



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze Biomediche

CICLO XXVIII

COORDINATORE Prof. Persio Dello Sbarba

Ruolo della Pathway di Notch1
nella tumorigenesi renale

Settore Scientifico Disciplinare MED14

Dottorando

Dott. Sisti Alessandro

Tutore

Prof. Romagnani Paola

Coordinatore

Prof. Dello Sbarba Persio

Anni 2012/2015

INDICE

1 – INTRODUZIONE

1.1 - L'eterogeneità dei tumori renali, differenze qualitative e quantitative

- 1.1.1 – Principali tipologie di tumori renali, la nuova classificazione
- 1.1.2 – Classificazione delle lesioni proliferative e non proliferative nel modello animale
- 1.1.3 – Dilatazione tubulare
- 1.1.4 – Cisti tubulare
- 1.1.5 – Basofilia Tubulare
- 1.1.6 – Dilatazione dello spazio di Bowman
- 1.1.7 – Metaplasia/Iperplasia della capsula di Bowman
- 1.1.8 – Infiltrato infiammatorio interstiziale
- 1.1.9 – Fibrosi Interstiziale
- 1.1.10 – Iperplasia tubulare semplice
- 1.1.11 – Iperplasia tubulare atipica
- 1.1.12 – Adenoma
- 1.1.13 – Carcinoma

1.2 – Stimoli pro-tumorali, può Notch1 essere un trigger?

- 1.2.1 – La via di segnalazione di Notch
- 1.2.2 – Il ruolo di Notch nell'embriogenesi renale
- 1.2.3 – Oltre l'embriogenesi. Notch: danno acuto e rigenerazione
- 1.2.4 – Il danno cronico: Notch e fibrosi
- 1.2.5 – Notch e RCC

1.3 – Modelli murini: Strumenti per lo studio dell'evoluzione tumorale

- 1.3.1 – I nuovi modelli murini: Lineage Tarcing e Attivazione condizionale
- 1.3.2 – Il promotore Pax8
- 1.3.3 – Il transgene Notch1

2 – IPOTESI DI STUDIO

2.1 – Può l'attivazione di Notch1 essere un trigger per la formazione di neoplasie nel tessuto renale?

3 – MATERIALI E METODI

3.1 – Creazione e selezione del modello murino

- 3.1.1 – Provenienza e breeding del modello murino transgenico Pax8-rtTA/TetO-Cre/ROSA26-Confetti/ROSA26-Notch1-GFP
- 3.1.2 – Selezione degli animali tramite genotipizzazione

3.2 – La lunga strada della sperimentazione: dall'induzione al sacrificio dell'animale

- 3.2.1 – Induzione del modello murino transgenico
- 3.2.2 – Monitoraggio della funzionalità renale
- 3.2.3 – Il sacrificio della cavia: l'acquisizione del tessuto renale

3.3 – Preparazione e studio del tessuto renale

- 3.3.1 – Analisi Istologica: taglio, colorazione e acquisizione tramite microscopia ottica
- 3.3.2 – Analisi di Espansione Clonale: taglio, marcatura e acquisizione tramite microscopia confocale

3.4 – Criteri di analisi e metodologia statistica

3.4.1 – Istologia: analisi quantitativa e qualitativa del tessuto

3.4.2 – Espansione clonale: Analisi e conta della clonogenicità del tessuto

3.4.3 – Analisi statistica dei dati

4 – RISULTATI

4.1 – La validazione del modello, la conferma dell'attivazione condizionale

4.1.1 – Verifica dell'attivazione del transgene ROSA26-Confetti e distribuzione delle cellule Pax8 nel rene

4.1.2 – Verifica dell'avvenuta espressione del transgene ROSA26-Notch1-GFP

4.1.3 – Controllo leakage del sistema transgenico

4.2 – Monitoraggio della funzione renale nel tempo: i fattori influenti

4.3 – La distribuzione delle alterazioni nella struttura renale

4.4 – Studio della clonogenicità nel tumore

5 – DISCUSSIONE

6 – BIBLIOGRAFIA

7 – RINGRAZIAMENTI

1 – INTRODUZIONE

1.1 - L'eterogeneità dei tumori renali, differenze qualitative e quantitative

1.1.1 – *Principali tipologie di tumori renali umani, la nuova classificazione*

I tumori del rene rappresentano circa il 2% delle neoplasie che affliggono il genere umano, con circa 190.000 nuovi casi l'anno distribuiti in tutto il mondo, con una maggiore incidenza nei paesi sviluppati (1).

I tumori renali possono essere divisi in 8 grosse famiglie (1):

- Carcinomi a cellule renali
- Tumori metanefrici
- Tumori nefroblastici
- Tumori mesenchimali
- Tumori epiteliali e mesenchimali misti
- Tumori neuroendocrini
- Tumori ematopoietici e linfoidi
- Tumori delle cellule germinali

In questa tesi ci concentreremo sul carcinoma a cellule renali o RCC (Renal Cell Carcinoma). Con RCC intendiamo un gruppo di tumori eterogeneo che vengono ad originarsi dai componenti epiteliali del nefrone.

Il carcinoma a cellule renali rappresenta il gruppo di neoplasie renali più cospicuo, raccogliendo oltre il 90% dei casi negli adulti di entrambi i sessi, con una manifestazione 2-3 volte maggiore negli uomini rispetto alle donne. L'incidenza aumenta dopo i 40 anni d'età, come per tutti tumori di origine epiteliale, diminuendo dopo i 75 anni in entrambi i sessi (2) (3).

Per quanto riguarda l'eziologia il fumo di tabacco è la maggior causa di sviluppo del tumore nel maschio (39% dei casi) (4). Altri stimoli possono essere costituiti dall'esposizione ad alcuni composti dell'arsenico utilizzati in alcuni processi industriali o all'assunzione di acqua contaminata che aumentano il

rischio di sviluppo del 30% (5). Molti altri composti chimici ambientali come amianto, cadmio, alcuni solventi organici, pesticidi e alcune tossine fungine potrebbero costituire uno stimolo cancerogenico per il rene ma non vi sono ancora dati certi (5) (6). Vari studi epidemiologici hanno mostrato che il rischio di cancro renale cresce direttamente con l'aumento dell'Indice di Massa Corporea (IMC, Body Mass Index BMI), la misurazione più semplice per la determinazione del sovrappeso (7). L'incidenza di RCC in persone obese (BMI > 29 kg/m²) è doppia rispetto ad un individuo (8).

L'incidenza di RCC aumenta notevolmente in persone con condizioni di ipertensione sanguigna indipendente dall'obesità e fumo di tabacco (9) (10) (11).

Altre cause possibili sono state identificate in: storia familiare di tumori renali (12), peso alla nascita (13), basso consumo di frutta e vegetali (14) e il consumo di farmaci antidepressivi e diuretici; anche se il significato di queste associazioni sono al momento da chiarire. Alcuni studi hanno poi ipotizzato che specifiche caratteristiche genetiche possano modulare l'effetto dato dall'esposizione a prodotti chimici cancerogeni (15) (16).

La sintomatologia è varia, la triade dei sintomi più comuni corrisponde a: ematuria, dolore e gonfiore del fianco. Circa il 40% dei pazienti affetti manifesta invece sintomi sistemici come: elevazione della velocità di sedimentazione eritrocitaria, anemia normocitica, epatosplenomegalia, perdita di peso, dolore addominale, anoressia e febbre (17) (18) (19) (20) (21).

Il rene può comunque essere affetto da alcune forme di cancro ereditario. Per la maggior parte di esse sono state identificate: le mutazioni germinali di attivazione di oncogeni o di inattivazione di oncosoppressori possono essere utilizzate per confermare la diagnosi clinica di sindrome ereditaria.

Comunque, ogni sindrome ereditaria predispone l'individuo a sviluppare differenti tipi di carcinoma renale, e comunemente i pazienti affetti sviluppano tumori renali multipli bilaterali (22).

La classificazione dei tumori renali è basata sulla morfologia del tumore stesso. Il primo caso documentato di carcinoma renale risale a più di 200 anni fa, da allora si sono susseguiti vari tentativi di classificazione con Koenig nel 1826 (23), con Cornil e Ranvier (24) ed in seguito tramite i convegni di Heindelberg del 1996 (25) e di Rochester del 1997 (26). La classificazione formulata rimase in utilizzo fino al 2002, quando fu ripresa ed ampliata durante il terzo incontro dell'Organizzazione Mondiale della Sanità a Lione nello stesso anno. Questa classificazione nel 2012 è stata ulteriormente ampliata in seguito all'opera di revisione della letteratura della International Society of Urological Pathology (ISUP) nella corrente classificazione di Vancouver (27) (Figura 1).

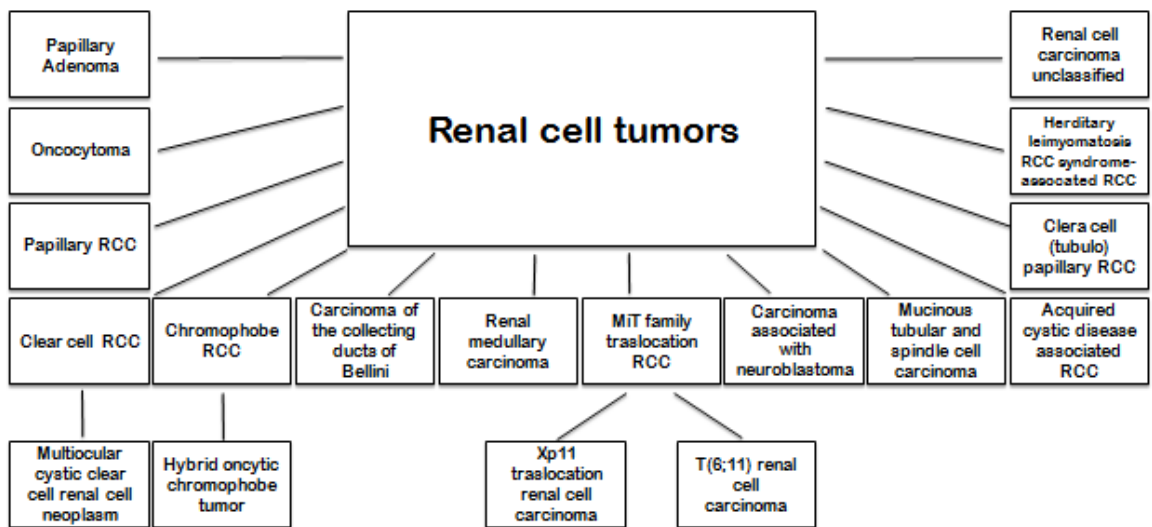


Figura 1 - Classificazione schematica dei vari tipi di carcinoma a cellule renali.

Segue quindi un *excursus* delle varie tipologie di RCC con una breve analisi delle loro caratteristiche principali.

Adenoma Papillare

Questa neoplasia dell'epitelio dei tubuli renali è la più comune; lesioni simili si sviluppano frequentemente in pazienti in dialisi a lungo termine e si ritrovano nel 33% dei pazienti affetti da malattia cistica renale acquisita (28).

Il tumore si sviluppa con un'architettura papillare, tubulare o tubulo-papillare, con nuclei dalla forma variabile tra il circolare e l'ovale e citoplasma voluminoso e eosinofilo, ricordando fortemente il Carcinoma Papillare di tipo 1 e 2 (29) (30).

L'adenoma Papillare è ben circoscritto, con noduli di colore variabile tra il giallo e il bianco grigiastro di dimensioni inferiori ad 1mm di diametro quando si ritrovano nella zona corticale (la maggior parte si localizzano appena sotto la capsula renale). Sono di solito solitari, ma raramente multipli e bilaterali. Quando sono veramente numerosi si parla di "adenomatosi renale".

Oncocitoma

E' una neoplasia epiteliale benigna composta da cellule di ampio volume, citoplasma eosinofilo, ricche di mitocondri, derivante dalle cellule intercalari. Le cellule intercalari insieme alle cellule principali formano i dotti collettori renali. Le cellule principali sono contraddistinte da alta permeabilità all'acqua e ai soluti e rispondono a regolazione ormonale, le cellule intercalari sono invece responsabili della secrezione di ioni H⁺ e del mantenimento dell'equilibrio acido-base.

In base alle casistiche chirurgiche l'oncocitoma costituisce circa il 5% di tutte le neoplasie del rene. E' contratto da persone adulte di tutte le età, con un picco in corrispondenza della settima decade. Circa 2/3 dei casi sono contratti dai soggetti di sesso maschile.

L'oncocitoma è un tumore ben circoscritto non incapsulato di un colore marrone mogano e più raramente giallo pallido. Al centro è possibile sia

presente una cicatrice di forma stellata, più comune nei tumori di maggior dimensione. L'emorragia e la necrosi sono poco frequenti.

Questo tumore presenta alcuni segni caratteristici: strutture solide compatte, acinari, tubuli e microcisti. La cellula predominante è l'oncocita, di forma variabile dal circolare al poligonale con un citoplasma eosinofilo granulare molto denso. I nuclei sono regolari e circolari, si posizionano al centro della cellula, mentre la cromatina è dispersa (31) (32) (33) (34).

Carcinoma a Cellule Renali Papillare

Il carcinoma papillare è un tumore maligno di origine parenchimale con un architettura papillare o tubulo-papillare.

Nelle casistiche chirurgiche circa il 10 % dei casi di tumore renale è costituito da questi carcinomi. I casi risultano essere concentrati in un range d'età tra 52-68 anni e con un rapporto maschi:femmine variabile tra 1,8:1 a 3,8:1 (29) (35) (36).

Frequentemente questo tumore contiene aree emorragiche, necrotiche e cisti degenerate. In alcuni tumori ben circoscritti è possibile identificare una pseudo-capsula a separare il tumore dal resto del tessuto (37) (38). Il tumore Papillare è composto da cellule epiteliali maligne che formano in proporzione variabile papille e tubuli. Le papille tumorali hanno all'interno un delicato nucleo fibrovascolare e possono essere presenti aggregati di macrofagi schiumosi e cristalli di colesterolo (39). Una variante è costituita da tubuli o piccole papille simili a glomeruli (40).

Sono stati descritti due tipi morfologici:

- Tipo 1, si sviluppano papille coperte da un singolo strato di piccole cellule con scarso citoplasma sulla membrana basale del tumore. Questi sono più frequentemente multifocali.
- Tipo 2, costituito da cellule con citoplasma eosinofilo e nuclei pseudo-stratificati in corrispondenza del centro della papilla.

Carcinoma a Cellule Renali a Cellule Chiare

E' una neoplasia maligna composta da cellule con citoplasma chiaro ed eosinofilo con una delicata rete vascolare. Sono tumori della zona corticale con egual frequenza di manifestazione in entrambi i reni, la multicentricità e/o la bilateralità si ritrova in meno del 5% dei casi (41). La multiceutralità, come la bilateralità e la manifestazione in età precoce, sono caratteristici della sindrome ereditaria di Von Hippel-Lindau.

Il carcinoma a cellule chiare è tipicamente una massa globulare bozzoluta che si espande dalla corticale, i limiti sono normalmente ben marcati da un "margine di spinta" (pushing margin) e da una pseudo-capsula. Ha tipicamente un colore giallo, dato dall'alto contenuto lipidico delle cellule. Sono comunque comunemente presenti: cisti, aree necrotiche, emorragie e calcificazione (42) (43).

