fattori prognostici ed indicazioni terapeutiche.

5.2 Tecniche e metodologie di IHC

Esistono diversi protocolli per l'utilizzo dell'immunoistochimica ³⁴⁻³⁹, che vengono scelti in base al tipo di campione (sezioni di tessuto, cellule isolate o in coltura), alla sensibilità del test e al tipo di antigene che si vuole andare a marcare.

La colorazione immunoistochimica avviene secondo fasi precise, che devono essere seguite per evitare di ottenere risultati non veritieri e artefatti.

Le fasi sono le seguenti: sparaffinatura e idratazione, smascheramento antigenico, inibizione degli enzimi endogeni, incubazione con anticorpi specifici primari e secondari marcati, disidratazione e montaggio e infine osservazione al microscopio. Inoltre è importante eseguire in contemporanea dei controlli positivi per confermare la funzionalità dell'anticorpo utilizzato.

5.3 Modelli di espressione di IHC

Esistono diversi modelli di espressione immunoistochimica in base alla localizzazione dell'antigene che si vuole andare ad identificare con l'anticorpo, esso infatti può essere normalmente espresso a livello nucleare, citoplasmatico o della membrana.

- **Espressione Nucleare:** la colorazione IHC è localizzata nel nucleo della cellula, dove sono presenti il DNA, l'RNA e molte proteine regolatrici. Ad esempio, si possono colorare in questo modo numerosi recettori nucleari, proteine coinvolte nella replicazione e riparazione del DNA, proteine che regolano i fattori di trascrizione come nel caso dei recettori per gli estrogeni ER rilevati nelle cellule dei tumori al seno. La colorazione nucleare è, quindi, importante nella diagnosi di malattie che comportano alterazioni nell'espressione genica o nella regolazione del ciclo cellulare.
- **Espressione Citoplasmatica:** la colorazione IHC è localizzata nel citoplasma della cellula. In questo modo si evidenziano proteine coinvolte nel metabolismo, proteine strutturali e alcune molecole di segnalazione. La ricerca delle citocheratine (proteine dei filamenti intermedi) è un esempio di colorazione citoplasmatica, utile nell'identificazione delle cellule tumorali di origine epiteliale.
- **Espressione di Membrana:** la colorazione IHC è localizzata sulla membrana della cellula, come i recettori di membrana, trasportatori e molecole di adesione cellulare. Un esempio è HER2, recettore di membrana che viene sovraespresso in alcuni tumori al seno. Quindi, questa colorazione è importante soprattutto per identificare le cellule che rispondono a segnali extracellulari o che sono coinvolte nelle interazioni cellula- cellula o cellula-matrice.

5.4 Vantaggi e svantaggi dell'IHC nelle biopsie renali

L'immunoistochimica è una tecnica ampiamente utilizzata in nefrologia ed è particolarmente utile nelle biopsie renali dei pazienti affetti da glomerulonefrite membranosa.

Tra i suoi vantaggi sicuramente rientrano l'elevata specificità e sensibilità che permettono di identificare in maniera precisa le molecole coinvolte nel processo alla base del danno renale, come le proteine e le cellule coinvolte nell'attivazione del sistema immunitario. In particolare, quindi, permettono di identificare il tipo preciso di molecola coinvolta e la sua localizzazione a livello dei diversi compartimenti cellulari. Questo permette di capire in modo più approfondito quelli che sono i meccanismi patogenetici che guidano la malattia, fondamentale per trovare terapie sempre più "target-specifiche" e efficaci.

Uno degli svantaggi principali dell'immunoistochimica è correlato al rischio di avere falsi positivi e falsi negativi, legati sia al processo di preparazione del tessuto (fissazione, antigen- retrieval) sia agli anticorpi stessi, che possono essere poco specifici o reagire con altre molecole. Per ovviare a questo problema è importante avere protocolli standardizzati ed effettuare controlli di qualità stringenti.

Un altro limite dell'immunoistochimica è legato alla lettura del tessuto colorato, in quanto questa fase è operatore – dipendente, ovvero ci può essere una certa variabilità di interpretazione del vetrino da parte del patologo che analizza il campione, che richiede una certa esperienza e conoscenza della materia.

5.5 Utilizzo dell'IHC nella glomerulonefrite membranosa

L'immunoistochimica è una tecnica fondamentale dell'iter diagnostico del sospetto di glomerulonefrite membranosa, che presenta segni e sintomi indicativi di malattia renale. Una volta eseguite le colorazioni standard del tessuto, che evidenziano le strutture renali principali, si può procedere alle colorazioni di immunoistochimica che vanno a evidenziare l'espressione di diverse proteine, che possono essere presenti in tutti i compartimenti renali (glomeruli, tubuli, interstizio e vasi). Queste colorazioni, inoltre, permettono di andare a rilevare le molecole driver del danno renale. Le colorazioni più frequenti hanno lo scopo di ricercare le proteine associate all'attivazione del sistema immunitario, come i componenti del complemento, le citochine e gli immunocomplessi.

Inoltre, l'IHC permette di rilevare la presenza di marker specifici coinvolti nella patogenesi della GMN, come la molecola LGALS3BP.

L'espressione di queste molecole all'immunoistochimica permette di correlare con la gravità della malattia, con la prognosi e con la scelta del trattamento, target-specifico.

5.6 Interpretazione di IHC

Una volta ottenuta la colorazione dei tessuti all'immunoistochimica, per andare a leggere correttamente i risultati è necessario un approccio metodico, che prevede la definizione di parametri specifici.

Bisogna tenere conto di diversi parametri:

- Dell'intensità con cui la molecola viene espressa. Ad esempio, può essere suddivisa in lieve (+), moderata (++), severa (+++); la maggiore intensità rispecchia la maggiore espressione della molecola di interesse;

- Della distribuzione della molecola nei tessuti. Per esempio se vi è una maggiore presenza di questa a livello delle strutture glomerulari, tubulari o interstiziali;
- Della localizzazione cellulare. Quindi se si tratta di una espressione di membrana, citoplasmatica o nucleare.

Per interpretare correttamente i risultati ottenuti dalla colorazione immunoistochimica, prima di procedere con la colorazione dei tessuti in esame, è necessario effettuare un controllo positivo. Questo consiste nell'eseguire la colorazione su un tessuto sano specifico in cui si conosce la precisa localizzazione ed espressione della molecola, in modo da prevenire eventuali falsi negativi, dovuti al non funzionamento dell'anticorpo.

È fondamentale paragonare i risultati ottenuti tra di loro, soprattutto identificare le differenze e le uguaglianze di espressione di una data molecola nei diversi stadi di glomerulonefrite membranosa.

La corretta interpretazione è essenziale per la prognosi e l'approccio terapeutico.

6. OBIETTIVO DELLO STUDIO

Questo studio nasce con l'obiettivo di valutare ed eventualmente dimostrare la correlazione tra l'immuno-espressione della molecola LGALS3BP a livello renale e le alterazioni istologiche presenti nelle biopsie renali di pazienti affetti da Glomerulonefrite Membranosa, il tutto correlato alla gravità clinica della malattia.

La proteina LGALS3BP, implicata nelle risposte immunitarie e nell'infiammazione, è emersa come un potenziale biomarcatore nella glomerulonefrite membranosa.

Questo studio, quindi, indaga l'immuno-espressione di LGALS3BP nelle biopsie renali di pazienti affetti da glomerulonefrite membranosa e la correlazione con diversi parametri clinici e di laboratorio, in particolare con l'età, i livelli sierici di

creatinina, proteinuria, ematuria, i livelli di complemento (C3, C1q), e i livelli di IgG, IgA e IgM.

In particolare ci si propone di:

- Verificare se l'espressione di LGALS3BP differisce significativamente tra forme primitive e secondarie, in analogia con quanto osservato nei modelli murini (reni sani negativi vs reni LES-murini fortemente positivi);
- Valutare la correlazione tra lo score di LGALS3BP e indicatori clinici di danno renale (creatinina, proteinuria, ematuria) e di attività immunologica (C3, C1q, IgG, IgA, IgM);
- Analizzare l'espressione di LGALS3BP nei diversi compartimenti renali (glomerulare, tubulare, interstiziale, vascolare) per identificare pattern compartimento-specifici caratteristici delle forme primitive vs secondarie.

7. MATERIALI E METODI

Lo studio è di tipo retrospettivo ed è stato condotto analizzando casi di glomerulonefrite membranosa in pazienti pediatrici diagnosticati presso l'U.O. di Anatomia Patologica dell'Ospedale Pediatrico Giannina Gaslini di Genova nel periodo 2001-2026. Sono stati identificati 24 casi, tutti in età pediatrica (0-18 anni), suddivisi in due gruppi:

- 15 casi di GMN primitiva (pGMN): diagnosi confermata dalla negatività per ANA/anti-dsDNA e per gli anticorpi anti-PLA2R sierici, dall'assenza di criteri clinici per LES o altra malattia sistemica, e dal pattern IHC (positività PLA2R o altro antigene primario, negatività EXT1/EXT2);
- 9 casi di GMN secondaria: di cui 6 casi soddisfano i criteri per la diagnosi di nefrite lupica e presentano morfologia corrispondente alla Classe V ISN/RPS (nefrite lupica membranosa pura). La quasi totalità (>85%) presenta aspetto 'full house' all'immunofluorescenza e positività per ANA e/o anti-dsDNA.

Per ogni paziente sono stati raccolti i seguenti dati clinici: sesso, età all'esordio, proteinuria, ematuria, creatinina sierica, livelli di C3 e C1q, livelli di IgG, IgA e IgM. I dati clinici sono stati forniti dall'U.O. di Nefrologia dell'Ospedale Pediatrico Giannina Gaslini.

7.1 Prelievo e allestimento dei vetrini

Il frammento renale inviato all'Anatomia Patologica per le analisi è stato prelevato mediante biopsia percutanea eco-guidata la quale consiste nell'introduzione di un ago sottile attraverso la pelle, in prossimità dell'area che si vuole prelevare; l'ago viene guidato tramite sonda ecografica all'interno del parenchima renale fino alla zona di interesse, viene prelevato un frustolo di tessuto e inviato in laboratorio in contenitori appositi.

Per essere rappresentativo, e quindi idoneo alla diagnosi, il frammento deve contenere almeno 5-10 glomeruli.

Una volta in laboratorio il tessuto viene fissato, incluso e sezionato, come meglio di seguito specificato.

Fasi per allestire un preparato istologico:

- 1 Prelievo;
- 2 Fissazione;
- 3 Processazione;
- 4 Inclusione;
- 5 Sezionamento e Montaggio;
- 6 Colorazione.

1. Prelievo del materiale, in questo caso sono stati prelevati dei frammenti di tessuto renale con biopsia eco-guidata.
2. Fissazione: è un passaggio fondamentale, che permette di prevenire la decomposizione e mantiene inalterata la struttura del tessuto. Il rischio principale è che il campione prelevato vada incontro ad ischemia con conseguente degradazione del DNA, dell'RNA e autolisi attraverso l'attivazione di enzimi.

