

Indice

Riassunto	pag 2
Summary	pag 3
Introduzione	pag 5
Aspetti di genetica molecolare	pag 6
Eterogeneità genetica della malattia di Dent	pag 7
Fisiologia e localizzazione dei canali del cloro della famiglia clc	pag 8
Topi knock –out privi di CLC come modelli per la malattia di Dent	pag 10
Ruolo del canale del cloro	pag 14
Relazione tra alterata endocitosi ed ipercalciuria	pag 16
Patogenesi dell'ipercalciuria nei pazienti con mutazione CLCN5	pag 17
Placche di Randall	pag 18
Aspetti clinici	pag 20
La diagnosi differenziale	pag 23
Cenni di terapia	pag 24
Scopo dello studio	pag 27
Materiali e metodi	pag 27
Procedimento di diagnostica molecolare	pag 29
Studio metabolico	pag 30
Risultati	pag 31
Studio metabolico	pag 34
Analisi statistica	pag 37
Analisi strumentale	pag 41
DXA	pag 42
Definizione “densitometrica” dell'osteoporosi	pag 44
Rapporti fra massa ossea e fratture	pag 45
Discussione	pag 48
Tabelle e figure	pag 51-58
Bibliografia	pag 58

Riassunto

Definizione.

Per malattia di Dent si intende un gruppo eterogeneo di disordini tubulari renali X-linked causati da mutazioni del canale del cloro CLC-5. E' una malattia rara con una prevalenza inferiore a 1/2000. I maschi emizigoti sviluppano proteinuria a basso peso molecolare, ipercalciuria, nefrocalcinosi, nefrolitiasi, insufficienza renale progressiva ed in alcuni casi rachitismo o osteomalacia. Queste manifestazioni possono essere accompagnate da aminoaciduria, glicosuria, iperuricuria e alterazione dell'acidificazione dell'urina tipiche delle tubulopatie prossimali. Sono state identificate alcune sindromi con fenotipi analoghi alla malattia di Dent definite come nefrolitiasi recessiva X-linked (XRN), rachitismo ipofosfatemico recessivo X-linked (XLRH), e la microproteinuria idiopatica. Tutte queste sindromi presentano ipercalciuria, proteinuria a basso peso molecolare e nefrocalcinosi in comune, mentre il rachitismo e l'insufficienza renale non sono presenti in tutti i casi; si distinguono due tipi di malattia di Dent: il tipo I (OMIN No 300009) e il tipo II (OMIN No 300555). Il tipo I è legato a mutazioni di CLCN5 che codifica per il canale del cloro CLC-5. L'evoluzione della nefropatia in uremia avverrebbe tra la III e la V decade di vita.

Scopo dello studio.

Materiali e metodi. È giunto alla nostra osservazione un paziente, della Clinica Pediatrica il cui caso poneva il sospetto di una malattia di Dent per la quale è stata avviata la diagnostica molecolare che ha messo in evidenza una mutazione nel gene CLCN5. È stato costruito l'albero genealogico fino a quattro generazioni, l'indagine molecolare è stata estesa a 26 sui 52 componenti riferiti del pedigree. La Clinica Nefrologica ha seguito un gruppo di pazienti (n.9) della II e III generazione per i quali è stato condotto uno studio metabolico-strumentale della nefrolitiasi. In ciascun paziente sono stati valutati: creatinina, ac. urico, Ca, P, Na, K, Cl, Mg sia a livello plasmatico che urinario, pH ematico (venoso). Inoltre, sono stati dosati PTH, Osteocalcina, Vit. D3, ALP ossea a livello

plasmatico. Nelle urine delle 24h sono stati dosati, inoltre, ossalati (Ox) e citrati. In tutti è stata eseguita l'ecografia.

Risultati. Sono stati trovati con mutazione, oltre al probando, 7 su 11 maschi, affetti quindi da malattia di Dent, e 11 femmine eterozigoti su 15 analizzate. In 6/9 pazienti si rilevava iperfosfaturia, ipersodiuria e iperuricurìa; nei 3 mutati l'iperuricurìa si associava ad iperuricemia. In 5/9 pazienti era presente ipercalcìuria e iperossaluria; in 2/9 ipocitraturia. Nessuno dei 9 pazienti presentava ipomagnesiuria o ipomagnesiemia. In tutti i pazienti i livelli di PTH, Osteocalcina e ALP ossea sono risultati nella norma, come pure la Clearance della Creatinina. L'analisi statistica condotta con test t tra mutati e non ha messo in luce differenze per UCa e UPO₄. Il test di regressione lineare ha messo in evidenza le seguenti correlazioni: TmPO₄/VFG vs UPO₄ (r = -0,82 p = 0,006); EFNa/ UNa (r = 0,77 p = 0,013); UNa/ UPO₄ (r = 0,73 p = 0,023), UCa vs UPO₄ (r=0.74 p=0.02), UNa vs UCa (r= 0.72 p=0.026). Sulla base dell'ecografia renale in tutti si evidenziava microlitiasi bilaterale.

Conclusioni. Nessuno dei componenti della III generazione risulta avere insufficienza renale compresi i mutati 3 i quali non avevano neppure ridotta funzione. L'iperuricemia nei 3 mutati non è certo secondaria. Si segnala inoltre la presenza e la bilateralità della microlitiasi in tutti i soggetti studiati. Pur essendoci nei 3 soggetti mutati i segni caratteristici della tubulopatia prossimale, lo studio metabolico dei pazienti ha rilevato un quadro simile a quello che si osserva comunemente nella nefrolitiasi bilaterale recidivante.

Summary

Background . Dent's disease is an X-linked recessive renal proximal tubular disorder. It is usually characterized by low-molecular-weight proteinuria, hypercalciuria, nephrolithiasis, nephrocalcinosis and progressive renal failure. Aminoaciduria, phosphaturia, glycosuria, uricosuria and an acquired impairment of urinary acidification may also occur. At the present time two kinds of Dent's disease are known: Dent's

disease-1(OMIN No 300009) and Dent's disease-2 (OMIN No 300555). The first associated with mutations in CLCN5 that encodes the renal chloride channel CIC-5. the progression of the nephropaty into uraemia would occur between the third and fifth decade of life.

Object of the study. The aim of this study is to carry out a metabolic-instrumental survey of the renal calculosis in a family where some members have mutations in the CLCN5 gene.

Material and methods. A patient from clinical pediatrics was admitted to our centre due to a suspected Dent's disease so a molecular analysis was performed and a CLCN5 gene mutation was detected. We created a family tree over four generations, the molecular analysis was performed on 26 out of the generations, the molecular analysis was performed on 26 out of the 52 members of the family. The nephrological clinic followed up a group of 9 patients, from the second and third generation, and carried out a metabolic-instrumental survey of the nephrolitiasis. For each patient we evaluated the creatinine, uric acid, Ca, P, K, Cl, Mg both at the plasmatic level and urinary level, pH hematic (venous).

Furthemore we tested PTH, osteocalcina, vt.D3, bony ALP at the plasmatic level. The 24h urine excretion, oxalate (Ox) and citrate were tested. All patients were studied with renal ultrasonography.

Results. Besides the proband, the mutation was detected also in 7 males out 11 and 11 heterozygotic females out of 15. Six patients out of 9 showed hyperphosphaturia, hypersodiuria and hyperuricuria was associated with hyperuricemia. In 5/9 patients hypercalciuria and hyperossaluria were detected; in 2/9 hypocitraturia was detected. None of the 9 patients showed hypomagnesiuria or hypomagnesaemia. All patients had a normal level of PTH, osteocalcina and bony ALP, the same was for the clearance of the creatinine. The statistical analysis carried out with t Student's tests between mutated and non-mutated patients did not reveal differences as for UCa e UPO₄. The linear regression test revealed the following correlations: TmPO₄/VFG vs UPO₄ (r=-0.82 p=0.006); EFNa/UNa /r=0.77 p=0.013); UNa/UPO₄(r=0.73 p=0.023), UCa vs UPO₄ (r=0.74 p=0.02), UNa vs UCa (r =0.72 p=0.026). According to the renal ultrasonography 8/9 patients showed bilateral microlithiasis.

Conclusions. None of the members of the 3rd generation had renal failure including the 3 mutated patients. Moreover these patients showed hyperuricemia that didn't seem related to renal involvement. In all the subjects we studied, there was the presence and the bilaterality of the microlithiasis. Although in the 3 subjects there were the distinctive signs of the proximal tubulopathy, from the metabolic survey we detected a picture similar to the typical bilateral relapsing nephrolithiasis.

Introduzione

Per malattia di Dent si intende un gruppo eterogeneo di disordini tubulari renali X-linked causati da mutazioni del canale del cloro CLC-5.

E' una malattia rara con una prevalenza inferiore a 1/2000, anche se probabilmente questo dato riflette il fatto che essa è sottodiagnosticata.

I maschi emizigoti sviluppano proteinuria a basso peso molecolare, ipercalciuria, nefrocalcinosi, nefrolitiasi, insufficienza renale progressiva ed in alcuni casi rachitismo o osteomalacia. Queste manifestazioni possono essere accompagnate da aminoaciduria, glicosuria, iperuricemia e alterazione dell'acidificazione dell'urina tipiche delle tubulopatie prossimali(1). La malattia di Dent venne definita da Dent e Friedman nel 1964, i quali riportarono due casi di bambini caratterizzati da ipercalciuria ma con normale capacità di acidificazione delle urine.

Sono state identificate alcune sindromi con fenotipi analoghi alla malattia di Dent definite come nefrolitiasi recessiva X-linked (XRN), rachitismo ipofosfatemico recessivo X-linked (XLRH) (2), e la microproteinuria idiopatica (3). Tutte queste sindromi presentano ipercalciuria, proteinuria a basso peso molecolare e nefrocalcinosi in comune, mentre il rachitismo e l'insufficienza renale non sono presenti in tutti i casi; tuttavia il rischio evolutivo in uremia è nettamente superiore a quello di gran parte delle forme di calcolosi, e di poco inferiore a quello delle nefrocalcinosi da iperossalurie primitive, da deficit di adenina fosforibosiltransferasi, da deficit di ipoxantina fosforibosiltransferasi, da deficit di xantina ossidasi, ma assai superiore a quello delle acidosi tubulari renali distali ereditarie, e della cistinuria (4).

I primi segni renali, spesso trascurati o non riconosciuti, si manifestano sin dall'infanzia nonostante non raramente le prime manifestazioni siano osservate in età adulta e raggiungano l'insufficienza renale terminale tra la III e la V decade di vita. Una diagnosi precoce è quindi possibile e potrebbe modificare l'andamento lentamente evolutivo verso l'uremia di tale patologia.

Aspetti di genetica molecolare

I pazienti affetti da malattia di Dent presentano mutazioni nel gene CLCN5 (5). Lloyd et al. (2) dimostrarono che le mutazioni nel gene CLCN5 non erano responsabili solo della malattia di Dent, ma potevano causare anche disordini fenotipicamente simili (rachitismi ipofosfatemici X-linked recessivi e nefrolitiasi X-linked recessive).

Il gene CLCN5 mappa nella regione cromosomica pericentromerica Xp11.22, misura ~ 150 kb comprende 17 esoni e traduce 2 isoforme CIC-5, una proteina di 746 amminoacidi e una recentemente identificata con 70 amminoacidi aggiunti alla terminazione intracellulare (6). Esso codifica il CIC-5, un membro di una famiglia di geni che codificano per canali del cloro voltaggio-dipendenti (7, 8).

Nel gene CLCN5 sono state identificate finora 68 mutazioni, 9 delle quali sono ricorrenti (9). Tra queste il 27% sono mutazioni missenso (provocano la sostituzione di un amminoacido nel peptide codificato), il 32% nonsense (provocano la sostituzione di un codone codificante con un codone di terminazione che determina la fine prematura della proteina), altre ancora sono mutazioni "frameshift" per inserzione o delezione di una o più coppie di basi che provocano lo slittamento della cornice di lettura dell'mRNA (2%) o ancora mutazioni nei siti donatori o accettori di splicing, che modificano la lunghezza dell'mRNA (4% e 3% rispettivamente), delezioni e inserzioni di grosso calibro (8%) o delezioni dell'intero gene (2%) (10). La maggior parte delle mutazioni puntiformi sono localizzate nei domini transmembrana del canale CIC-5, domini cruciali per il corretto funzionamento della proteina canale. Dagli studi sui modelli animali della malattia (topi knockout per il gene CLCN5), è stato dimostrato che la maggioranza (circa il 70%) delle mutazioni sono inattivanti, causano cioè

la perdita della funzione del canale. La proteina risultante è assente o troncata, instabile e non inserita correttamente nella membrana plasmatica (11).

Eterogeneità genetica della malattia di Dent

Nel corso dell'ultimo decennio, le mutazioni a carico del gene *CLCN5* responsabile della malattia di Dent, sono state costantemente dimostrate. Tuttavia, alcuni pazienti con caratteristiche cliniche tipiche della malattia non presentano tali mutazioni. Nel 2005, Hoopes et al. (12) hanno confermato l'eterogeneità genetica della malattia di Dent e individuato mutazioni *OCRL1* in cinque probandi di 13 famiglie che sottostavano rigidamente ai criteri descritti per la malattia di Dent, ma in cui mancavano mutazioni del gene *CLCN5*.

Il gene *OCRL1* è stato identificato come il secondo gene causativo responsabile della malattia di Dent. Precedentemente allo studio di Hoopes si conosceva che la mutazione di *OCRL1* era responsabile della Sindrome di Lowe, una malattia multisistemica, caratterizzata da tubulopatia renale, cataratta congenita, e il ritardo mentale, da lieve a severo; nelle cellule tubulari prossimali *OCRL1* è localizzato anch'esso nel cromosoma X e codifica la *PIP₂ 5-fosfatasi* (fosfatidilinositolo 4,5-bis-fosfatasi), quest'ultima è posta soprattutto nel complesso di Golgi, nei lisosomi e negli endosomi. *OCRL1* è ubiquitario nell'uomo, lo si ritrova anche nei tessuti oculare, renale e cerebrale. Il ruolo delle mutazioni del gene *OCRL1* responsabile della sindrome di Lowe è ancora poco chiaro. L'alterata funzione della fosfatasi *OCRL1* porta alla elevazione dei livelli cellulari di *PIP2* che risulta essere coinvolta nel traffico di vescicole a carico dell'apparato del Golgi. Si ipotizza che elevati livelli di *PIP2* siano responsabili delle alterazioni a carico dei filamenti di actina del citoscheletro dei fibroblasti di pazienti con sindrome di Lowe; il rimodellamento a carico dei filamenti di actina è strettamente collegato sia al traffico di vescicole dell'apparato del Golgi (sia al traffico di vescicole della membrana endosomiale) ciò suggerisce che tali alterazioni possano

agire su una serie di processi cellulari a carico dell' epitelio renale dei pazienti con sindrome di Lowe.

Le manifestazioni cliniche, della malattia di Dent sono distinte da quelle della sindrome di Lowe e l'unico aspetto in comune è l'alterazione tubulare prossimale renale. Fu così che i risultati di Hoopes et al. furono inaspettati. Attualmente si designa con OMIN No 300009 (malattia di Dent-1) la malattia di Dent causata dalla mutazione di CLCN5 e con OMIN 300555 (malattia di Dent-2) quella che deriva dalla mutazione di OCRL1 (12,13).

Fisiologia e localizzazione dei canali del cloro della famiglia CIC

I canali per il cloro CIC appartengono alla famiglia dei canali a controllo di potenziale, deputati alla regolazione del volume intracellulare, della eccitabilità di membrana ed al trasporto transepiteliale, e sono localizzati a livello della membrana plasmatica, nelle membrane degli organelli intracellulari come il reticolo endoplasmatico, i mitocondri, gli endosomi, i lisosomi e l'apparato di Golgi (14,15); negli endosomi sub-apicali del tubulo prossimale renale svolgono un ruolo fondamentale nei fenomeni di endocitosi.

Nei mammiferi sono stati identificati 9 differenti geni che codificano per i canali del cloro CIC (Tab.1).

In base all'omologia di sequenza questi possono essere raggruppati in 3 gruppi: i membri del primo gruppo svolgono la loro funzione nella membrana plasmatica, mentre gli altri due gruppi comprendono i canali che risiedono principalmente a livello delle membrane intracellulari (16, 17).

Recentemente dalla struttura tridimensionale dei canali CIC si è visto che essi sono degli omodimeri costituiti da 2 subunità le quali contengono 18 eliche di cui molte non attraversano completamente la membrana (18, 19). I canali del cloro CIC possiedono inoltre una lunga porzione carbossi-terminale citoplasmatica che può legarsi ad altre proteine; in questa maniera essi possono essere coinvolti nelle interazioni proteina-proteina, nel traffico intracellulare, nell'oligomerizzazione e nella regolazione

enzimatica allosterica durante la quale possono subire cambiamenti conformazionali (20, 21) (fig1A e 1B).

Il CIC-5 è espresso non solo nel rene, ma anche nel fegato, nel cervello, nel testicolo e nell'intestino. A livello renale è localizzato nel tubulo prossimale, nel tratto ascendente dell'ansa di Henle e nelle cellule intercalate dei dotti collettori (22,23) (fig. 2).

Nel tubulo prossimale umano l'espressione di CIC-5 inizia nel segmento S1 e continua nei segmenti S2 e S3. Qui il canale è localizzato intracellularmente nella regione di formazione delle vescicole, sotto i microvilli dell'orletto a spazzola e in modo predominante, a livello degli endosomi precoci. In particolare, questi ultimi contengono la pompa protonica H^+ – ATPasi e fanno parte del pathway endocitico deputato, attraverso recettori di membrana, al trasporto di albumina e proteine a basso peso molecolare (24-26)(fig.3). La colocalizzazione di CIC-5 suggerisce un ruolo di quest'ultimo nel contro-trasporto di ioni necessario per il funzionamento della pompa protonica e quindi per la corretta acidificazione e funzione degli endosomi. A livello dei dotti collettori corticali e midollari, CIC-5 è espresso apicalmente nelle cellule intercalate di tipo alfa e anche qui co-localizza con la pompa protonica, H^+ – ATPasi suggerendo un suo coinvolgimento nella partecipazione ai processi di trasporto ionico trans-epiteliali (27) (fig. 3).

CIC-5 è anche espresso nelle cellule epiteliali del tratto ascendente dell'ansa di Henle, dove sembra avere un ruolo nell'eziologia dell'ipercalciuria (28).

CIC-5 è espresso quindi soprattutto nei compartimenti vescicolari della cellula tubulare; transitoriamente è anche presente nella membrana plasmatica, dove potrebbe svolgere un ruolo nel riciclo delle vescicole endocitiche.

Esso è inoltre il primo canale del cloro per il quale è stato stabilito un ruolo cruciale nel traffico e nel riciclo, acidificazione-dipendente, delle proteine apicali di membrana.