Questo tumore ha una variegata architettura, si manifesta più frequentemente con strutture solide, alveolari o acinari. La fitta e sottile rete vascolare è un utile strumento per il riconoscimento e la classificazione. Nella struttura alveolare non sono presenti lumi, è invece presente una cavità centrale piena di fluido sieroso lievemente acidofilo o eritrociti nella struttura acinare. Queste due architetture possono dilatarsi producendo microcisti e macrocisti.

Alla maggior parte dei tumori è associata una risposta infiammatoria, raramente può essere presente infiltrato linfocitico o neutrofilo.

Carcinoma a Cellule Renali a Cellule Chiare con Cisti Multioculari

Questo sottotipo corrisponde a circa il 4% dei carcinomi a cellule chiare. Affligge adulti di mezza età colpendo maggiormente i maschi rispetto alle femmine in un rapporto 1,2:1 a 2,1:1. E' di solito scoperto casualmente durante analisi effettuate per altre cause ed è quasi sempre unilaterale (44) (45) (46).

Macroscopicamente il tumore è composto esclusivamente di cisti di dimensioni variabili separate da setti sottili, piene di un fluido chiaro gelatinoso o sieroso. Le cellule chiare possono essere scambiate per linfociti o istiociti, anche in questo caso la vascolarizzazione è un importante strumento di analisi.

Carcinoma a Cellule Renali Cromofobo

E' caratterizzato da grandi cellule pallide con spessa membrana. Corrisponde a circa il 5% dei tumori epiteliali renali rimossi chirurgicamente. Affligge in egual percentuale maschi e femmine tra 27-86 anni. Esistono rare forme ereditarie (47).

Appare come un tumore solido, circoscritto, con una superficie lievemente lobulata, ha un tono marrone che vira al grigio dopo fissazione in formalina.

Il tumore manifesta spesso zone di calcificazione e ampi setti fibrotici. A differenza delle Carcinoma a Cellule Chiare molti vasi hanno pareti spesse ed eccentricamente ializzate, ovvero acquisiscono un aspetto vetroso e appaiono rifrangenti al microscopio (questo accade a causa di un arricchimento di collagene), ispessendosi e rigonfiandosi.

Nel tumore le grandi cellule poligonali con citoplasma chiaro sono comunemente mischiate a cellule più piccole con citoplasma granulare ed eosinofilo.

La variante eosinofila del carcinoma Cromofobo è completamente composta da cellule altamente eosinofile con una membrana prominente (48). Le cellule hanno poi nuclei irregolari, a volta sono binucleate.

Tumore Ibrido Oncocitoma/Cromofobo

Sono un gruppo di tumori con cellule miste che manifestano caratteristiche morfologiche di entrambi i tipi tumorali. E' stato riscontrato in 3 situazioni clinico-patologiche:

- Può essere trovato sporadicamente
- In associazione con oncocitosi e oncocitomatosi,
- In pazienti con la sindrome Birt-Hogg-Dubè (BHD).

I tumori di questi tre gruppi manifestano caratteristiche morfologiche simili ma hanno un differente background molecolare e genetico (49) (50) (51) (52) (53) (54) (55) (56) (57).

I tumori ibridi sporadici sono composti di cellule neoplastiche con un architettura prevalentemente solida-alveolare con nuclei pleomorfici e abbondanti granuli eosinofili, le cellule hanno frequentemente un anello perinucleare e sono occasionalmente binucleate.

I tumori ibridi in associazione con oncocitosi e oncocitomatosi sono molto simili a quelli sporadici ma sono composti da piani di cellule separati da una delicata vascolatura. Le cellule possono essere tonde o poligonali e nuclei irregolari.

I tumori ibridi associati a BHD hanno tre aspetti morfologici tipici:

- 1) un susseguirsi di zone a morfologia tipica del tumore cromofobo e oncocitoma
- 2) cellule cromofobe disperse in un background tipico dell'oncocitoma
- 3) larghe cellule eosinofile con vacuoli intracitoplasmatici.

I pazienti affetti sono adulti con egual distribuzione tra maschi e femmine. I tumori sono di solito ben circoscritti e non incapsulati, la necrosi compare raramente mentre può essere presente una cicatrice fibrotica centrale (58) (59) (60).

Carcinoma dei dotti collettori del Bellini

E' un tumore epiteliale maligno derivante dalle cellule principali dei dotti collettori del Bellini. E' una neoplasia rara, conta <1% dei casi di tumore renale, sono stati descritti oltre 100 casi in un range d'età di 13-83 anni, con una media di 55, ed un rapporto maschi:femmine di 2:1 (61).

Questo tumore è generalmente collocato verso il centro del rene. Quando è piccolo si può vedere originare da una piramide renale. La dimensione media è di circa 5 cm, sono tipicamente di un colore grigio-bianco dai bordi irregolari. Non è un tumore facile da riconoscere, il prototipico carcinoma dei dotti collettori del Bellini ha un architettura tubulare o tubulo-papillare nella quale si ritrovano strutture simil-ghiandolari che infiltrano il parenchima renale associate a stroma desmoplastico (62) (63) (64).

Possono poi essere viste piccole invaginazioni di morfologia papillare e delle micro-cisti.

Carcinoma renale midollare

Un tumore a crescita rapida originato dalla zona midollare renale, associato quasi sempre con una condizione di anemia falciforme. Questo è un tumore estremamente raro, in un periodo di 27 anni solo 49 casi sono stati diagnosticati (65) (66).

Il tumore origina in posizione centrale nel rene, scarsamente circoscritto ha una dimensione media di 7 cm. La maggior parte dei tumori manifestano emorragie e necrosi.

E' di solito composto da foglietti di cellule, arrangiati reticolarmente o in zone più compatte di struttura adenoide. Le cellule sono eosinofile con nuclei chiari e nucleoli prominenti. Si ritrovano spesso neutrofili mischiati al tessuto tumorale, soprattutto in corrispondenza dei margini in crescita.

Carcinoma a Cellule Renali con traslocazione della Famiglia MiT

La famiglia MiT (microphthalmia family of transcription factors) è un gruppo di fattori di trascrizione "elica-ansa-elica" e "cerniera di leucina" coinvolto nella regolazione lineage-specifica di vari tipi cellulari come: melanociti, osteoclasti e mastociti (67). Fanno parte della famiglia le proteine MiTF, TFE3, TFEB, TFEC. Queste riconoscono le stesse sequenze di DNA, mostrano i

medesimi domini di attivazione/legame al DNA e eterodimerizzano in tutte le combinazioni. Da dati in vitro, sembra che attivino anche la trascrizione di geni simili. MiTF è uno dei più noti ed ha il ruolo di attivare l'espressione di marker di differenziamento melanocitico nel lineage omonimo, attiva poi anche la produzione di proteasi come la Cathepsina K nelle cellule osteoclastiche (68).

La fusione genica di due di questi fattori è stata identificata in alcuni Carcinomi a Cellule Renali:

- **Carcinoma a Cellule Renali con traslocazione Xp11** = In questo gruppo di neoplasie il gene del fattore TFE3 localizzato in Xp 11.2 trasloca e va a fondersi con un ampio spettro di possibili geni tra cui: ASPL, PRCC, NonO (p54^{nrb}), PSF e CLTC (69) (70) (71) (72) (73).

I carcinomi a cellule renali nei bambini sono minori del 5% del totale di tutte le neoplasie renali, approssimativamente il 50% di questi casi è dovuto a Traslocazione Xp11. Nell'adulto è stato stimato che una proporzione variabile tra 1% e 4% dei casi di Carcinoma a cellule renali sia dovuto a questa traslocazione (74) (75) (76).

Più del 15% dei pazienti con la traslocazione Xp11 hanno una storia clinica di chemioterapia durante l'infanzia (77).

I preparati istologici dei tumori presentano caratteristicamente sia le cellule chiare, che l'architettura papillare, che numerosi corpi psammomatosi, anche se il tumore può presentarsi con caratteristiche istologiche tipiche di altri tipi di carcinoma a cellule renali.

- **Carcinoma a Cellule Renali con traslocazione t(6;11)** = In questa neoplasia si verifica una traslocazione t(6;11)(p21; q12) che porta alla formazione di una proteina di fusione *Alpha-TFEB* (78) (79) (80) (81) (82) (83) (84).

Questo tumore dimostra tipicamente due morfologie, comprendendo cellule epiteliodi grandi e piccole di solito raggruppate in corrispondenza della

membrana basale. Anche se non è chiaro il quadro delle possibili manifestazioni, sono stati documentati alcune situazioni dominate da sclerosi, o da cellule chiare, o da architettura papillare.

Il carcinoma con traslocazione t(6;11) è comunque sempre caratterizzato dalla presenza di marker melanocitici come HMB-45 e Melan-A, ma è totalmente negativo o solo focalmente positivo ai marker epiteliali, come le citocheratine. Come risultato della sostituzione del promotore il gene di fusione *Alpha-TFEB* provoca un'overespressione del TFEB nativo, la marcatura nucleare immunohistochimica per TFEB è uno strumento specifico e sensibile per l'identificazione di questo tumore

La maggior parte dei casi si manifesta in giovani adulti.

Carcinoma a Cellule Renali associato con Neuroblastoma

E' un tumore che viene sviluppato a tempi lunghi da pazienti sopravvissuti a neuroblastoma durante l'infanzia.

Sono stati riportati 18 casi, con uomini e donne ugualmente affette. L'età al momento della diagnosi di neuroblastoma era inferiore ai 2 anni. L'età media al momento della diagnosi di Carcinoma a Cellule Renali era di 13,5 anni, in un range di 2-35 anni (85) (86) (87) (88) (89) (90).

Ha una dimensione media di 4 cm e può interessare entrambi gli organi.

Questi tumori hanno una morfologia eterogenea, alcuni caratterizzati da un'architettura solida o di tipo papillare, le cellule hanno un abbondante citoplasma eosinofilo.

Carcinoma tubulare a cellule mucinose e cellule fusate

E' una neoplasia renale epiteliale polimorfica di basso grado, caratterizzata da cellule tubulari mucinose e cellule fusate.

Colpisce in un range d'età compreso tra i 17 e gli 82 anni, con rapporto maschi:femmine di 1:4 (91) (92).

Il tumore è di solito ben circoscritto, con un colore grigio o marrone chiaro. Istologicamente appare composto da tubuli allungati, piccoli e strettamente impacchettati, separati da un pallido stroma mucinoso. I tubuli paralleli hanno spesso una configurazione a cellule fusate, che ricorda a volte la struttura del leiomioma o del sarcoma. Le cellule sono comunque piccole con forma cuboidale o ovale. Occasionalmente si incontrano aree di necrosi, di infiammazione cronica o depositi di cellule schiumose.

Carcinoma a Cellule Renali Tubulocistico

Mostra una somiglianza col Carcinoma dei dotti Collettori, infatti questa neoplasia è concepita come un carcinoma dei dotti collettori di basso grado tumorale (93) (94).

Analizzando la casistica degli ultimi anni (circa 70 casi) è stato possibile definire alcuni criteri base per il riconoscimento del tumore. L'età media del paziente si aggira intorno a 60 anni con una forte prevalenza nel sesso maschile (rapporto maggiore o uguale di 7:1) (95) (96) (97) (98).

Il carcinoma Tubulocistico ha tipicamente un epicentro corticale o corticale-midollare, è ben circoscritto, normalmente incapsulato con una superficie a "pluriball" bianca o grigia. Istologicamente è composto da tubuli di piccole e medie dimensioni e tubuli più larghi dilatati cisticamente in varie proporzioni. La faccia luminale del tubulo è composto da una linea di cellule atipiche con abbondante citoplasma eosinofilo e spesso hanno una configurazione a "buletta". I nuclei sono ingranditi e hanno prominenti nucleoli. Lo stroma interposto è normalmente ipocellulare e fibrotico.

Carcinoma a Cellule Renali associato a malattia cistica acquisita

E' la neoplasia più comune affliggente pazienti in Malattia Renale Terminale o ESRD (End Stage Renal Disease), specialmente in quelli con Malattia Cistica Acquisita (99) (100). Il tumore è caratterizzato da cellule con citoplasma

eosinofilo, architettura cribiforme o "a setaccio" e cristalli di ossalato intratumorali. Recentemente è stata identificata un'associazione molto forte tra questo tumore ed il trattamento dialitico per lunghi periodi (superiori ai 10 anni) (101) (102).

Il tumore appare o come una serie di noduli emergenti dalle pareti delle cisti (riempiendole completamente), o come masse solide separate da queste cisti. Il tumore non cistico è ben circoscritto e può essere circondato da una capsula fibrosa con calcificazione distrofica.

Il tumore mostra un'architettura acinare, tubulare, alveolare-solido, microcistica e macrocistica, papillare, e solido a foglietti (103). Molti tumori hanno un abbondante citoplasma granulare eosinofilo con nuclei ovali. Possono essere incontrati foci con citoplasma chiaro o vacuolato.

Data la variabile architettura è facilmente confuso con il tumore papillare di tipo II, mentre la presenza del citoplasma chiaro e la struttura acinare, può far pensare ad un Carcinoma a Cellule Chiare.

Le cisti sono numerose e nella maggior parte dei casi composte da un singolo strato di grandi cellule eosinofile, "cisti atipiche" sono invece definite le cisti con proliferazione epiteliale.

Carcinoma a Cellule Renali a Cellule Chiare (Tubulo) Papillare

È un carcinoma composto da cellule chiare con un'architettura variabile di tipo: papillare, tubulare/acinare e cistica. Ha un epitelio tubulare caratterizzato da una disposizione lineare dei nuclei in opposizione alla superficie basale delle cellule (104) (105).

Il carcinoma a Cellule Renali a Cellule Chiare (Tubulo) Papillare è stato all'inizio riscontrato solo nei pazienti in ESRD (99), ma molti casi sporadici sono stati identificati in seguito. Costituisce circa 1% della totalità delle neoplasie renali, l'età di presentazione è simile a quella del Carcinoma a cellule

Renali Papillare, con un range 18-88 anni e una media di 60 anni d'età in entrambi i sessi (106) (107).

E' normalmente ben circoscritto e incapsulato, variabile nel colore, tra il biancastro e il giallo. Variabile anche nella compattezza, con grandi aree fibrose, o con aree ad apparenza solide a causa delle papille strettamente impacchettate, o con aree a predominanza cistica. Sono di solito unicentrici, unilaterali e piccoli.

La principale diagnosi differenziale è da fare con il carcinoma a cellule chiare, alcuni di questi possono avere foci con nuclei allineati che ricordano l'andamento cellulare del Carcinoma a Cellule Renali a Cellule Chiare (Tubulo) Papillare (100) (108).

Carcinoma a Cellule Renali associato a Leiomiomatosi Ereditaria

La leiomiomatosi familiare è una patologia a trasmissione autosomica dominante, portata da una mutazione al gene dell'enzima Fumarato Idratasi localizzato sul cromosoma 1q42. La leiomiomatosi è caratterizzata dalla presenza di leiomiomi cutanei e uterini multipli e può associarsi a tumori in altri organi. I leiomiomi sono neoplasie benigne dei tessuti molli che originano dalla muscolatura liscia.