Inoltre favorisce la colorazione perché consente ai coloranti di penetrare nei tessuti e di fissarsi a particolari strutture. È stato dimostrato che se la fissazione non avviene nei tempi e nei modi corretti, attraverso i fenomeni di ischemia che si instaurano, si altera l'espressione di diverse molecole quali il Ki-67, il recettore per gli estrogeni o il recettore per il progesterone, alterando il risultato finale col rischio di dare falsi negativi o falsi positivi. Dall'altro lato, anche lasciare il tessuto a fissare per un periodo troppo lungo può andare a danneggiare in modo irreversibile alcuni antigeni/epitopi.

I fissativi sono generalmente distinti in due categorie:

- Fisici: la fissazione del tessuto avviene attraverso il rapido riscaldamento o congelamento del tessuto.
- Chimici: possono agire in due modi: come coagulanti le proteine (acido acetico, alcool etilico) o come non coagulanti le proteine (formalina, tetrossido di osmio).

Il più utilizzato è la formalina (aldeide formica), un fissativo non coagulante, che serve a formare dei ponti metilenici che stabilizzano la struttura molecolare della materia e impediscono il deterioramento. Bisogna ricordare che la formalina è tossica, irritante e cancerogena e non va utilizzata in atmosfera libera, ma con dispositivi adeguati, come le cappe aspiranti.

La fissazione non deve durare più di 18 ore, solitamente avviene over-night.

3. **Processazione:** questa fase avviene attraverso il processatore, il quale esegue una serie di passaggi con alcool crescenti e histo-clear per disidratare e togliere i lipidi al preparato, permettendo la fase successiva di inclusione in paraffina. Anche questa fase ha una durata over-night.
4. **Inclusione:** dopo la processazione i campioni disidratati e privati dei lipidi vengono messi in infusione nella paraffina liquida, formata da una miscela di lunghe catene carboniose. Successivamente avviene l'inclusione in paraffina, attraverso la quale si ottengono dei blocchetti rigidi di paraffina all'interno della quale è contenuto il tessuto che può essere sezionato.
L'inclusione non è necessaria se è avvenuta la fissazione fisica.
5. **Sezionamento e Montaggio:** il blocchetto di paraffina viene tagliato con il Microtomo, strumento specifico, in sezioni sottili di 3 micron di spessore, con l'obiettivo di ottenere un monostrato di cellule che verranno visualizzate alla microscopia ottica. In base alle esigenze e al tipo di tessuto le sezioni possono essere tagliate con uno spessore variabile da 1 a 7 micron. Le sezioni ottenute vengono poi montate sul vetrino portaoggetti.
6. **Colorazione:** i vetrini così ottenuti vengono definiti "sezioni bianche", le quali vengono colorate in modo tale da aumentare il contrasto delle diverse componenti cellulari e tissutali e migliorare la leggibilità. I coloranti possono essere: sintetici o naturali, acidi o basici.

La colorazione standard utilizzata è l'Ematossilina-Eosina. Essa è una colorazione su base acquosa nella quale l'eosina (colorante acido) lega molecole basiche, come le proteine citoplasmatiche, mentre l'ematossilina (colorante basico) lega molecole acide, come il DNA. Prima di essere colorato il vetrino deve essere deparaffinato e reidratato (alcool decrescenti e histo-clear).

In base al tessuto in esame e alle caratteristiche/strutture che si vogliono visualizzare si possono usare diversi tipi di colorazioni speciali, le quali sfruttano le caratteristiche chimico- fisiche del tessuto per risolvere parti della cellula o parti del tessuto.

Le biopsie renali dei pazienti dello studio sono state sottoposte a diverse colorazioni che vengono eseguite di default, secondo alcune linee guida specifiche per il tipo di tessuto, in modo tale da mettere in evidenza glomeruli, tubuli, interstizio, vasi ed eventuali alterazioni a carico delle suddette strutture.

Nel caso della glomerulonefrite membranosa, le colorazioni sono:

- Ematossilina-eosina: colorazione standard, che evidenzia le strutture principali dei tessuti (cellule e architettura);
- PAS: evidenzia bene le alterazioni mesangiali e endocapillari;
- Masson Trichrome: permette di vedere eventuali foci di necrosi fibrinoide, sclerosi glomerulare e interstiziale;
- PASM (Jones Silver): mette in evidenza lo spessore della parete dei capillari e eventuali neoformazioni a livello della membrana basale (es. microspikes e domes).

In seguito alla colorazione dei vetrini, questi sono stati esaminati alla microscopia ottica, attraverso la quale sono state descritte le strutture renali e le eventuali alterazioni che hanno permesso di fare diagnosi di glomerulonefrite membranosa.

I referti delle diagnosi sono stati recuperati dall'archivio dell'Anatomia Patologica dell'Ospedale Gaslini.

7.2 Immunoistochimica per LGALS3BP

Per la ricerca dell'espressione di LGALS3BP è stato utilizzato l'anticorpo monoclonale murino Mac-2BP (E-8) (Santa Cruz Biotechnology, sc-74443), diretto contro gli aminoacidi 84-383 della sequenza di Mac-2BP umana. Lo stesso anticorpo è applicabile a tessuto murino, consentendo la validazione comparativa tra casistica umana e modello animale MRL/lpr.

L'anticorpo ha un peso molecolare di 90 kDa ed è pervenuto all'interno di una fiala contenente 200 µg di catena leggera kappa IgG1 in 1,0 ml di PBS con < 0,1%

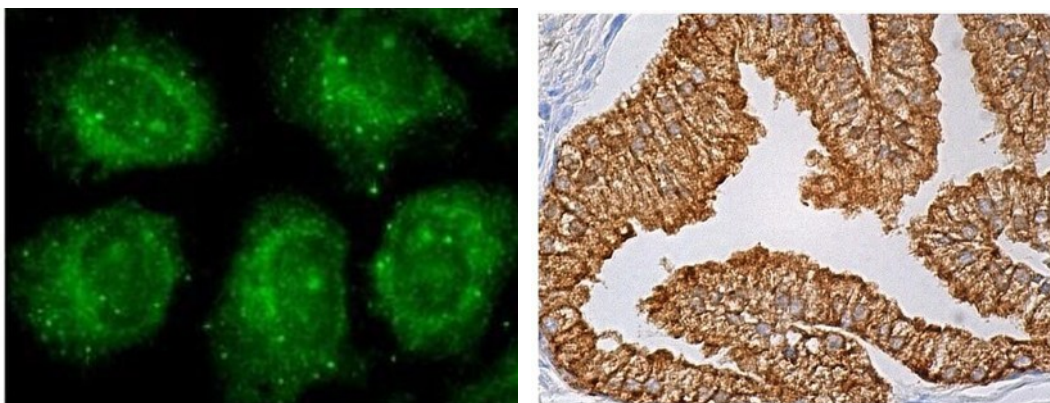
azoturo di sodio e gelatina allo 0,1%; Mac-2BP (E-8) è disponibile coniugato all'agarosio.

L'utilizzo di Mac-2BP (E-8) è consigliato per il rilevamento della proteina LGALS3BP nei tessuti di origine murina e umana mediante Western Blotting (diluizione iniziale 1:100, intervallo di diluizione 1:100-1:1000), immunoprecipitazione [1-2 µg per 100-500 µg di proteine totali (1 ml di lisato cellulare)], immunofluorescenza (diluizione iniziale 1:50, diluizione intervallo 1:50-1:500), immunoistochimica (diluizione iniziale 1:50, intervallo di diluizione 1:50-1:500) e ELISA in fase solida (diluizione iniziale 1:30, intervallo di diluizione 1:30-1:3000).

Infine, l'anticorpo deve essere conservato a 4°, non deve essere congelato e ha una validità di un anno dalla data di spedizione.

Prima di procedere alla colorazione delle biopsie renali l'anticorpo è stato testato su un frammento di prostata sana di un individuo adulto, utilizzato come controllo positivo.

La colorazione è avvenuta correttamente e ha mostrato una positività citoplasmatica e di membrana delle cellule ghiandolari prostatiche.



Una volta effettuato il controllo positivo è stata eseguita la colorazione immunoistochimica sulle sezioni bianche, precedentemente tagliate, dei 24 pazienti dello studio.

Le fasi principali seguite durante il processo di colorazione consistono in: deparaffinatura e idratazione, smascheramento antigenico, inibizione degli enzimi endogeni, incubazione con anticorpi specifici primari e secondari marcati, esecuzione dei controlli, controcolorazione, montaggio e infine osservazione al microscopio.

Deparaffinatura e idratazione

Come per ottenere le colorazioni standard, anche in questo caso il materiale prelevato deve essere fissato, solitamente con formalina, incluso in paraffina e sezionato. Le sezioni così ottenute vengono posizionate sui vetrini porta-oggetto, deparaffinate e reidratate.

Smascheramento antigenico

La paraffina è il metodo di inclusione più frequentemente utilizzato per i tessuti istologici, ma alcuni antigeni non sopravvivono alla fissazione con la formaldeide, spesso gli epitopi (antigeni) che legano gli anticorpi possono essere mascherati dai legami crociati e dai ponti di metilene che si formano, perciò è necessario lo smascheramento dell'epitopo (antigen retrieval) per permettere una buona interpretazione dell'IHC.

Vengono utilizzati due metodi per il recupero dell'antigene:

- HIER (Heat Induced Epitope Retrieval): vengono utilizzati il calore o la pressione per ripristinare l'antigenicità. È quello maggiormente usato e comporta il riscaldamento dei campioni. In questo caso l'efficacia dipende dal pH del tampone usato;
- PIER (Protease-Induced Epitope Retrieval): gli enzimi servono come metodo principale per ripristinare l'antigenicità. Il meccanismo con cui agiscono non è completamente chiaro, però di base gli enzimi scindono i legami crociati proteici e smascherano gli epitopi bersaglio. Tra le proteasi più comuni rientrano la proteinasi K, la tripsina e la pepsina. Questo secondo metodo risulta più difficile da controllare e quindi meno utilizzato.

Inibizione degli enzimi endogeni

Lo step successivo prevede l'eliminazione delle proteine in eccesso per ridurre le colorazioni di fondo indesiderate e quindi ridurre il rischio di ottenere falsi positivi, ovvero che l'anticorpo primario si leghi in modo non specifico; infatti, la reazione substrato-cromogeno utilizzata non può distinguere tra l'enzima che fa parte del sistema sperimentale e l'attività enzimatica presente nel campione. Viene effettuato utilizzando una soluzione proteica.

Incubazione con anticorpi specifici primari e secondari marcati.

Successivamente si procede con l'incubazione dell'anticorpo primario: il vetrino viene incubato con un anticorpo primario specifico per l'antigene di interesse. Gli anticorpi utilizzati possono essere:

- Policlonali: gli anticorpi legano diversi epitopi di un solo antigene. In genere sono ottenuti da sperimentazioni animali, attraverso la stimolazione ripetitiva di un antigene.
- Monoclonali: l'anticorpo reagisce con un solo epitopo di un singolo antigene. Ottenuto da un singolo ibridoma che produce anticorpi.

Questo passaggio consente all'anticorpo di legarsi al suo antigene specifico nel tessuto.

Nel caso specifico di questo studio si utilizza l'anticorpo monoclonale Mac-2BP, di origine murina, che ha come bersaglio specifico la molecola di LGALS3BP.