In un modello animale di malattia di Dent, topi knockout per il gene CLCN5, si è dimostrato che allo sbilanciamento del traffico endocitico sono riconducibili non solo la proteinuria a basso peso molecolare tipica

della malattia di Dent, ma anche l'ipercalciuria, la fosfaturia e di conseguenza la nefrocalcinosi (29).

Topi knock-out privi di CLC-5 come modelli per la malattia di Dent

Sono stati sviluppati da tre diversi gruppi di ricerca tre modelli murini di malattia di Dent. Piwon e coll (28). hanno scisso il gene *clc-5* ottenendo la perdita dell'RNA e generando topi (*clcn5* -) privi del canale del cloro CLC-5.

Questi animali non presentavano alterazioni morfologiche o istopatologiche renali e non sviluppavano nefrolitiasi né nefrocalcinosi nemmeno a distanza di un anno. Se confrontati con topi wild-type (WT), quelli *clcn5* - producevano una quantità di urina lievemente più acida; inoltre non presentavano ipercalciuria, ma un aumento del 50% circa dell'escrezione di fosfati nell'urina. Tali ratti avevano inoltre una proteinuria a basso peso molecolare analogamente a quanto accade nei pazienti con malattia di Dent. Iniettando lattoglobulina fluorescente si è visto come nei topi WT questa veniva accumulata in vescicole localizzate immediatamente sotto all'orletto a spazzola delle cellule tubulari prossimali in quantità significativamente maggiori rispetto ai topi *clcn5* -.

Anche utilizzando il FITC- destrano, un marcatore non proteico per l'endocitosi a fase fluida si è osservato come questo era riassorbito per il 70% in meno nei ratti privi di canale del cloro.

Anche la megalina (recettore utilizzato dalle cellule del tubulo prossimale per il riassorbimento delle proteine luminali), era significativamente ridotta nelle cellule prive di CLC-5.

Il canale del cloro si co-localizza assieme alla pompa H⁺ATPasi nella regione subapicale delle cellule del tubulo prossimale e delle cellule intercalate del tubulo distale; però a differenza della megalina la scissione del gene *clc-5* non influenza l'espressione di tale pompa protonica.

Diverse proteine di trasporto poste nell'orletto a spazzola sono regolate dall'endocitosi: tra queste il co-trasportatore NaPi-2 di Na⁺/fosfato (responsabile del trasporto di più del 70% del fosforo nell'orletto a spazzola) e la proteina apicale NHE3 di scambio Na⁺/H⁺ (coinvolta nel

riassorbimento di Na, HCO_3^-). Entrambe le proteine sono rimosse dalle membrane plasmatiche in risposta al PTH. Il trasportatore NaPi-2 viene poi degradato nei lisosomi. Quando i topi WT venivano tenuti a dieta normale, l'immunofluorescenza con anticorpi anti-NaPi2 colorava intensamente l'orletto a spazzola di cellule prossimali; al contrario, la colorazione nei ratti *clcn5* - era invece meno intensa e la proteina presentava una diversa localizzazione subcellulare in parti diverse dal tratto S1; questo risultato era inaspettato in quanto un difetto dell'endocitosi di NaPi-2 avrebbe dovuto comportare un aumento della presenza a livello della membrana plasmatica dello stesso carrier. In femmine eterozigoti *clcn5*^{+/-} l'orletto a spazzola era colorato intensamente quanto nei topi WT; l'analisi western-blot dimostra che la NaPi-2 era ridotta in *clcn5*, ma non in *clcn*^{+/-}. Questi risultati indicano che una difettosa regolazione nella membrana plasmatica di NaPi-2 può causare iperfosfaturia in topi *clcn-5* - e in pazienti con malattia di Dent.

Privando i topi *clcn-5*- e WT di Pi veniva accentuata l'espressione sulla membrana plasmatica di NaPi-2; quando però si iniettava PTH ai topi privati di Pi, dopo circa 15 min si osservava che NaPi-2 veniva assorbito in tutti segmenti PT nei topi WT, ma non nei topi *clcn-5* -; 30 min dopo, NaPi-2 cominciava ad essere evidente in vescicole intracellulari nei tubuli dei topi *clcn-5* - ma a localizzazione ancora apicale, mentre dopo un'ora risultava significativamente assorbito. Quindi si deduce che la regolazione di NaPi-2 da parte del PTH avviene in questi animali più lentamente sebbene quantitativamente in modo normale.

Nei topi *clcn-5*- il PTH sierico risultava lievemente aumentato. Nelle cellule del tubulo prossimale i recettori per il PTH sono espressi nelle membrane basolaterali e apicali con quest'ultimi che risultano essere funzionali; inoltre il PTH si lega alla megalina e viene endocitato e degradato nelle cellule del tubulo prossimale; ciò suggerisce che l'endocitosi che risulta insufficiente nei ratti *clcn-5* - sia responsabile dei livelli di PTH luminali nei segmenti S1 e S3 del tubulo prossimale e che la conseguente maggior stimolazione dei recettori luminali del PTH determini un'accentuazione dell'assorbimento di NaPi-2.

Se questa ipotesi è corretta, l'assorbimento di NaPi-2 non dovrebbe aumentare nel segmento S1, poiché i livelli di PTH non sono aumentati nel tratto iniziale del tubulo.

Questa ipotesi suggerisce inoltre un aumento della perdita urinaria di PTH. È stato osservato che nell'urina di topi privi di megalina vi è un aumento di 4 volte del PTH, e che la lieve insufficienza di endocitosi mediata dalla megalina nei topi *clcn-5*- aumenta l'escrezione urinaria di PTH di 1.7 volte. Pertanto la fosfaturia nei topi *clcn-5*- può essere la conseguenza di una ridotta endocitosi del PTH ultrafiltrato.

L'aumento del PTH luminale dà adito ad altre due previsioni:

l'attività dei recettori di PTH dovrebbe stimolare nel tubulo prossimale la conversione di 25(OH) vitamina D3 nel metabolita attivo 1-25(OH)2 vitamina D3. La perdita urinaria di Pi può aumentare l'1-25(OH)2 vitamina D3 come è stato rilevato dalla riduzione del 50% della NaPi-2 in ratti *Npt2*^{+/-}.

D'altra parte la riduzione dell'endocitosi della vitamina D legata alla sua proteina legante porta ad una perdita di vit D nell'urina e diminuisce la disponibilità del precursore 25(OH) vitamina D3 nelle cellule PT.

Topi knock-out per la megalina nei quali l'endocitosi mediata dai recettori della proteina che si lega alla vitamina D è totalmente abolita, presentano una grave carenza di vitamina D. Nei topi *clcn-5*- i livelli sierici di 25(OH) vitamina D3 e 1-25(OH)2 vitamina D3 sono rispettivamente inferiori di 2 e 3 volte. Dato che 1-25(OH)2 inibisce direttamente la secrezione di PTH questo può determinare il lieve aumento di tale ormone nel siero. Ciò però contrasta con i livelli modicamente elevati di 1-25(OH)2 vitamina D3 e concentrazioni lievemente diminuite riscontrate in molti pazienti con malattia di Dent.

Questa differenza può essere giustificata dal delicato equilibrio fra gli effetti opposti della maggior stimolazione dei recettori luminali del PTH e della diminuita disponibilità di 25(OH) vitamina D3 risultanti entrambi da una endocitosi apicale ridotta. Ciò può portare sia ad un aumento che ad una diminuzione nella concentrazione di 1-25(OH)2 vitamina D3.

Dato che 1-25(OH)₂ vitamina D₃ stimola l'assorbimento di Ca²⁺ e Pi, il suo aumento può condurre all'ipercalciuria e alla nefrolitiasi nella malattia di Dent.

Inoltre, poichè questa è una conseguenza indiretta dell'insufficienza dell'endocitosi, la complessità della regolazione ormonale interposta può spiegare la mancanza di nefrocalcinosi nel modello animale di Pivrot (63) e il quadro clinico variabile negli esseri umani, dove la proteinuria e l'iperfosfaturia sono a volte le uniche manifestazioni.

la stimolazione apicale dei recettori del PTH dovrebbe promuovere l'assorbimento di NHE3 nei tubuli prossimali dei topi *clcn-5*- tenuti a dieta normale. In effetti questo si verifica; tale effetto non è autonomo e la privazione di Pi ha portato ad una espressione apicale di NHE3 anche in topi a dieta priva di Pi. La stimolazione con PTH dei topi privati di Pi ha rilevato un livello più lento di assorbimento di NHE3 in cellule mancanti di *clcn-5*-. Ciò dimostra che l'acidificazione endosomica da parte di NHE3 non può compensare la perdita di CLC-5. Dato che NHE3 è un determinante importante nel trasporto di sale e acqua nelle cellule prossimali, la diminuzione dell'espressione superficiale di NHE3 può contribuire alla lieve diminuzione del volume urinario in topi CLC-5 -.

Secondo Wang e coll. l'insufficienza renale, che è generalmente osservata negli adulti con malattia di Dent, non è stata osservata nei topi con deficit di CLC-5 e ciò può essere dovuto alla ancor giovane età dei topi al termine dell'esperimento .

CLC-5 è localizzata assieme alla pompa H⁺ATPasi negli endosomi che formano parte del percorso dell'endocitosi mediata dai recettori nelle cellule del tubulo prossimale e tale osservazione ha suggerito un ruolo del canale del cloro nell'acidificazione degli endosomi. Il grado di acidificazione endosomiale varia in funzione del fatto che la loro H⁺ATPasi elettrogenica viene antagonizzata da altri trasportatori, ad es. la pompa del Na, o facilitata dalla conduzione del Cl⁻ (68). Si è visto come l'inibizione dell'acidificazione degli endosomi previene la progressione dei primi endosomi verso endosomi maturi e quindi verso i lisosomi. Il CLC-5 ha un ruolo fondamentale nell'acidificazione dei primi endosomi e nel riassorbimento proteico mediato da recettori nelle cellule del tubulo

prossimale; la mancanza di tale processo non porterebbe solo a proteinuria a basso peso molecolare, ma anche a una perdita di aminoacidi e glucosio, presumibilmente attraverso un malfunzionamento del ricircolo dei loro trasportatori specifici alle membrane delle cellule apicali

Ruolo del canale del cloro

Attraverso il processo di endocitosi le cellule internalizzano le sostanze extracellulari. Tale processo inizia con la gemmazione della membrana plasmatica; le vescicole formatesi vengono via via acidificate lungo il percorso endocitico sino a giungere ai pH elevati nei lisosomi (32).

L'ambiente acido è necessario per l'attività delle proteasi lisosomiali e questo viene mantenuto grazie all'attività della pompa H⁺ATPasi; ovviamente è necessario il mantenimento dell'elettroneutralità all'interno dell'organulo cellulare e questo avviene grazie al fatto che il catione H⁺ è seguito da un'anione come il Cl⁻; l'alterata funzione del canale del cloro e quindi della pompa H⁺ATPasi causa l'aumento del pH endosomiale riducendo l'attività delle proteasi e diminuzione dell'endocitosi con conseguente proteinuria a basso peso molecolare (33).

Due principali tipi di cellule, le cellule prossimali tubulari e le cellule alfa intercalate del dotto collettore, esprimono elevati livelli di H⁺ – ATPasi; nelle stesse cellule e negli stessi compartimenti è presente CIC-5 che, assieme alla pompa, garantisce l'efficace acidificazione degli endosomi e il corretto funzionamento del processo endocitico. Questo è stato dimostrato in maniera convincente usando topi knockout per CIC-5, nei quali gli endosomi apparivano significativamente meno acidi rispetto agli endosomi dei topi wild-type (29).

Un ruolo centrale nella regolazione del volume e della composizione dei liquidi corporei, è svolto dal riassorbimento tubulare, e la sede di questo processo è il tubulo contorto prossimale il quale svolge un ruolo unico nel nefrone per quanto riguarda l'handling delle proteine filtrate. Le membrane plasmatiche luminali, infatti, hanno un ricco apparato di microvilli che provocano un aumento della superficie di membrana tale da facilitare così

l'endocitosi delle macromolecole del lume tubulare attraverso vescicole rivestite di clatrina (32, 34) (fig 4).

Tali cellule hanno un citoplasma in cui sono particolarmente rappresentate le componenti dell'apparato endocitico, inclusi endosomi, lisosomi, vescicole tubulari apicali dense coinvolte nel riciclo dagli endosomi alla membrana plasmatica apicale dei recettori per l'assorbimento delle proteine, ma anche di numerose proteine di trasporto, ad es. il cotrasportatore NaPi-2, lo scambiatore Na⁺/H⁺ NHE3 e forse il canale epiteliale del calcio vit.D dipendente ECaC (34).

Numerosi sono i recettori coinvolti nei processi di riassorbimento tubulare delle proteine a basso peso molecolare, ma il ruolo principale sembra però essere svolto da megalina e cubilina (35). Le mutazioni inattivanti il canale CIC-5 possono dare spiegazione della principale caratteristica della malattia di Dent: la proteinuria a basso peso molecolare. L'ipofunzionalità di CIC-5, è causa di un diminuito influsso di cloro nelle vescicole, di una mancata dissipazione delle cariche generate dalla pompa protonica H⁺ – ATPasi, e conseguentemente di un'alterata acidificazione endosomiale, di un alterato riciclo dei recettori di megalina e cubilina, e quindi di un inefficiente riassorbimento delle proteine a basso peso molecolare. Inoltre, il difetto nel processo di endocitosi sembra essere responsabile anche dell'inappropriato riciclo di trasportatori specifici a livello della membrana luminale. La glicosuria, l'aminoaciduria, la fosfaturia della malattia di Dent potrebbero così essere riconducibili a tale fenomeno.

Ci sono crescenti evidenze che dimostrano come le interazioni tra la porzione C-terminale dei canali ionici con trasportatori e altre proteine cellulari sono critiche per molte funzioni associate alla membrana plasmatica. Queste comprendono la regolazione del traffico delle proteine agli e dagli endosomi, la formazione di complessi macromolecolari mediante proteine strutturali, il conferimento della specificità spaziale ai segnali di trasduzione (36). Le interazioni della porzione C-terminale con il citoscheletro e in particolare con proteine che legano l'actina, oppure con proteine strutturali e altre molecole che regolano la dinamica di formazione dei microfilamenti sembrano essenziali per queste funzioni.

Nel tubulo prossimale, dove il processo di endocitosi è molto attivo, i filamenti di actina consentono un costante rimodellamento, che può avvenire solo in presenza di un citoscheletro intatto. Difetti a carico del citoscheletro, o alla scorretta interazione di questo con CIC-5 possono quindi riflettersi in anomalie nel processo di endocitosi anche molto precoci, nel momento cioè della formazione del nascente endosoma (37).

Relazione tra alterata endocitosi ed ipercalciuria

Il riassorbimento del calcio è un processo altamente regolato da diversi ormoni e vitamine, ed avviene in un lungo tratto del nefrone che include il tubulo prossimale, l'ansa discendente di Henle e il tubulo distale (38). Nel tubulo prossimale una certa quantità di calcio è riassorbita mediante endocitosi. Qui la megalina, oltre che mediare l'endocitosi dell'albumina e delle proteine a basso peso molecolare legherebbe anche ioni calcio e potrebbe perciò essere responsabile di gran parte dell'assunzione non regolata del calcio che avviene a questo livello del nefrone. Alterazioni del processo endocitotico prossimale potrebbero quindi, in parte, spiegare un'altra delle caratteristiche cliniche della malattia di Dent, l'ipercalciuria che in tal caso sarebbe di "tipo renale". La maggior parte del riassorbimento regolato del calcio avviene nel tratto ascendente dell'ansa di Henle e nel tubulo distale (39). La localizzazione di CIC-5 nelle cellule epiteliali del tratto ascendente dell'ansa di Henle, suggerisce un altro possibile meccanismo dell'ipercalciuria: le anomalie nel riciclo endosomico derivati da disfunzioni di CIC-5, in questo tratto di nefrone, potrebbero portare ad un alterato riciclo ed attività del recettore calcio sensibile (CaSR) e dei trasportatori di superficie come il co-trasportatore sodio-potassio-cloro (NKCC2) (40), il canale del cloro CIC-kb e il canale del potassio (ROMK) coinvolti nell'assorbimento di elettroliti e del calcio (41). Un'ultima ipotesi è stata recentemente dimostrata in topi knockout per CIC-5: l'ipercalciuria è una conseguenza della variazione del metabolismo degli ormoni calciotropi. I due ormoni principali che regolano il metabolismo minerale sono l'ormone paratiroideo (PTH) e la forma attiva

della vitamina D (1,25-diidrossi vit.D3). Il precursore della vitamina D (25-idrossi vit D3) associato alla vitamin D binding protein e il PTH, sono filtrati nell'urina primaria, endocitati a livello delle cellule epiteliali tubulari con un processo megalina-dipendente e quindi degradati (31,39) (fig.5). Nei topi knockout l'aumento delle concentrazioni luminali di PTH da difetto del processo di endocitosi, attraverso la stimolazione dei recettori apicali per PTH stesso, inducono l'espressione intracellulare dell'enzima x-idrolasi mitocondriale che genera la forma attiva della vit.D dal suo precursore (29, 42). Questo si riflette in un aumento dei livelli di vitamina nel siero, come si osserva nei pazienti con malattia di Dent.

L'aumento dei livelli sierici di 1,25 diidrossi vit. D3 attiva, provoca a sua volta, l'aumento dell'assorbimento intestinale del calcio, quindi ipercalciuria e formazione di calcoli renali e/o la nefrocalcinosi. Con questo meccanismo l'ipercalciuria sarebbe di tipo intestinale (assorbitiva).

Se da un lato gli elevati livelli di PTH luminali stimolano l'idrossilazione della 25(OH)vitamina D3 nell'ormone attivo, questo processo è contrastato dalla contemporanea perdita urinaria del precursore, che si verifica a causa dell'endocitosi difettiva. Esiste un delicato bilancio tra questi due opposti effetti che probabilmente determina la presenza o l'assenza di ipercalciuria e questo potrebbe spiegare parte della variabilità clinica della malattia di Dent così come dimostrato in modelli animali (29, 31).

Patogenesi dell'ipercalciuria nei pazienti con mutazione CLCN5

La nefrocalcinosi e/o nefrolitiasi sono invariabilmente presenti nella malattia di Dent e una delle cause è l'ipercalciuria.

Recentemente sono stati condotti studi su un modello sperimentale in vitro (31), che hanno fornito dettagli su come difetti a carico di CLC-5 possa condurre allo sviluppo di nefrolitiasi a carico del dotto collettore.