Le leiomiomatosi uterine sono particolarmente difficili da trattare e per circa il 50% delle donne è necessario sottoporsi ad un isterectomia prima del trentesimo anno d'età (109) (110).

Il tratto morfologico distintivo di queste cellule è un distinto e prominente nucleolo eosinofilo con un chiaro alone a "occhio di gufo" simile all'aspetto dei corpi d'inclusione del citomegalovirus.

La struttura del tumore è normalmente papillare, ma è stata riscontrata anche architettura cribiforme o solida.

Carcinoma a Cellule Renali non classificato

In questa categoria vengono raggruppati i carcinomi a cellule renali le cui caratteristiche non ricalcano esattamente quelle necessarie per l'assegnazione alle altre categorie (25) (26).

Nelle casistiche chirurgiche questo gruppo rappresenta circa il 4-5% dei casi. Esempi di aspetti morfologici per includere un carcinoma in questa categoria possono essere: presenza composita di caratteristiche di altri tumori catalogati, morfologia sarcomatoide senza elementi epiteliali riconosciuti, produzione di muco, presenza composita di elementi epiteliali e stromali, tipi cellulari irriconoscibili.

1.1.2 – *Classificazione delle Lesioni Proliferative e non Proliferative nel modello animale*

Nello studio dello sviluppo tumorale il modello animale ricopre spesso un ruolo fondamentale per la comprensione dei meccanismi di nascita, crescita e metastatizzazione.

Come chiarito precedentemente i tumori renali possono manifestarsi con un ampio ventaglio di caratteristiche morfologiche. Molte di queste mostrano una correlazione anatomica/strutturale con lesioni di diversa natura ritrovate nel modello animale: alcune di natura pre-tumorale e altre con spiccata manifestazione proliferativa (ricollegabile a un commissionamento di tipo neoplastico). E' necessario perciò affacciarci ad una veloce carrellata delle lesioni che si sviluppano nel modello animale e alla loro classificazione, esplorando con maggior attenzione alcune di queste.

Il sistema urinario in tutte le specie di mammifero, inclusi ratto e topo, è rappresentato dal rene e dalle basse vie urinarie (ureteri, vescica e uretra). La funzione primaria del rene è quella di filtrare il sangue ed eliminare i prodotti di scarto del metabolismo, funzioni secondarie comprendo la produzione ormonale, il controllo della volemia, regolazione degli elettroliti, turnover delle proteine a basso peso molecolare. La funzione del basso sistema urinario è quella di trasportare e accumulare l'urina, dal rene fino all'espulsione dal corpo.

Lesioni degenerative non-proliferative possono essere incontrare comunemente nei reni dei roditori d'età avanzata. L'effetto dell'invecchiamento, della dieta, delle malattie infettive nel ratto è stato approfonditamente studiato (111) (112) e il danno renale può manifestarsi a causa di un effetto diretto sui tubuli o sui glomeruli o indirettamente tramite una emodinamica alterata.

Le lesioni proliferative nei roditori da laboratorio possono svilupparsi spontaneamente o in seguito a esposizione a carcinogeni (113).

Anche il basso sistema urinario essendo composto di tessuti epiteliali, muscolari e connettivi simili a quelli renali hanno la potenzialità di sviluppare simili lesioni proliferative e non-proliferative.

L'unità funzionale del rene è il nefrone: ha inizio dal corpuscolo renale composto dalla capsula di Bowman e dal glomerulo, continua con il tubulo contorto prossimale, discende nella zona midollare del rene formando l'ansa di Henle, una lunga ansa a forma di "U", risalendo nella zona corticale con il tubulo contorto distale che infine defluisce nel dotto collettore. Questo porta l'urina nella pelvi renale, dove i dotti collettori si riuniscono a formare i dotti papillari che infine scaricano l'urina nella pelvi renale (Figura 2). Ci sono circa 10.000 nefroni nel rene murino, ma possono variare in base al ceppo e all'età, a causa di una perdita progressiva nell'invecchiamento.

Il glomerulo è composto da una rete capillare proiettata nella capsula di Bowman. Il tuft glomerulare è fiancheggiato da cellule endoteliali, è sovrastato da una lamina basale fenestrata e da uno strato di cellule podocitarie.

I tubuli prossimali compongono la maggior parte della struttura della zona corticale (fino al 75%). Il tubulo prossimale può essere suddiviso nelle porzioni S1, S2 (che corrispondono al segmento convoluto), e S3 il segmento retto o diritto.

Il segmento S1 in sezione appare spesso ovale o trasverso, ha uno spesso orletto a spazzola e numerosi mitocondri allungati baso-laterali.

Il segmento S2 ha un orletto meno pronunciato ed un minore numero di mitocondri, ma corpi lisosomiali sono più pronunciati.

Il segmento S3 in sezione appare sia lineare (longitudinale) che trasversale, l'orletto a spazzola appare più pronunciato che nelle altre porzioni.

Dal segmento S3 parte il tratto discendente dell'ansa di Henle, fungendo da legame tra la zona esterna ed interna della midollare esterna. I nefroni juxtamedullari hanno un tratto discendente più lungo che può estendersi in profondità nella midollare fino alla papilla, mentre i nefroni sottocapsulari hanno tratti discendenti più corti che si distribuiscono nella midollare esterna. Il tratto ascendente sottile, diventa il tratto ascendente spesso risalendo verso la zona corticale. Il tratto spesso è considerato parte del nefrone distale insieme alla macula densa e al tubulo distale convoluto.

Il tubulo spesso termina vicino al proprio glomerulo, appena dopo la macula densa. Le cellule endoteliali del tratto ascendente spesso sono cuboidali e eosinofile con nucleo centrale prominente ed ovoidale, sono di dimensioni inferiori rispetto alle cellule del tubulo prossimale convoluto.

L'apparto iuxtaglomerulare si trova in corrispondenza del polo vascolare del glomerulo ed è composto dalla macula densa, le arteriole afferenti ed efferenti, le cellule granulari secernenti renina e le cellule mesangiali.

Il tubulo convoluto distale comincia dietro la macula e si estende fino ai tubuli connettori che portano poi ai dotti collettori.

I dotti collettori si estendono dalla corteccia in tutte le zone del rene fino alla punta della papilla.

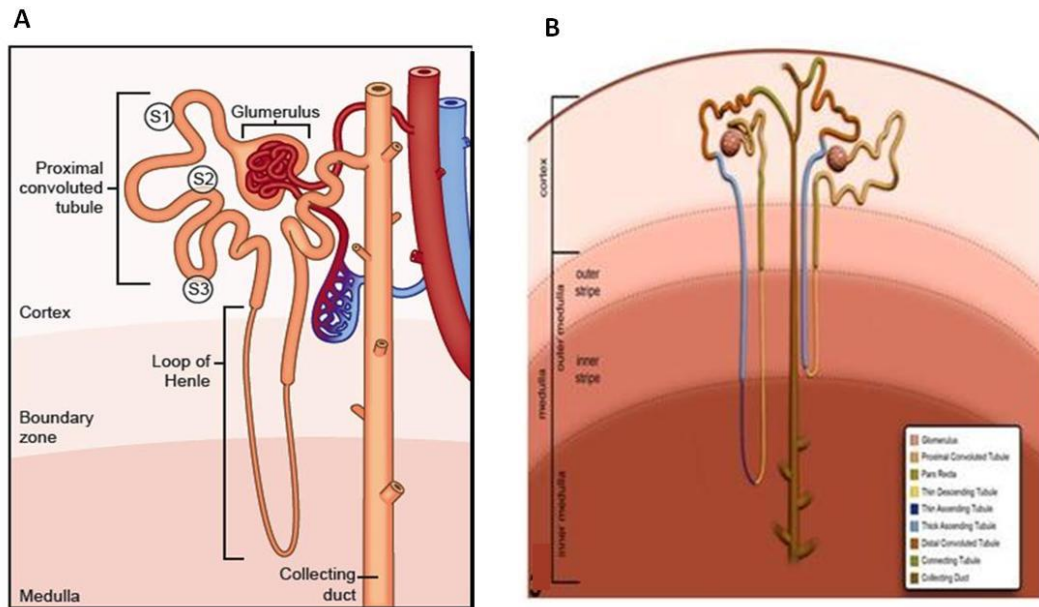


Figura 2 - Il nefrone. (A) Le diverse porzioni del tubulo prossimale; (B) Localizzazione delle varie porzioni del Nefrone

Le basse vie urinarie comprendono in tutte le loro sezioni un urotelio (epitelio di transizione) formato da tre o più strati epiteliali a bassa attività mitotica, di cui solo lo strato più profondo è metabolicamente attivo. L'urotelio è circondato in modo variabile da tessuto connettivo e strati di tessuto muscolare.

Il progetto INHAND (International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria for Lesions in Rats and Mice) tramite la collaborazione della: ESTP (European Societies of Toxicologic Pathology), BST (Great Britain Societies of Toxicologic Pathology), JSTP (Japan Societies of Toxicologic Pathology) e STP (North America Societies of Toxicologic Pathology) ha permesso di sviluppare a livello internazionale una nomenclatura unica per classificare le lesioni proliferative e non proliferative per gli animali da laboratorio (114).

Per quanto riguarda il rene possiamo distinguere le seguenti categorie di lesione indicando per ognuna le porzioni renali interessate (115):

1) Lesioni congenite del rene

- Residui Surrenatici
- Agenesia della zona corticale e/o midollare
- Ipoplasia della zona corticale e/o midollare
- Displasia della zona corticale e/o midollare

2) Modiche Epiteliali (tubulari) del Rene

- Atrofia tubulare: Tubuli prossimali e distali
- Degenerazione Tubulare: Tubuli prossimali, distali e dotti collettori
- Necrosi della singola cellula: Tubuli prossimali, distali e dotti collettori
- Necrosi: Tubuli prossimali, distali e dotti collettori
- Necrosi Papillare: Zona Interna della Midollare e Papilla
- Infarto: Zona Corticale
- Emorragia: Zona corticale e midollare
- Vacuolazione: Tubuli prossimali, distali e dotti collettori
- Accumulazione dei Glicogeno: Tubuli prossimali e distali
- Accumulazione di gocce ialiniche: Tubuli prossimali e distali
- Nefropatia da Alfa_{2u}-Globulina: Tubulo prossimale
- Dilatazione tubulare: Tubuli prossimali, distali e dotti collettori
- Cisti: Zona corticale e Midollare
- Nefropatia retrograda: Tubuli prossimali, distali e dotti midollari
- Basofilia tubulare: Tubuli prossimali, distali e dotti collettori
- Nefropatia Cronica Progressiva: Tubuli Prossimali e distali
- Cilindri: Tubuli prossimali, distali, ansa di Henle e dotti collettori midollari
 - Cilindro Ialino
 - Cilindro Granulare
- Aggregato adiposo interstiziale: Interstizio corticale e midollare
- Cristalli: Tubuli prossimali, distali e dotti collettori
- Nefropatia ostruttiva: Tubuli prossimali, distali e tratto sottile ascendente

- Mineralizzazione: Dotti collettori midollari, giunzione cortico-midollare, tubuli prossimali e distali, pelvi renale
 - Mineralizzazione tubulare
 - Mineralizzazione intraluminare
 - Mineralizzazione interstiziale
- Metaplasia ossea: Interstizio
- Accumulazione di pigmenti: Tubuli prossimali, distali e dotti collettori
- Corpi d'Inclusione: Tubuli prossimali, distali e dotti collettori
- Granuli Basofili: Tubuli prossimali e distali
- Amiloidosi Interstiziale: Interstizio e tubuli
- Rigenerazione tubulare: Tubuli prossimali e distali
- Cariomegalia: Tubuli prossimali e distale
- Ipertrofia tubulare: Tubuli prossimali, distali e dotti collettori

3) Modifiche Glomerulari

- Glomerulonefriti: Glomeruli
- Glomerulopatia Ialina: Glomeruli
- Glomerulopatia Mesangioproliferativa: Glomeruli
- Glomerulosclerosi: Glomeruli
- Mesangiolisi: Glomeruli
- Amiloidosi glomerulare: Glomeruli
- Atrofia Glomerulare: Glomeruli
- Dilatazione dello spazio di Bowman: Glomeruli
- Metaplasia/Iperplasia della capsula di Bowman: Glomeruli
- Iperplasia mesangiale: Glomeruli

4) Infiammazione nel rene

- Infiltrato infiammatorio interstiziale: Interstizio della zona corticale e midollare
- Nefriti Interstiziali: Interstizio della zona corticale e midollare
- Microascesso: Zona corticale e midollare

- Edema Interstiziale: Zona corticale e midollare
- Pielonefrite: Zona midollare (interstizio e dotti collettori)
- Fibrosi Interstiziale: Zona corticale e midollare

5) Lesioni proliferative non neoplastiche

- Iperplasia Tubulare: Tubuli prossimali, distali e dotti collettori
 - Iperplasia Tubulare Semplice
 - Iperplasia Tubulare Atipica
- Iperplasia oncocitica

6) Lesioni varie

- Ematopoiesi Extramidollare: Interstizio adiacente alla pelvi
- Iperplasia Iuxtaglomerulare: Zona corticale

7) Lesione proliferative neoplastiche

- Adenoma: Rene
- Oncocitoma: Rene
- Carcinoma: Rene
- Nefroblastomatosi: Rene
- Nefroblastoma: Rene
- Tumore renale mesenchimale: Rene
- Sarcoma renale: Rene

Per quanto riguarda le basse vie urinarie possiamo distinguere le seguenti categorie di lesione:

1) Lesioni non proliferative delle basse vie urinarie

- Aplasia uretrale: Uretere
- Dilatazione della Pelvi: Pelvi renale
- Dilatazione: Uretere
- Infiltrato infiammatorio: Uretere, uretra, pelvi renale
- Erosione: Vescica, pelvi renale
- Ulcerazione: Vescica, pelvi renale

- Vacuolazione dell'urotelio: Vescica
- Inclusione dell'urotelio: Vescica
- Calcoli: Vescica, uretere, pelvi renale
- Cristalli: Vescica, uretere, pelvi renale
- Edema: Vescica
- Infiltrato infiammatorio: Vescica
- Necrosi: Vescica
- Emorragia: Vescica
- Angiectasi: Vescica
- Dilatazione: Vescica
- Mineralizzazione: Vescica
- Uropatia ostruttiva: Vescica
- Diverticolo: Vescica
- Ipertrofia dell'urotelio: Vescica
- Tappo proteico: Vescica, uretra
- Nematodiasi: Vescica
- Ostruzione: Uretra
- Infiltrato infiammatorio: Uretra

2) Lesioni Proliferative delle Basse vie urinarie

- Iperplasia dell'urotelio: Uretere, vescica, uretra, pelvi renale
- Metaplasia delle cellule squamose: Uretere, vescica, uretra, pelvi renale
- Metaplasia ghiandolare: Uretere, vescica, uretra
- Papilloma delle cellule transizionali: Uretere, vescica, uretra, pelvi renale
- Papilloma delle cellule squamose: Uretere, vescica, uretra
- Carcinoma delle cellule transizionali: Uretere, vescica, uretra, pelvi renale
- Carcinoma delle cellule squamose: Uretere, vescica, uretra

- Adenocarcinoma: Uretere, vescica, Uretra
- Lesioni proliferative mesenchimali: Vescica, uretra

1.1.3 – Dilatazione tubulare

E' un'alterazione che può riguardare i tubuli prossimali, distali e i dotti collettori (Figura 3). Ha i seguenti aspetti diagnostici:

- Tubuli con espansione del lume da leggera a moderata con un epitelio normale o minimamente più sottile
- Spesso associata a necrosi tubulare
- Può contenere nel lume cilindri, detriti cellulari o infiammazione suppurativa
- Distruzione radiale o zonale
- Può essere il risultato di un ostruzione del nefrone per cristalluria, cilindri proteici, detriti cellulari o per ostruzione delle basse vie urinarie

Diagnosi differenziale:

- Rene policistico o altre malattie congenite con cisti

La dilatazione tubulare di solito accompagna altre forme di danno renale come la necrosi o la degenerazione, ma può verificarsi anche in seguito alla somministrazione di agenti come amidi modificati, litio o ACE (Angiotensin-Converting Enzyme) inibitori (116) (117). L'infiammazione interstiziale e la fibrosi possono manifestarsi in maniera variabile in base alla natura dell'agente stesso. La patogenesi della dilatazione tubulare è stata collegata alla stasi tubulare, a cambiamenti eccessivi nell'emodinamica e alla perdita eccessiva di acqua ed elettroliti (118) (119).