La fase successiva viene definita di immunocolorazione e ha come scopo finale quello di visualizzare al microscopio ottico l'interazione anticorpo-antigene specifico.

Per questo obiettivo si utilizza una metodica indiretta che prevede l'uso di un anticorpo secondario che va a legare l'anticorpo primario del complesso anticorpo-antigene formatosi in precedenza. L'anticorpo secondario per essere rilevato è coniugato ad un enzima (come la perossidasi di rafano o la fosfatasi alcalina) o ad un marcatore fluorescente, che permettono di rendere visibile il complesso

anticorpo-antigene attraverso delle reazioni colorimetriche nel primo caso, o mediante fluorescenza nel secondo caso.

Per il rilevamento colorimetrico viene aggiunto un substrato che l'enzima converte in un prodotto colorato visibile nel sito dell'interazione antigene-anticorpo. In alcuni casi si utilizza una metodica diretta, che ha lo stesso principio della precedente, con la differenza che gli enzimi o le molecole fluorescenti vengono coniugate direttamente all'anticorpo primario.

Esecuzione del Controllo

Per assicurare l'accuratezza dei risultati è fondamentale effettuare alcuni controlli, sia della procedura che dei reagenti.

I controlli vengono eseguiti sull'anticorpo primario per accertare che la colorazione positiva sia il risultato del suo legame specifico con il relativo antigene e non con altre molecole. È importante che i campioni di controllo siano sottoposti alla stessa fissazione e processazione del campione da testare, in modo che una mancata colorazione del campione non possa essere imputabile a fissazione impropria (falsi negativi).

È bene che vengano allestite sezioni di controllo per ogni antigene e che non vengano utilizzati preparati ottenuti commercialmente. La presenza di cellule o tessuti di controllo positivo nello stesso preparato in esame rappresentano il controllo interno, che garantisce la massima omogeneità di fissazione e colorazione.

Controcolorazione

Consiste nel contro-colorare il campione con ematossilina-eosina, in modo tale da distinguere più facilmente nella fase successiva il complesso antigene-anticorpo, rispetto alle strutture circostanti.

Montaggio e Osservazione al microscopio

Infine il vetrino viene montato e coperto con un copri-oggetto, poi può essere esaminato con la microscopia ottica: la localizzazione, l'intensità e il modello di colorazione forniscono informazioni sulla presenza e sulla distribuzione dell'antigene all'interno del tessuto. Infatti, quando viene aggiunto un cromogeno

esso reagisce con l'enzima e precipita nella sede istologica dell'antigene. Il cromogeno precipitato indica la presenza dell'antigene e l'intensità della reazione è proporzionale alla quantità di antigene presente. Le cellule che non contengono antigene e le strutture circostanti saranno contrastate mediante la controcolorazione (ematossilina-eosina).

L'aspetto più difficile dell'IHC è la valutazione del prodotto finale.

Durante la fase di lettura dei risultati è importante tenere conto della possibile presenza di artefatti, che vanno ad interferire con una corretta interpretazione dei risultati. Si possono avere diversi tipi di artefatti: da background, precipitanti, tissutali e di colorazione.

Una volta che i 24 casi dello studio sono stati colorati, sono stati osservati al microscopio ottico.

7.3 Score LGALS3BP

Durante l'analisi dei vetrini è stata esaminata l'immuno-espressione della proteina LGALS3BP, in particolare è stato definito uno Score che prende in considerazione l'intensità, il tipo di distribuzione e la localizzazione di LGALS3BP nel tessuto renale.

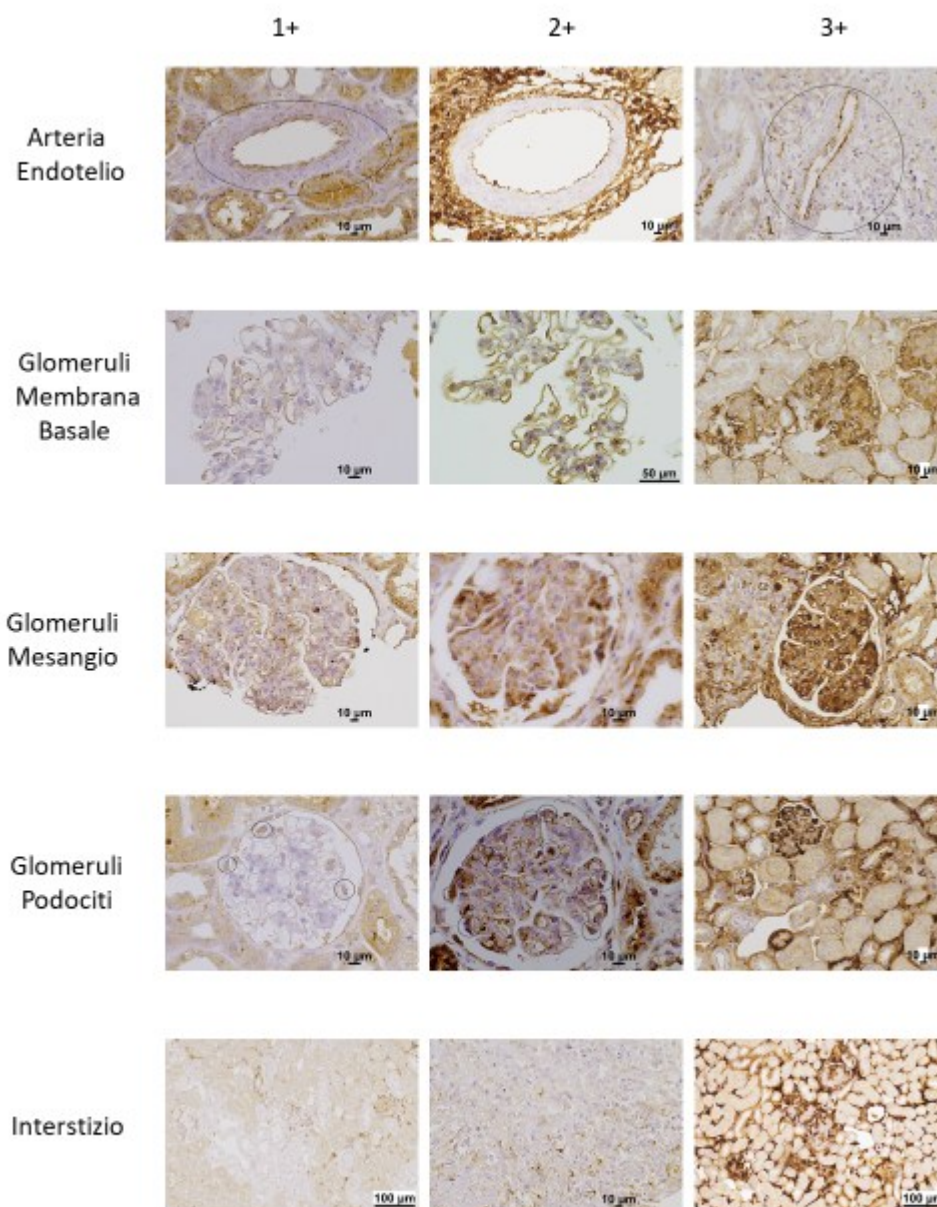
Si è analizzata l'espressione di LGALS3BP a livello dei seguenti compartimenti:

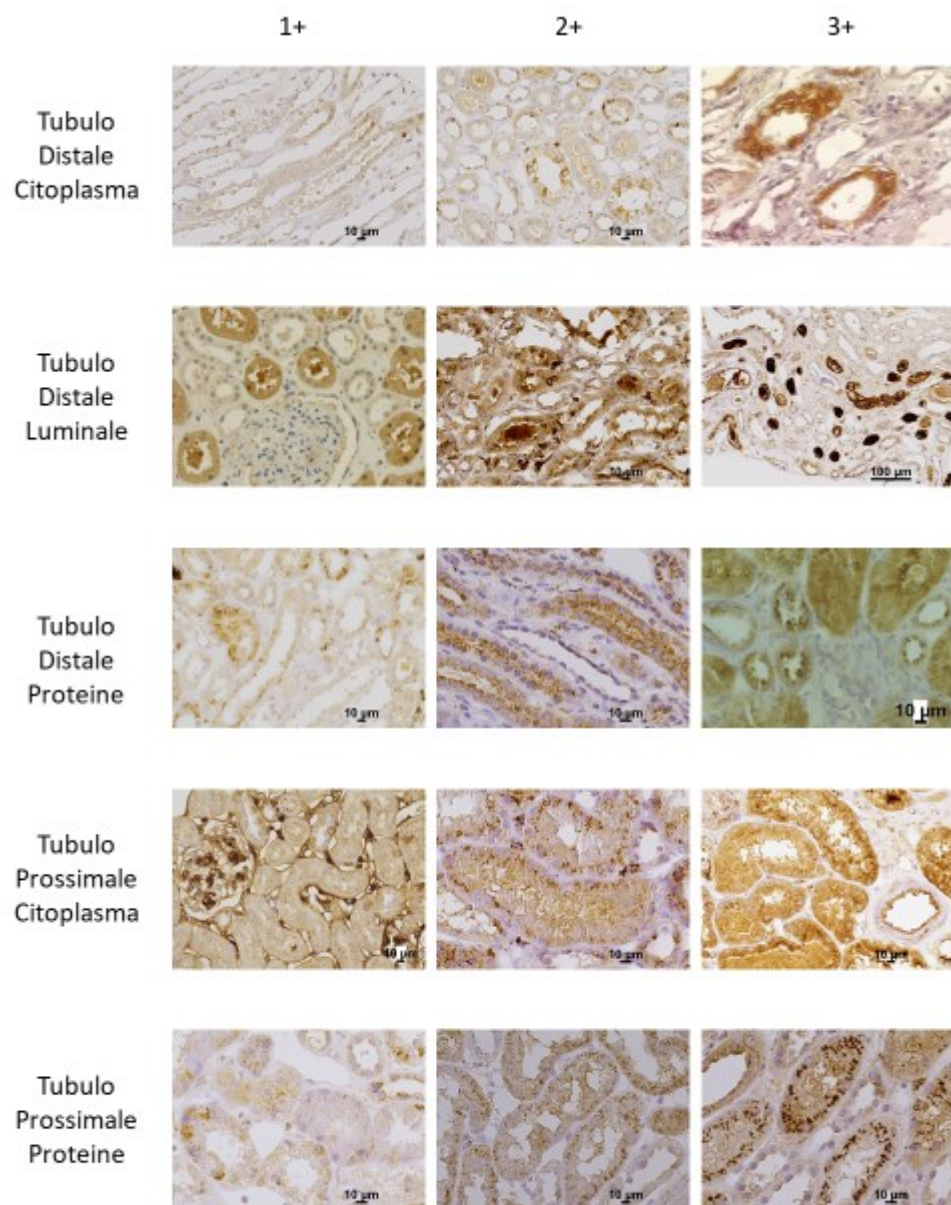
- 1 Arteria – Endotelio
- 2 Glomeruli – Membrana Basale
- 3 Glomeruli – Mesangio
- 4 Glomeruli – Podociti
- 5 Interstizio
- 6 Tubulo Distale – Citoplasma
- 7 Tubulo Distale – Luminale
- 8 Tubulo Distale – Proteine
- 9 Tubulo Prossimale – Citoplasma
- 10 Tubulo Prossimale – Proteine

Per ogni compartimento analizzato è stato assegnato un punteggio da 0 a 3, in base all'intensità e al grado di distribuzione della proteina.