L'urina nella parte più distale del nefrone raggiunge condizioni di supersaturazione tali da portare alla formazione di microcristalli di fosfato di calcio. Questi possono formare dei nuclei solidi, che possono aderire alla superficie apicale delle cellule del dotto collettore, e quindi aumentare di dimensioni in seguito al deposito di ossalato o fosfato di calcio,

diventando calcoli clinicamente significativi (43). L'ipotesi che l'epitelio tubulare abbia un ruolo fisiologico nella clearance dei cristalli di calcio dalle urine mediante endocitosi e dissoluzione nei compartimenti endosomiali acidi, è stata recentemente confermata in un modello in vitro di cellule duttali murine transfettate con CIC-5 antisense per bloccare la trascrizione del gene CLCN5. In questo modello di cellule l'internalizzazione delle lectina così come dei cristalli di ossalato e fosfato di calcio risultavano alterati; Più recentemente è stato dimostrato in queste linee cellulari un importante aumento nella membrana plasmatica dell'annexinA2, una molecola cristallo legante.

L'incremento di questa molecola indurrebbe un aumento degli agglomerati di cristalli sulla superficie delle cellule che possono essere attenuati con anticorpi anti-annexinA2. Si suppone che il difetto a carico del canale del cloro e quindi dell'endocitosi conduca all'accumulo nella membrana di molecole cristallo-leganti che successivamente condurrebbero alla formazione di agglomerati di cristalli di calcio ed infine alla nefrocalcinosi e/o nefrolitiasi.(69).

Placche di Randall

Nel 1937 Alexander Randall, descrive per la prima volta la presenza nell'epitelio di papille renali prelevate da cadaveri non selezionati, di placche calcaree. Egli teorizza che tali placche, definite da quel momento come placche di Randall, abbiano un ruolo nella patogenesi della calcolosi urinaria ; l'ipotesi è che tali placche, possano perdere la loro copertura epiteliale e da quel momento siano esposte all'urina caliceale, diventando così il "nidus" su cui si stratificherebbero cristalli di fosfato di calcio. In questo studio egli ha potuto osservare placche nel 19,6% delle 1154 coppie di reni studiati.

La placca di Randall (Fig 6 a-b) rappresenta un segno patognomonico della nefrocalcinosi ; è un sito posto, in corrispondenza dell'apice delle papille renali, di colore biancastro con bordi serpiginosi, di deposizione di cristalli di fosfato di calcio. Le dimensioni di questi depositi è dell'ordine dei

50 nm i quali si accrescono sotto forma di sfere formate da più anelli di materiale elettrondenso posti in strati l'uno sopra l'altro.

Originano in corrispondenza della membrana basale del tratto sottile dell'ansa di Henle e crescendo, tendono ad estendersi verso l'interstizio, sino all'urotelio papillare dove costituiscono dei siti di ancoraggio per la formazione di calcoli nello spazio urinario.

I possibili eventi che portano alla formazione dei comuni calcoli di ossalato di calcio potrebbero essere i seguenti: (69)

la placca di Randall si formerebbe in risposta all'elevata concentrazione di calcio nonché al ridotto volume e pH urinario. Per motivi sconosciuti, la perdita dell'integrità dell'urotelio papillare (ulcerazione) esporrebbe tali regioni della placca alle proteine urinarie che successivamente formerebbero uno strato che coprirebbe la placca esposta; almeno in parte questo strato contiene due proteine prevalenti nell'urina, rappresentate dalla proteina di Tamm-Horsfall (THP) e dall'osteopontina, che presentano elevata affinità per i cristalli di idrossiapatite. All'interno di questo strato favoriti dalle sovrasaturazioni dell'urina di fosfato di calcio, si formano, i cristalli amorfi di idrossiapatite.

Ulteriori proteine dell'urina si adsorbono all'idrossiapatite formando un altro strato; questo processo si ripeterebbe con la formazione così di strati ripetuti di cristallizzazione a formare la placca di Randall nel suo aspetto tipico.

Le dimensioni della placca sono proporzionali alle concentrazioni urinarie di calcio e inversamente proporzionali al volume dell'urina; di conseguenza, i trattamenti che riducono la concentrazione del calcio nell'urina e che aumentino il volume urinario hanno un doppio beneficio: riducono le dimensioni della placca e le forze che favoriscono la crescita eccessiva dei cristalli di ossalato di calcio.

In un interessante lavoro del gruppo del prof. F. Coe, (70) che conferma gli studi precedenti, l'esame endoscopico mostrava calcoli adesi alle papille renali nella sede di placche di Randall ulcerate (Fig 7). L'esame istologico del tessuto papillare, prelevato mediante biopsia, mostrava che la placca di Randall consisteva proprio in depositi di idrossiapatite che avevano origine lungo la membrana basale del tratto discendente

dell'ansa per poi estendersi nell'interstizio fino alla superficie della papilla avvolgendo il tubulo discendente, il fascio vascolare e il dotto di Bellini. Occasionalmente era osservata sofferenza delle cellule tubulari (vacuolizzazione citoplasmatica, distacco dalla membrana basale). Nello stesso lavoro, era notato come nei pazienti con calcolosi secondaria a bypass ileo digiunale non vi fossero placche di Randall sulle papille, bensì noduli all'emergenza del dotto di Bellini dove si depositavano macroaggregati di calcio ossalato. Il ruolo della placca di Randall nella patogenesi della calcolosi sembra perciò tipico dei pazienti con calcolosi idiopatica e in questa sequenza patogenetica potrebbe avere un ruolo il CaSR. Il CaSR è espresso sulla membrana apicale delle cellule del tubulo collettore. In questa sede ha la capacità di inibire l'espressione dei canali dell'acqua (AQP2) e quindi il riassorbimento dell'acqua dipendente dall'ADH. È perciò verosimile che alterando il riassorbimento dell'acqua nel tubulo collettore il CaSR possa favorire la precipitazione interstiziale dell'idrossiapatite. Questa ipotesi necessita però di prove che caratterizzino la funzione del CaSR nel tubulo collettore e che individuino le modificazioni indotte dalle SNPs considerate sulla funzione del CaSR.

Aspetti clinici

La malattia di Dent è caratterizzata da proteinuria a basso peso molecolare, ipercalciuria, nefrocalcinosi, nefrolitiasi ed insufficienza renale progressiva.

Le manifestazioni cliniche della malattia di Dent generalmente compaiono, anche se spesso trascurate o non riconosciute, sin nei primi anni di vita, sebbene non di rado le prime manifestazioni vengano osservate in età adulta.

1) Proteinuria a basso peso molecolare:

La maggior parte dei pazienti affetti può presentare solamente proteinuria a basso peso molecolare (proteinuria tubulare) rappresentata soprattutto da $\beta 2$ microglobulina, retinol-binding protein, $\alpha 1$ microglobulina in range normalmente non nefrosico (raramente superiore al grammo/die).

2) Ipercalciuria

Nella malattia di Dent l'ipercalciuria è presente nella maggior parte dei maschi affetti ma anche le femmine possono presentarla pur essendo in quest'ultime più vicine ai limiti di normalità; l'ipercalciuria è di tipo misto comprendente un eccessivo assorbimento intestinale e perdita urinaria di calcio (45), come si osserva anche nelle ipercalciurie idiopatiche e può essere anche particolarmente cospicua superando anche i 10-12 mg/kg/die. I livelli ematici di PTH sono normali o ai limiti inferiori della norma mentre quelli della 1,25(OH) vit D3 sono elevati. Questo modello di rimaneggiamento del calcio è stato inoltre trovato in molti pazienti con ipercalciuria idiopatica.

L'escrezione urinaria dell'ossalato, del citrato e dell'acido urico è solitamente normale.

Nefrolitiasi, nefrocalcinosi e ipercalciuria possono variamente associarsi tra loro e con altre manifestazioni suggestive di un disordine tubulare complesso, prevalentemente prossimale (aminoaciduria, glicosuria, e meno frequentemente fosfaturia ed ipercalciuria), ma anche distale (acidosi tubulare distale, ipocitraturia, difetti di concentrazione). Queste anomalie biochimiche non sono in genere eclatanti e non dominano il quadro, salvo nei casi caratterizzati da rachitismo in cui l'ipofosfatemia è tipicamente presente (47).

3) Nefrocalcinosi e nefrolitiasi.

La nefrocalcinosi si osserva molto frequentemente (fino al 75% dei maschi affetti) ed è di tipo midollare in particolare essa è localizzata nella midollare esterna e non papillare, diversamente da quanto accade nell'MSK (rene midollare a spugna) dove le calcificazioni sono localizzate nelle porzioni papillari interne dei dotti collettori; anche la nefrolitiasi è frequente (fino al 50%) rappresentata da calcoli di ossalato e/o di fosfato di calcio, di solito bilaterali con episodi di colica che possono manifestarsi già dall'infanzia.

4) IRC

La patogenesi dell'insufficienza renale terminale nella malattia di Dent rimane ancora sconosciuta.

La progressione verso l'insufficienza renale non è legata alla nefrocalcinosi visto che ciò si verifica anche in pazienti nei quali tale condizione non era presente (45,46). Inoltre, in altre condizioni in cui si manifesta nefrocalcinosi con la stessa estensione che nella malattia di Dent, ad es. l'acidosi tubulare renale di tipo 1, l'insufficienza renale si verificava meno frequentemente. Si ipotizza che le elevate concentrazioni urinarie di polipeptidi (ormoni, proteine vettrici delle vitamine, fattori di crescita e chemochine) giochino un ruolo nella patogenesi del danno renale. E' possibile che il difetto dell'endocitosi presente nella malattia di Dent delle proteine mimino un overload proteico a livello del tubulo prossimale, in grado di attivare una cascata di fattori fibrogenetici (45).

E' stato valutato che il 35-100% dei pazienti con malattia di Dent sviluppa insufficienza renale terminale ; l'età media di insorgenza è di 47 ± 13 anni. Il reperto istologico è rappresentato da nefrite interstiziale cronica con foci calcifici peri- ed intra- epiteliali. I glomeruli sono normali o sede di ialinosi, prevale l'atrofia tubulare, con infiltrati infiammatori diffusi composti da linfociti e foci di calcificazione attorno e all'interno delle cellule epiteliali tuttavia tale quadro può essere assente tanto da non consentire neppure d'ipotizzarla. L'immunofluorescenza è negativa. La nefrocalcinosi e la nefrolitiasi non recidivano nel rene trapiantato in questi pazienti (45). Rarissimo è il riscontro di insufficienza renale cronica nelle donne portatrici (1), che invece presentano talvolta ipercalciuria e quasi costantemente microproteinuria (51). Quest'ultima osservazione rende la proteinuria a basso peso molecolare (soprattutto la β_2 -microglobulina e la retinol binding protein), un marker dello stato di portatore nelle femmine delle famiglie di pazienti affetti. Sono stati descritti anche casi di donne portatrici con calcolosi renale (52).

5) Tubulopatia prossimale

La diagnosi differenziale con la sindrome di Fanconi si basa essenzialmente sulla presenza della nefrocalcinosi e/o dell'ipercalciuria

e/o della nefrolitiasi. Rispetto ad altre tubulopatie, ad es. la malattia di Bartter che in casi particolari è stata sospettata in pazienti Dent con spiccata nefropatia potassio-disperdente (si trattava di casi con insufficienza renale avanzata) e che può essere anch'essa associata a nefrocalcinosi e ipercalciuria e talora insufficienza renale, la diagnosi trae vantaggio dalla diagnostica molecolare del difetto genetico (53).

La diagnosi differenziale

La malattia di Dent appare come una patologia potenzialmente uremigena sottodiagnosticata.

La diagnosi differenziale viene posta in primo luogo con la nefrolitiasi calcica idiopatica associata a ipercalciuria nei maschi.

La familiarità e il tipo di trasmissione possono non essere d'aiuto, anche perché la NCI ha una significativa tendenza familiare e nei 2/3 dei casi interessa i maschi. Le caratteristiche dell'ipercalciuria non sono certamente patognomoniche, anzi sono quelle che tipicamente si osservano nella NCI. L'età d'insorgenza può essere certamente un indice di sospetto se la calcolosi si manifesta in età pediatrica. Indice di sospetto per la malattia di Dent dovrebbe essere l'associazione con la nefrocalcinosi che nella nefrolitiasi calcica si riscontra solo nell'acidosi tubulare renale distale e nel rene con midollare a spugna. Tuttavia nella malattia di Dent le calcificazioni sono spesso presenti nel passaggio cortico-midollare, in una zona cioè atipica rispetto alle altre condizioni. La microproteinuria quasi costantemente presente nella malattia di Dent dovrebbe orientare verso la diagnosi corretta poiché questa è raramente presente in queste due condizioni e nella NCI. L'associazione con alterazioni, anche iniziali, della funzione renale globale (creatininemia, clearance della creatinina) in casi senza una storia significativa di interventi urologici, di sepsi urinarie, di complicanze della calcolosi dovrebbe mettere in guardia sulla possibile diagnosi di malattia di Dent di fronte ad un maschio affetto da calcolosi calcica (49).

La diagnosi differenziale con sindrome di Fanconi si basa invece essenzialmente sulla presenza della nefrocalcinosi e/o dell'ipercalciuria

e/o della nefrolitiasi. Rispetto ad altre tubulopatie, ad es. la malattia di Bartter che in casi particolari è stata sospettata in pazienti Dent con spiccata nefropatia potassio-disperdente (si trattava di casi con insufficienza renale avanzata) e che può essere anch'essa associata a nefrocalcinosi e ipercalciuria e talora insufficienza renale, la diagnosi trae vantaggio dalla diagnostica molecolare del difetto genetico (52).

Cenni di terapia

I topi knockout per CLC5, carenti del canale del cloro (55,56) sviluppano poliuria, proteinuria a basso peso molecolare, aminoaciduria, glicosuria e l'ipercalciuria. La calciuria giornaliera è circa due volte superiore nei topi knockout CLC5, un incremento simile a quello rilevato nei pazienti affetti da malattia di Dent (57).

Gli esperimenti nei tubuli prossimali dei knockout CLC5 valutanti l'assorbimento di diversi markers di endocitosi come la β_2 -microglobulina, hanno dimostrato che c'è una diminuzione nell'assorbimento, mediato da recettore, di proteine a basso peso molecolare, causando la proteinuria a basso peso molecolare. Il malfunzionamento dei canali CLC5 portano ad un'endocitosi difettiva ma non è ancora chiara la ragione. È stato ipotizzato che la perdita del CLC5 porti a un'acidificazione difettiva del compartimento endocitico. È stato dimostrato come i topi knockout CLC5 adulti possiedano alcuni attributi della malattia di Dent inclusa la nefrocalcinosi, l'insufficienza renale progressiva e la fibrosi quest'ultima rivelata da un'alta concentrazione del TGF β_1 (55).

È stato ipotizzato che la rimozione del citrato dalla normale dieta (58) avrebbe accelerato la malattia renale. Mettendo a confronto i due tipi di topi, wild -type e knockout in base ai parametri biochimici di funzionalità renale come la creatinina, la frazione di filtrazione glomerulare e alle caratteristiche istologiche come l'infiammazione e la fibrosi interstiziali, l'atrofia tubulare e la nefrocalcinosi, si dimostra che la rimozione del citrato dalla dieta accelera l'insufficienza renale nei topi knockout CLC5. Viceversa, la dieta ad alto citrato preserva le funzioni renali e ritarda la

progressione della malattia renale in questo modello (Cebotaru et al., 2005).

L'ipercalciuria è il principale fattore di rischio che promuove la nefrolitiasi nella malattia di Dent. Raja ed altri hanno valutato l'effetto dei diuretici sull'escrezione del calcio urinario(59).

Questo studio ha esaminato la composizione urinaria in otto pazienti maschi con la malattia di Dent di età compresa tra i 6 - 49 anni ipercalcemici a confronto con otto maschi di età compresa tra i 7 - 34 anni, con ipercalcemia idiopatica. Sono state ottenute due successive raccolte urinarie delle 24/h in assenza di terapia e dopo 2 settimane dall'assunzione di clortalidone (25mg), di amiloride (5mg) e dei due diuretici in associazione. Clortalidone da solo ($P < 0.002$) e la combinazione di clortalidone e dell'amiloride ($P < 0.003$) hanno ridotto significativamente l'escrezione del calcio in entrambi i gruppi di pazienti. Con il solo clortalidone, l'escrezione del calcio è ritornata nella norma (< 4.0 mg/kg) in tutti i pazienti di ogni gruppo.

L'amiloride da solo non ha avuto un significativo effetto sull'escrezione urinaria del calcio, in entrambi i gruppi di pazienti. Ciò non era una conseguenza dell'inattivazione CIC-5, perché era inefficace sia nei pazienti con ipercalcemia idiopatica quanto in quelli con la malattia di Dent. La fibrogenesi renale porta allo stadio finale dell'insufficienza renale nella nefropatia ostruttiva. Nella fase iniziale le cellule mononucleate infiltrano l'interstizio, questo porta all'attivazione e alla proliferazione dei fibroblasti che si pensa aumentino la matrice interstiziale. Le cellule tubulari prossimali interstiziali diventano ipertrofiche in modo da compensare la perdita funzionale, questo seguito da atrofia tubulare (60).

L'eccessivo deposito di matrice provoca la distruzione della struttura renale e diminuzione della funzionalità (61).

I pazienti con malattia di Dent hanno processi infiammatori, atrofia tubulare, fibrosi interstiziale e glomerulosclerosi. Wrong, Norden e Feest (Wrong et al., 1994) hanno descritto anche numerose piccole cisti in un terzo dei pazienti (1).

L'infiammazione interstiziale, l'atrofia tubulare e la fibrosi interstiziale erano significativamente aumentate nei topi knockout a zero citrato di sei e nove mesi paragonati con i topi selvatici corrispondenti per età e dieta.

Venne notato che la fibrosi interstiziale era da lieve a moderata nei topi knockout a zero citrato di sei mesi confrontati con i topi knockout ad alto citrato di dodici mesi. Nei topi knockout a zero citrato di nove mesi la fibrosi interstiziale e l'atrofia tubulare erano da lieve a moderata e comparabile con quella dei topi knockout ad alto citrato di diciassette mesi.

Queste scoperte dimostrano che la fibrosi interstiziale e l'atrofia tubulare possono essere ritardate nei topi knockout nutriti ad alto citrato a lungo termine(58).

Livelli elevati di $TGF\beta_1$ stimolano sia la sintesi di proteine di matrice extracellulare sia di chemochine, così come attivano i fibroblasti, portando ad atrofia tubulare, fibrosi tubulointerstiziale e glomerulosclerosi. L'ostruzione tubulare porta a diminuzione del $TGF\beta_1$. Il $TGF\beta_1$ era aumentato nei reni dei topi knockout a zero citrato di nove mesi rispetto ai topi selvatici a zero citrato di nove mesi. Nei topi knockout e selvatici ad alto citrato di nove e dodici mesi, il $TGF\beta_1$ non era individuabile. Nonostante il $TGF\beta_1$ fosse elevato in un numero di malattie renali progressive sembra che nei topi knockout l'attivazione della cascata $TGF\beta_1$ sia maggiormente relazionata alla calcinosi e alla fibrosi interstiziale (62,64).