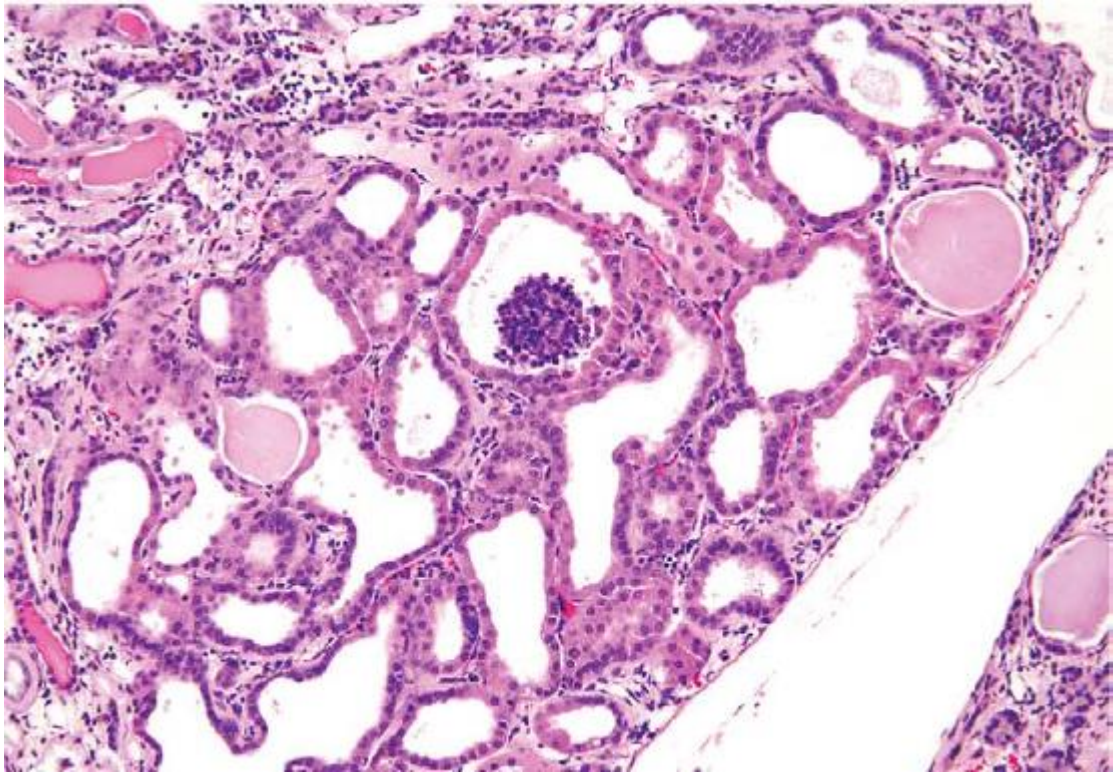


Figura 3 - Esempio di Dilatazione tubulare in rene di ratto. Estratto da: KS Frazier et al., *Toxicologic Pathology*, 2012.

1.1.4 – Cisti Tubulare

E' un'alterazione che può manifestarsi nella zona corticale e nella zona midollare. Si riconosce per i seguenti aspetti diagnostici (Figura 4):

- Tubuli con un lume marcatamente espanso
- Epitelio tubulare formato da un singolo strato di cellule assottigliate
- Contenuto del lume variabile
- Occasionalmente circondati da una capsula fibrosa
- Occasionalmente presente infiammazione peritubulare

Diagnosi differenziale:

- Vena arcuata dilatata
- Dilatazione tubulare

La cisti tubulare corrisponde ad una manifestazione più grave di dilatazione tubulare e si trova comunemente nel ratto e nel topo agli stadi finali di CPN (Chronic Progressive Nephropaties, Nefropatia Cronica Progressiva). Le cisti possono però rappresentare anche la manifestazione di malattie congenite come il rene policistico (120) (121).

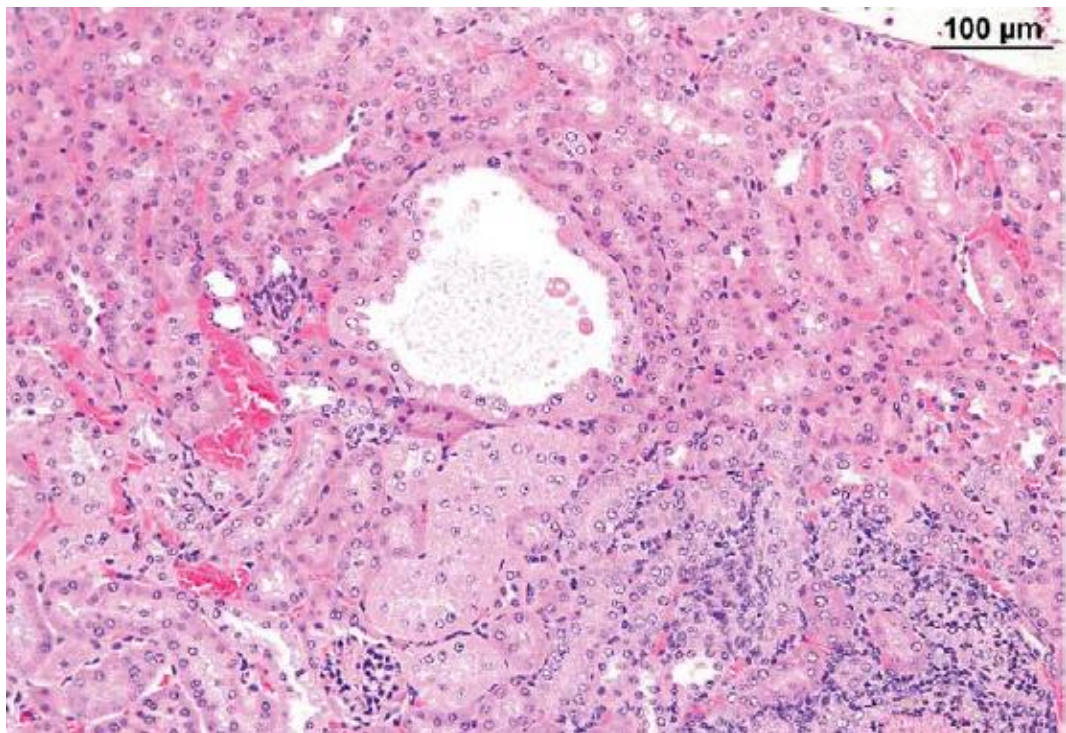


Figura 4 - Esempio di Cisti Tubulare. Estratto da: KS Frazier et al., Toxicologic Pathology, 2012.

1.1.5 – *Basofilia Tubulare*

E' un'alterazione che può interessare i tubuli prossimali, distali e i dotti collettori. Si riconosce per i seguenti aspetti diagnostici (Figura 5):

- Cellule epiteliali tubulari con citoplasma basofilo (più viola nella colorazione Ematossilina/Eosina)
- Possibilità di leggero ingrossamento
- Nucleo ingrandito

Diagnosi differenziale:

- Artefatti della colorazione
- Iperplasia tubulare semplice
- Rigenerazione tubulare
- CPN associata a basofilia tubulare

La basofilia tubulare è una delle manifestazioni più comuni del danno indotto al nefrone. Può seguire una condizione degenerativa o rappresentare un eccessivo turnover cellulare (122). La basofilia tubulare può presentarsi in caso di rigenerazione tubulare, ma può anche dipendere da atrofia o danno persistente da composti chimici a bassa tossicità.

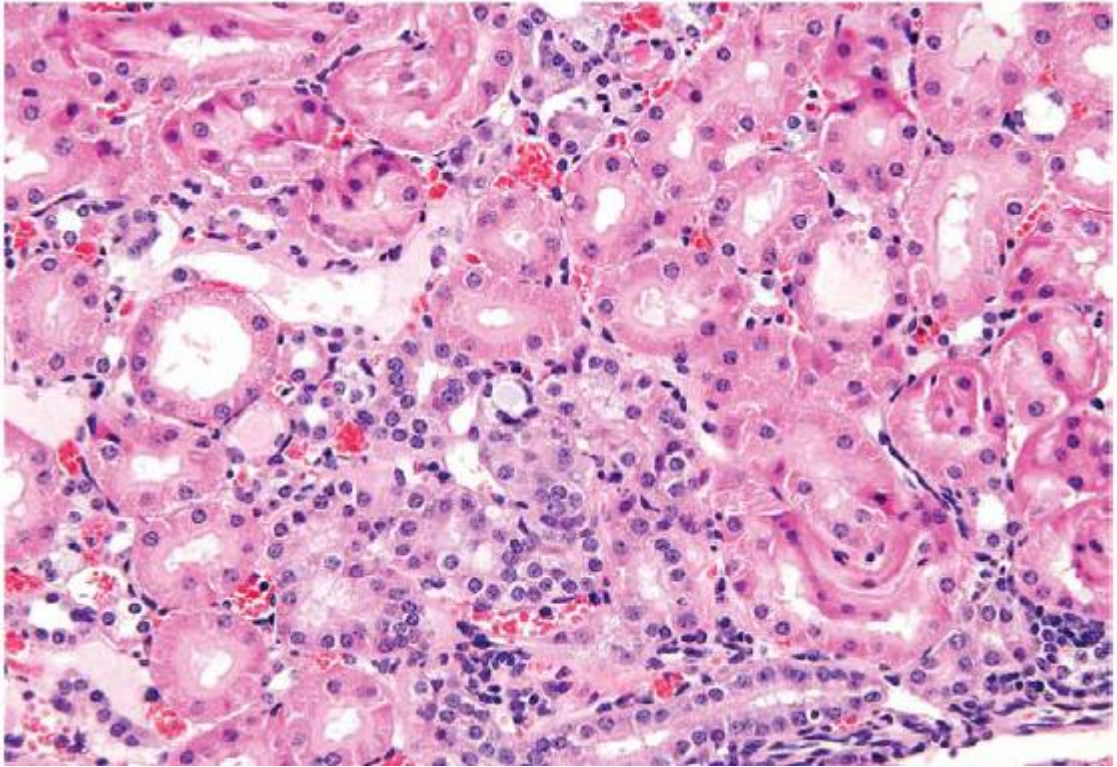


Figura 5 - Esempio di Basofilia Tubulare in rene di ratto. Estratto da: KS Frazier et al., *Toxicologic Pathology*, 2012.

1.1.6 – Dilatazione dello Spazio di Bowman

E' un'alterazione che interessa i glomeruli. Si riconosce per i seguenti aspetti diagnostici (Figura 6):

- Pronunciato aumento del diametro della capsula di Bowman senza aumento delle dimensioni del tuft glomerulare
- Associato comunemente con l'infarto del parenchima adiacente o con nefropatia cronica avanzata (123)
- Può avere una distribuzione focale, multifocale, segmentale o globale

Diagnosi differenziale:

- Glomerulopatia

La dilatazione dello spazio di Bowman può dipendere:

- da un aumento della pressione idrostatica all'interno della capsula di Bowman a causa di iperfiltrazione glomerulare
- da una riduzione del tuft glomerulare a causa dell'atrofia.

Può essere anche causata da reflusso intra tubulare del tratto ascendente.

Questa lesione rimane comunque indicativa di un'alterazione della pressione intraglomerulare e può condurre a degenerazione dell glomerulo e dei tubuli a valle.

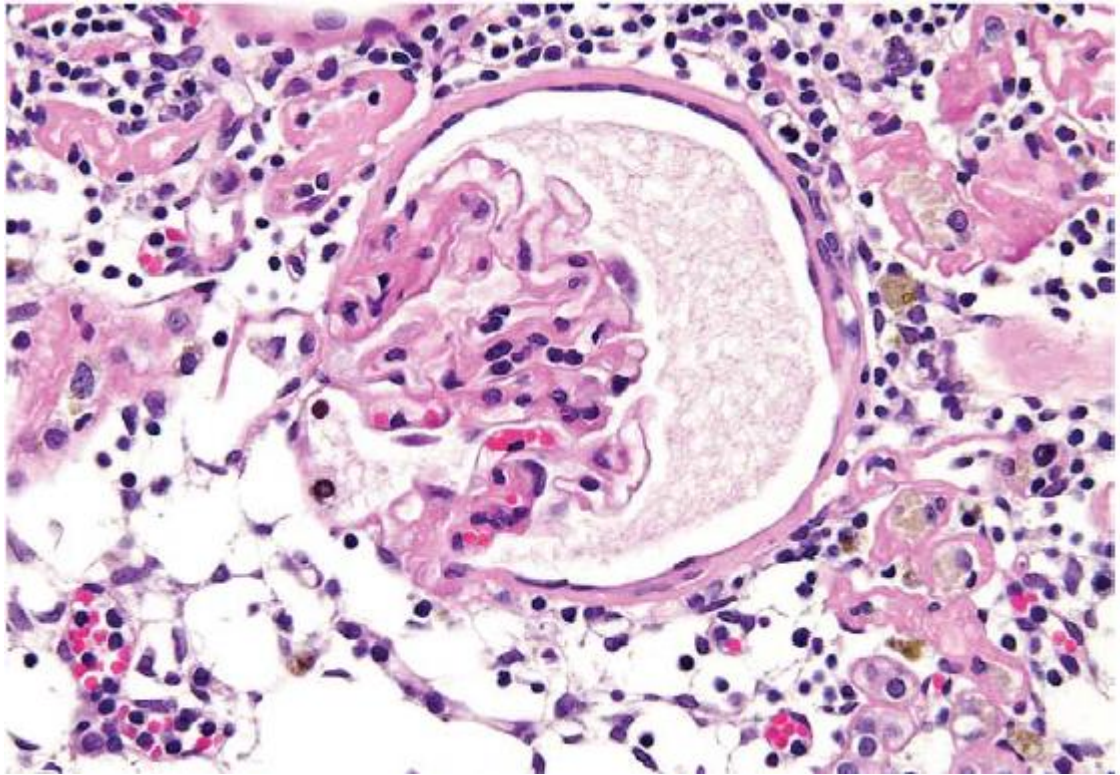


Figura 6 - Esempio di Dilatazione dello Spazio di Bowman in rene di ratto. Estratto da: KS Frazier et al., Toxicologic Pathology, 2012.