Infine i punteggi assegnati ad ogni sottoclasse sono stati sommati, il punteggio finale corrisponde allo Score di LGALS3BP e può andare da 0 (nessuna espressione di LGALS3BP) ad un massimo di 33.

Di seguito viene riportato un Panel contenente le immagini più significative degli score assegnati, in modo tale da rendere replicabile l'assegnazione di ciascun punteggio.





7.4 Validazione su modello murino

Inoltre è stato effettuato uno studio su modello murino per validare il ruolo di LGALS3BP come possibile marcatore di danno infiammatorio renale. Non potendo ovviamente utilizzare una coorte umana come controlli sani, ci siamo orientati verso il modello murino.

Per gli esperimenti è stato utilizzato il modello murino spontaneo di lupus eritematoso sistemico rappresentato dai topi MRL/lpr. Questo ceppo sviluppa una malattia autoimmune lupus-like dovuta alla mutazione lpr del gene Fas, che determina un difetto dell'apoptosi linfocitaria e il conseguente accumulo di linfociti autoreattivi. La progressiva perdita della tolleranza immunologica porta alla produzione di autoanticorpi, alla formazione di immunocomplessi e allo sviluppo di una glomerulonefrite immunomediata che riproduce numerose caratteristiche della nefrite lupica umana

I topi MRL/lpr sviluppano spontaneamente le prime manifestazioni autoimmuni a partire dalle 6–8 settimane di età, con comparsa di linfadenopatia, splenomegalia e autoanticorpi circolanti. Il coinvolgimento renale diventa evidente tra le 10 e le 12 settimane, mentre una nefrite lupica conclamata si osserva generalmente tra le 14 e le 16 settimane di età, caratterizzata da proteinuria progressiva, deposizione di immunocomplessi e danno glomerulare.

8. RISULTATI

8.1 Risultati modello murino

Il sistema di scoring LGALS3BP è stato applicato a 10 topi: 3 sani (controllo) e 7 affetti da LES indotto sperimentalmente.

Come si vede dalla tabella, la media di espressione di LGALS3BP è molto superiore nei topi malati (in marroncino) rispetto a quelli sani (in azzurro). La media dello score totale di espressione di LGALS3BP nei topi sani era di 3,7 e quella dei topi malati era di 14.

Mouse ID	Sub-endoteliale arteriosa	Mesangiale	Podocitaria	Membrana Basale Glomerulare	Interstiziale	Tubulare Prossimale Citoplasmatica	Tubulare Prossimale Proteica	Tubulare Distale Citoplasmatica	Tubulare Distale Proteica	Tubulare Distale Luminale	Totale	Media
1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	3,7
2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	5	
3	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	4	
4	1	2	3	3	1	1	1	1	0	1	14	14
5	3	2	3	2	1	1	2	1	0	2	17	
6	3	1	3	2	2	1	1	1	0	1	15	
7	1	1	2	2	0	1	1	1	0	0	9	
8	2	2	2	3	2	2	2	1	0	1	17	
9	2	2	2	3	1	1	1	1	0	0	13	
10	1	1	2	3	2	1	2	1	0	0	13	

Parametro LGAL	Topi sani (n=3) Media +/- DS	Topi malati LES (n=7) Media +/- DS	p-value	Sig.
Glomerulo				
MBG	1.00 +/- 0.00	2.57 +/- 0.54	0.0157	*
Podociti	0.67 +/- 0.58	2.43 +/- 0.54	0.0168	*
Mesangio	0.67 +/- 0.58	1.57 +/- 0.54	0.0778	~
Tubuli				
TP prot.	0.00 +/- 0.00	1.43 +/- 0.54	0.0157	*
TP cito.	0.33 +/- 0.58	1.14 +/- 0.38	0.0486	*
TD prot.	0.00 +/- 0.00	0.00 +/- 0.00	1.0000	ns
TD cito.	0.00 +/- 0.00	1.00 +/- 0.00	0.0043	**
TD lum.	0.00 +/- 0.00	0.71 +/- 0.76	0.1514	ns
Vasi				
Arterie	0.67 +/- 0.58	1.86 +/- 0.90	0.0866	~
Interstizio				
Interstizio	0.33 +/- 0.58	1.29 +/- 0.76	0.1165	ns
Totale				
LGAL tot.	0.37 +/- 0.15	1.40 +/- 0.28	0.0218	*

Tabella 1. Confronto Mann-Whitney U: topi sani (n=3) vs topi malati LES (n=7). Media +/- DS. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ~ $p < 0.10$ (tendenza); ns = non significativo. Vedere Figura 1 (heatmap) per la rappresentazione visiva individuale.

Si sono riscontrate differenze statisticamente significative tra i topi sani e i topi malati. Di seguito i principali risultati:

- Parametri significativi ($p < 0.05$): TD citoplasma ($p = 0.004$, **) — assente in tutti i topi sani, presente in tutti i malati. MBG ($p = 0.016$), Podocitaria ($p = 0.017$), TP proteine ($p = 0.016$), TP citoplasma ($p = 0.049$).
- Tendenza statistica ($p < 0.10$): Arterie ($p = 0.087$) e Mesangio ($p = 0.078$): il segnale biologico è presente ma il basso numero (3 sani) limita la potenza del test.
- Score totale LGALS3BP: differenza altamente significativa ($p = 0.022$). Topi sani: 3.67 ± 1.25 ; topi malati: 14.00 ± 2.56 . Il sistema discrimina chiaramente salute e malattia.
- Comparto glomerulare: il più compromesso nei malati. MBG: 1.00 (sani) vs 2.57 (malati); Podocitaria: 0.67 vs 2.43.

In conclusione si evince come il sistema LGALS3BP stratifica in modo statisticamente significativo tra topi sani e topi malati LES su più parametri e sul totale, validando istologicamente il ruolo di LGALS3BP come marker di danno infiammatorio renale, validando dunque il modello murino.

8.2 Caratteristiche epidemiologiche della popolazione complessiva

La popolazione in studio comprendeva 24 pazienti pediatrici affetti da glomerulonefrite membranosa (GMN) sottoposti a biopsia renale presso l'Ospedale Pediatrico Giannina Gaslini nel periodo compreso tra il 2001 e il 2026.

L'età dei pazienti al momento della diagnosi variava da 0,7 a 17,8 anni, con un'età media di $10,6 \pm 5,2$ anni e una mediana di 12,1 anni (IQR 6,6–14,7). La distribuzione anagrafica evidenzia come la patologia possa manifestarsi lungo tutto l'arco dell'età pediatrica, dall'infanzia precoce fino all'adolescenza avanzata.

La popolazione risultava perfettamente bilanciata dal punto di vista del sesso, essendo costituita da 12 maschi (50,0%) e 12 femmine (50,0%).

Dal punto di vista eziopatogenetico, 15 casi (62,5%) erano classificati come glomerulonefrite membranosa primitiva (pGMN), mentre 9 casi (37,5%) rappresentavano forme secondarie (sGMN), prevalentemente associate a lupus eritematoso sistemico.

Tabella 1. Caratteristiche epidemiologiche della popolazione complessiva (n = 24)

Variabile	Valore
Numero totale pazienti	24
Età media $\pm$ DS (anni)	10,6 $\pm$ 5,2
Mediana età (IQR)	12,1 (6,6–14,7)
Range età (anni)	0,7–17,8
Maschi	12 (50,0%)
Femmine	12 (50,0%)
Forme primitive	15 (62,5%)
Forme secondarie	9 (37,5%)

Distribuzione per classi di età

La distribuzione per fasce di età mostra una relativa omogeneità lungo tutto il periodo pediatrico, con una lieve prevalenza dei casi nelle fasce adolescenziali.

Tabella 2. Distribuzione per classi di età

Classe di età	Casi	%
< 5 anni	5	20,8
5–10 anni	6	25,0
10–15 anni	7	29,2
> 15 anni	6	25,0

La fascia compresa tra 10 e 15 anni rappresentava il gruppo maggiormente rappresentato (29,2%). Nel complesso, il 54,2% dei pazienti aveva più di 10 anni al momento della diagnosi.

Distribuzione per sesso

Contrariamente a quanto osservato nelle grandi casistiche adulte, la presente serie non evidenzia una netta predominanza di uno dei due sessi. Tale dato potrebbe riflettere sia la limitata numerosità campionaria sia la maggiore eterogeneità eziologica delle forme pediatriche.

Distribuzione eziologica

La prevalenza delle forme primitive conferma il ruolo predominante dei meccanismi autoimmuni podocitari anche nell'età pediatrica. Tuttavia, la quota relativamente elevata di forme secondarie (oltre un terzo dei casi) rappresenta una caratteristica peculiare dell'età evolutiva rispetto alle casistiche adulte.

Confronto epidemiologico tra forme primitive e secondarie

Tabella 3. Caratteristiche epidemiologiche secondo l'eziologia

Variabile	pGMN (n=15)	sGMN (n=9)
Età media (anni)	9,5	12,4
Età mediana (anni)	9,6	12,3
Maschi	9 (60,0%)	3 (33,3%)
Femmine	6 (40,0%)	6 (66,7%)

Le forme secondarie tendevano a manifestarsi in età leggermente più avanzata rispetto alle forme primitive (12,4 vs 9,5 anni). Inoltre, mentre le forme primitive mostravano una lieve prevalenza maschile, le forme secondarie risultavano prevalentemente femminili, in accordo con l'epidemiologia del lupus eritematoso sistemico.

8.3 Caratteristiche cliniche della popolazione in studio

La popolazione analizzata comprendeva 24 pazienti pediatrici affetti da glomerulonefrite membranosa, di cui 15 con forma primitiva e 9 con forma secondaria. I dati clinico-laboratoristici erano disponibili con numerosità variabile a seconda del parametro considerato.

La proteinuria all'esordio era documentata in 23 pazienti e rappresentava il principale elemento clinico di presentazione. Il valore medio era pari a $2,85 \pm 2,88$ g/L, con mediana di 1,27 g/L (IQR 0,85–4,37; range 0,10–10,10). Sette pazienti presentavano proteinuria $>3,5$ g/L, compatibile con range nefrosico.

L'ematuria era presente in 18/24 pazienti (75,0%). Lo score medio di ematuria era $1,88 \pm 1,48$, con mediana 2 (IQR 0,75–3). Otto pazienti presentavano ematuria di grado elevato, definita come score ≥ 3 .

La creatinina sierica all'esordio era disponibile in 23 pazienti. Il valore medio era $0,57 \pm 0,40$ mg/dL, con mediana 0,48 mg/dL (IQR 0,30–0,69). L'eGFR era disponibile in 16 pazienti e risultava mediamente conservato, con valore medio di $123,31 \pm 42,59$ mL/min/1,73 m² e mediana 127,50 (IQR 94,50–151,50). Solo 2/16 pazienti presentavano eGFR <90 mL/min/1,73 m² all'esordio.