La dieta al citrato quindi prolunga apparentemente la funzione renale in questi topi nonostante l'assenza di calcoli e un'evidenza piuttosto sporadica di nefrocalcinosi. Il mantenimento di questo topo con dieta a zero citrato permette ulteriori studi riguardanti lo sviluppo della malattia renale e l'identificazione di nuovi indici di perdita acuta di funzionalità renale. Se questi risultati su un modello murino possono essere applicati alla funzione renale umana nei pazienti con malattia di Dent, l'uso a lungo termine dell'incremento della dieta ad alto citrato potrebbe ritardare la progressione (58).

Scopo dello studio

Scopo di questo studio è stato quello di valutare, attraverso l'esecuzione di uno studio metabolico e di esami strumentali, se emergevano caratteristiche particolari tali da consentire la differenziazione tra malattia di Dent e nefrolitiasi calcica idiopatica, partendo dall'individuazione di un caso di malattia di Dent tipo 1, grazie al quale ci è stato possibile ricostruire l'intero albero genealogico della famiglia, diagnosticando altri individui mutati.

È noto che la diagnosi di malattia di Dent talvolta può essere difficile a causa della povertà delle manifestazioni e dei segni clinici e con presentazioni a volte atipiche.

Da questo deriva l'importanza attribuita alla diagnosi precoce in particolare nell'infanzia, lì dove i sintomi di nefrocalcinosi e microlitiasi potrebbero essere non riconosciuti, rendendo in questo modo, tale patologia potenzialmente uremigena, come sottodiagnosticata.

Materiali e metodi

Pazienti

Un ragazzo di 15 anni giungeva alla nostra osservazione proveniente dal reparto di pediatria dell'ospedale di Padova, a seguito della scoperta avvenuta casualmente per un controllo medico sportivo, di microematuria e lieve proteinuria (0.8-1.0 g/24h). La storia familiare suggeriva una trasmissione autosomica dominante per calcolosi, nefrocalcinosi ed insufficienza renale cronica ; il nonno e uno zio materno avevano infatti una storia clinica di nefrolitiasi e un fratello del nonno era in stadio finale di insufficienza renale cronica con storia clinica di nefrolitiasi e nefrocalcinosi correlata ad un rene midollare a spugna (MSK) per il quale era in trattamento dialitico da 26 anni.

Gli esami bioumorali eseguiti dimostravano creatinina sierica di 45.1 $\mu\text{mol/l}$, indici immunologici (complemento, immunoglobuline, immunocomplessi, fattore reumatoide, anticorpi anti-nucleo e anticorpi anti DNA) nella norma. Furono trovati cristalli di ossalato di calcio nelle urine, quindi si dosarono gli ossalati e il calcio urinari dai quali si riscontrò ipercalciuria (16.4 mmol/24h). Era inoltre presente un indice di selettività

proteico urinario di 0.64 che faceva sospettare una malattia glomerulare e per questo fu prescritta una biopsia renale.

Alla microscopia ottica si rilevarono glomeruli tutti nella norma ad eccezione di due che erano ialini. Si osservò inoltre fibrosi interstiziale associata in un'area, ad infiltrati cellulari. In alcuni glomeruli si riscontrarono depositi mesangiali diffusi o segmentali non specifici di IgM e C3. Alla microscopia elettronica la membrana basale glomerulare risultò normale. Il quadro quindi fece propendere per un disordine interstiziale di tipo non-immunologico.

Uno studio metabolico urinario successivamente eseguito evidenziò la presenza di ipercalciuria tanto da porre il sospetto di malattia di Dent per la quale fu avviata la diagnostica molecolare che mise in evidenza nel gene CLCN5 una sostituzione del nucleotide G con T nell'esone 7 in posizione 1,070 (1,070 G>T), che consisteva in una sostituzione non-conservativa glicina→ valina (G260V). Questa mutazione del gene CLCN5 non era mai stata descritta in precedenza. Venne quindi posta diagnosi di malattia di Dent tipo I (65). Fù inoltre possibile costruire l'albero genealogico fino a quattro generazioni ed estendere l'indagine molecolare a 26 sui 52 componenti riferiti del pedigree.

I maschi affetti della IV generazione vennero presi in carico dai nefrologi della Pediatria.

Alcuni soggetti (n.9) della II e III generazione furono seguiti dalla Clinica Nefrologica ed acconsentirono a sottoporsi all'esecuzione di uno studio metabolico e strumentale per la calcolosi, anamnesticamente veniva riferita familiarità per nefrolitiasi.

Allo studio hanno partecipato complessivamente 9 membri di cui 5 maschi (III 3, III 4, III 12, III 13 e III 15) e 4 femmine (II 1, II 5, III 14).

La bassa numerosità dei soggetti arruolati nello studio deriva sia da difficoltà logistiche (alcuni membri risiedono fuori regione) che da un negato consenso.

Il laboratorio afferente alla Clinica Nefrologica di Padova si occupa, da anni, di diagnostica molecolare in particolare della malattia di Dent in qualità di referente nell'ambito del territorio nazionale.

Metodi

La famiglia indagine di questo studio è composta da 52 componenti; 26 soggetti hanno acconsentito all'esecuzione di un prelievo ematico dedicato all'analisi molecolare del gene CLN5; di questi, 9 hanno acconsentito all'esecuzione di uno studio metabolico nelle urine 24 h e ad esami strumentali comprendenti una ecografia renale e 7 su 9 anche a DXA (densitometria digitale a raggi X) eseguiti da due colleghi dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

Procedimento di diagnostica molecolare per l'individuazione di mutazioni nella malattia di Dent

Dalle cellule nucleate del sangue periferico è stato estratto il DNA genomico utilizzando un metodo di estrazione che prevede l'uso di membrane di silice in formato spin-column alle quali gli acidi nucleici, in presenza di sali calciotropi, si legano in modo specifico.

Per ciascun campione l'estrazione viene fatta in doppio modo tale da avere una quantità di DNA sufficiente per le analisi successive; una volta pronto, il DNA è conservato a 4° C.

La concentrazione e la purezza del DNA estratto vengono determinate attraverso la misura dell'assorbanza a 260 nm (A260) e dell'assorbanza a 280 nm (280) con lo spettrofotometro GeneQuant RNA/DNA calculator (Pharmacia Biotechnology, Uppsala, Sweden).

Sono stati indagati tutti gli 11 esoni utilizzando una metodica di PCR ed impiegando per l'amplificazione di ciascun esone 50 ng di DNA genomico. Dopo la verifica dell'amplificazione, effettuata mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilamide al 7%, ciascun esone del gene CLCN5 è stato studiato mediante l'analisi di SSCP (single strand conformation Polymorfism) su gel di poliacrilamide all'8% con e senza glicerolo e sequenziamento diretto dei prodotti di amplificazione.

Studio metabolico

Nello studio metabolico, in ogni paziente sono stati determinati: creatinina, acido urico, Ca, P, Na, K, Cl, Mg sia a livello plasmatico che urinario e il pH ematico venoso.

Sono inoltre stati dosati anche la fosfatasi alcalina ossea, osteocalcina, paratormone e vitamina D3 a livello plasmatico.

Nelle urine delle 24 ore sono stati dosati, metaboliti specifici quali ossalati (Ox) e citrati e veniva dosata anche la α_1 -microglobulina delle 24 ore.

I dati derivanti dall'analisi ematochimica ed urinaria sono stati rielaborati in funzione di uno studio metabolico della nefrolitiasi (Tab.2).

E' stato calcolato per ognuno la clearance della creatinina in base alla formula classica:

$$C_{cr} = U_{cr} \cdot V_{min} / P_{cr}$$

dove: C_{cr} è la clearance della creatinina (ml/min)

U_{cr} è la creatinina urinaria (mg/dl)

V_{min} si ottiene dal rapporto tra la diuresi delle 24 ore e 1440 (secondi in 24 ore)

P_{cr} è la creatinina plasmatica

Sono stati poi considerati i rapporti tra due metaboliti urinari, Ca e ac. urico, con la creatinina urinaria. I valori nel range di norma sono:

$$U_{Ca}/cr = < 0.14 \text{ (mg/mg)}$$

$$U_{ac.urico}/cr = 0.20-0.40 \text{ (mg/mg)}$$

Inoltre è stata calcolata l'escrezione frazionata (EF) del Na e dell'ac. urico secondo la formula:

$$EF_{Na} = C_{Na} \cdot 100 / C_{cr} \text{ (v.n. 0.5-1.5\%)}$$

$$EF_{ac.urico} = C_{ac.urico} \cdot 100 / C_{cr} \text{ (v.n. 7-14\%)}$$

Un altro parametro calcolato è stato quello del T_m (tubulare massimo) ovvero la quantità massima di ogni sostanza che può essere trasportata attraverso i tubuli, sia per l'assorbimento che per la secrezione. In particolare è stato calcolato il T_m del fosfato ($T_{m_{PO_4}}/VFG$ dove VFG è la velocità di filtrazione glomerulare), attraverso la seguente formula:

$$C_{PO_4}/C_{cr} = U_{PO_4} \cdot P_{cr} / U_{cr} \cdot P_{PO_4}$$

il cui valore normale è compreso tra 2.2 e 4.4.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta mediante test t (di student) dove sono state calcolate la media e la deviazione standard (DS) e test di regressione lineare (r, p).

Risultati

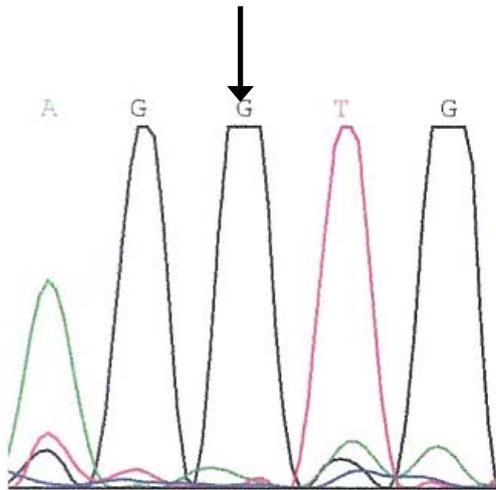
Studio molecolare

L'analisi molecolare di CLCN5 ha messo in evidenza una mutazione che consisteva in una sostituzione del nucleotide G con T nell'esone 7 in posizione 1,070 (1,070 G>T), questo comportava una sostituzione non-conservativa glicina→valina (G260V).

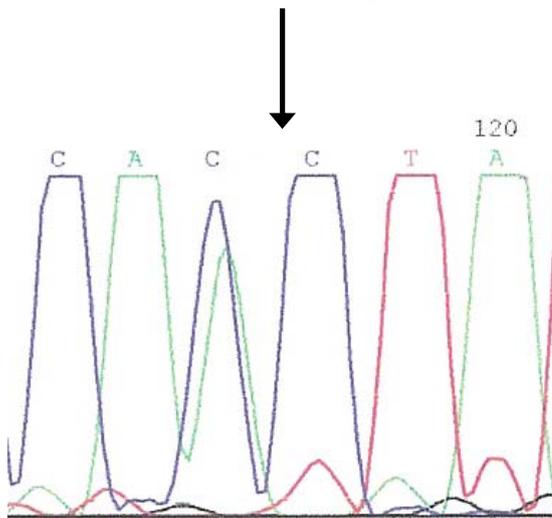
Essa è stata riscontrata, oltre al probando, anche in 7 maschi su 11 e 11 femmine eterozigoti su 15, tutti affetti quindi da malattia di Dent. Quattro maschi affetti e 3 femmine portatrici appartengono alla IV generazione, e la loro età variava al momento della diagnosi molecolare (2005) da 15 a 2 anni; 4 maschi affetti e 2 non affetti, e 8 femmine eterozigoti e 2 non portatrici, sono stati identificati nella III e II generazione (la loro età variava tra 76 e 64 anni per la II generazione, tra 46 e 37 anni per la III).

Di seguito l'albero genealogico della famiglia vengono illustrate le sequenze wild-type (WT), eterozigote e mutata del gene CLCN5; nelle sequenze WT e mutata è stato usato un primer forward mentre in quella eterozigote un primer reverse.

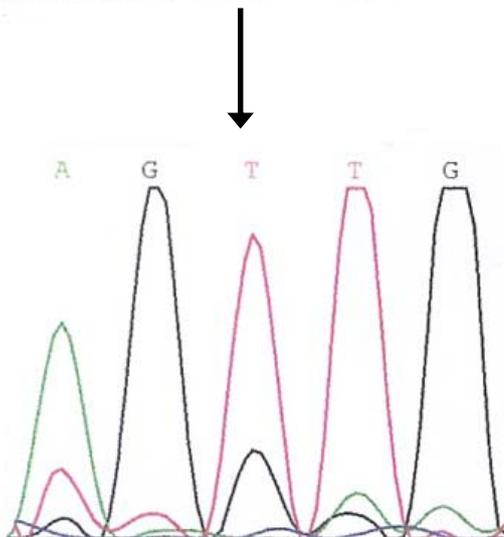
Mutazione G260V



WT(primerforward)sequenza normale



ETEROZIGOTE (primer reverse)



SEQUENZA MUTATA (primer forward)

Studio metabolico

Lo studio metabolico ha evidenziato che 5 pazienti su 9 presentavano ipercalciuria (U ca > 300 mg/die) di questi 3 erano i soggetti risultati mutati (III 4, III12, III13), 1 era eterozigote (II 5) e 1 era non mutato (III 15); mentre 6 pazienti e tra questi sono compresi i 3 mutati, presentavano iperfosfaturia (U PO₄ > 1000 mg/die), ipersodiuria (U Na > 220 mMol/die) e iperuricuria (U ac. Urico > 750 mg/die), va sottolineato inoltre che nei tre mutati l'iperuricuria si associava ad iperuricemia (P ac. Urico > 7.0 mg/die). Quest'ultimo dato fa pensare ad una non secondarietà dell'iperuricemia, inoltre essa non era mai stata precedentemente descritta in letteratura come caratteristica in persone con mutazione del canale del cloro e quindi malattia di Dent

L'iperossaluria (U OX > 0.63 mMol/die) era presente in 5 pazienti, di cui 2 erano mutati (III 12 e III 13), 2 eterozigoti (II 5 e III 14) e 1 non mutato (III 15); l'ipocitraturia (U citrato < 2.0 mMol/die) è stata riscontrata in 2 di questi pazienti, di cui 1 mutato (III4) e 1 eterozigote (II 1). Nessuno dei soggetti da noi studiati presentava ipomagnesiuria o ipomagnesiemia.

In nessuno di questi soggetti è stata riscontrata ne insufficienza renale ne una ridotta funzione renale nonostante i 3 pazienti mutati abbiano un'età compresa fra la III e IV decade, periodo in cui si manifesta l'insufficienza renale in persone con mutazione CLCN5 (tab. II.a).

In tuttii soggetti studiati i livelli di PTH, Osteocalcina e ALP ossea sono risultati nella norma, come pure la clearance della creatinina. Si segnala un lieve aumento di PTH in 1 soggetto non mutato (III 15). La vitamina D3 è in concentrazioni inferiori ai limiti di sufficienza in 3 soggetti, 1 mutato (III13), e 2 eterozigoti (II1,III14) (Tab. 3 plasma).

I livelli di α_1 microglobulina erano particolarmente elevati nei 3 pazienti mutati, questo dato conferma la proteinuria a basso peso molecolare caratteristica della malattia di Dent (Tab. II b urine).

Tabella II.a – Studio metabolico per la nefrolitiasi: parametri ematochimici ed urinari.

Paziente	II 1	III 2	III 3	III 4	II 5	III 12	III 13	III 14	III 15
Sesso	F	F	M	M	F	M	M	F	M
Età (anni)	78	48	48	42	70	47	45	43	39
P _{Cr} (mg/dl) [0.6 – 1.3]	0.74	0.61	0.81	0.69	0.74	0.85	0.74	0.90	0.71
C _{LCr} (ml/min/1.73 m ²) [78 – 134]	95.6	116.9	98.6	81.2	98.5	130.7	136.0	131.6	121.8
P _{Ca} (mg/dl) [8.4 – 10.4]	9.88	9.64	9.8	10.2	10.2	9	9.48	9.72	9.2
U _{Ca} (mg/die) [100 – 300]	38.8	236.4	200	424.8	430.4	401.2	367.2	262.8	328.8
U _{Ca} /Cr [< 0.14]	0.03	0.22	0.17	0.52	0.40	0.27	0.21	0.18	0.20
U _{Na} (mMol/die) [40 – 220]	107	202	198	299	310	426	503	261	299
EF _{Na} [0.5 – 1.5%]	0.65	0.86	1.49	1.23	1.57	1.59	1.76	0.79	1.20
P _{PO4} (mg/dl) [2.7 – 4.5]	3.65	3.16	3.68	3.99	4.03	3.25	3.03	2.85	3.19
U _{PO4} (mg/die) [< 1000]	341	613.8	1050.1	1277.2	985.8	1007.7	1560.9	1292.7	1320.6
T _m PO ₄ /VFG [2.2 – 4.4]	4.08	2.90	2.94	2.90	3.38	2.76	2.30	2.16	2.50
P _{Ac.Urico} (mg/dl) [3.7 – 7.0]	5.4	2.70	5.41	6.59	5.07	5.24	12.67	7.27	3.89
U _{Ac.Urico} (mg/die) [250 – 750]	195	595	652	776	602	822	1069	1362	1003
EF _{Ac.Urico} [7 – 14%]	2.60	13	12.70	10.04	8.30	8.25	4.20	5.50	13.09
U _{Ac.Urico} /Cr [0.20 – 0.40]	0.19	0.57	0.56	0.95	0.57	0.50	0.72	0.79	0.70
U _{Ossalato} (mMol/die) [0.23 – 0.63]	0.26	0.24	0.23	0.20	0.74	0.93	0.88	0.72	0.80
U _{Mg} (mMol/die) [2.5 – 8.5]	3.4	4	3.6	3.8	5.4	7.8	8	7.2	9.9
U _{Citrato} (mMol/die) [2.0 – 4.0]	1	4.67	2.58	0.47	2.64	3.65	3.62	4.97	5.01

Tabella II.b- studio metabolico per nefrolitiasi

Paziente	II 1	III 2	III 3	III 4	II 5	III 12	III 13	III 14	III 15
Plasma									
Osteocalcina (mg/l) [0 – 7]	2.5		3.3	3.3	<0.5	0.7	3.4	<0.5	0.7
PTH (ng/l) [10 – 55]	37	14	30	25	42	36	27	29	63
VitaminaD3 (nmol/l) [30 – 100]	26	42	30	42		97	24	24	
ALP-ossea (µg/L) [0 – 20.1]	15.3		20	27	20.5	17.5	13	13.3	
Urine									
α ₁ MG (mg/die) [0-17]	10	5	8	67.5	10.7	207.8	53	14.7	16.8