1.1.7 – *Metaplasia/Iperplasia della capsula di Bowman*

E' un'alterazione che può interessare i glomeruli. Si riconosce per i seguenti aspetti diagnostici (Figura 7):

- Sostituzione delle cellule parietali squamose della capsula di Bowman con spesso epitelio cuboidale
- Aumento del numero delle cellule parietali accompagnato da cambio della morfologia

Diagnosi differenziale:

- Artefatti derivanti dalla manipolazione del tessuto

Le cellule dell'epitelio parietale della capsula possono essere influenzate anche dagli ormoni nel topo maschio maturo con l'invecchiamento.

Nei ratti è stato dimostrato che le cellule dell'epitelio possono andare incontro a ipertrofia o iperplasia durante le patologie glomerulari come la glomerulosclerosi (124).

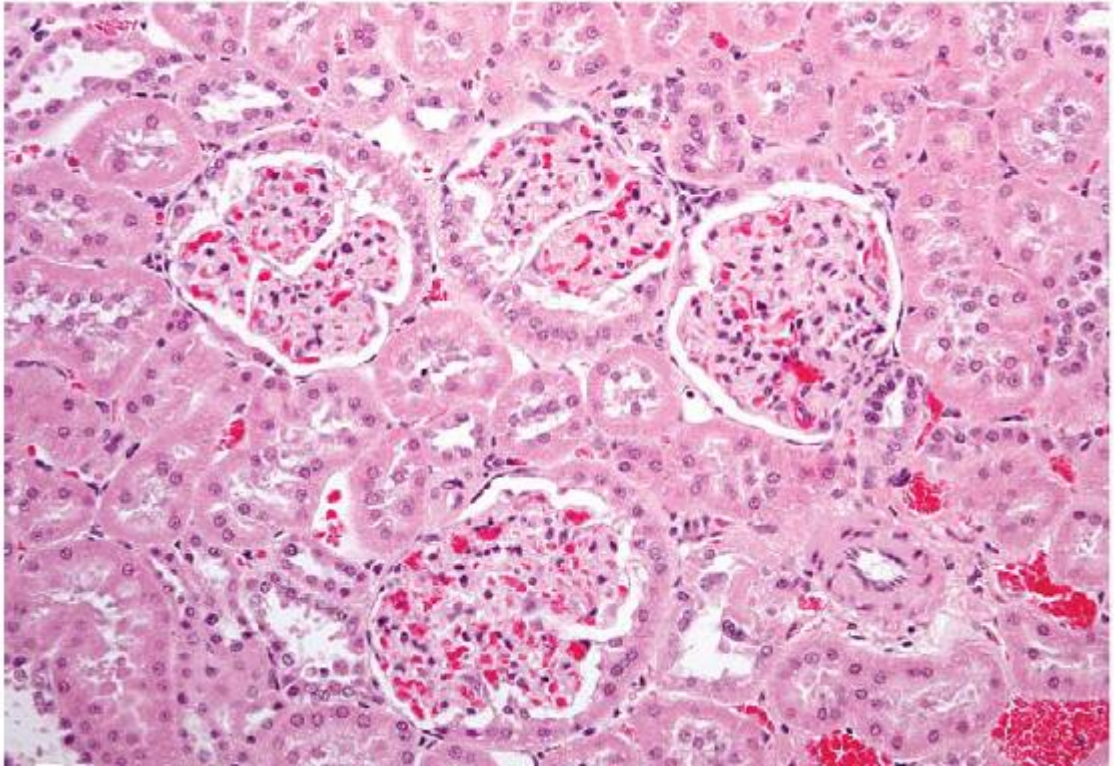


Figura 7 - Esempio di Metaplasia/Iperplasia della capsula di Bowman. Estratto da: KS Frazier et al., Toxicologic Pathology, 2012.

1.1.8 – *Infiltrato infiammatorio interstiziale*

E' un'alterazione che può interessare l'interstizio della zona corticale e midollare. Si riconosce per i seguenti aspetti diagnostici (Figura 8):

- Piccoli foci di cellule infiammatorie presenti nell'interstizio con cellule mononucleate (linfociti, plasma cellule e/o macrofagi) e/o neutrofili

E' una condizione molto comune in topi e ratti che va aumentando con l'età o condizioni patologiche come CPN o nefropatia cronica.

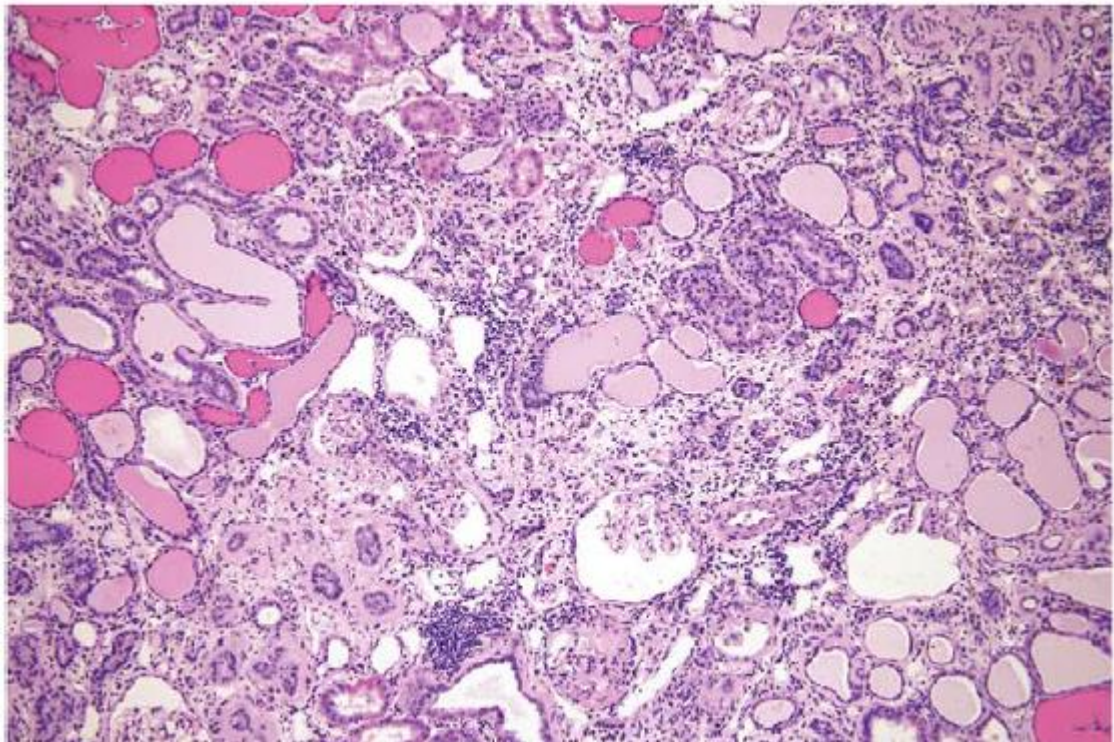


Figura 8 - Esempio di Infiltrato infiammatorio interstiziale in reni di ratto. Estratto da: KS Frazier et al., *Toxicologic Pathology*, 2012.

1.1.9 – *Fibrosi interstiziale*

E' un'alterazione che può interessare la zona corticale e midollare. Si riconosce per i seguenti aspetti diagnostici:

- Accumulo interstiziale di collagene fibroso con aumento delle cellule interstiziali, soprattutto miofibroblasti
- Accumulo di matrice extracellulare attorno ai tubuli degenerati
- Localizzata o diffusa in base al grado di danno tubulare
- Cicatrici fibrotiche terminali con depressione della superficie renale

Diagnosi differenziale:

- Nefrite interstiziale
- Infiltrato infiammatorio interstiziale

E' una risposta del tessuto adiacente al danneggiamento tubulare. Normalmente l'interstizio corticale è composto da una rete di fibroblasti e cellule dendritiche con un piccolo numero di linfociti o macrofagi (125). Nella fibrosi interstiziale cronica, la cellula interstiziale ha caratteristiche di miofibroblasto, questi si pensa derivi dalla proliferazione e dalla differenziazione dei fibroblasti residui (126). Il tempo di manifestazione e la localizzazione delle cellule indica che questa è una reazione interstiziale stimolata dai cambiamenti del tubulo adiacente (127) (128). Le cellule trasformate secernono una grande quantità di metalloproteasi-2 che degrada in modo specifico la membrana basale. Il TGF- β porta le cellule alla produzione di α -actina del muscolo liscio e inizia la riorganizzazione dei filamenti all'interno della matrice interstiziale. I miofibroblasti e la reazione fibrotica sono parte di un processo ripartivo, bloccare queste reazioni può accrescere la disfunzione renale.

1.1.10 – *Iperplasia Tubulare Semplice*

E' un'alterazione proliferativa non neoplastica che può interessare i tubuli prossimali, distali e i dotti collettori. Si riconosce per i seguenti aspetti diagnostici (Figura 9):

- Aumento del numero di cellule dell'epitelio tubulare su singolo strato, non intraluminale
- Citoplasma basofilo
- Dimensione variabile in funzione della dilatazione del lume e all'aumento del numero di cellule

Diagnosi differenziale:

- Iperplasia tubulare atipica
- Basofilia tubulare

L'Iperplasia tubulare semplice può essere spontanea come nella CPN o indotta chimicamente come conseguenza degenerativa della singola cellula seguita da rigenerazione.

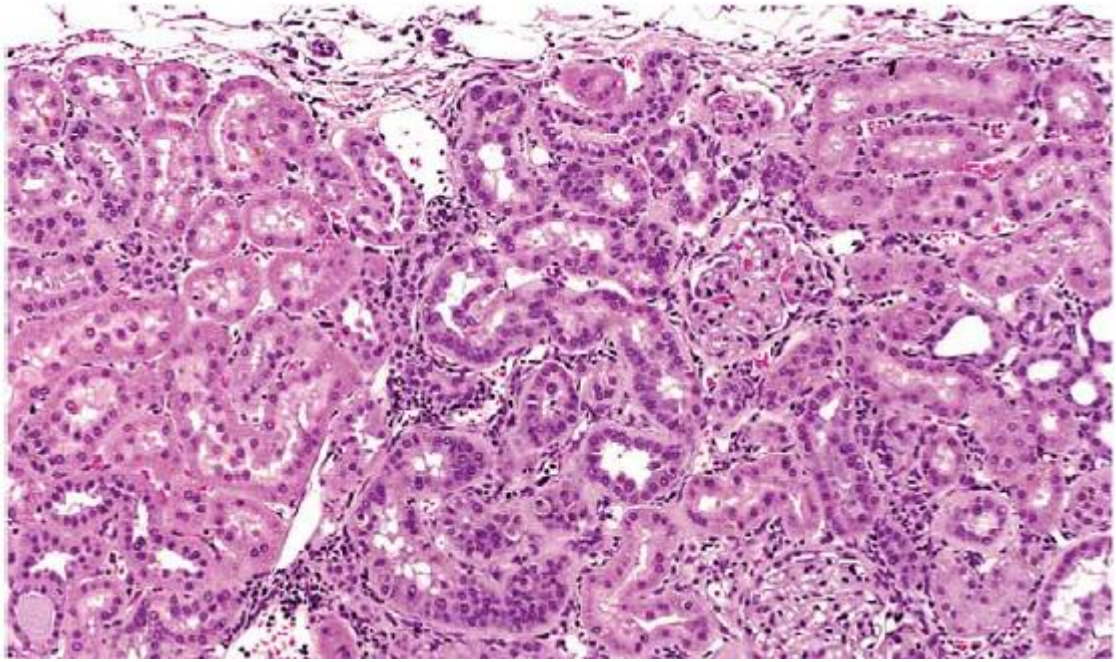


Figura 9 - Esempio di Iperplasia Tubulare Semplice. Estratto da: KS Frazier et al., Toxicologic Pathology, 2012.

1.1.11 – *Iperplasia Tubulare Atipica*

E' un'alterazione proliferativa non neoplastica che può interessare i tubuli prossimali, distali e i dotti collettori. Si riconosce per i seguenti aspetti diagnostici (Figura 10):

- Proliferazione cellulare complessa confinata ad un singolo tubulo
- Più di uno strato cellulare formante la parete tubulare, con proiezione di tipo papillare, o a strati di cellule sottili quando il tubulo è dilatato o cistico
- Il lume tubulare può essere parzialmente o completamente obliterato
- Le dimensioni del tubulo possono risultare aumentate in seguito alla dilatazione o alla eccessiva crescita cellulare
- Le cellule hanno tipicamente un citoplasma sviluppato con bordi cellulari ben definiti, normalmente basofilo ma occasionalmente eosinofilo o chiaro, con prominenti nucleoli
- Pleomorfismo nucleare e cellulare con marcata variabilità nelle dimensioni
- E' mantenuta l'integrità della singola struttura tubulare
- Non è presente vascolatura

Diagnosi differenziale:

- Rigenerazione tubulare
- Ipertrofia tubulare
- Adenoma

L'iperplasia tubulare atipica è solitamente catalogata come lesione pre-neoplastica e in continuum con l'adenoma (129) (130) (131) (132). La fibrosi periferica o i capillari intorno alla lesione iperplastica possono risultare degli utili marker di crescita espansiva.

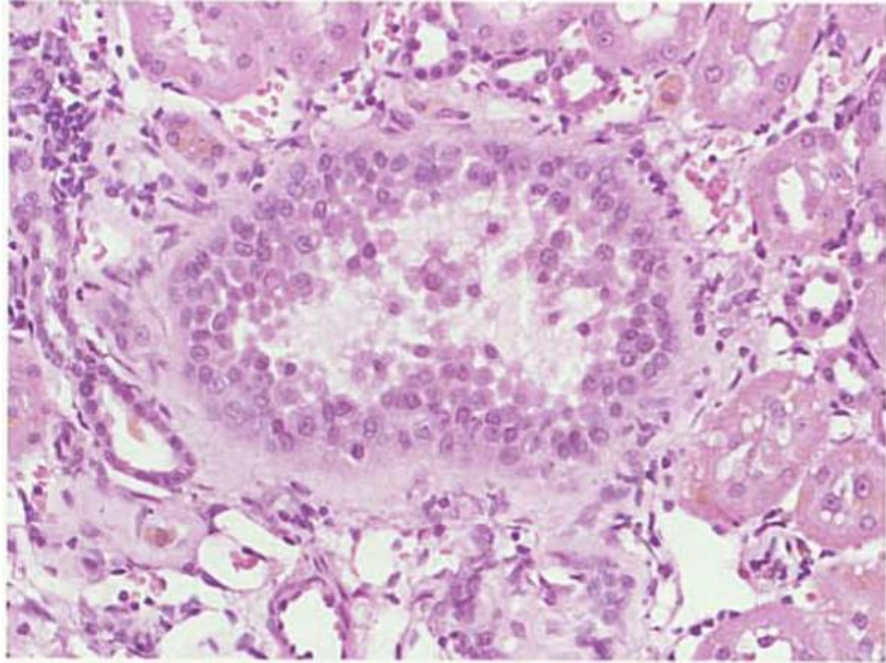


Figura 10 - Esempio di Iperplasia Tubulare Atipica. Estratto e modificato da: GC Hard et al., Guides for Toxicologic Pathology, 1995.