Tabella 1. Caratteristiche cliniche all'esordio

Variabile	Valore
Proteinuria, n valutabili	23
Proteinuria, media $\pm$ DS	2,85 $\pm$ 2,88 g/L
Proteinuria, mediana (IQR)	1,27 (0,85–4,37) g/L
Proteinuria, range	0,10–10,10 g/L
Proteinuria >3,5 g/L	7/23 (30,4%)
Ematuria presente	18/24 (75,0%)
Ematuria score, media $\pm$ DS	1,88 $\pm$ 1,48
Ematuria score, mediana (IQR)	2,00 (0,75–3,00)
Ematuria score ≥ 3	8/24 (33,3%)
Creatinina, n valutabili	23
Creatinina, media $\pm$ DS	0,57 $\pm$ 0,40 mg/dL
Creatinina, mediana (IQR)	0,48 (0,30–0,69) mg/dL
eGFR, n valutabili	16
eGFR, media $\pm$ DS	123,31 $\pm$ 42,59 mL/min/1,73 m ²
eGFR, mediana (IQR)	127,50 (94,50–151,50)
eGFR <90 mL/min/1,73 m ²	2/16 (12,5%)

Confronto tra forme primitive e secondarie

Le forme primitive mostravano una proteinuria media più elevata rispetto alle forme secondarie: $3,57 \pm 3,22$ g/L vs $1,51 \pm 1,48$ g/L. Anche la quota di pazienti con proteinuria $>3,5$ g/L era maggiore nelle forme primitive (6/15, 40,0%) rispetto alle secondarie (1/8, 12,5%). La differenza, tuttavia, non raggiungeva la significatività statistica.

La creatinina sierica risultava lievemente superiore nelle forme secondarie, mentre l'eGFR medio era inferiore rispetto alle forme primitive. Anche in questo caso, tuttavia, le differenze non erano statisticamente significative, verosimilmente anche per la limitata numerosità della casistica.

Tabella 2. Confronto clinico all'esordio tra pGMN e sGMN

Variabile	pGMN	sGMN	p
Proteinuria, n	15	8	—
Proteinuria, media $\pm$ DS	$3,57 \pm 3,22$	$1,51 \pm 1,48$	0,149
Proteinuria, mediana (IQR)	2,34 (0,99–6,31)	1,13 (0,64–1,55)	0,149
Proteinuria $>3,5$ g/L	6/15 (40,0%)	1/8 (12,5%)	0,345
Ematuria presente	12/15 (80,0%)	6/9 (66,7%)	0,635
Ematuria score, media $\pm$ DS	$2,00 \pm 1,46$	$1,67 \pm 1,58$	0,604
Ematuria score ≥ 3	6/15 (40,0%)	2/9 (22,2%)	0,657
Creatinina, media $\pm$ DS	$0,54 \pm 0,42$	$0,64 \pm 0,39$	0,302
Creatinina, mediana (IQR)	0,44 (0,28–0,56)	0,57 (0,45–0,74)	0,302
eGFR, media $\pm$ DS	$130,75 \pm 40,22$	$101,00 \pm 47,47$	0,249
eGFR, mediana (IQR)	135,00 (102,50–160,50)	114,00 (79,00–136,00)	0,249

Evoluzione clinica in 6 mesi

A 6 mesi, la proteinuria risultava disponibile in 20 pazienti. Il valore medio si riduceva a $0,97 \pm 1,70$ g/L, con mediana 0,30 g/L (IQR 0,21–0,84). Dodici pazienti su 20 (60,0%) presentavano proteinuria $<0,5$ g/L.

La creatinina media a 6 mesi era $0,64 \pm 0,39$ mg/dL, con mediana 0,58 mg/dL. L'eGFR medio era $113,72 \pm 41,95$ mL/min/1,73 m².

Tabella 3. Caratteristiche cliniche a 6 mesi

Variabile	Valore
Proteinuria, n valutabili	20
Proteinuria, media $\pm$ DS	$0,97 \pm 1,70$ g/L
Proteinuria, mediana (IQR)	0,30 (0,21–0,84) g/L
Proteinuria $<0,5$ g/L	12/20 (60,0%)
Proteinuria $>3,5$ g/L	1/20 (5,0%)
Creatinina, media $\pm$ DS	$0,64 \pm 0,39$ mg/dL
Creatinina, mediana (IQR)	0,58 (0,35–0,74) mg/dL
eGFR, media $\pm$ DS	$113,72 \pm 41,95$ mL/min/1,73 m ²
eGFR, mediana (IQR)	114,50 (84,12–138,75)

Evoluzione clinica a 12 mesi

A 12 mesi, la proteinuria era disponibile in 21 pazienti. Il valore medio era $0,77 \pm 1,23$ g/L, con mediana 0,26 g/L (IQR 0,10–1,04). Quattordici pazienti su 21 (66,7%) presentavano proteinuria $<0,5$ g/L.

La creatinina sierica media a 12 mesi era $0,65 \pm 0,39$ mg/dL, mentre l'eGFR medio era $111,53 \pm 42,64$ mL/min/1,73 m².

Tabella 4. Caratteristiche cliniche a 12 mesi

Variabile	Valore
Proteinuria, n valutabili	21
Proteinuria, media $\pm$ DS	0,77 $\pm$ 1,23 g/L
Proteinuria, mediana (IQR)	0,26 (0,10–1,04) g/L
Proteinuria <0,5 g/L	14/21 (66,7%)
Proteinuria >3,5 g/L	2/21 (9,5%)
Creatinina, media $\pm$ DS	0,65 $\pm$ 0,39 mg/dL
Creatinina, mediana (IQR)	0,52 (0,38–0,75) mg/dL
eGFR, media $\pm$ DS	111,53 $\pm$ 42,64 mL/min/1,73 m ²
eGFR, mediana (IQR)	119,00 (75,00–143,00)

Tabella 5. Andamento della proteinuria nel tempo

Tempo	n valutabili	Media $\pm$ DS	Mediana (IQR)	Proteinuria <0,5 g/L	Proteinuria >3,5 g/L
Esordio	23	2,85 $\pm$ 2,88	1,27 (0,85–4,37)	—	7/23 (30,4%)
6 mesi	20	0,97 $\pm$ 1,70	0,30 (0,21–0,84)	12/20 (60,0%)	1/20 (5,0%)
12 mesi	21	0,77 $\pm$ 1,23	0,26 (0,10–1,04)	14/21 (66,7%)	2/21 (9,5%)

8.4 Caratteristiche istopatologiche della casistica ed espressione di LGALS3BP

La casistica comprendeva 24 biopsie renali pediatriche con diagnosi di glomerulonefrite membranosa. Tutti i casi sono stati rivalutati mediante microscopia ottica, immunofluorescenza e immunoistochimica per LGALS3BP.

Il numero medio di glomeruli valutabili per biopsia era adeguato per la caratterizzazione morfologica completa e per la valutazione immunoistochimica.

Dal punto di vista morfologico, la maggior parte dei casi apparteneva agli stadi iniziali o intermedi della classificazione di Ehrenreich e Churg.

Tabella 1. Distribuzione degli stadi istologici

Stadio	n	%
I	10	41,7
II	7	29,2
III	1	4,2
IV	6	25,0

La distribuzione degli stadi evidenzia una predominanza delle lesioni precoci (stadi I-II), che complessivamente rappresentano il 70,8% della popolazione studiata. Gli stadi avanzati (III-IV) erano presenti nel 29,2% dei casi.

Questo dato è coerente con la pratica clinica pediatrica, dove la biopsia viene generalmente eseguita in presenza di alterazioni urinarie persistenti e prima dello sviluppo di una significativa compromissione funzionale renale.

8.5 Espressione immunoistochimica di LGALS3BP

L'espressione totale di LGALS3BP mostrava un'ampia variabilità interindividuale.

Tabella 1. Score totale di LGALS3BP

Parametro	Valore
Numero casi	24
Media $\pm$ DS	5,92 $\pm$ 3,45
Mediana	5
Range	2–14

Lo score totale mostrava una distribuzione eterogenea, suggerendo una significativa variabilità biologica dell'attivazione immunitaria locale tra i diversi pazienti.

Distribuzione compartimentale dell'espressione di LGALS3BP

L'analisi dei singoli compartimenti renali ha evidenziato una distribuzione non uniforme della proteina.

Tabella 2. Espressione media di LGALS3BP nei diversi compartimenti renali

Compartimento	Score medio
Tubulo prossimale proteico	1,17
Podociti	0,79
Tubulo distale proteico	0,67
Membrana basale glomerulare	0,63
Tubulo prossimale citoplasmatico	0,63
Endotelio arterioso	0,58
Tubulo distale citoplasmatico	0,54
Tubulo distale luminale	0,50
Mesangio	0,29
Interstizio	0,17

L'espressione risultava particolarmente intensa nei compartimenti tubulari, soprattutto nel citoplasma e nel contenuto proteico del tubulo prossimale, mentre il compartimento interstiziale mostrava livelli generalmente bassi.

A livello glomerulare la positività interessava prevalentemente podociti e membrana basale glomerulare, mentre il coinvolgimento mesangiale era più limitato.

Confronto tra forme primitive e secondarie

L'analisi comparativa ha evidenziato una maggiore espressione complessiva di LGALS3BP nelle forme secondarie.

Tabella 3. Score totale di LGALS3BP nelle forme primitive e secondarie

Gruppo	n	Media $\pm$ DS	Mediana
GMN primitiva	15	4,27	4
GMN secondaria	9	8,67	8

Le forme secondarie presentavano uno score totale di LGALS3BP circa doppio rispetto alle forme primitive.

Questa osservazione rappresenta uno dei risultati più rilevanti dello studio e suggerisce una maggiore attivazione immunitaria locale nei casi associati a patologia autoimmune sistemica.

Distribuzione compartimentale nelle forme primitive e secondarie

Tabella 4. Espressione compartimentale di LGALS3BP nelle forme primitive e secondarie

Compartimento	pGMN	sGMN
Membrana basale glomerulare	0,53	0,78
Podociti	0,80	0,78
Mesangio	0,13	0,56
Interstizio	0,07	0,33

Le differenze più evidenti riguardavano:

- Il compartimento mesangiale;
- Il compartimento interstiziale;
- La membrana basale glomerulare.

L'espressione podocitaria risultava invece sostanzialmente sovrapponibile tra i due gruppi.

Questo dato suggerisce che nelle forme primitive LGALS3BP sia prevalentemente associato al danno podocitario, mentre nelle forme secondarie la sua espressione coinvolga più diffusamente il microambiente glomerulare e interstiziale.

8.6 Correlazioni tra clinica, istopatologia ed espressione di LGALS3BP

Le associazioni tra variabili cliniche, istopatologiche ed espressione immunoistochimica di LGALS3BP sono state analizzate mediante test non parametrici, considerata la numerosità limitata della coorte e la natura ordinale di molte variabili istologiche e immunoistochimiche.

Le correlazioni tra variabili continue o ordinali sono state valutate mediante coefficiente di correlazione di Spearman (ρ). Il confronto tra due gruppi indipendenti è stato eseguito mediante test di Mann–Whitney U. Le variabili categoriche sono state analizzate mediante test esatto di Fisher. È stato considerato statisticamente significativo un valore di $p < 0,05$. I risultati con p compreso tra 0,05 e 0,10 sono stati considerati tendenze statistiche esplorative.