Tabella IV- studio metabolico nelle tre categorie di pz studiati

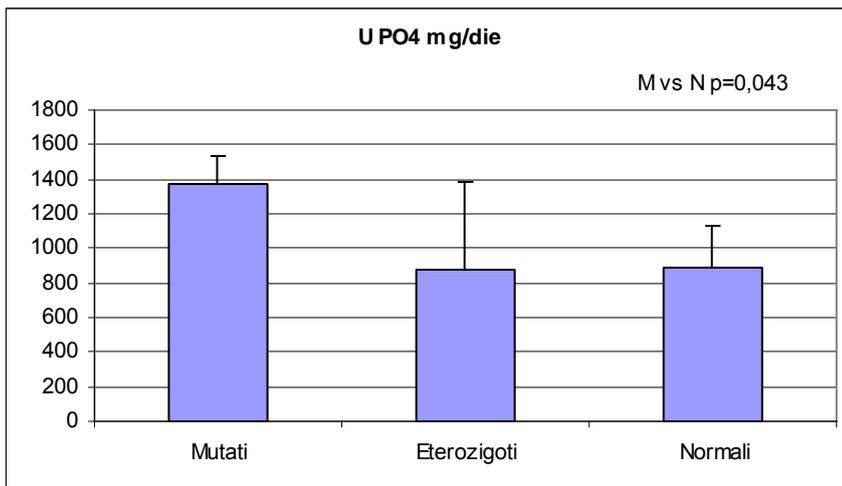
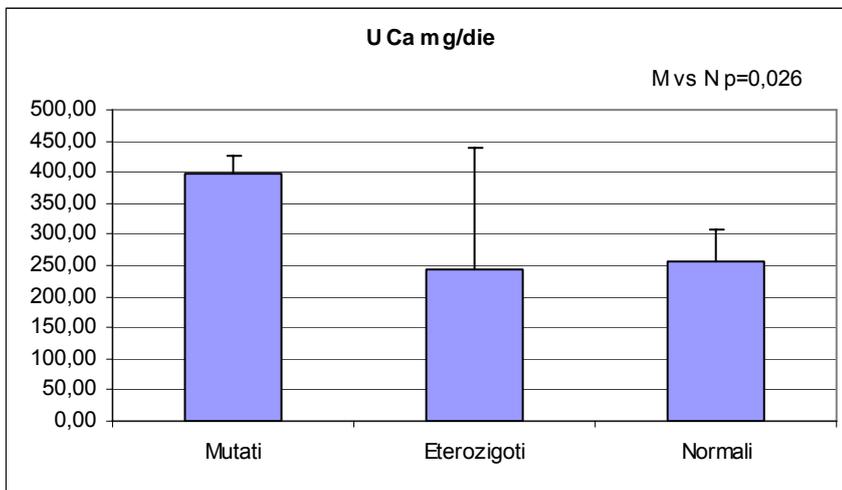
Mutati	U PO4 mg/die	Tm PO4	U Ca mg/die	U Na mMol/die	EF Na	P ac.urico mg/dl	U ac. Urico mg/die	EF ac. urico	U Ox mMol/die	U citrati mMol/die	U Mg mMol/ die
III 4	1277,20	2,90	424,80	299	1,23	6,59	776	10,04	0,20	0,47	3,80
III 12	1560,90	2,30	401,20	503	1,76	12,67	1069	4,20	0,85	3,60	8
III 13	1292,70	2,16	367,20	261	0,79	7,27	1362	5,50	0,72	4,97	7,20
media	1376,93	2,45	397,73	354,33	1,26	8,84	1069	6,58	0,59	3,01	6,33
DS	159,51	0,39	28,95	130,14	0,49	3,33	293	3,07	0,34	2,31	2,23
Eterozigoti											
II 1	341,00	4,08	38,80	107	0,65	5,41	195	2,60	0,26	1	3,40
II 5	985,80	3,38	430,40	310	1,57	5,07	602	8,30	0,74	2,64	5,40
III 14	1320,60	2,50	262,80	299	1,20	3,89	1003	13,09	0,80	5,01	9,90
media	882,47	3,32	244,00	238,67	1,14	4,79	600	8	0,60	2,88	6,23
DS	497,91	0,79	196,47	114,16	0,46	0,80	404	5,25	0,30	2,02	3,33
Normali											
III 2	613,80	2,90	236,40	202	0,86	2,70	595	13	0,24	4,67	4
III 3	1050,10	2,94	200	198	1,49	5,41	652	12,70	0,23	2,58	3,60
III 15	1007,70	2,76	328,80	426	1,59	5,24	822	8,25	0,93	3,65	7,80
media	890,53	2,87	255,07	275,33	1,31	4,45	689,67	11,32	0,47	3,63	5,13
DS	240,59	0,09	54,21	130,50	0,40	1,52	118,09	2,66	0,40	1,05	2,32

Analisi statistica

L'analisi statistica condotta con il test t ha analizzato eventuali differenze esistenti tra mutati, eterozigoti e non mutati, all'interno del gruppo di studio, considerando i seguenti parametri: UCa, UPO₄, UAc.urico, PAc.urico, U Ox, UCitr., UMg, UNa e TmPO₄ (Tab.IV).

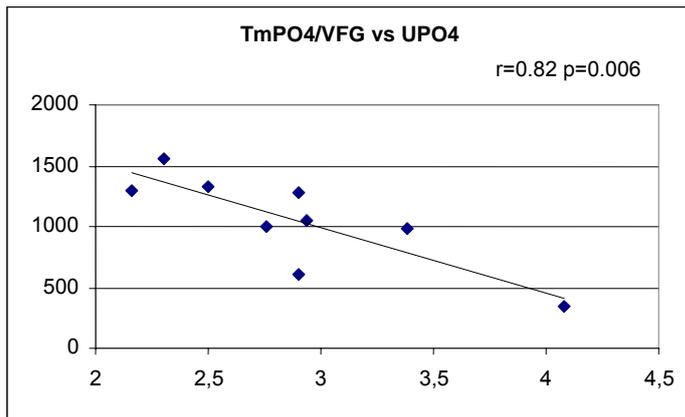
Differenze rilevanti sono emerse per la calciuria e la fosfaturia, niente di statisticamente rilevante è invece emerso dall'analisi degli altri parametri (UAc.urico, PAc.urico, UOx, UCitr., UMg, UNa, TmPO₄).

Di seguito sono riportati i diagrammi rispettivamente della calciuria e della fosfaturia

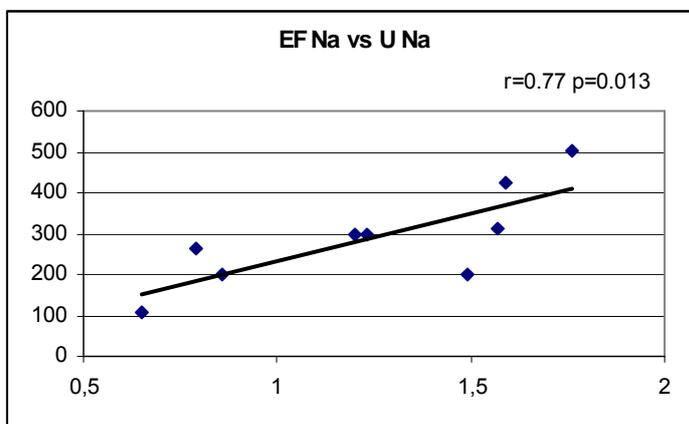


L'analisi statistica, condotta con il test di regressione lineare, ha messo in evidenza le seguenti correlazioni: TmPO₄/VFG vs UPO₄ (r=-0.82 p=0.006); EFNa vs UNa (r=0.77 p=0.013); UNa vs UPO₄ (r=0.73

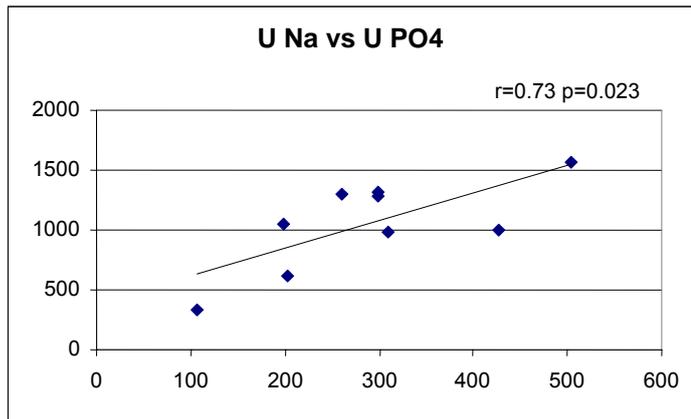
p=0.023); UOx vs UCitrati (r=0.78 p=0.012), UOx vs UMg (r=0.90 p=0.001), UCa vs UPO₄ (r=0.74 p=0.02), UNa vs UCa (r= 0.72 p=0.026).



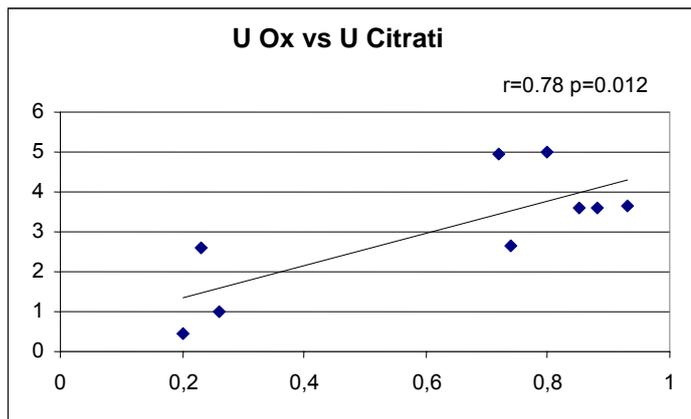
Il grafico mette in evidenza la correlazione inversa tra questi due parametri: diminuendo il TmPO₄/VFG aumenta la fosfaturia.



La correlazione tra l'escrezione frazionata di Na e il Na urinario è diretta, infatti, aumentando la frazione di escrezione del sodio aumenta anche la sodiuria.

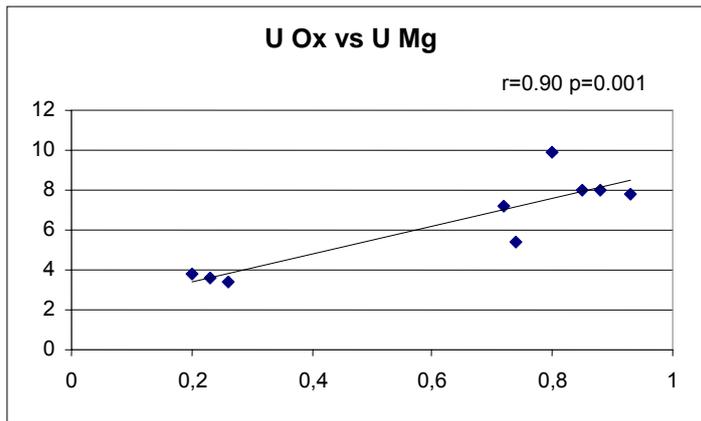


La sodiuria e la fosfaturia sono correlate in modo diretto, con l'aumento della prima aumenta anche la seconda.

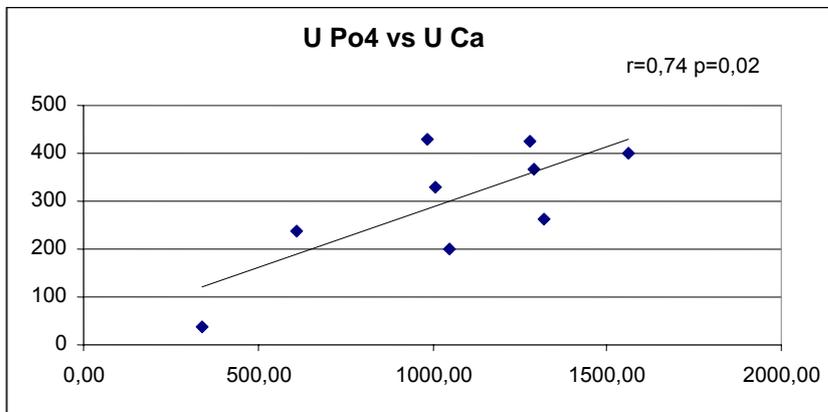


La correlazione tra ossaluria e citraturia è diretta.

La concentrazione urinaria del citrato è molto importante perché essa inibisce la precipitazione dell'ossalato e del fosfato di calcio.



Ossaluria e magnesuria sono correlate direttamente, l'aumento dell'ossalato urinario si accompagna all'aumento del magnesio urinario.



La correlazione lineare è di tipo diretto tra fosfaturia e calciuria, aumentando il primo parametro aumenta anche il secondo.

Analisi strumentale

Ecografie renali

II 1 Reni in sede, il sinistro lievemente aumentato di dimensioni rispetto al controlaterale e con spessore corticale lievemente ridotto (11 mm). Presenti bilateralmente numerosi spots calcifici intraparenchimali, più numerosi e diffusi a destra, a sinistra invece sono localizzati prevalentemente al polo superiore. Non dilatazione delle vie escrettrici.

III 2 Reni in sede, di morfologia nei limiti e di dimensioni ai valori grandi di norma. Entrambi contengono numerosi spots calcifici diffusi nel seno pielico. Conservato lo spessore corticale. Non significativa la dilatazione delle cavità calicopieliche.

III 3 Reni in sede di dimensioni e morfologia nei limiti. Entrambi i reni presentano diffusi e piccoli spots iperecogeni intraparenchimali riferibili a microlitiasi. Spessore corticale ai limiti inferiori della norma (14 mm) Conservata la differenziazione corticomidollare. Non dilatazione delle vie escrettrici. Sembra apprezzarsi piccola cisti parapielica al passaggio tra terzo superiore e medio del rene di sinistra. Buona la vascolarizzazione intraparenchimale.

III 4 Reni in sede, il destro di dimensioni aumentate rispetto al controlaterale (13,4 cm) e sembra presentare setto mesorenale con doppia vena renale (doppio distretto). Sempre il destro contiene piccola cisti di circa 1 cm al terzo superiore. Il rene di sinistra è delle dimensioni di circa 11,5 cm e contiene due piccole formazioni cistiche al terzo superiore e al terzo inferiore. Al suo terzo superiore sembra apprezzarsi una "**placca di Randall**". Ad entrambi i reni sono apprezzabili numerosi spots calcifici riferibili a microlitiasi, il maggiore di circa 4 mm al polo inferiore di destra. Non dilatazione delle vie escrettrici. Buona la vascolarizzazione intraparenchimale.

II 5 Reni in sede , di dimensioni e morfologia nei limiti. Nel contesto del seno pielico del rene di sinistra, si apprezzano alcuni spots iperecogeni al terzo superiore. Non calicopielectasie.

III 12 Reni in sede, di dimensioni e morfologia nei limiti. Entrambi contengono numerosi spots calcifici distribuiti sia al terzo superiore che al terzo medio ed inferiore, non seguiti da cono d'ombra in quanto di piccole

dimensioni (i maggiori di circa 3 mm). Non dilatazione delle vie escrettrici. Conservato lo spessore corticale e la differenziazione cortico-midollare. Buona la vascolarizzazione intraparenchimale.

III 13 Reni in sede, di dimensioni e morfologia nei limiti. Entrambi contengono numerosi spots calcifici, più numerosi a destra ove si apprezzano anche delle piccole aree calcifiche corticali al passaggio tra terzo medio ed inferiore. Non dilatazione delle vie escrettrici.

III 14 Reni in sede, di dimensioni e morfologia nei limiti di norma. Alcuni spots iperecogeni nel contesto del seno pelico al terzo inferiore del rene di destra e più diffusi all'interno del seno pelico del rene di sinistra. Non calcicopielectasie.

III 15 Reni in sede, di dimensioni e morfologia nei limiti. Presentano diffusi e piccoli spots iperecogeni da riferire a microlitiasi ad entrambi i parenchimi renali. Conservato lo spessore corticale e la differenziazione cortico-midollare. Non dilatazione delle vie escrettrici. Buona la vascolarizzazione intraparenchimale.

I referti ecografici evidenziano in tutti i pazienti studiati la presenza di microlitiasi bilaterale. In un paziente con mutazione (III 4) vengono segnalate, inoltre, formazioni cistiche bilaterali e una placca di Randall.

DXA (densitometria digitale a raggi X)

La densitometria ossea è la metodica di riferimento per la valutazione dell'entità della mineralizzazione ed è significativamente associata al rischio di frattura. Fin dall'introduzione della misurazione dell'assorbimetria a singolo raggio fotonico (SPA) a livello del radio distale avvenuta nel 1963 si è avuta una rapida evoluzione delle nuove tecniche radiologiche per quantizzare l'integrità dello scheletro . Gli sviluppi più importanti comprendono la misurazione dell'assorbimento a doppio raggio fotonico (DPA) della colonna vertebrale e dell'anca e la tomografica computerizzata quantitativa (QCT) dell'osso trabecolare nei corpi delle vertebre lombari. La tecnica che più di ogni altra è stata responsabile della recente rapida crescita delle applicazioni cliniche della densitometria

ossea è l'assorbimetria a doppio raggio X (DXA) (71). Rispetto alla DPA, la DXA consente una migliore precisione, tempi di scansioni più brevi e una calibrazione più stabile (72).

Il principio fondamentale che è alla base della DXA è la misurazione della trasmissione attraverso l'organismo dei raggi X provenienti da due diverse fonti di energia fotonica; ciò permette di quantizzare le masse di due tipi di tessuto (in questo caso l'osso e il tessuto molle). Nella tecnica della DPA, usata inizialmente, si usava una fonte di radionuclidi Gd/153, perché le sue due emissioni a 44 e 103 keV erano vicine al valore ideale per la misurazione della colonna vertebrale lombare. Ad energie fotoniche superiori a 100 keV, si hanno poche differenze nell'attenuazione da parte del tessuto osseo e dei tessuti molli e le misurazioni della trasmissione rispecchiano la massa totale di tessuto nel fascio.