1.1.12 – Adenoma

E' un'alterazione proliferativa neoplastica che può interessare tutto il rene. Si riconosce per i seguenti aspetti diagnostici (Figura 11):

- E' solitario, circoscritto o irregolare, a crescita nodulare. Più frequentemente localizzato nelle zone più esterne del rene (zona corticale, zona esterna della midollare esterna (133)).
- Demarcato dalla compressione del parenchima circostante
- Le cellule sono ben differenziate
- Può essere presente pleomorfismo nucleare
- Le cellule sono nella maggior parte dei casi basofile alla colorazione, ma più raramente anche eosinofile, anfifiliche, oncocitiche, a cellule chiare, cromofobe o una forma mista delle precedenti
- Formano strutture solitamente più grandi di 5-6 strutture tubulari adiacenti normali e si estendono oltre i confini dell'originale struttura tubulare
- L'architettura può essere solida, tubulare, cistica, lobulare, papillare, cisto-papillare o mista
- Possono essere presenti mini-lumi
- Può essere presente un inizio di neo-vascolarizzazione
- Non si rileva la presenza di aree necrotiche o emorragiche

Diagnosi differenziale:

- Iperplasia tubulare atipica
- Carcinoma
- Rigenerazione tubulare in CPN
- Oncocitoma

Gli adenomi a cellula basofile originano principalmente dai tubuli prossimali, mentre alcuni adenomi a cellule chiare e acidofili sono stati visti originarsi dai

dotti collettori in ratto. E' stato dimostrato, sempre in ratto, che anche gli adenomi oncocitici originino dai tubuli collettori (134) (135).

L'adenoma e il carcinoma mostrano una progressione di tipo neoplastico dall'Iperplasia tubulare atipica (136). Gli adenomi basofili ad architettura lobulare sono di gran lunga i più comuni in topo e ratto. Nel topo l'architettura è spesso papillare o cisto-papillare (137) (138) (139).

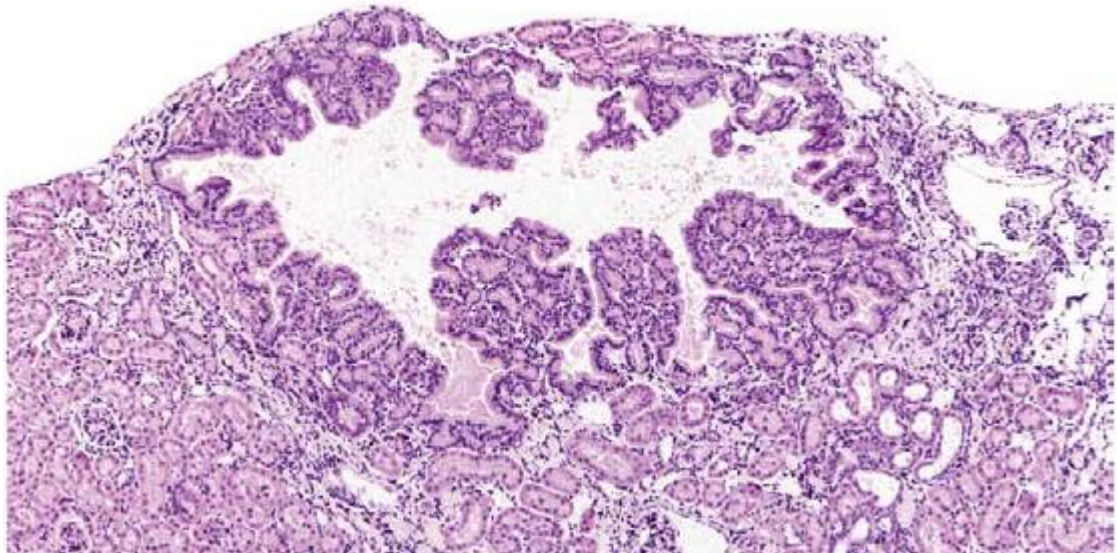


Figura 11 - Esempio di Adenoma. Estratto da: KS Frazier et al., Toxicologic Pathology, 2012.

1.1.13 – *Carcinoma*

E' un'alterazione proliferativa neoplastica che può interessare tutto il rene. Si riconosce per i seguenti aspetti diagnostici (Figura 12):

- Può essere circoscritto o irregolare, rigonfio, a crescita nodulare
- La crescita è espansiva con eccezione delle varianti anaplastiche che possono essere espansive e infiltrative (140) (141) (131) (132).
- Evidenza di pleomorfismo cellulare e alle volte nucleare
- Presenza di aree necrotiche o emorragiche con vascolarizzazione ben sviluppata
- Diffusa e elevata attività mitotica
- Nel topo la colorazione dei tessuti è normalmente basofila, ma anche eosinofila, chiara o mista (142).
- L'architettura del tessuto può essere solida, papillare, anaplastica o mista (133) (137) (143).
- Le varianti anaplastiche risultano più comuni nel topo che nel ratto

Diagnosi differenziale:

- Adenoma
- Nefroblastoma
- Metastasi secondaria ad un tumore epiteliale.

Si presume che i carcinomi originino principalmente dalle cellule dei tubuli prossimali (144), l'origine derivante dai tessuti del nefrone distale è comunque possibile, soprattutto per i tumori a cellule chiare (133).

Vi è una progressione proliferativa di tipo neoplastico dall'iperplasia tubulare atipica verso l'adenoma e il carcinoma.

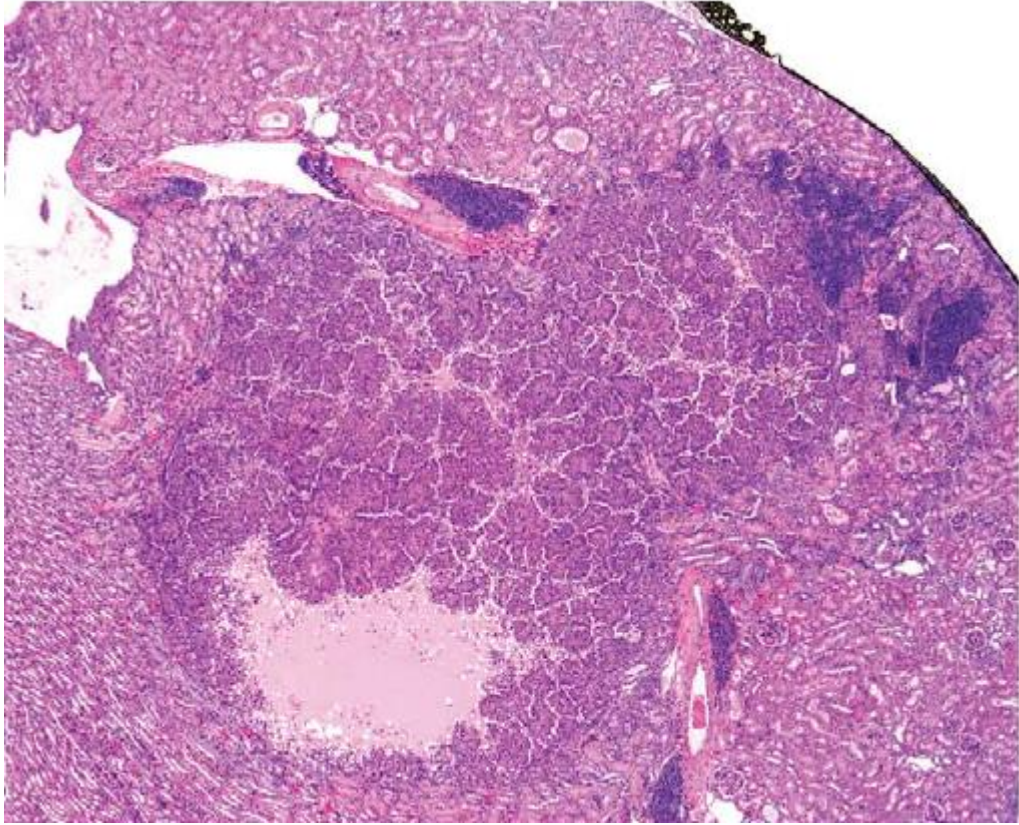


Figura 12 - Esempio di Carcinoma. Estratto da: KS Frazier et al., Toxicologic Pathology, 2012.

1.2 – Stimoli pro-tumorali, può Notch1 essere un trigger?

1.2.1 – La via di segnalazione di Notch

La via di segnalazione di Notch è un meccanismo di comunicazione cellula-cellula evolutivamente conservato. Regola molti processi cellulari come: proliferazione, mantenimento della staminalità e della nicchia staminale, specializzazione cellulare, differenziazione e morte cellulare sia durante lo sviluppo che durante il mantenimento del tessuto adulto (145). E' presente in tutti i metazoi e opera come una delle più importanti vie per la determinazione dell'identità cellulare durante l'embrigenesi (146) (147). Esistono quattro recettori nei mammiferi Notch 1-4 e cinque differenti ligandi Delta-like 1, 3, 4 (DLL1,3,4), Jagged1 e 2 (Jag1, 2) (148) (Figura 13). Sia i recettori che i ligandi sono proteine recettoriali transmembrana di tipo 1, ovvero a passaggio singolo con l'N-terminale sul versante extracellulare (148) (145).

Notch è prodotto nel reticolo endoplasmatico come precursore del peso di 300 kDa; la proteina viene clivata nel trans-Golgi e modificata nella porzione intra ed extra cellulare. La porzione extra-cellulare è soggetta a numerose N- e O- glicosilazioni durante sintesi e secrezione (149), ad opera della famiglia di glicosiltransferasi che catalizza fucosilazione tramite l'aggiunta di N-acetilglucosammina su specifiche ripetizioni EGF-simili. Questa modificazione altera la responsività del recettore ai differenti ligandi (149) (150).

Nei vertebrati Notch è costitutivamente clivato nel Golgi e riassembleto sulla superficie come recettore eterodimerico. Notch viene attivato dal legame col ligando, questo innesca una serie di tagli proteolitici dalle metalloproteasi della famiglia ADAM in corrispondenza del sito S2 e dal

complesso della γ -secretasi (Presenilina, Nicastrina, Aph1 e Pen2) in corrispondenza del sito S3 (151) (152).

Il clivaggio in S3 induce l'endocitosi della porzione extracellulare di Notch insieme al ligando da parte della cellula segnalante, ed il conseguente rilascio del dominio intracellulare NICD (Notch Intracellular Domain) e la traslocazione nel nucleo della cellula ricevente (153).

L'NICD nel nucleo scalza il co-repressore associato a Rbpj (detta anche CSL o CBF1, e associandosi nel complesso NICD, Rbpj e Mastermind (Mam1) portando all'attivazione dei geni bersaglio di Notch (154).

La risposta alla segnalazione di Notch varia molto tra i differenti tipi cellulari, lo stesso segnale può infatti promuovere la proliferazione in alcune cellule e indurre apoptosi in altre (146) (155) (156) (157). Questa plasticità d'effetti può essere in parte ricollegabile ad un cross-talk con altre vie di segnalazione. La differente risposta può essere ricollegata anche alle diverse isoforme del recettore, che nonostante la grande omologia possono avere effetti marcatamente diversi (158) (159) (160).

I geni target meglio caratterizzati sono gli bHLH (basic helix-loop-helix) appartenenti alla famiglia Hes e Hey che operano come fattori di trascrizione (161) (162).

Il segnale viene spento tramite la degradazione ubiquitina-mediata dell'NICD, facilitata da Maml e dalla Kinasi-8 Ciclina dipendente che fosforila la proteina nel dominio PEST (Proline, Glutamic Acid, Serine e Threonine rich domain) diventando bersaglio del proteasoma (163).

Questa corrisponde alla via canonica di segnalazione di Notch.

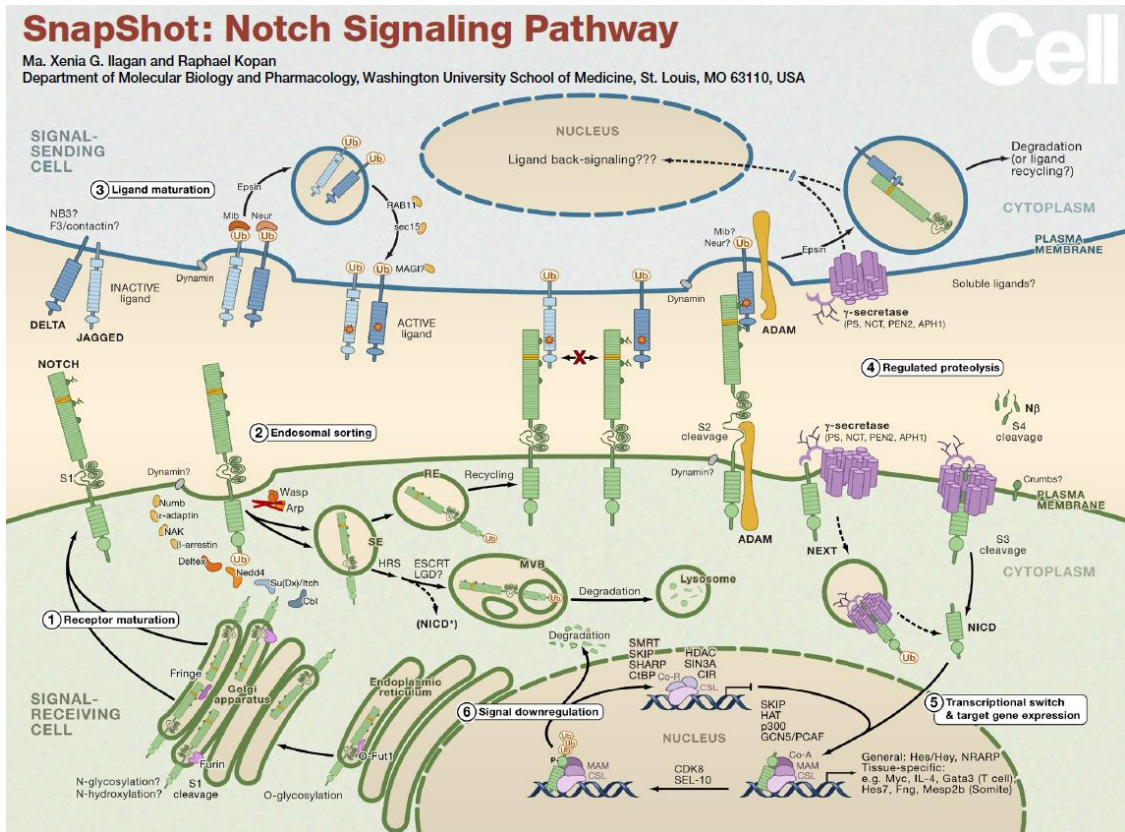


Figura 13 - Via di segnalazione di Notch. Estratto e modificato da: Ilagan MX, Kopan R, Cell, 2007.

1.2.2 – Il ruolo di Notch nell'embriogenesi renale

L'epitelio renale è un epitelio secondario formato dall'interazione inducente reciproca tra due differenti precursori tissutali mesenchimali: la Gemma Ureterica o UB (Ureteric Bud) che origina il sistema dei dotti collettori ed il Mesenchima Metanefrico o MM (Metanephric Mesenchyme) che origina le altre cellule epiteliali renali (dai podociti all'epitelio dei tubuli distali) (164) (165) (166).