Tabella 1. Correlazioni principali dello score totale di LGALS3BP

Variabile	n	Spearman ρ	p
Stadio istologico	24	0,703	0,0001
IgA score	23	0,590	0,0030
IgG score	23	-0,439	0,0361
C1q score	23	0,382	0,0725
eGFR esordio	16	-0,458	0,0746
eGFR 12 mesi	17	-0,422	0,0914
% IFTA	24	0,346	0,0973
Proteinuria esordio	23	-0,215	0,3241
Ematuria esordio	24	-0,154	0,4727
Creatinina esordio	23	0,005	0,9819

Lo score totale di LGALS3BP mostrava una forte correlazione positiva con lo stadio istologico della glomerulonefrite membranosa ($\rho = 0,703$; $p = 0,0001$), indicando che l'espressione complessiva della proteina aumenta con l'avanzare del danno morfologico.

Una correlazione positiva significativa era inoltre presente con lo score IgA ($\rho = 0,590$; $p = 0,0030$), mentre si osservava una correlazione inversa con lo score IgG ($\rho = -0,439$; $p = 0,0361$). Il dato suggerisce che LGALS3BP non sia semplicemente associato alla quantità complessiva di immunodepositi, ma possa riflettere un diverso profilo immunopatologico, più vicino alle forme secondarie/immunologicamente complesse.

Non si osservavano correlazioni significative tra score totale di LGALS3BP e proteinuria all'esordio, ematuria o creatinina sierica. Questo dato è importante perché suggerisce che LGALS3BP si comporti più come biomcatore di attività istopatologica e immunologica locale che come semplice indicatore diretto di severità clinica proteinurica.

Tabella 2. Espressione di LGALS3BP nelle forme primitive e secondarie

Variabile	pGMN (n=15)	sGMN (n=9)	p
LGALS3BP totale, media	4,27	8,67	0,0038
LGALS3BP totale, mediana	4,00	8,00	0,0038
Membrana basale glomerulare, media	0,53	0,78	0,3706
Podociti, media	0,80	0,78	1,0000
Mesangio, media	0,13	0,56	0,0895
Tubulo prossimale proteico, media	0,93	1,56	0,1082
Tubulo prossimale citoplasmatico, media	0,53	0,78	0,5506
Tubulo distale proteico, media	0,53	0,89	0,2724
Tubulo distale citoplasmatico, media	0,40	0,78	0,1663
Tubulo distale luminale, media	0,20	1,00	0,1015
Endotelio arterioso, media	0,20	1,22	0,0027
Interstizio, media	0,07	0,33	0,1063

Le forme secondarie mostravano uno score totale di LGALS3BP significativamente superiore rispetto alle forme primitive (8,67 vs 4,27; $p = 0,0038$). Questo rappresenta uno dei risultati centrali dello studio.

Tra i singoli compartimenti, la differenza più marcata riguardava l'endotelio arterioso, significativamente più espresso nelle forme secondarie (1,22 vs 0,20; $p = 0,0027$). Si osservava inoltre una tendenza a maggiore espressione mesangiale nelle forme secondarie ($p = 0,0895$), coerente con un più ampio coinvolgimento immunologico glomerulare.

Nel complesso, le forme primitive sembrano caratterizzate da un'espressione più limitata e prevalentemente podocitario-tubulare, mentre le forme secondarie presentano un pattern più diffuso, con coinvolgimento vascolare, mesangiale, interstiziale e tubulare.

Tabella 3. Espressione di LGALS3BP secondo stadio precoce o avanzato

Variabile	Stadi I-II (n=17)	Stadi III-IV (n=7)	p
LGALS3BP totale, media	4,18	10,14	0,0003
LGALS3BP totale, mediana	4,00	10,00	0,0003
Mesangio, media	0,12	0,71	0,0207
Interstizio, media	0,00	0,57	0,0010
Membrana basale glomerulare, media	0,59	0,71	0,5249
Podociti, media	0,71	1,00	0,2460
Tubulo prossimale proteico, media	1,00	1,57	0,1228

L'espressione totale di LGALS3BP risultava nettamente superiore negli stadi istologici avanzati rispetto agli stadi precoci (10,14 vs 4,18; $p = 0,0003$). Questo dato conferma la forte associazione tra LGALS3BP e progressione morfologica della glomerulonefrite membranosa.

L'aumento negli stadi avanzati era particolarmente evidente a livello mesangiale e interstiziale. Il compartimento interstiziale, virtualmente negativo negli stadi I-II, mostrava invece una positività significativa negli stadi III-IV ($p = 0,0010$). Questo suggerisce che l'espressione interstiziale di LGALS3BP possa rappresentare un marker di evoluzione cronica o di maggiore complessità del danno parenchimale.

Tabella 4. Correlazioni significative tra compartimenti LGALS3BP e variabili clinico-istopatologiche

Compartimento LGALS3BP	Variabile correlata	n	ρ	p
Endotelio arterioso	Stadio istologico	24	0,855	<0,0001
Tubulo prossimale citoplasmatico	Ematuria esordio	24	-0,721	0,00007
Tubulo distale proteico	eGFR 12 mesi	17	-0,698	0,0018
Interstizio	Stadio istologico	24	0,557	0,0047
Mesangio	IgA score	23	0,543	0,0074
Interstizio	% IFTA	24	0,496	0,0137
Tubulo prossimale citoplasmatico	Età	24	0,473	0,0194
Tubulo distale proteico	Creatinina 12 mesi	21	0,505	0,0196
Endotelio arterioso	IgA score	23	0,481	0,0201
Endotelio arterioso	% IFTA	24	0,469	0,0209
Mesangio	Stadio istologico	24	0,462	0,0232
Tubulo distale proteico	Stadio istologico	24	0,452	0,0265
Endotelio arterioso	eGFR esordio	16	-0,531	0,0345
Tubulo distale proteico	Creatinina 6 mesi	20	0,469	0,0369
Interstizio	Età	24	0,420	0,0411
Tubulo distale luminale	Proteinuria esordio	23	-0,425	0,0432
Tubulo distale luminale	Stadio istologico	24	0,416	0,0434
Tubulo distale proteico	C1q score	23	0,418	0,0471

L'analisi compartimentale evidenzia tre pattern biologicamente rilevanti.

- Primo, l'espressione endoteliale arteriosa di LGALS3BP mostra la correlazione più forte dell'intera analisi, essendo strettamente associata allo stadio istologico ($\rho = 0,855$; $p < 0,0001$). Questo dato suggerisce che il coinvolgimento vascolare di LGALS3BP possa rappresentare un indicatore particolarmente sensibile di danno istologico avanzato.
- Secondo, l'espressione interstiziale correla sia con lo stadio istologico sia con la percentuale di IFTA. Questo rafforza l'ipotesi che la positività interstiziale non sia un reperto casuale, ma rifletta un microambiente renale più cronicamente alterato.
- Terzo, il compartimento tubulare, soprattutto distale, mostra associazioni con parametri funzionali renali nel follow-up, tra cui eGFR e creatinina a 6

e 12 mesi. Questo dato suggerisce un potenziale ruolo della positività tubulare di LGALS3BP come marker di stress tubulare o di danno parenchimale persistente.

Associazione tra LGALS3BP e funzione renale

Tabella 5. Relazione tra LGALS3BP e funzione renale

Variabile	n	ρ	p
LGALS3BP totale vs eGFR esordio	16	-0,458	0,0746
LGALS3BP totale vs eGFR 6 mesi	16	-0,404	0,1202
LGALS3BP totale vs eGFR 12 mesi	17	-0,422	0,0914
Endotelio arterioso vs eGFR esordio	16	-0,531	0,0345
Endotelio arterioso vs eGFR 12 mesi	17	-0,516	0,0338
Tubulo distale proteico vs eGFR 6 mesi	16	-0,543	0,0298
Tubulo distale proteico vs eGFR 12 mesi	17	-0,698	0,0018

Lo score totale di LGALS3BP mostrava una tendenza inversa con l'eGFR all'esordio e a 12 mesi, pur senza raggiungere la significatività statistica. Tuttavia, alcuni compartimenti specifici mostravano associazioni significative con la funzione renale.

In particolare, l'espressione endoteliale arteriosa correlava negativamente con l'eGFR all'esordio e a 12 mesi, mentre l'espressione proteica del tubulo distale mostrava una correlazione inversa particolarmente forte con l'eGFR a 12 mesi.

Questi risultati suggeriscono che non tutti i compartimenti hanno lo stesso significato biologico: lo score totale riflette il carico globale di espressione, mentre la localizzazione vascolare e tubulare potrebbe essere più informativa rispetto alla funzione renale.

Tabella 6. Relazione tra LGALS3BP e proteinuria

Variabile	n	ρ / confronto	p
LGALS3BP totale vs proteinuria esordio	23	$\rho = -0,215$	0,3241
LGALS3BP totale vs proteinuria 6 mesi	20	$\rho = 0,021$	0,9286
LGALS3BP totale vs proteinuria 12 mesi	21	$\rho = -0,062$	0,7880
LGALS3BP totale in proteinuria esordio $>3,5$ g/L	7 vs 16	Mann–Whitney	0,7607
LGALS3BP totale in proteinuria 6 mesi $\geq 0,5$ g/L	8 vs 12	Mann–Whitney	0,6661
LGALS3BP totale in proteinuria 12 mesi $\geq 0,5$ g/L	7 vs 14	Mann–Whitney	0,8496
Tubulo distale luminale vs proteinuria esordio	23	$\rho = -0,425$	0,0432

Lo score totale di LGALS3BP non correlava significativamente con la proteinuria all'esordio né con la proteinuria a 6 o 12 mesi. Inoltre, non si osservavano differenze significative dello score totale tra pazienti con proteinuria nefrosica e non nefrosica all'esordio.

Questo dato è particolarmente rilevante: LGALS3BP non sembra essere un semplice marker quantitativo di perdita proteica urinaria. Al contrario, la sua espressione appare più strettamente legata al danno istologico, alla componente immunologica e alla localizzazione compartimentale del danno renale.

Tabella 7. Relazione tra LGALS3BP ed ematuria

Variabile	n	Test	p
LGALS3BP totale vs ematuria score	24	Spearman	0,4727
LGALS3BP totale in ematuria presente vs assente	18 vs 6	Mann–Whitney	0,5001
LGALS3BP totale in ematuria score ≥ 3 vs <3	8 vs 16	Mann–Whitney	0,9260
Tubulo prossimale citoplasmatico vs ematuria score	24	Spearman $\rho = -0,721$	0,00007

Lo score totale di LGALS3BP non era associato alla presenza o all'intensità dell'ematuria. Tuttavia, l'espressione citoplasmatica nel tubulo prossimale mostrava una forte correlazione inversa con lo score di ematuria.

Questo risultato deve essere interpretato con cautela, poiché potrebbe riflettere una distribuzione sbilanciata dei casi oppure un diverso pattern di danno nei pazienti con maggiore componente ematurica. Rimane comunque un'associazione statisticamente robusta che merita eventuale approfondimento in casistiche più ampie.