Energie fotoniche di circa 40 keV sono ideali per il fascio a bassa energia, perché vi è un buon contrasto fra osso e tessuto molle senza eccessiva attenuazione per limitare il segnale che raggiunge il rivelatore. La sostituzione della fonte di Gd-153 con un tubo a raggi X ha migliorato le prestazioni dei densitometri ossei a doppio raggio fotonico combinando un elevato flusso con le piccole dimensioni della focale del tubo a raggi X. La disponibilità di un fascio di radiazione intenso, ristretto, ha migliorato il tempo di scansione e la definizione dell'immagine e ha permesso un concomitante incremento di precisione. I produttori più importanti di apparecchiature di DXA sono: Hologic (Waltham, MA, Stati Uniti), Lunar (Madison, WI, Stati Uniti) e Norland (Fort Atkinson, WI, Stati Uniti). Negli scanner da QDR Hologic il fascio di raggi X a doppia energia è generato commutando il generatore HV fra 70 e 140 kVp durante mezzi cicli alternati dell'alimentazione di corrente, una ruota girevole che contiene filtri equivalenti all'osso e ai tessuti molli calibra la scansione pixel per pixel. La prima generazione di scanner DXA utilizzava un fascio sottile accoppiato ad un solo rivelatore nel braccio di scansione. Un importante sviluppo della tecnologia della DXA è stata l'introduzione di scanner con un fascio a ventaglio accoppiato ad un rivelatore lineare. Gli esami con fasci a ventaglio vengono acquisiti dal braccio di scansione che esegue un solo passaggio attraverso il paziente invece della scansione

bidimensionale necessaria per la geometria a fascio sottile. Di conseguenza, i tempi di scansione sono significativamente abbreviati. Quando si usava la scansione con DPA, una sola scansione richiedeva 20-30 minuti e un esame completo della colonna vertebrale e dell'anca richiedeva un'ora. I primi sistemi di DXA a fascio sottile riducevano i tempi di scansione a 5-10 minuti e aumentavano la resa a due pazienti l'ora. Oggi l'ultima generazione di sistemi a fascio a ventaglio, come il sistema QDR-4500 A della Hologic, eseguono singole scansioni in 15-30 secondi e permettono di studiare fino a quattro pazienti all'ora. Un esame più rapido dei pazienti è uno dei principali vantaggi dei nuovi sviluppi della tecnologia DXA. Un altro significativo miglioramento è costituito da una migliore definizione dell'immagine che consente un'identificazione più facile della struttura vertebrale unitamente agli artefatti dovuti a malattia degenerativa che sono un limite significativo della DXA convenzionale. La DXA consente le seguenti scansioni standardizzate: total body, lombare, femore, avambraccio, analisi periprotetica dell'anca, calcagno, mano totale.

DEFINIZIONE "DENSITOMETRICA" DELL'OSTEOPOROSI

La definizione di osteoporosi si basa su quattro punti) (73,74,75):

1. Riduzione della massa ossea.
2. Normale mineralizzazione della massa ossea residua.
3. Deterioramento della microarchitettura (diminuzione del numero di interconnessioni trabecolari).
4. Aumento della fragilità con maggior rischio di frattura.

Questa definizione include il concetto importante che il paziente con maggior rischio di frattura può essere identificato sulla base di indagini non invasive che valutino la massa ossea, l'integrità dell'architettura dell'osso, la sua mineralizzazione. L'altro concetto è quello che la frattura da osteoporosi va intesa solo come una complicazione di questa malattia, che può esistere indipendentemente dalle fratture che determina. Negli studi clinici, quando si vogliono comparare popolazioni sane e popolazioni sicuramente osteoporotiche, è invalsa l'abitudine di considerare soggetti con buona massa ossea senza fratture vs soggetti con bassa massa

ossea e fratture spontanee. E' pertanto evidente che, per fare diagnosi di osteoporosi, non si può prescindere da una valutazione quantitativa e qualitativa dell'osso.

La classificazione della mineralizzazione scheletrica, pertanto, si basa sul rapporto fra demineralizzazione e rischio di frattura e consta di tre fasce di appartenenza in cui la popolazione può essere stratificata. (76,77)

1. **Popolazione normale:** la densità ossea è non più di 1 SD (deviazione standard) al di sotto del valore medio dei giovani adulti (20-30anni).

2. **Popolazione con osteopenia:** la BMD è compresa fra 1 e 2,5 SD al di sotto della densità ossea media dei giovani adulti.

3. **Popolazione con osteoporosi:** la BMD è inferiore a 2,5 SD.

RAPPORTI FRA MASSA OSSEA E FRATTURE

La valutazione della densità ossea, ha consentito di considerare l'osteoporosi non in termini di evenienza di fratture da fragilità, bensì in termini di aumentato rischio di fratture associate ad una massa ossea ridotta. Una demineralizzazione superiore a 2,5 SD rispetto alla media dei giovani adulti determina una impennata del rischio di frattura a tal punto che, in modo eccessivamente schematico ma efficace, tale demineralizzazione è stata identificata con la malattia osteoporosi, è stata distinta dall'osteopenia che non è un'entità nosologica riconosciuta, ed ha determinato la definizione altrettanto schematica della soglia di frattura, che corrisponde ad una BMD di -2,5 SD. (76,77). Una limitazione nel definire una soglia per l'osteoporosi e per le fratture sta nel fatto che esiste un gradiente continuo fra aumento del rischio di frattura e decremento della massa ossea, ma è altrettanto evidente che la relazione non è rettilinea bensì esponenziale. In particolare oltre una perdita di massa ossea di 2-2,5 SD si verifica che per ulteriori piccole perdite di minerale si hanno ampi incrementi del rischio di frattura. Ciò è determinato ovviamente dal subentrare di alterazioni qualitative dell'osso legate alla frammentazione trabecolare. Nel paziente anziano subentrano fattori non ossei individuali e fattori ambientali che aumentano il rischio di frattura e che riducono ulteriormente la predittività della densitometria nei riguardi delle fratture soprattutto se sono già presenti altre fratture. Uno dei

problemi più importanti è quello della scelta della sede di misurazione della BMD al fine della migliore predizione del rischio di frattura. Un modo per valutare la validità di differenti sedi scheletriche consiste nel calcolare per una riduzione della BMD di 1SD il risk-ratio (RR) o l' Odd ratio (OR) basato sulla regressione logistica. Più in particolare in uno studio eseguito da Cummings (21) su 8134 donne ultra 65enni i soggetti nel quartile a più bassa BMD avevano una probabilità di fratture femorali 8,5 volte superiore rispetto ai soggetti del quartile meglio mineralizzato. In altri termini una perdita di BMD corrispondente a 1SD (circa il 10%) corrisponde ad un RR di frattura femorale di 2,6; è interessante notare che il calcagno risultava altrettanto predittivo del femore mentre meno predittive risultavano la sede lombare e quella radiale. Nella stessa casistica, considerando globalmente le fratture, non esisteva differenza tra la predittività delle diverse sedi densitometriche. In questo studio il follow-up era relativamente breve, 1,8 anni, per cui esso si può considerare non definitivo. Solamente gli studi sul radio si protraggono oltre 10 anni e in un caso oltre 20 anni ma non consentono la comparazione con le altre sedi. Per quanto concerne le fratture vertebrali mentre nel 99% dei casi non esistono dubbi sui criteri di identificazione della frattura del femore, che sono pertanto gli stessi nei vari studi, la frattura vertebrale necessita di essere definita in base all'entità della riduzione di altezza del corpo vertebrale (15, 20 o 25 %), alla sede di riduzione (anteriore media o posteriore), al parametro di riferimento (vertebra sovrastante e/o altezza media degli "age-matched"), ed all'estrinsecazione clinica; ciò determina frequentemente l'impossibilità di comparare i vari studi eseguiti a livello vertebrale. E' evidente che, soprattutto per la presenza di fattori che rendono meno sensibile l'esame a livello lombare (artrosi, calcificazioni vascolari), in alcuni studi la predizione delle fratture vertebrali è migliore utilizzando la BMD del calcagno o del polso, che la BMD vertebrale.

Il **T-score** rapporta il dato di BMD alla media di giovani adulti ma anche al range di normalità espresso dalla SD, esso infatti si ricava dalla differenza della BMD/SD.

Il **Z-score** si ricava nello stesso modo ma la BMD di riferimento è quella dei soggetti di pari età. Pertanto che in un giovane adulto T-score e Z

score coincideranno, mentre con il passare degli anni il Z-score sarà sempre più piccolo del T-score e quindi darà una indicazione di minore gravità della demineralizzazione rispetto al T-score.

Il fatto che la soglia di frattura sia stata riferita ai giovani adulti e che non cambi con l'età, ed il desiderio e la necessità di correlare il dato densitometrico con il rischio di frattura ha fatto sì che il T-score prendesse il sopravvento nella refertazione densitometrica rispetto allo Z-score a tal punto che come abbiamo già visto, lo stato della mineralizzazione e quindi l'osteoporosi sono stati classificati in base al T-score (normalità: T-score > -1 ; osteopenia T-score < -1 e > 2.5 ; osteoporosi < 2.5)

Abbiamo eseguito in 7 soggetti su 9, densitometria ossea (tab.V.) basata sulla tecnica DXA utilizzando un apparecchio Hologic 4500 A (Hologic Inc., Waltham, USA). La diagnosi di osteoporosi è stata effettuata secondo i criteri del World Health Organization (WHO). I dati relativi a rachide lombare, femorale prossimale e collo femorale sono stati espressi come BMD (Bone Mineral Density, g/cm²), T-score e Z-score. La calibrazione dello strumento mediante "phantom" è stata eseguita giornalmente.

T-score	Diagnosi
> -1 SD	Normale
Da -1 a $-2,5$ SD	Osteopenia
$< 2,5$ SD	Osteoporosi
$< 2,5$ SD con frattura ossea	Osteoporosi complicata

Tab V – Studio densitometrico

codice paz.	Mutazione	Rachide lombare			Femore prossimale			Collo femorale		
		BMD	T score	Z score	BMD	T score	Z score	BMD	T score	Z score
II 5	Eterozigote	0,683	-3,3	-1,2	0,992	+0,4	+1,9	0,857	+0,1	+1,9
III 4	Mutato	0,968	-1,1	-1,0	1,041	+0,1	+0,3	0,877	-0,4	+0,2
III 3	Normale	0,977	-1,0	-0,7	1,037	+0,0	+0,3	0,791	-1,0	-0,3
III14	Eterozigote	0,887	-1,5	-1,1	0,934	-0,1	+0,2	0,825	-0,2	+0,2
III13	Mutato	0,925	-1,5	-1,3	1,149	+0,8	+1,0	0,840	-0,7	-0,0
III12	Mutato	1,071	-0,2	-0,1	1,123	+0,6	+0,8	0,897	-0,2	+0,2
III15	Normale	0,991	-0,9	-0,9	1,071	+0,3	+0,3	0,906	-0,2	-0,0

Discussione

In questo lavoro, abbiamo evidenziato nella II generazione, 2 soggetti mutati con presenza sia di calcolosi renale (II 3 e II 4) che di insufficienza renale cronica (II 4).

Nella III generazione invece nessuno dei componenti presentava nefrocalcinosi ne riduzione della funzionalità renale ne tantomeno insufficienza renale progressiva nonostante tra questi, ci siano i 3 soggetti mutati (III 4, III 12, III13) i quali sono attualmente compresi tra la III e la V decade di vita, periodo in cui normalmente, compare l'insufficienza renale nella malattia di Dent.

Abbiamo inoltre dimostrato la presenza di ipercalciuria in 5 soggetti su 9 (III 4, II 5, III 12, III 13 e III 15); questo dato è di grande rilevanza perché esso caratterizza tipicamente la malattia di Dent ed è correlato direttamente alla presenza di nefrolitiasi.

L'esame ecografico eseguito a ciascuno dei membri appartenenti sia alla II che alla III generazione, ha evidenziato, dato del tutto inaspettato la presenza di microlitiasi che in ben 8 soggetti su 9 si è manifestata bilateralmente.

La presenza di microlitiasi , è un dato caratteristico della malattia di Dent tipo 1 che anche nei nostri pazienti ben correla con il quadro metabolico (ipercalciuria, iperuricuria, iperfosfaturia ed iperossaluria) emerso dallo studio per la nefrolitiasi da noi condotto.

Inaspettato è stato invece tale reperto ecografico nei pazienti eterozigoti, ma soprattutto nei non mutati.

La microlitiasi è stata descritta in 3 pazienti a livello del seno pelico (III 2, II5 e III14) ed in 6 (II1,II3.III4,III 12, e III13) a livello intraparenchimale.

Nelle femmine eterozigoti per malattia di Dent è possibile rilevare la presenza sia di ipercalciuria come di proteinuria a basso peso molecolare; tuttavia i nostri dati evidenziano un solo caso di ipercalciuria ed in tutte l'assenza di microproteinuria.

Il quadro, sia esso metabolico come strumentale appare sovrapponibile sia nei soggetti mutati come nei non mutati; i referti ecografici ottenuti, fanno pensare che le microlitiasi possano non essere dipendente dalla mutazione del gene CLCN5.

Alcune correlazioni emerse dalla valutazione dei parametri utilizzati nello studio metabolico sono risultati congruenti alle nostre aspettative, come ad esempio la correlazione inversa tra $TmPO_4/VFG$ vs UPO_4 e le correlazioni dirette tra $EFNa$ vs Una , Una vs UPO_4 e UPO_4 vs UCa .

Del tutto inaspettate sono state invece le relazioni dirette emerse tra UOx vs citrato e UOx vs UMg . Infatti, solitamente alti livelli di ossaluria si accompagnano a bassi livelli sia di citraturia che di magnesuria.

L'iperuricemia riscontrata nei 3 mutati, che come prevedibile presentavano anche un'importante iperuricuria, non è stata precedentemente descritta come caratteristica associata nella malattia di Dent e non è da ritenersi secondaria non essendo presente insufficienza renale.

Si segnalano inoltre la presenza e la bilateralità della microlitiasi in tutti i soggetti studiati.

In base ai dati a nostra disposizione non ci è possibile dire se l'iperuricuria presente nei tre pazienti mutati sia l'espressione della tubulopatia e non sia invece dipendente dall'iperuricemia.

I dati relativi allo studio densitometrico eseguito, evidenziano parametri, espressi come BMD (Bone Mineral Density), T-score, e Z-score che risultano rientrare nei range di normalità, con l'unica eccezione del livello di demineralizzazione espresso come T-score a livello del rachide lombare della paziente (II 5), (T-score -3,3); tale dato risulta ben al di sotto dei valori di deviazione standard (SD) di -2,5 considerati come livello minimo al di sotto del quale vi è una grande suscettibilità al rischio di frattura spontanea.

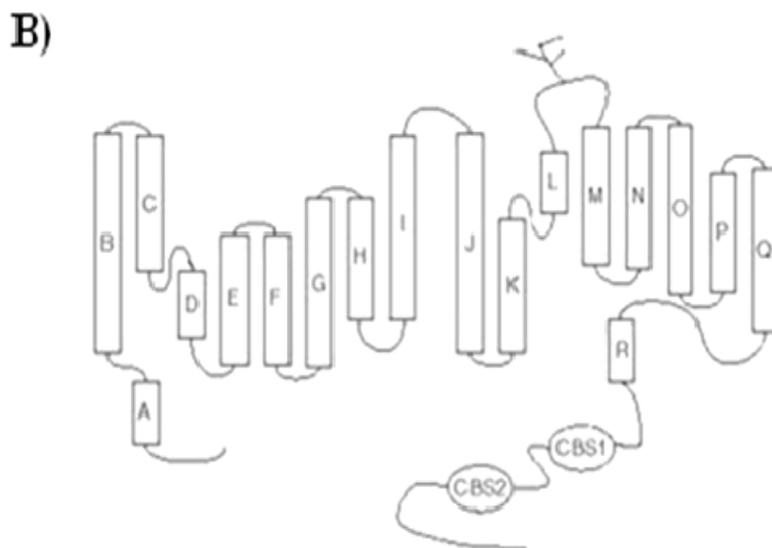
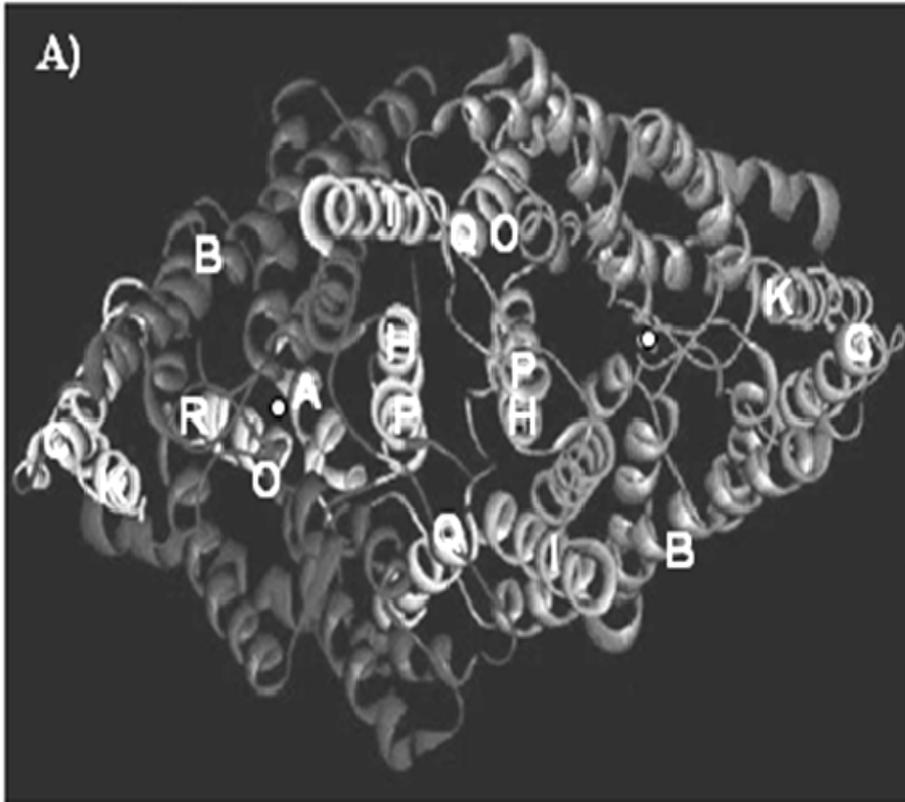
Non si è osservato alcuna correlazione tra questi parametri e lo studio metabolico eseguito; si segnala tuttavia che 5 su 9 soggetti studiati, erano ipercalcemici, ed il soggetto (II 5) precedentemente citato, esprime il più elevato livello di ipercalcemia assoluta rilevato (430,4 mg/die), e che non risulta esserci alcuna distinzione tra soggetti di sesso femminile eterozigoti e maschi, siano essi normali come mutati.

Possiamo dunque concludere che dal nostro studio appare chiaro come, pur essendoci nei tre mutati i segni caratteristici della tubulopatia prossimale, l'analisi metabolica dei pazienti ha rilevato un quadro simile a quello che si osserva spesso nella nefrolitiasi bilaterale recidivante.

Tabella I - famiglia de canali CLC

Canale del cloro	Localizzazione cromosomica	Funzione	Distribuzione tissutale	Malattia associata
CIC-1	7q35	Stabilizzazione del voltaggio	Muscolo scheletrico, placenta	Miotonia di Thomsen e di Becker
CIC-2	3q26-3q28	Regolazione del volume cellulare	Ubiquitario	
CIC-3	4q33	?	Multipla	
CIC-4	Xp22.3	?	Muscolo scheletrico, cervello, cuore, rene, retina	
CIC-5	Xp11.22	Trasporto endosomiale di cloro	Prevalentemente nel rene	Malattia di Dent
CIC-6	1p36	?	Ubiquitario	
CIC-7	16p13	Acidificazione dei lisosomi	Multipla (cervello, testicoli, rene, muscolo scheletrico)	Osteopetrosi
CIC-Ka	1p36	Trasporto transepiteliale	Rene	
CIC-Kb	1p36	Riassorbimento di cloro (?)	Rene	Sindrome di Barter

Figura 1 – Modello di struttura tridimensionale (A) di CIC-5 e topologia di membrana (B).