Il mesenchima secerne un fattore neurotrofico che attrae la gemma verso il mesenchima stesso. La gemma a sua volta secerne Wnt9b che ha un effetto induttivo sul mesenchima, che risponde con la produzione di Wnt4 (167) (168) (169) (170) (171) (172).

Wnt4 e Fgf8 (Fibroblast Grow Factor 8) sono conosciuti per avere un ruolo centrale nella transizione mesenchima-epitelio o MET (mesenchimal-to-epithelial) (173).

Il mesenchima metanefrico va incontro a condensazione seguita da frammentazione a formare il "corpuscolo a forma di virgola" o "corpuscolo a forma di S". Il segmento prossimale del corpuscolo differenzierà verso cellule podocitarie, la sezione mediana originerà il tubulo prossimale e l'ansa di Henle, la sezione distale differenzierà nei tubuli distali (174).

La via di segnalazione di Notch è fortemente attiva durante lo sviluppo renale ma l'esatta localizzazione dei recettori e dei ligandi è ancora in dibattito.

I recettori Notch 1 e 2 sono espressi negli aggregati pretubulari come durante lo sviluppo delle cellule epiteliali tubulari e glomerulari. I ligandi Delta 1 e Jagged 1 sono ugualmente espressi negli aggregati pretubulari (175) (176) (177).

Non è chiaro se Notch1 sia espresso nei tessuti dei futuri tubuli prossimali, mentre Notch 2 è espresso con una debole co-localizzazione nei progenitori

podocitari. Più avanti nella maturazione, Jagged 1 sembra essere espresso nelle cellule epiteliali del glomerulo e dei dotti collettori. Le cellule endoteliali esprimono sia Jagged 1 che DLL4 (178) (179) (180) (181).

Studi funzionali hanno mostrato un ruolo chiave per Notch nella nefrogenesi: il metanefro murino coltivato in presenza di inibitori della γ -secretasi, bloccando l'attivazione e la traslocazione nel nucleo di NICD, provoca una prepotente deficienza nell'apparato dei tubuli prossimali e dei glomeruli (182). Wang et al. mostrano topi con delezione genica per alcune subunità del complesso della γ -secretasi (Presinilina 1 e 2), caratterizzati da pesanti difetti durante la nefrogenesi e virtualmente nessuno sviluppo del corpuscolo a forma di S e di glomeruli maturi (183). Topi con allele ipomorfico per Notch2 o topi con delezione target di Notch2 dal mesenchima metanefrico mostrano un fenotipo simile (184).

Studi recenti indicano come Notch sia coinvolto nella formazione dell'epitelio del tubulo prossimale e nello stabilire la composizione dei dotti collettori determinando la percentuale di cellule principali e intercalari (185) (186) (187) (188).

1.2.3 – Oltre l'embriogenesi. Notch: danno acuto e rigenerazione

Comparando il rene maturo con l'embriogenesi, l'espressione di Notch risulta fortemente diminuita.

Il danno forza l'organo adulto alla rigenerazione e alla riparazione attivando molte vie di segnalazione cellulari (189), il rene è dotato di elevatissime capacità di riparazione in seguito a vari differenti tipi di danno renale acuto o AKI (Acute Kidney Injury).

Il danno renale acuto viene normalmente classificato in base alla sede del danno e si differenzia in:

- AKI pre-renale, causato da patologie che determinano un'insufficiente perfusione del parenchima renale (55% dei casi di AKI). E' la forma più frequente di danno renale acuto, ed è la conseguenza di una riduzione del flusso ematico renale che porta ad una ipoperfusione. È una forma reversibile se tempestivamente trattata, in quanto non determina danno al parenchima renale.
- AKI intrinseco, causato da un'alterazione della normale struttura anatomo-funzionale del parenchima (circa il 40% dei casi). E' determinato da un danno diretto al parenchima renale che può coinvolgere tutte le strutture presenti nel nefrone. La regione del rene maggiormente colpita nella condizione ischemica, sia nell'uomo che nel modello murino, è rappresentata dalla midollare esterna.
- AKI post-renale, determinato da un'ostruzione delle vie urinarie (circa il 5% dei casi). L' ostruzione delle vie renali che può accumularsi a qualsiasi livello delle vie escrettrici: pelvi renale, ureteri, vescica ed uretra.

Sperimentalmente l'AKI può essere indotto nel modello animale tramite ischemia/riperfusione o iniezione di composti con un effetto tossico diretto sull'epitelio tubulare.

Nella risposta al danno, Notch viene riattivato e può aiutare nei processi di differenziamento cellulare, proliferazione e riparazione (190). Negli studi di Kobayashi et al. viene mostrata un' aumentata espressione di Delta1, Notch2 e il loro bersaglio a valle Hes1 in un modello in ratto di danno da ischemia/riperfusionazione (191).

In controtendenza gli studi di Bielez mostrano che un' attivazione di Jagged1/Notch1/HeyL nella precipitazione dell'acido folico induce AKI (192).

Riassumendo l'attivazione di Notch è visibile in vari modelli di AKI ma il suo contributo nello sviluppo del danno o nella riparazione non è ancora chiaro.

1.2.4 – Il danno renale cronico: Notch e fibrosi

Le malattie renali croniche o CKD (*Chronic Kidney Disease*) sono definite come anomalie della struttura o della funzionalità renale che persistono per più di tre mesi con effetti sulla condizione di salute del paziente (193) (194).

Per anomalie si intende: diminuzione del Tasso di Filtrazione Glomerulare (<60mL/min/1.73m²) o GFR (Glomerular Filtration Rate), evidenze di uno o più segnali di danno renale (albuminuria, anormale sedimento urinario, anomalie nei livelli degli elettroliti, alterazioni del tessuto rilevate tramite istologia o imaging, storia di trapianto renale) (193).

Le CKD sono un problema in crescita che riguarda la salute pubblica mondiale, sono una delle principali cause di mortalità e morbilità nei paesi occidentali e si stima che in U.S.A. affliggano il 13% della popolazione, rendendole più comuni del diabete (195) (194) (196).

Nei pazienti con patologie cardiovascolari la presenza di CKD aumenta il tasso di mortalità di 8-10 volte rispetto ai pazienti non affetti da CKD. Queste patologie sono poi un fattore di rischio importante nei pazienti con diabete e ipertensione (197).

Recenti stime sui dati derivanti dal sistema di classificazione KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) che valuta i livelli di funzionalità renale e dell'escrezione urinaria dell'albumina, mostrano che la prevalenza di CKD tra pazienti con diabete è del 43,5 %, mentre nelle condizioni di bassa diminuzione della funzione renale o condizioni peggiori [eGFR (estimated GFR) <60 mL/min/1,73 m²] è del 22% (198). La nefropatia diabetica risulta essere la più alta predittrice di mortalità nei pazienti diabetici (199) (200).

Nei paesi sviluppati, come U.S.A., la nefropatia diabetica è la principale causa di Malattia Renale Terminale o ESRD (199).

Il grado di severità viene classificato in 5 stadi (201): si va da uno stadio 1 in cui si riscontra una GFR nella norma $>90 \text{ mL/min/1.73 m}^2$, ma con evidenza di danno renale (per lo più definito da albuminuria persistente); ad uno stadio 5, in cui la GFR è inferiore a $15 \text{ mL/min/1.73 m}^2$, e si parla ormai di ESRD (202).

Indipendentemente dal tipo d'insulto iniziale, la maggior parte delle malattie renali croniche evolve verso il quadro comune di ESRD, caratterizzato istologicamente dalla presenza di un'abbondante componente infiammatoria e fibrotica interstiziale e da atrofia tubulare (203).

Il declino della funzione renale è proporzionalmente legato allo sviluppo di tali alterazioni a livello dell'interstizio tubulare (204): tutte le forme di malattia renale cronica sono difatti caratterizzate da un danno tubulo-interstiziale, anche qualora la malattia primaria sia una glomerulopatia (205) (206).

Studi di array genico fatti su campioni umani di tessuto patologico e sano hanno confermato l'attivazione della via di segnalazione di Notch durante CKD (207). Tramite ibridizzazione in-situ Walsh et al. hanno dimostrato un aumento d'espressione di Jagged1 e Hes1, e la loro co-espressione nei tubuli da campioni prelevati da pazienti con nefropatia diabetica (208).

Murea et al. hanno mostrato un aumentato livello dell'espressione delle proteine della via di Notch, non solo nei casi di nefropatia diabetica, ma anche nelle altre CKD associate a fibrosi renale (207).

Nel tubulo interstiziale la gravità della fibrosi correla con i livelli d'espressione di Notch1 clivato. I recenti studi di Bielez et al. riportano che il trattamento con inibitori della γ -secretasi riduce in modo significativo la fibrosi in due differenti modelli murini di danno (danno da iniezione di Acido Folico e Ostruzione uretrale unilaterale). La delezione genetica

specifica degli effettori della via di segnalazione di Notch (Rbpj) porta ad una riduzione dell'espressione dei marker di fibrosi come il collagene 1a1, l'actina del muscolo liscio e la vimentina (192).

Espressione condizionale dell'NICD in cellule epiteliali tubulari in topo conduce rapidamente allo sviluppo di fibrosi tubulo-interstiziale. Significativo è sapere che l'espressione di Notch in colture di cellule epiteliali umane e di ratto è un forte induttore di Transizione Epitelio-Mesenchima o EMT (epithelial-to-mesenchymal transition) (209), anche se questo dato non è confermato in vivo, fa supporre che l'EMT e l'induzione verso un fenotipo fibrotico siano effetti di Notch scollegati tra loro.

E' ormai dimostrato dalle fonti in letteratura che vi sia un'incidenza più alta di 4-5 volte di sviluppo di Carcinoma renale nei pazienti in ESRD, sia nei pazienti trapiantati che in terapia dialitica (210) (211) (212).

Sono sempre più numerose le fonti che suggeriscono una correlazione tra sviluppo tumorale e condizioni di CKD non particolarmente severe <40mL/min/1,73 m² (213) (214) (215).

Essendo quindi Notch attivato durante lo sviluppo di CKD e muovendosi la letteratura nella direzione di una sempre più forte correlazione tra CKD e sviluppo tumorale, è legittimo pensare che almeno uno degli attori che porta a questa situazione sia Notch, e che la sua azione reiterata nel tempo porti ad un alterazione della funzione e della struttura renale fino ad uno stato di neoplasia.

1.2.5 – Notch e RCC

Notch è coinvolto nello sviluppo di più tessuti diversi in praticamente tutte le specie, in cui manifesta i già detti molteplici effetti (147) (216) (217) (218).

Possiamo schematizzare più chiaramente l'effetto di Notch nelle seguenti categorie:

- Segnale Inducente = Promuove lo sviluppo di un preciso tipo cellulare verso uno specifico lineage tramite l'espressione di molecole regolatorie. Un esempio lo si ha durante lo sviluppo delle ali in *Drosophila*: la perdita del segnale di Notch risulta in un mancato sviluppo dei tessuti delle ali, mentre un segnale ectopico porta alla formazione di tessuti extra (219).

- Segnale Inibitorio = le cellule che condividono lo stesso destino cellulare mandano e ricevono contemporaneamente il segnale di Notch, ciò si traduce in un segnale inibitorio "mutuale". Quando è invece necessario che una sola cellula cominci a specializzarsi, lei inibirà solo le cellule intorno, questo risulta in un segnale inibitorio "laterale". Un esempio avviene sempre in *Drosophila* durante la neurogenesi dove Notch inibisce la neurogenesi. Un'espressione di Notch eccessiva impedisce la differenziazione neuronale, mentre un blocco di Notch porta ad un fenotipo eccessivamente neurogenico (220) (221).

La presenza di Notch è spesso correlata allo sviluppo tumorale, anche se il suo ruolo non è sempre chiaro e può variare in funzione del tumore stesso (222) (223)

In uno studio che esamina il pattern di espressione della proteina Notch 1, 2 3 o 4 in campioni di RCC utilizzando la tecnologia del microarray tissutale, gli autori hanno osservato che nel CCR cromofobo si riscontra un'espressione aumentata di Notch1 (178), e che Notch1 potrebbe risultare utile in futuro, come biomarker per la diagnosi differenziale di diversi sottotipi istologici RCC.

Notch1 è un forte induttore di proliferazione nelle cellule epiteliali tubulari (192). In un modello murino transgenico in cui Notch1 è overespresso nel rene, l'analisi istologica mostra grave degenerazione del tessuto, dilatazione tubulare, e fibrosi interstiziale. Analisi di Affimetrix Expression Array su campioni di tessuti renali mostra un'alterazione delle vie di segnalazione per: proliferazione, divisione e ciclo cellulare.

In un modello di danno tubulare da iniezione di acido folico, nelle cellule progenitrici renali (identificate da Kang HM *et al.*) l'overespressione di Notch1 aumenta la proliferazione e porta ad un miglioramento della struttura renale come osservato in istologia (224).

Il gruppo Axelson ha mostrato che in linee cellulari di carcinoma a cellule renali a cellule chiare (CCRCC) umane la cascata segnalatoria di Notch è costitutivamente attiva (225). Il blocco della via di segnalazione di Notch porta ad una ridotta proliferazione e ad una restrizione ancoraggio-dipendente per le cellule di CCRCC. Il trattamento di topi nudi allotrapiantati con cellule di CCRCC con un inibitore della segnalazione di Notch inibisce la crescita del tumore.

Inoltre, Notch-1 e il suo ligando Jagged-1, sono espressi a livelli significativamente più elevati in campioni di CCRCC umani rispetto al tessuto renale normale circostante; la crescita delle cellule CCRCC primarie è stata soppressa dopo inibizione del segnale di Notch. Questi risultati indicano che la cascata segnalatoria di Notch può rappresentare un nuovo ed accessibile percorso terapeutico nel trattamento del CCRCC.

Dati *in vitro* del gruppo di Hu J confermano questi risultati, mostrando che l'inibizione della via segnalatoria di Notch tramite il blocco di KRT6 porta alla morte delle cellule di carcinoma a cellule renali in coltura (226).

D'altra parte, analisi su carcinoma a cellule renali papillare mostrano invece una riduzione del segnale di Notch (227). L'analisi dell'espressione genica

indica che almeno un bersaglio di Notch (Hey1) risulta ridotta, mentre è stato osservato un aumento dell'espressione e la localizzazione nucleare di KyoT3/FHL1B. Questa è una variante di splicing nota per agire come inibitore della via di segnalazione canonica di Notch. Pertanto queste osservazioni potrebbero essere coerenti con l'idea che la via di segnalazione canonica di Notch sopprima lo sviluppo del carcinoma a cellule renali papillare. Coerentemente, i topi in cui è stato deletato il segnale di Notch (Notch1, 2, o RBP) durante lo sviluppo presentano formazioni di tipo microadenomatose papillari.

Anche in altri tessuti di carcinomi renali umani è stata rilevata una significativa diminuzione dei livelli d'espressione o assenza di Notch1 e 4 comparati al tessuto adiacente non tumorale (228).