Correlazioni tra istopatologia tradizionale e forme primitive/secondarie

Tabella 8. Confronto istopatologico tra pGMN e sGMN

Variabile	pGMN	sGMN	p
Stadio istologico, media	1,47	3,22	0,0017
Stadio istologico, mediana	1,00	4,00	0,0017
% IFTA, media	4,67	7,22	0,1377
% infiammazione, media	4,67	2,22	0,8657
C3 score, media	1,07	1,11	0,9471
IgG score, media	2,21	1,22	0,0234
IgA score, media	0,21	0,67	0,0371
IgM score, media	0,57	0,44	0,8583
C1q score, media	0,29	0,67	0,1737

Le forme secondarie presentavano stadi istologici significativamente più avanzati rispetto alle forme primitive. Questo dato è coerente con la maggiore complessità immunopatologica delle forme secondarie, in particolare di quelle associate a lupus.

Dal punto di vista immunopatologico, le forme primitive mostravano uno score IgG più elevato, mentre le forme secondarie mostravano uno score IgA più elevato. Il C1q risultava mediamente più alto nelle forme secondarie, senza tuttavia raggiungere la significatività statistica.

Correlogramma LGALS3BP – Correlazioni di Spearman

Coorte umana — n = 24 pazienti pediatrici con GMN (15 primitiva, 9 secondaria). Ogni cella riporta il coefficiente ρ di Spearman.

Significatività: *** $p < 0,001$ | ** $p < 0,01$ | * $p < 0,05$ | ~ tendenza $p < 0,10$

LGALS3BP	Prot. esordio	Ematuria (score)	Creat. esordio	eGFR esordio	Prot. 6 mesi	Creat. 6 mesi	eGFR 6 mesi	Prot. 12 mesi	Creat. 12 mesi	eGFR 12 mesi	Stadio	% IFTA	Score C3	Score IgG	IgA	IgM	C1q
MBG	0.04	-0.06	-0.08	-0.01	-0.21	0.07	-0.19	-0.16	-0.02	-0.06	0.13	0.05	-0.10	-0.15	0.22	-0.16	-0.27
Podociti	0.34	-0.03	-0.27	0.13	0.24	-0.22	0.19	0.07	-0.24	0.16	0.06	-0.05	0.11	0.10	0.19	0.00	0.20
Mesangio	-0.25	-0.17	-0.06	0.16	0.00	0.05	0.17	0.07	-0.03	0.06	0.46*	0.15	0.26	0.16	0.54**	0.22	0.39~
TP Proteine	-0.07	-0.08	0.01	-0.41	0.29	-0.08	-0.19	-0.10	-0.13	-0.24	0.21	0.03	0.01	0.37~	0.16	-0.17	0.30
TP Citoplasma	0.06	-0.72***	0.28	-0.09	0.23	0.26	-0.12	0.11	0.22	-0.22	0.24	0.03	-0.01	0.04	0.26	0.27	0.16
TD Proteine	-0.10	0.09	0.26	-0.21	0.09	0.47*	0.54*	0.39~	0.50*	0.70**	0.45*	0.33	-0.09	-0.35	0.10	0.04	0.42*
TD Citoplasma	0.13	-0.04	-0.02	0.11	-0.10	-0.05	0.00	0.09	-0.13	0.11	0.03	-0.02	-0.20	-0.20	0.11	-0.21	-0.09
TD Luminale	-0.43*	0.05	-0.05	-0.22	-0.08	0.01	-0.04	-0.20	-0.01	0.03	0.42*	0.35~	-0.01	-0.18	0.34	0.18	0.40~
Arterie	-0.30	0.06	0.18	-0.53*	-0.03	0.18	0.44~	-0.04	0.14	-0.52*	0.86***	0.47*	-0.07	-0.44*	0.48*	-0.09	0.41~
Interstizio	0.00	-0.04	0.14	-0.36	0.26	0.35	-0.25	0.09	0.28	-0.31	0.56**	0.50*	0.13	-0.20	0.34	0.02	0.30
Totale LGALS3BP	-0.22	-0.15	0.01	-0.46~	0.02	0.09	-0.40	-0.06	0.01	0.42~	0.70***	0.35~	-0.07	-0.44*	0.59**	0.14	0.38~

Legenda cromatica

Correlazione positiva forte ($\rho \geq 0,60$, $p < 0,05$)

Correlazione positiva debole ($\rho < 0,40$, $p < 0,05$)

Correlazione negativa forte ($\rho \leq -0,60$, $p < 0,05$)

Correlazione negativa debole ($\rho > -0,40$, $p < 0,05$)

Tendenza ($0,05 \leq p < 0,10$)

Non significativo ($p \geq 0,10$)

Correlazione positiva moderata ($0,40 \leq \rho < 0,60$, $p < 0,05$)

Correlazione negativa moderata ($-0,60 < \rho \leq -0,40$, $p < 0,05$)

Abbreviazioni: MBG = membrana basale glomerulare; TP = tubulo prossimale; TD = tubulo distale; Prot. = proteinuria; Creat. = creatinina; % IFTA = fibrosi tubulointerstiziale e atrofia tubulare.

9. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

9.1 Commento epidemiologico

La casistica analizzata rappresenta una popolazione pediatrica altamente selezionata proveniente da un centro di riferimento nazionale per le nefropatie pediatriche.

Tre elementi meritano particolare attenzione:

1. Rarità della patologia: l'identificazione di soli 24 casi in un arco temporale di oltre vent'anni conferma la bassa incidenza della glomerulonefrite membranosa in età pediatrica.
2. Elevata quota di forme secondarie: il 37,5% dei casi era riconducibile a forme secondarie, percentuale superiore a quella generalmente riportata nelle popolazioni adulte e coerente con la maggiore rilevanza delle malattie autoimmuni sistemiche nell'età evolutiva.
3. Predominanza adolescenziale: oltre la metà dei pazienti aveva più di 10 anni al momento della diagnosi, suggerendo una maggiore suscettibilità alla malattia nelle fasi più avanzate dello sviluppo immunologico.

Nel complesso, la popolazione studiata appare rappresentativa delle caratteristiche epidemiologiche della glomerulonefrite membranosa pediatrica osservata nei centri specialistici, costituendo una base adeguata per l'analisi delle correlazioni tra espressione di LGALS3BP, caratteristiche istopatologiche e parametri clinico-laboratoristici.

9.2 Interpretazione clinica

Nel complesso, la popolazione studiata mostra un quadro clinico dominato dalla proteinuria, spesso associata a ematuria microscopica, ma con funzione renale generalmente conservata all'esordio. Questo profilo è coerente con la glomerulonefrite membranosa pediatrica, nella quale l'alterazione iniziale della barriera di filtrazione glomerulare precede nella maggior parte dei casi una compromissione significativa della funzione renale.

L'andamento longitudinale mostra una marcata riduzione della proteinuria già a 6 mesi, con ulteriore miglioramento a 12 mesi. Questo dato suggerisce una risposta clinica complessivamente favorevole nella maggior parte dei pazienti, pur in presenza di alcuni casi con persistenza di proteinuria significativa.

Il confronto tra forme primitive e secondarie non evidenzia differenze statisticamente significative nei principali parametri clinici all'esordio. Tuttavia, si osserva una tendenza a maggiore proteinuria nelle forme primitive e a valori di eGFR inferiori nelle forme secondarie. Tale dato potrebbe riflettere due differenti profili biologici: nelle forme primitive un danno prevalentemente podocitario-proteinurico, nelle forme secondarie un maggiore coinvolgimento immunologico sistemico e potenzialmente più globale del parenchima renale.

Queste osservazioni rafforzano l'interesse per LGALS3BP come possibile biomarcatore tissutale capace di integrare i dati clinici tradizionali, soprattutto nei casi secondari associati ad attivazione immunitaria sistemica.

9.3 Caratteristiche istopatologiche della casistica

La quota di fibrosi tubulo-interstiziale (%IFTA) e il grado di infiammazione interstiziale risultavano generalmente contenuti nella maggior parte dei casi.

Le lesioni croniche avanzate erano osservabili prevalentemente nei casi secondari e nelle forme istologicamente più evolute.

L'interessamento tubulo-interstiziale mostrava una stretta associazione con l'aumento dell'espressione complessiva di LGALS3BP, suggerendo un possibile coinvolgimento della proteina nei processi di rimodellamento cronico del parenchima renale.

9.4 Interpretazione biologica

L'espressione di LGALS3BP appare fortemente associata all'attivazione immunitaria renale.

Tre osservazioni emergono come particolarmente significative:

1. Predominanza tubulare: la maggiore espressione nel tubulo prossimale suggerisce che LGALS3BP possa essere coinvolto nella risposta del compartimento tubulare alla proteinuria e al danno glomerulare.
2. Incremento nelle forme secondarie: lo score totale significativamente più elevato nelle forme secondarie supporta l'ipotesi che LGALS3BP sia strettamente collegato ai meccanismi immunologici sistemici caratteristici della nefrite lupica e delle glomerulonefriti autoimmuni.

3. Coinvolgimento mesangiale e interstiziale: l'aumento dell'espressione in questi compartimenti nelle forme secondarie suggerisce un ruolo della proteina nei fenomeni di infiammazione cronica e di interazione tra cellule immunitarie e parenchima renale.

Nel complesso, i risultati ottenuti indicano che LGALS3BP non rappresenta semplicemente un marker di danno glomerulare, ma potrebbe configurarsi come un biomarcatore integrato dell'attività immunologica renale, particolarmente utile nelle forme secondarie di glomerulonefrite membranosa associate a lupus eritematoso sistemico.

9.5 Sintesi interpretativa complessiva

L'analisi integrata delle correlazioni cliniche, istopatologiche e immunoistochimiche evidenzia che LGALS3BP si comporta come un biomarcatore prevalentemente istopatologico-immunologico più che come un semplice indicatore clinico di proteinuria.

I risultati principali possono essere sintetizzati in cinque punti:

1. LGALS3BP aumenta significativamente nelle forme secondarie: lo score totale è circa doppio nelle forme secondarie rispetto alle primitive, con differenza statisticamente significativa. Questo supporta il ruolo di LGALS3BP come marker di attivazione immunitaria sistemica e locale.
2. LGALS3BP correla fortemente con lo stadio istologico: la correlazione con lo stadio di Ehrenreich e Churg è il risultato più solido dell'analisi. L'aumento dello score negli stadi avanzati suggerisce che LGALS3BP rifletta la progressione morfologica del danno glomerulare.
3. Il compartimento vascolare è particolarmente informativo: l'espressione endoteliale arteriosa mostra una correlazione molto forte con lo stadio istologico e una correlazione inversa con l'eGFR. Questo compartimento potrebbe rappresentare un indicatore sensibile di danno renale più avanzato.

4. Il compartimento interstiziale si associa a cronicità: l'espressione interstiziale correla con stadio istologico e IFTA, suggerendo un ruolo di LGALS3BP nei processi di rimodellamento cronico del parenchima renale.
5. LGALS3BP non correla direttamente con la proteinuria: l'assenza di correlazione significativa con la proteinuria suggerisce che LGALS3BP non sia un marker quantitativo della perdita proteica, ma piuttosto un marker del microambiente immunologico e istopatologico renale.

9.6 Conclusioni

La glomerulonefrite membranosa pediatrica si conferma una malattia rara e clinicamente eterogenea, caratterizzata da una significativa quota di forme secondarie e da una notevole variabilità morfologica e immunopatologica.