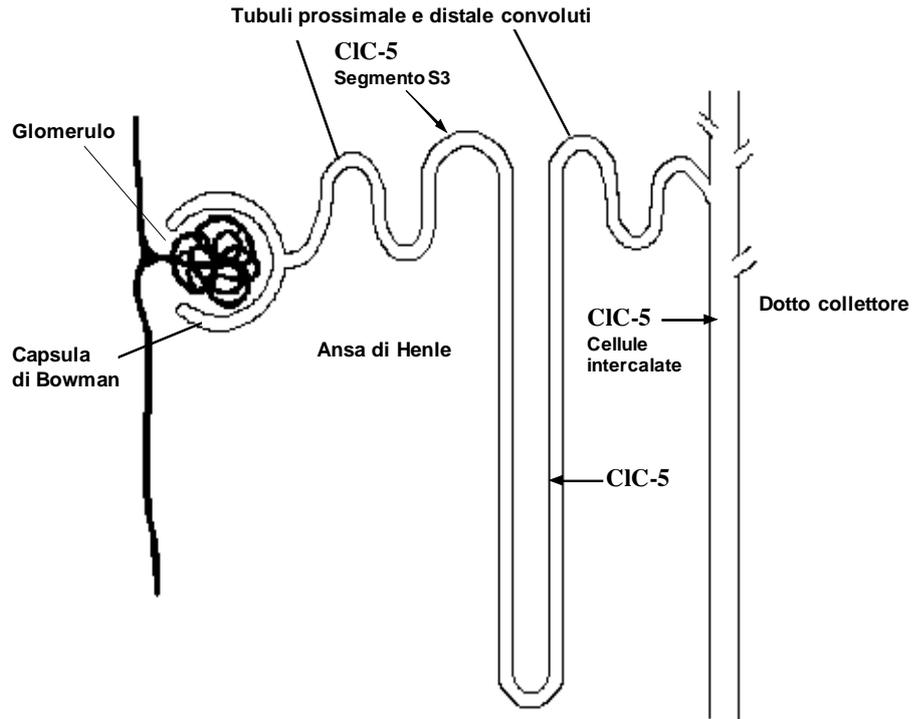


Figura 2 – Localizzazione di CIC-5 lungo il nefrone.

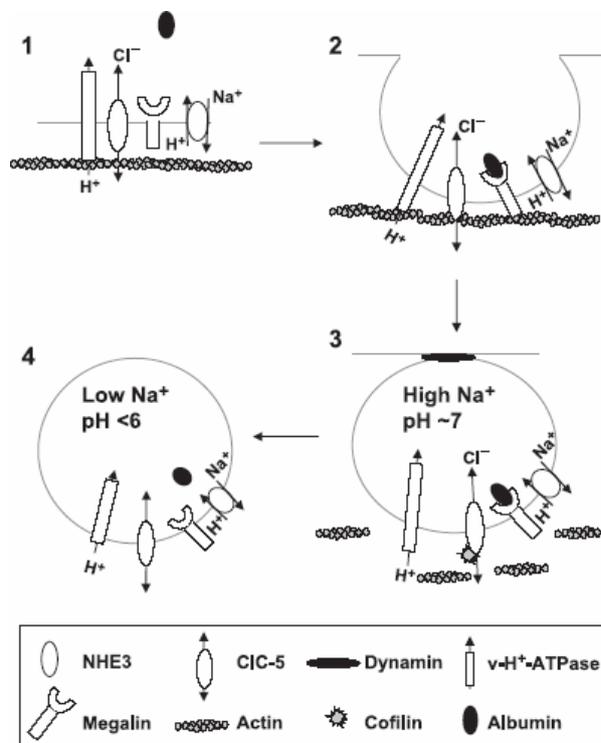


Figura 3 – complesso macromolecolare coinvolto nel processo di endocitosi a livello del tubulo prossimale

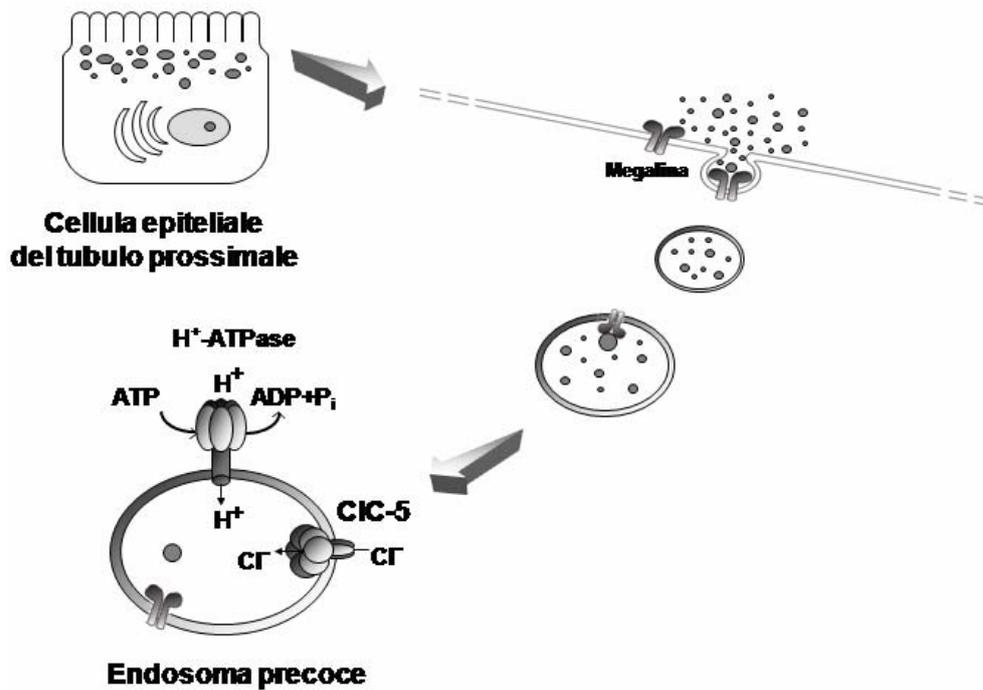


Figura 4 – Localizzazione intracellulare di CIC5 nel processo endocitico del tubulo prossimale.

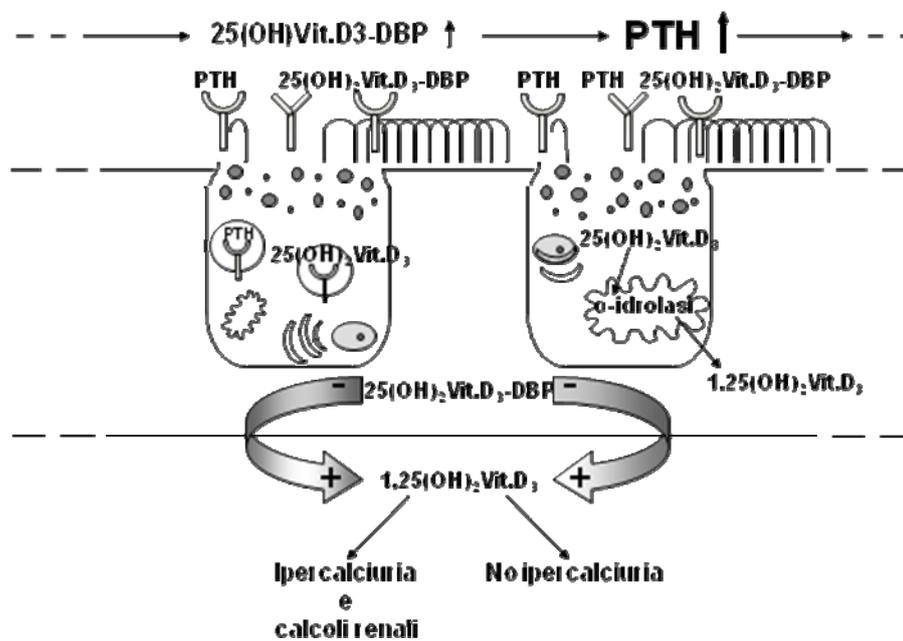


Figura 5 – Rappresentazione dell'alterazione del metabolismo degli ormoni calciotropi nei tubuli prossimali renali.

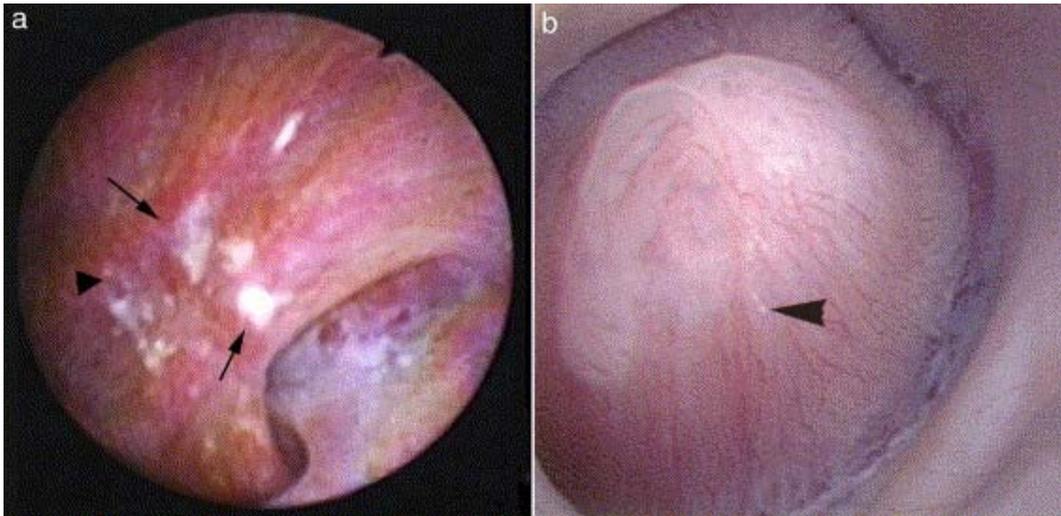


Fig. 6 a-b – Immagini di placche di Randall all’apice di papille renali

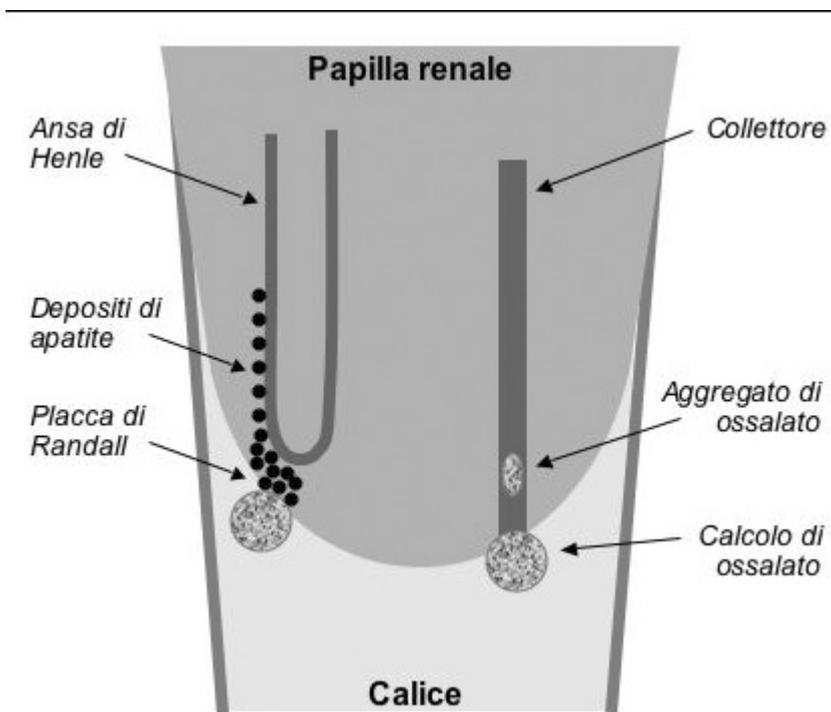


Fig 7 – Meccanismo di formazione della placca di Randall

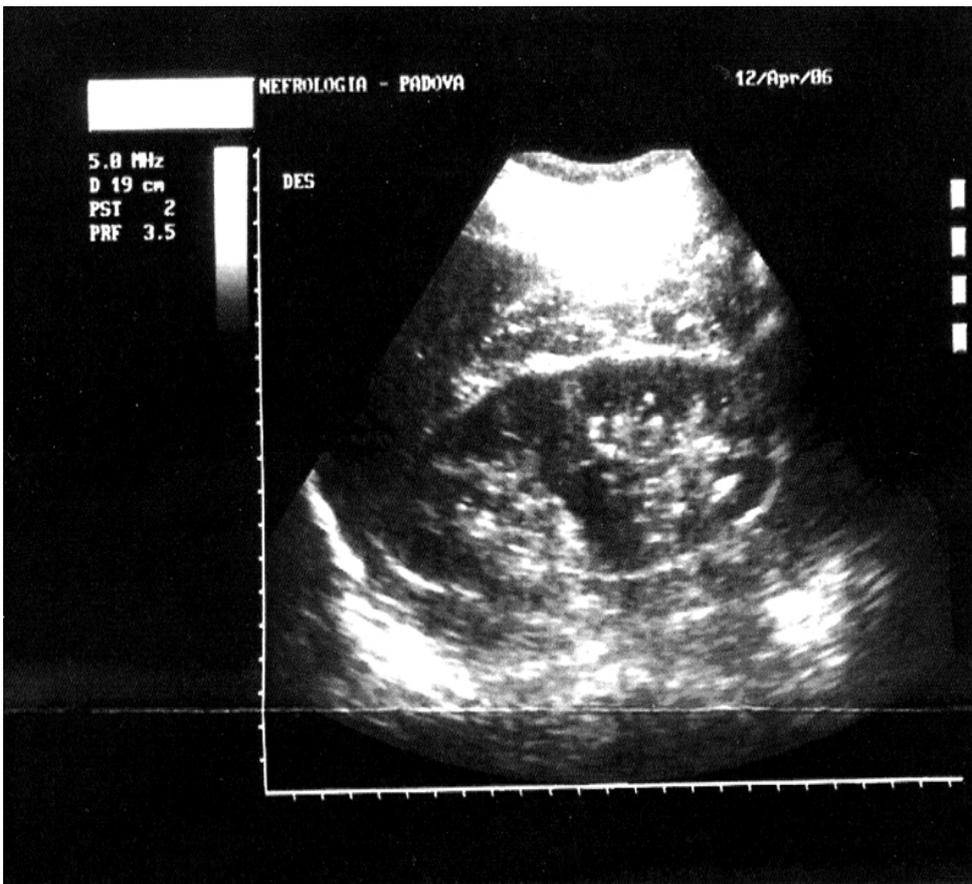
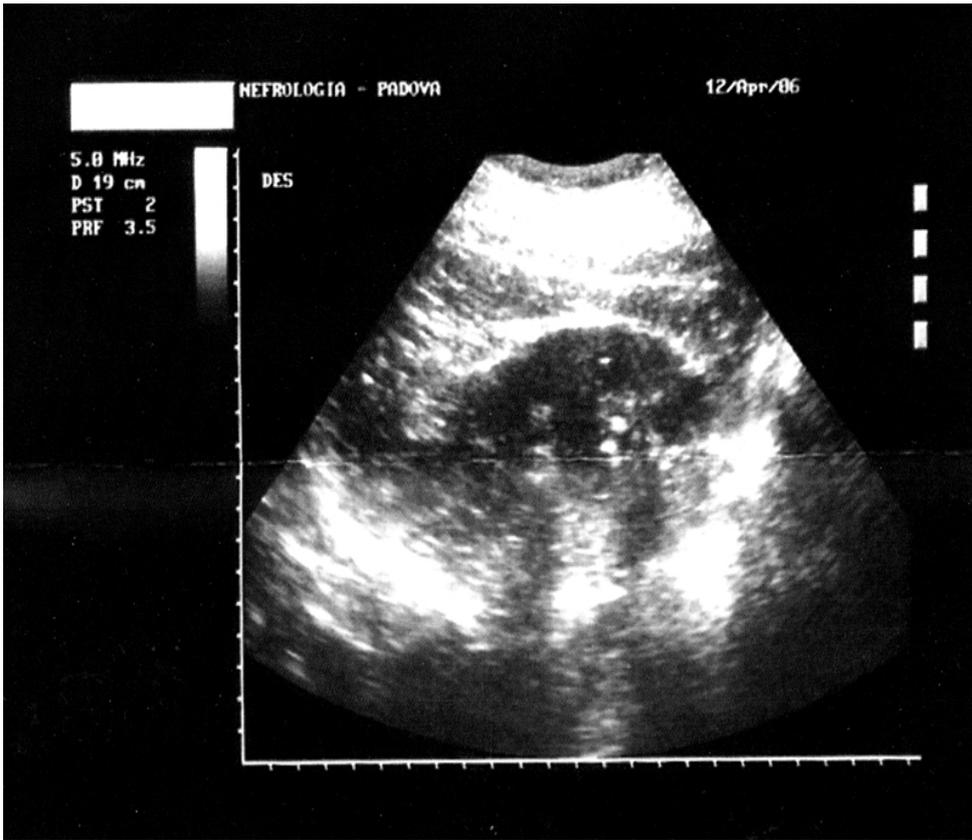