L'approccio anatomico-clinico integrato consente una caratterizzazione più accurata della malattia rispetto alla sola valutazione clinica.

Nella presente casistica, le forme secondarie hanno mostrato una maggiore complessità biologica, associata a stadi istologici più avanzati e a una più intensa attivazione immunitaria locale.

LGALS3BP emerge come un promettente biomarcatore tissutale associato alla progressione morfologica della malattia, al coinvolgimento vascolare e al danno tubulo-interstiziale, configurandosi come possibile strumento aggiuntivo per la caratterizzazione biologica delle glomerulonefriti membranose pediatriche.

Ulteriori studi multicentrici saranno necessari per confermare tali osservazioni e per definire il possibile valore prognostico e terapeutico di questo biomarcatore nel contesto delle nefropatie immunomediate dell'età evolutiva.

BIBLIOGRAFIA

1. Claudio P. Primary membranous nephropathy: an endless story. *J Nephrol*. 2023 Mar;36(2):563-574.
2. Ponticelli C. Membranous Nephropathy. *J Clin Med*. 2025 Jan 24;14(3):761.
3. Ronco P, Beck L, Debiec H, et al. Membranous nephropathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2021 Sep 30;7(1):69.
4. Dahan K. Physiopathologie, démarche diagnostique et avancées thérapeutiques dans les glomérulonéphrites extra-membraneuses [Membranous nephropathy: Diagnosis, new insights in pathophysiology, and therapeutic approach]. *Rev Med Interne*. 2016 Oct;37(10):674-679. French.
5. Lutz J. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of membranous nephropathy. *Nephrol Ther*. 2021 Apr;17S:S1-S10.
6. Dantas M, Silva LBB, Pontes BTM, et al. Membranous nephropathy. *J Bras Nefrol*. 2023 Apr-Jun;45(2):229-243.
7. Gu Y, Xu H, Tang D. Mechanisms of Primary Membranous Nephropathy. *Biomolecules*. 2021 Mar 30;11(4):513.
8. Couser WG. Primary Membranous Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017 Jun 7;12(6):983-997.
9. Pozdzik A, Brochériou I, David C, et al. Membranous Nephropathy and Anti-Podocytes Antibodies: Implications for the Diagnostic Workup and Disease Management. *Biomed Res Int*. 2018 Jan 8;2018:6281054.
10. Churg J, Ehrenreich T. Membranous nephropathy. *Perspect Nephrol Hypertens*. 1973;1 Pt 1:443-8.
11. Ahmad SB, Appel GB. Antigens, antibodies, and membranous nephropathy: a decade of progress. *Kidney Int*. 2020 Jan;97(1):29-31.
12. Salvadori M, Tsalouchos A. New antigens involved in membranous nephropathy beyond phospholipase A2 receptor. *World J Nephrol*. 2022 Jul 25;11(4):115-126.

13. Sethi S. New 'Antigens' in Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2021 Feb;32(2):268-278.
14. Sethi S, Fervenza FC. Antigens in membranous nephropathy: discovery and clinical implications. *Nat Rev Nephrol*. 2025 Oct;21(10):653-670.
15. Sethi S, Fervenza FC. Membranous nephropathy-diagnosis and identification of target antigens. *Nephrol Dial Transplant*. 2024 Mar 27;39(4):600-606.
16. Huang G, Liu F, Yu L, et al. Pediatric membranous nephropathy: In the novel antigens era. *Front Immunol*. 2022 Aug 9;13:962502.
17. van de Logt AE, Fresquet M, Wetzels JF, Brenchley P. The anti-PLA2R antibody in membranous nephropathy: what we know and what remains a decade after its discovery. *Kidney Int*. 2019 Dec;96(6):1292-1302.
18. Liu J, Malhotra D, Ge Y, et al. THSD7A-associated membranous nephropathy involves both complement-mediated and autonomous podocyte injury. *Front Pharmacol*. 2024 Jul 17;15:1430451.
19. Tomas NM, Hoxha E, Reinicke AT, et al. Autoantibodies against thrombospondin type 1 domain-containing 7A induce membranous nephropathy. *J Clin Invest*. 2016 Jul 1;126(7):2519-32.
20. Sethi S, Debiec H, Madden B, et al. Neural epidermal growth factor-like 1 protein (NELL-1) associated membranous nephropathy. *Kidney Int*. 2020 Jan;97(1):163-174.
21. Sethi S, Madden BJ, Debiec H, et al. Exostosin 1/Exostosin 2-Associated Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2019 Jun;30(6):1123-1136.
22. Bobart SA, Tehranian S, Sethi S, et al. A Target Antigen-Based Approach to the Classification of Membranous Nephropathy. *Mayo Clin Proc*. 2021 Mar;96(3):577-591.
23. Sethi S, Debiec H, Madden B, et al. Semaphorin 3B-associated membranous nephropathy is a distinct type of disease predominantly present in pediatric patients. *Kidney Int*. 2020 Nov;98(5):1253-1264.
24. Bomback AS, Fervenza FC. Membranous Nephropathy: Approaches to Treatment. *Am J Nephrol*. 2018;47 Suppl 1:30-42.

25. Lai WL, Yeh TH, Chen PM, et al. Membranous nephropathy: a review on the pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Formos Med Assoc.* 2015 Feb;114(2):102-11.
26. Kouri AM, Caza TN, Beck LH Jr, et al. Clinical and Histopathologic Characteristics of Pediatric Patients With Primary Membranous Nephropathy. *Kidney Int Rep.* 2023 Aug 28;8(11):2368-2375.
27. Ponticelli C, Moroni G, Fornoni A. Lupus Membranous Nephropathy. *Glomerular Dis.* 2021 Mar 2;1(1):10-20.
28. Crow MK. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus: risks, mechanisms and therapeutic targets. *Ann Rheum Dis.* 2023 Aug;82(8):999-1014.
29. Bajema IM, Wilhelmus S, Alpers CE, et al. Revision of the International Society of Nephrology/Renal Pathology Society classification for lupus nephritis: clarification of definitions, and modified National Institutes of Health activity and chronicity indices. *Kidney Int.* 2018 Apr;93(4):789-796.
30. Wilhelmus S, Alpers CE, Cook HT, et al. The Revisited Classification of GN in SLE at 10 Years: Time to Re-Evaluate Histopathologic Lesions. *J Am Soc Nephrol.* 2015 Dec;26(12):2938-46.
31. Weinmann-Menke J. Lupusnephritis – von der Diagnose zur Therapie [Lupus nephritis: from diagnosis to treatment]. *Inn Med (Heidelb).* 2023 Mar;64(3):225-233. German.
32. Loimaranta V, Hepojoki J, Laaksoaho O, Pulliainen AT. Galectin-3-binding protein: A multitask glycoprotein with innate immunity functions in viral and bacterial infections. *J Leukoc Biol.* 2018 Oct;104(4):777-786.
33. Wang F, Zhou L, Eliaz A, et al. The potential roles of galectin-3 in AKI and CKD. *Front Physiol.* 2023 Feb 23;14:1090724.
34. Kim SW, Roh J, Park CS. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *J Pathol Transl Med.* 2016 Nov;50(6):411-418.
35. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:299-311.
36. Magaki S, Hojat SA, Wei B, et al. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:289-2

37. Miller RT. Avoiding pitfalls in diagnostic immunohistochemistry-important technical aspects that every pathologist should know. *Semin Diagn Pathol.* 2019 Sep;36(5):312-335.
38. Katikireddy KR, O'Sullivan F. Immunohistochemical and immunofluorescence procedures for protein analysis. *Methods Mol Biol.* 2011;784:155-67.
39. Ramos-Vara JA. Principles and Methods of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol.* 2017;1641:115-128.

RINGRAZIAMENTI

Ci tengo a ringraziare il mio relatore, il Prof. Vellone, e il mio correlatore, il Dott. Gaggero. Si sono dedicati con grande disponibilità a questo lavoro e, nonostante alcune difficoltà incontrate lungo il percorso, credo di poter dire che il risultato finale sia di ottimo livello, soprattutto grazie al loro contributo.

Il reparto di Anatomia Patologica del Gaslini è stato un luogo accogliente nel quale mi sono sentito a mio agio fin dal primo giorno. Questo è merito della generosità, della professionalità e spirito di squadra che si respirano al suo interno. Desidero quindi ringraziare tutte le persone che vi lavorano: medici, biologi e tecnici di laboratorio. È stato un piacere e un onore far parte, anche se per poco tempo, del vostro gruppo.

Un ringraziamento speciale va ancora ai miei due relatori. Oltre ad essere uomini di scienza, siete persone di grande cultura, personalità e simpatia. Sono stato benissimo con voi. Grazie di cuore.

Ringrazio i miei colleghi. Pur non avendo instaurato grandi rapporti, soprattutto per la differenza di età, nel corso degli anni ho avuto il piacere di conoscere persone molto preparate ed educate. Tra tutte, però, c'è stata una persona in particolare con cui ho legato e che mi ha dato una grande mano, Beatrice. Non soltanto perché sei stata rappresentante di noi studenti, e già questo basterebbe, ma anche per la tua simpatia e compagnia. Ci siamo dati una mano nello studio, e la tua presenza è stata di grande importanza nel corso degli anni. Grazie di cuore anche a te.

Un grazie sincero va ai miei amici, in particolare Riccardo e Gabriele. Mi avete ascoltato in questi anni parlare di esami, lezioni e università, sopportando i miei racconti e sostenendomi sempre, dandomi la certezza di aver scelto la strada giusta. Siete persone importanti nella mia vita, a cui voglio bene, e spero di avervi sempre accanto. Grazie di cuore di esserci.

Il ringraziamento più grande è per i miei genitori. Grazie per il sostegno morale ed economico, per la pazienza, per i sacrifici e per aver creduto in me anche nei momenti più difficili. Questo traguardo è soprattutto vostro. Non c'è soddisfazione più grande, per me, che vedervi felici. Vi voglio bene.

Ce l'abbiamo fatta.

Conseguire la laurea in Medicina e Chirurgia è il punto di arrivo di un percorso iniziato molti anni fa. Un percorso fatto di ostacoli, cadute e difficoltà che, per lungo tempo, sono sembrati insormontabili. Eppure, dentro di me, non ho mai smesso di credere che un giorno ce l'avrei fatta.

Cinque anni fa ho deciso di riprovarci. Ho ripreso a studiare dopo oltre dieci anni di interruzione, nonostante l'età, tra dubbi, paure e lo scetticismo di molti. Mi chiedevo se ne sarei stato capace, se avrei retto il peso di un eventuale fallimento. Oggi conosco la risposta: è stata la scelta migliore della mia vita.

Per questo voglio ringraziare anche me stesso. Per non aver mollato. Per aver trovato il coraggio di ricominciare quando sarebbe stato più semplice rinunciare. Oggi posso dire di aver chiuso un cerchio e di essere finalmente pronto ad andare avanti.

Ce l'hai fatta.

“Non puoi aspettare che la vita smetta di essere difficile prima di decidere di essere felice”

Nightbirde

Ai miei nonni

Ai miei genitori

A me stesso

Scusate il ritardo