Figura 8 e 9 – spots iperecogeni riferibili a microlitiasi in pz studiati

Figura n 8 - Calcolo di 4 mm rene dx nel paz III 4

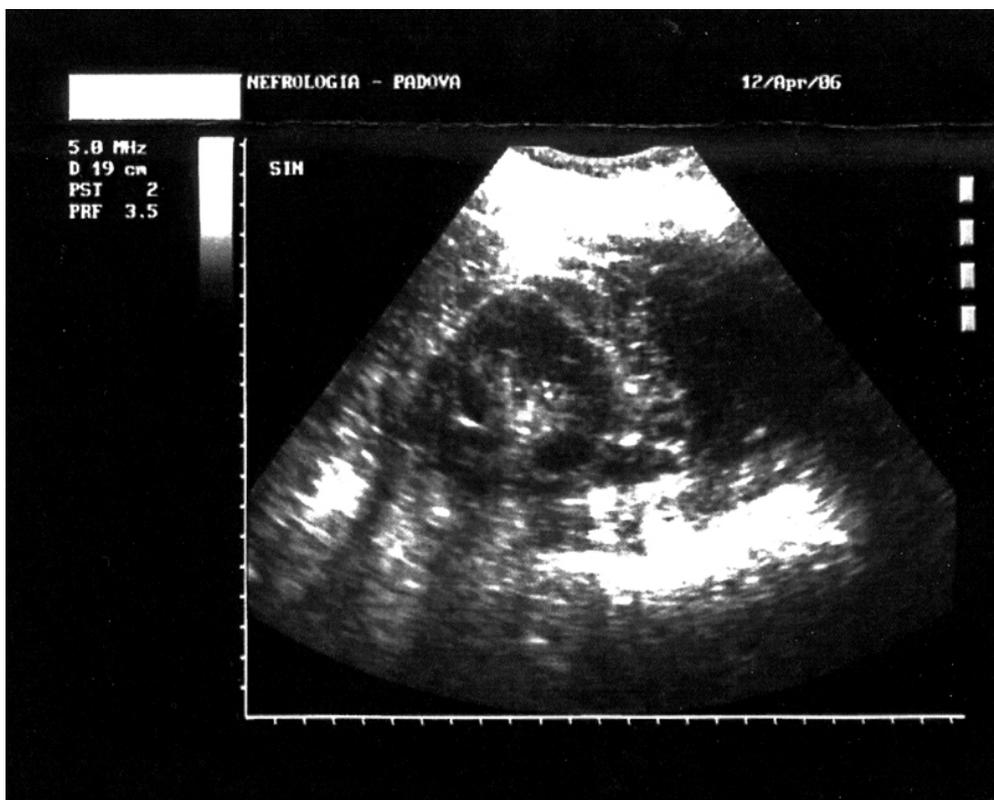
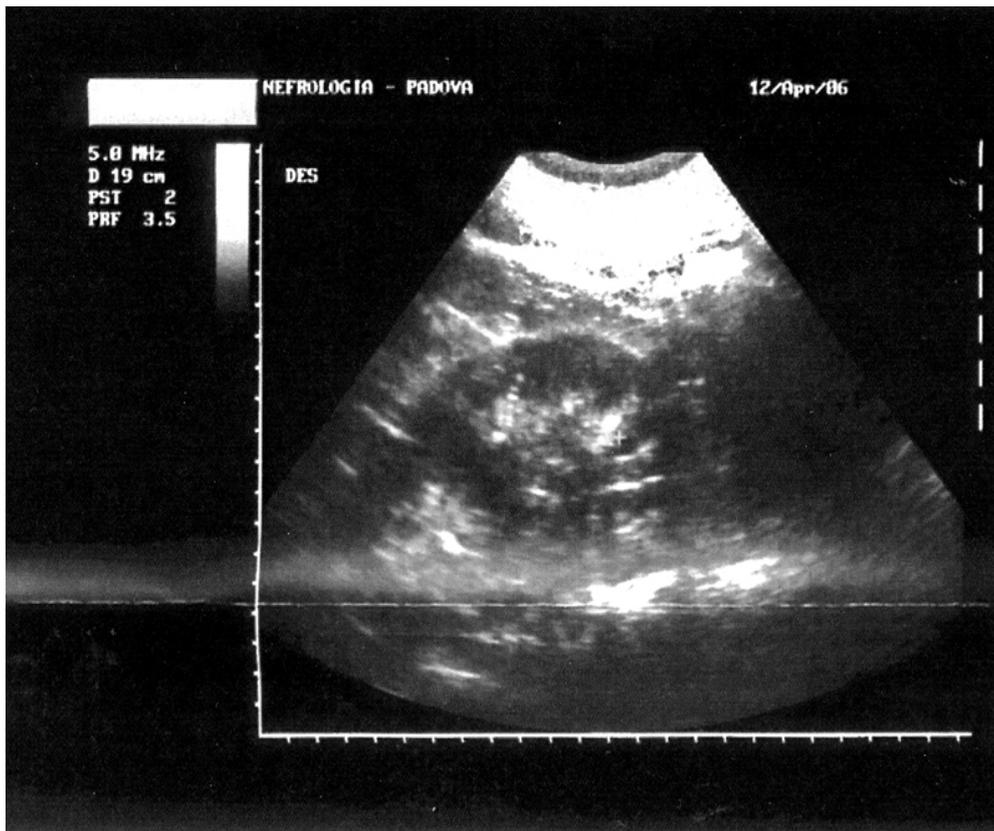


Figura n. 9 - placca di Randall rene sn pz III 4

Bibliografia

1. Wrong OM, Norden AGW, Feest TG. Dent's disease; a familial proximal renal tubular syndrome with low-molecular-weight proteinuria, hypercalciuria, nephrocalcinosis, metabolic bone disease, progressive renal failure and a marked male predominance. *Q J Med*, 1994; 87: 473-493.
2. Lloyd SE, Pearce SHS, Fischer SE et al. A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature*, 1996; 379: 445- 449.
3. Igarashi T, Hayakawa H, Shiraga H, et al. Hypercalciuria and nephrocalcinosis in patients with idiopathic low-molecular-weight proteinuria in Japan: is the disease identical to Dent's disease in United Kingdom?. *Nephron* 1995; 69 (3): 242-247.
4. Lloyd SE, Pearce SHS, Gunther W, et al. Idiopathic low-molecular-weight proteinuria associated with hypercalciuric nephrocalcinosis in Japanese children is due to mutations of the renal chloride channel. *J Clin Invest* 1997; 99: 967-974.
5. Fisher SE, Black GCM, Lloyd SE, Hatchwell E, Wrong O, Thakker RV, Craig IW. Isolation and partial characterization of a chloride channel gene which is expressed in kidney and is a candidate for Dent's disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis). *Hum Mol Genet* 1994 3:2053-2059.
6. Ludwig M, Doroszewicz J, Seyberth HW, Bökenkamp A, Balluch B, Nuutinen M, Utsch B, Waldegger S. Functional evaluation of Dent's disease-causing mutations: implications for ClC-5 channel trafficking and internalization. *Hum Genet* 2005; 117: 228-237.
7. Fischer SE, van Bakel I, Lloyd SE, Pearce SHS, Thakker RV, Craig IW. Cloning and characterization of ClCN5, the human kidney chloride channel gene implicated in Dent's disease. *Genomics* 1995; 29: 598-606.

8. Ludwig M, Waldegger S, Nuutinen M, Bokenkamp A, Reissinger A, Steckelbroeck S, Utsch B. Four additional CLCN5 exons encode a widely expressed novel long CLC-5 isoform but fail to explain Dent's phenotype in patients without mutation in the short variant. *Kidney Blood Press Res* 2003; 26: 176-184.
9. Thakker RV. Molecular pathology of renal chloride channels in Dent's disease and Bartter's syndrome. *Exp Nephrol* 2000; 8: 351-360.
10. Yamamoto K, Cox JP, Friedrich T, et al. Characterization of renal chloride channel mutation in Dent's disease. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1460-1468.
11. Carballo-Yrujillo I, Garcia-Nieto V, Moya-Angeler FJ, Anton-Gamero M, Loris C, Mendez-Alvarez S, Claverie-Martin F. Novel truncating mutations in the CLC-5 chloride channel gene in patient with Dent's disease. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 717-723.
12. Takashi S, Nozu K, Iyengar R et al. OCRL1 mutations in patients with Dent's disease phenotype in Japan. *Pediatr Nephrol* 22; 975-980: 2007.
13. Hoopes RR, Shrimpton AE, Simckes JMA et al. Dent's disease with mutations in OCRL1. *Am J Hum Genet* 76; 260-267: 2005.
14. Hubner CA, Jentsch TJ. Ion channel disease. *Hum Mol Genet* 2002; 11 (20): 2435-2445.
15. Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K. Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol Rev* 1999; 79 (4): 1317-1372.
16. Jentsch TJ, Friedrich T, Schriever A, Yamada H. The CLC chloride channel family. *Pflgers Arch* 1999; 457: 783-795.

17. Estevez R, Jentsch TJ. CLC chloride channels: correlating structure with function. *Curr Opin Struct Biol* 2002; 12: 531-539.
18. Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 2002; 415: 287-294.
19. Schmidt-Rose T, Jentsch TJ. Transmembrane topology of a CLC chloride channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 7633-7638.
20. Schwanke M, Friedrich T, Jentsch TJ. An internalization signal in ClC-5, an endosomal Cl⁻ channel mutated in Dent's disease. *J Biol Chem* 2001; 276 (15): 12049-12054.
21. Devuyst O, Christie PT, Courtoy PJ, Beawens R, Thakker RV. Intra-renal and subcellular distribution of the human chloride channel, CLC-5 reveals a pathophysiological basis for Dent's disease. *Hum Mol Genet* 1999; 8 (2): 247-257.
22. Gunther W, Luchow A, Cluzeaud F, Vandewalle A, Jentsch TJ. ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc Natl Sci USA* 1998, 95: 8075-8080.
23. Veizis E, Cotton CA. Role of kidney chloride channels in health and disease. *Pediatr Nephrol* 2007; 22: 770-777.
24. Thakker RV. Pathogenesis of Dent's disease and related syndromes of X-linked nephrolithiasis. *Kidney Int* 2000; 57: 787-793.
25. Wang SS, Devuyst O, Courtoy PJ, et al. Mice lacking renal chloride channel, ClC-5, are a model of Dent's disease, a nephrolithiasis disorder associated with defective receptor-mediated endocytosis. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2937-2945.

26. George AL Jr. Chloride channels and endocytosis: CIC-5 makes a Dent. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 7843-7845.
27. Reinart SC, Norden AGW, Lapsley M, et al. Characterization of carrier females and affected males with X-linked recessive nephrolithiasis. J Am Soc Nephrol 1995; 5: 1451-1461.
28. Piwon N, Gunther W, Schwake M, Bosl MR, Jentsch TJ. CIC-5 Cl⁻ channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. Nature 2000; 408 (6810): 369-373.
29. Gunther W, Piwon N, , Jentsch TJ. The CIC-5 chloride channel knock-out mouse an animal model for Dent's disease. Pflgers Arch 2003; 445 (6810): 369-373.
30. Leheste JR, Rolinski B, Vorum H, et al. Megalin knock-out mice an animal model of low molecular weight proteinuria. Am J Pathol 1999; 155: 1361-1370.
31. Christensen EI, Nielsen S. Structural and functional features of protein handling in the kidney proximal tubule. Semin Nephrol 1991; 11: 414-439.
32. Christensen EI, Birn H, Verroust P, Moestrup SK. Membrane receptor for endocytosis in renal proximal tubule. Int Rev Cytol 1998; 180: 237-283.
33. Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. Nat Rev Mol Cell Biol 2002; 3: 258-268.
34. Hryciw DH, Wang Y, Devuyst O, Pollock CA, Poronnik P, Guggino WB. Cofilin interacts with CIC-5 and regulates albumin uptake in proximal tubule cell lines. J Biol Chem 2003.

35. Gekle M, Midenberger S, Freudinger R, Schwerdt G, Silbernagl S. Albumin endocytosis in Ok cells: dependence on actin and microtubules and regulation by protein kinases. *Am J Physiol Renal Physiol* 1997; 272: F668-677.
36. Hebert SC, Brown EM, Harris HW. Role of the Ca^{2+} -sensing receptor in divalent mineral homeostasis. *J Exp Biol* 1997; 200: 295-302.
37. Silva IV, Blaisdell CJ, Guggino SE, Guggino WB. PTH regulates expression of ClC-5 chloride channel in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278: F238-245.
38. Thakker RV. Chloride channels cough up. *Nat Genet* 1997; 17: 125-127.
39. Yamamoto K, Cox JPDT, Friedrich T, et al. Characterization of renal chloride channel (CLCN5) mutations in Dent's disease. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1460-1468.
40. Murayama A, Takeyama K, Kitanaka S, et al. Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D3 1- α -hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin and 1- α ,25(OH) $_2$ D $_3$ in intact animals. *Endocrinology* 1999; 140: 2224-22231.
41. Sayer JA, Simmons NL. Urinary stone formation: Dent's disease moves understanding forward. *Exp Nephrol* 2002; 10: 176-181.
42. Sayer JA, Carr G, Pearce SHS, Goodship TH, Simmons NL. Disordered calcium crystal handling in antisense ClC-5 treated collecting duct cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300: 305-310.

43. Pesce C, Colombo B, Nicolini E, Spata F, Cappellari F. Medullary sponge kidney with severe renal function impairment: a case report. *Pediatrics Med Chir* 1995; 17: 65-67.
44. Gambaro G, Favaro S, D'Angelo A. Risk for renal failure in nephrolithiasis. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: 233-243.
45. Norden A, Lapsley M, Lee PJ, et al. Glomerular protein sieving and implication for renal failure in Fanconi Syndrome. *Kidney Int* 2001; 60: 1885-1892.
46. Morigi M, Macconi D, Zoja C, et al. Protein overload-induced NF-kappaB activation in proximal tubular cells requires H₂O₂ through a PKC-dependent pathway. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1179-1189.
47. Bolino A, Devoto M, Enia G, Zoccali C, Weissenbach J, Romeo G. Genetic mapping in the Xp 11.2 region of a new form of X-linked hypophosphatemic rickets. *Eur J Hum Genet* 1993; 1: 269-279.
48. Kelleher CL, Buckalew VM, Frederickson ED, Rhodes DJ, Conner DA, Seidman JG, Seidman CE. CLCN5 mutation Ser244Leu is associated with X-linked renal failure without X-linked recessive hypophosphatemic rickets. *Kidney Int* 1998; 53: 31-37.
49. Frymoyer PA, Scheinman SJ, Dunham PB, Jones DB, Hueber P, Schroeder ET. X-linked recessive nephrolithiasis with renal failure. *N Engl J Med* 1991; 325: 381-386.
50. Tosetto E, Anglani F, Graziotto R, Citron L, D'Angelo A, Gambaro G. Dent's disease: hereditary nephrolithiasis related to defective tubular endocytosis process. *Giornale Italiano di Nefrologia* 2003; 6: 578-588.

51. Scheinman SJ, Cox JP, Lloyd SE et al. Isolated idiopathic with mutation in CLCN5: relevance to idiopathic idiopathic. *Kidney Int* 2000; 57: 232-239.
52. Iragashi T, Inatomi J, Ohara T, Kuwahara T, Shimadzu M, Thakker RV. Clinical and genetic studies of CLCN-5 mutations in Japanese families with Dent's disease. *Kidney Int* 2000; 58: 520-527.
53. Norden AG, Knohl SJ, Scheinman SJ. Inherited hypercalciuric syndromes: Dent' disease (CLC-5) and familial hypomagnesemia with hypercalciuria (Paracellin-1). *Seminars in Nephrology* 2004; 1: 55-60.
54. Besbas n, Ozaltin J, Jeck N, et al. CLCN5 mutation (R347X) associated with hypokaliemic metabolic alkalosis in turkish child: an unusual presentation of Dent's disease. *Nephrol Dial transplant* 2005, 20: 1476 -1479.
- 55 . Wang SS, Devuyst O, Courtoy PJ, et al. Mice lacking renal chloride channel, CLC-5, are a model for Dent's disease, a nephrolitiasis disorder associated with defective receptor- mediated endocytosis. *Hum Mol Genet* 2000, 9: 2937 -2945.
56. Silva IV, Cebotaru V, Wang H, et al. The CLC-5 knock-out mouse model of Dent's disease has renal hypercalciuria and increased bone turnover. *J Bone Miner Res* 2002; 18: 615.623.
- 57 Christensen EI, Devuyst O, Dom G, et al. Loss of chloride channel CLC-5 impairs endocytosis by defective trafficking of megalin and cubilin in kidney proximal tubules. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8427.8477
58. Cebotaru V, Kaul S, Devuyst O, Cai H, Racusen L, Guggino WB, Guggino SE. High citrate diet delays progression of renal insufficiency in

the CIC-5 knockout mouse model of Dent's disease. *Kidney Int* 2005; 68 (2): 642-652

59. Raja Ka , Schuman S, D'Mello RG, et al. Responsiveness of hypercalciuria to thiazide in Dent's disease. *J Am Soc nephrol* 2002; 13: 2938-2944.

60. Klahr S, Morissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283: 861-875.

61. Zeisberg M, Strutz F, muller GA. Renal fibrosis: an update. *Curr opin Nephrol Hypertens* 2001; 10: 315-320.

62. Roberts AB, Sporn MB. Trasforming growth factor beta. *ADV Cancer Res* 1988; 51: 107-145.

63. Kuncio GS, Neilson EG, Haverty T. Mechanism of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 1991 ; 39:550-556.

64. Border WA, Noble Na. Trasforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286-1292.

65. Anglani F, Bernich P, Tosetto E, et al. Family history may be misleading in the diagnosis of Dent's disease. *Urol Res* 2006; 34: 61-63.

66 Evan A, Lingeman JE, Coe FL, et al. Randall's plaque of patients with nephrolithiasis begins in basement membranes of thin loops of Henle. *J Clin Invest* 2003; 111: 607-16.

67. Matlaga BR, Coe FL, Evan AP, Lingeman Je. The role of Randall's plaque in the pathogenesis of calcium stones. *The journal of urology* 2007; 1: 31-38

68. Sha Sha Wang, Devuyst, Coutoy, Wang Xi –Tao, Wang Wua, Wang Y, Thakker, Guggini S, Guggino W.2000 Mice lacking renal chloride channel, *clc-5* are a model for dent disease, a nephrolithiasis disorder associated with defective receptor mediate endocytosis. Human molecular genetics, vol 9 2937-2945

69 Carr G, Simmons NL, Sayer JA (2006) disruption of *clc-5* leads to redistribution of annexin A2 and promotes calcium crystalagglomeration in collecting duct epithelial cells. Cell Mol Life sci 63:367-377

70 AndrewP. Evan, Fredric L.Coe,James,E.Lingeman,YouzhiSghao,Andre J.Sommer,Sharon B. Bledsoe,Jennifer C. Anderson, Elaine M. Worcester Mechanism of Formation of Human Calcium Oxalate Renal Stones on Randall's Plaque The Anatomical Record 290:1315–1323 (2007)

71Mazess R, Collick B, Tremple J, Barden H, Hanson J. Performance evaluation of a dual-energy X ray bone densitometer: Calcif Tissue Int 1989; 44: 228-32.

72 Nuti R, Martini G, Righi G, Frediani B, Turchetti V.. Comparison of total body measurements by dual-energy x-ray absorptiometry and dual-photon absorptiometry. J. Bone Min. Res. 1991; 6: 681-687.

73 Caniggia A, Frediani B. Absorptiometry in metabolic bone disease: basal values and long-time treatment withcalcitriol (osteoporosis vs osteomalacia). Scanning Microscopy, Cells and Materials, Food Structure Meeting.Houston Maggio 1995; 6: 11-14.

74. Consensus Development conference: diagnosis, prophylaxis and tretment of osteoporosis. Am j Med (1991)90: 107-10.

75. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis Am J med (1993) 94: 646-50.

76. Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C et al. The diagnosis of osteoporosis . J Bone Miner Res (1994) 9: 1137-41.

77. World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: WHO Technical Report Series 843 (WHO: Geneva, 1994).