La via di segnalazione canonica di Notch potrebbe apparire semplice, in realtà le conseguenze dell'attivazione alterata di Notch sul destino cellulare sono complesse, dipendenti dal contesto e dall'intensità del segnale.

1.3 – Modelli murini: strumenti per lo studio dell'evoluzione tumorale

1.3.1 - I nuovi modelli murini: Lineage Tracing e Attivazione condizionale

Nell'ultimo decennio sono stati sviluppati decine di nuovi modelli animali transgenici per permettere un più fine studio delle gerarchie e delle dinamiche cellulari, in condizioni fisiologiche e patologiche. Questi nuovi strumenti di studio *in vivo* permettono di capire quale sia l'effetto della delezione o dell'attivazione di un dato gene, in uno specifico tipo cellulare, e di correlarlo ad uno preciso fenotipo. Forniscono la possibilità di selezionare e studiare fasi specifiche dello sviluppo o dei processi di danno e riparazione del tessuto (229) (230) (231; 232).

Questi modelli animali definiti di *lineage tracing*, permettono non solo di tracciare il movimento, la morte e la sostituzione di una singola cellula all'interno di una popolazione, ma anche studiare come differenti *pool* cellulari si interfacciano ed interagiscono tra loro in varie condizioni sperimentali (230).

Tramite l'introduzione nel genoma animale di transgeni *reporter* codificanti, generalmente, per proteine fluorescenti è possibile marcare ed individuare le singole cellule. Le proteine fluorescenti garantiscono una sensibilità ed una specificità di vari ordini di grandezza superiore rispetto alle tecniche precedenti come quelle che utilizzavano la proteina β -galattosidasi, rilevabili mediante metodica immunostochimica o con tecniche basate sull'uso di anticorpi con tutti i loro limiti (come il rischio di legami aspecifici). Un vantaggio ulteriore, prima non consentito, consiste nella possibilità di poter marcare eventuali cellule figlie in caso di divisione cellulare, permettendo un'analisi di tipo clonale (233).

Per studiare una precisa popolazione cellulare e marcarla univocamente rispetto alle altre, è essenziale che i meccanismi reporter si attivino solo

nelle cellule d'interesse e siano quindi controllati in maniera cellulo-specifica. Questo può essere realizzato tramite l'introduzione nel genoma animale di un transgene promotore che regoli l'espressione del transgene reporter nel contesto spaziale della cellula d'interesse. Vengono selezionati come promotori, geni espressi solo ed unicamente dal tipo cellulare d'interesse, questi transgeni vengono trascritti quando la cellula esprimerebbe fisiologicamente le forme naturali. Il transgene promotore porterà al suo interno una modifica nella sequenza con le informazioni utili a produrre delle proteine, comunemente enzimi di ricombinazione, che fungeranno come attivatori delle altre componenti transgeniche. La specificità del promotore consentirà l'attivazione dei reporter a livello di una popolazione specifica o anche di una singola cellula (230) (233).

L'enzima di ricombinazione è in grado di modificare in maniera irreversibile la sequenza acidonucleica del transgene *reporter* inducendone l'espressione. Cre ricombinasi-LoxP è il sistema più usato. Si basa sull'azione dell'enzima Cre ricombinasi (*causes recombination of the bacteriophage P1 genome*) e sulla sua capacità di riconoscere i siti LoxP (*locus of X-over P1*) (234; 235). La Cre ricombinasi riconosce la sequenza nucleotidica LoxP di 34 paia di basi, questa è introdotta nel genoma murino generalmente assieme al transgene *reporter*, ed è in grado di rimuovere sequenze interposte (o floxate) tra due siti LoxP con lo stesso orientamento (entrambe 5' → 3' o 3' → 5') (Figura 14A) (230) (234) (235) (236). Avendo quindi una sequenza di stop floxata tra i due siti LoxP posti a monte del gene *reporter*, in seguito alla delezione operata dalla Cre ricombinasi, il *reporter* verrà svincolato dallo stop e potrà essere espresso dalla cellula e da tutta la sua progenie (Figura 14A). Essendo infatti la modifica al DNA irreversibile, l'espressione del *reporter* sarà ereditata da tutte le cellule figlie, rendendo possibile la quantificazione della progenie derivata da una

singola cellula madre, e il loro comportamento in condizioni fisiologiche e patologiche (234).

Le analisi di *lineage tracing* rendono possibile non solo tracciare eventuali espansioni clonali dovute ad eventi rigenerativi o proliferativi, ma anche ottenere informazioni sull'estensione della duplicazione della popolazione marcata e capire lo stato differenziativo di una cellula sia basandosi sull'espressione di determinati geni che per effetto posizionale (237) (230).

Grazie al *lineage tracing* possiamo avere informazioni sia nei tessuti post-natali che in fase di sviluppo tramite una regolazione temporale oltre che spaziale, nei modelli "inducibili", tramite l'introduzione di un terzo transgene nel genoma animale. Mentre nei modelli "costitutivi" (chiamati così per contrapposizione), la ricombinazione genetica che porta all'espressione del *reporter* avviene in ogni cellula, in qualsiasi momento della sua vita o in qualsiasi condizione dovesse esprimere il promotore cellula-specifico; nei modelli inducibili è l'operatore a scegliere da quando far avvenire l'evento ricombinativo, tramite la somministrazione di molecole esogene che agiscono da induttori, come nei sistemi regolati da tamossifene (CreER^T), o nei sistemi regolati da tetraciclina (Tet) (230) (234).

Nei sistemi controllati da tetraciclina, il promotore cellula-specifico induce l'espressione del fattore trascrizionale *reverse tetracycline-controlled transactivator* (rtTA). Quando viene somministrata all'animale la Doxiciclina via dieta, acqua o iniezione, essa si legherà al fattore rtTA attivandolo e rendendolo in grado di legare la sequenza del transgene Tet (*Tetracycline-controlled transcriptional activation-elements*), evento che porterà all'espressione della Cre ricombinasi codificata subito a valle degli elementi Tet, portando così alla marcatura della cellula (Figura 14B). I sistemi inducibili permettono, quindi, di marcare il *pool* cellulare di interesse solo durante la finestra di somministrazione dell'induttore, rendendo impossibile qualsiasi nuovo evento di ricombinazione genetica in seguito

alla rimozione della molecola, anche qualora la cellula in oggetto fosse promotore-positiva. E' così possibile marcare solo le cellule desiderate, e solo nel momento richiesto in base all'*end point* sperimentale.

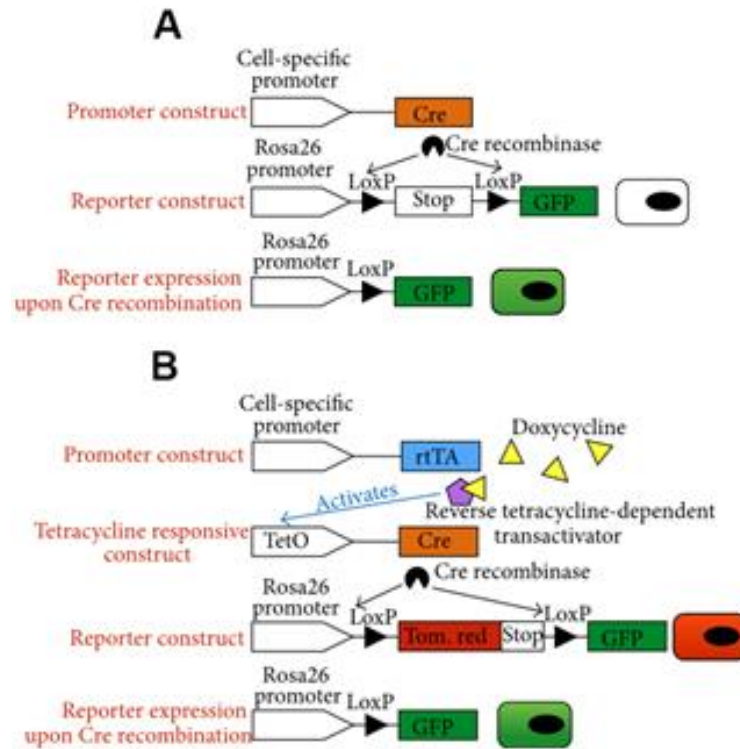


Figura 14. Rappresentazione schematica dei meccanismi esposti. Ogni linea rappresenta un differente ceppo transgenico murino che deve essere incrociato con gli altri affinché si possa ottenere il modello desiderato nella sua completezza. **A** - Il promotore cellula-specifico controlla direttamente l'attività della Cre ricombinasi creando così un modello costitutivo. Quando il promotore sarà attivato la Cre ricombinasi sarà espressa ed avrà accesso ai siti LoxP, rimuovendo così la cassetta di Stop floxata tra due siti LoxP. Questo evento ricombinatorio svincola la sequenza della GFP dal sito di Stop, permettendo la sua espressione. **B** - Modello inducibile basato sul fattore trascrizionale rtTA, il quale è costitutivamente espresso in forma inattiva nelle cellule positive al promotore scelto. Il legame con la Doxiciclina permetterebbe il legame della rtTA alle sequenze TetO (*Tetracycline-Controlled Transcriptional Activation-On*) che controllano l'espressione della Cre ricombinasi, attivando così i meccanismi ricombinatori già descritti in A e B. Estratta e modificata da: Lombardi D et al., Stem Cells Int., 2015.

Nell'ultimo decennio l'introduzione dei *reporter* multicolore ha fortemente incrementato l'*output* di dati derivanti dalle analisi di *lineage tracing*. Tra i *reporter* multicolore maggiormente impiegati troviamo il sistema Confetti, sviluppato nel 2007 da Livet *et al*, chiamato anche Rainbow (238) (239) (240).

Questo *reporter* permette l'espressione casuale di uno tra quattro fluorofori: GFP (*Green Fluorescent Protein*), RFP (*Red Fluorescent Protein*), YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) e CFP (*Cyan Fluorescent Protein*) grazie all'impiego di varianti incompatibili dei siti LoxP (LoxP e PLox) poste in maniera alternata con orientamento invertito ($5' \rightarrow 3'$ e $3' \rightarrow 5'$), dove i geni *reporter* sono posti *in tandem* tra tali siti con orientamento opposto ($5' \rightarrow 3'$ e $3' \rightarrow 5'$). In questo modo è possibile ottenere delle excisioni (se la Cre ricombinasi lega due siti LoxP) o delle inversioni di sequenza acidonucleica (se la Cre Ricombinasi lega un sito Loxp ed un PLox) mutualmente esclusive dei transgeni *reporter*, evento che forza le cellule ad acquisire in maniera stabile solo uno tra i 4 colori possibili (Figura 15) (238). La casualità di ricombinazione, determinando la possibilità di taggare le cellule con differenti fluorofori, permette ai sistemi costruiti con il *reporter* Confetti di rendere evidenti in maniera univoca le espansioni clonali derivanti da una singola cellula madre: queste appariranno difatti come *cluster* continui di cellule dello stesso colore (230) (235).

Inoltre, siccome cellule adiacenti saranno presumibilmente e statisticamente marcate con differenti fluorofori, il transgene Confetti permette non solo lo studio di più cellule staminali nel contesto della nicchia di residenza, ma consente anche di disettare come differenti effetti posizionali all'interno della nicchia stessa possano influire sulla capacità differenziativa e sul destino di cellule staminali o progenitori, sia in condizioni fisiologiche che patologiche (233) (239) (240).

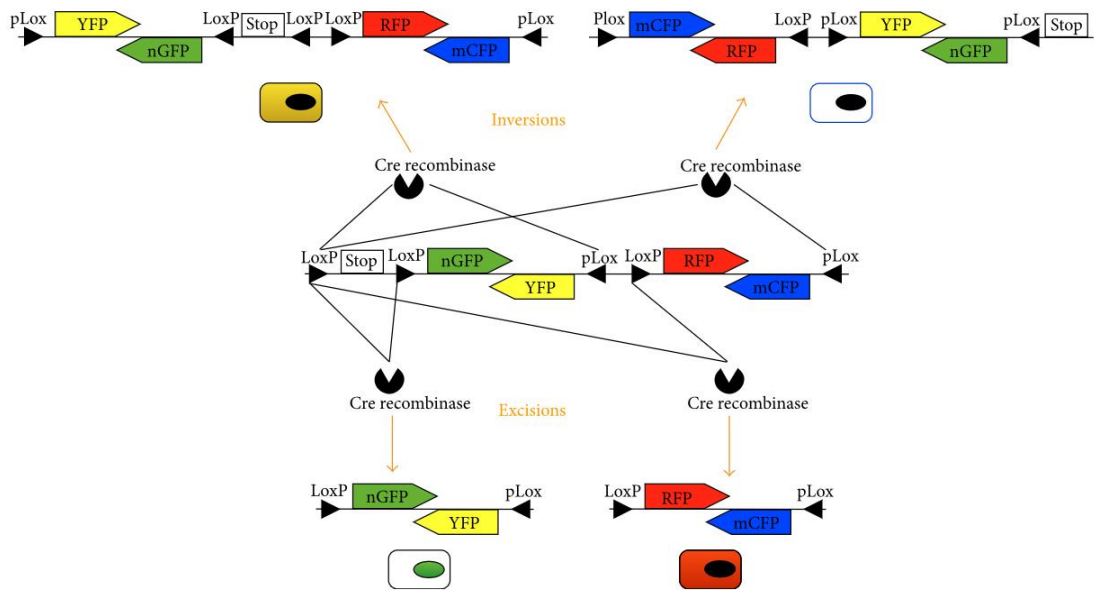


Figura 15. Rappresentazione schematica del sistema *reporter* Confetti. Al centro, il costrutto transgenico completo prima di eventi ricombinativi. In basso, le excisioni eliminano alcuni dei geni *reporter* portando la cellula verso una data colorazione. In alto, le inversioni si basano sui siti PLox e sono impiegate per invertire il costrutto, o parti di esso, così da favorire l'una o l'altra colorazione della cellula (la Cre ricombinasi inverte quei segmenti floxati tra due siti Lox posti con orientamento testa-a-testa). Sia i segmenti excisi che quelli invertiti possono continuare ad essere invertiti finché vi sia attività della Cre ricombinasi, dal momento in cui i siti LoxP sono rimossi dall'evento ricombinatorio, mentre i PLox no. Di conseguenza, questo sistema *reporter* necessita di modelli inducibili in quanto solo la rimozione dell'induttore è in grado di stabilizzare la colorazione di una data cellula. Estratta e modificata da: Lombardi D et al., *Stem Cells Int.*,

2015.

1.3.2 – Il promotore Pax8

Come già detto, l'embriogenesi renale è un processo estremamente complesso, durante la maturazione dell'organo, le cellule sono regolate da un'intricata rete di molecole a loro volta prodotte da un limitato numero di fattori trascrizionali chiave. Tra tutti fattori trascrizionali, quelli della famiglia Pax (Paired Box) giocano un ruolo fondamentale nell'induzione e nello sviluppo, nella morfogenesi e differenziamento del nefrone. La mancanza di funzionalità dei geni Pax si traduce in gravi difetti del sistema urogenitale generalmente definite come patologie CAKUT (Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract).

Le proteine Pax sono un gruppo di fattori di trascrizione che agiscono generalmente nell'organogenesi (241). Sia nell'uomo che nel topo la famiglia di proteine Pax comprende 9 membri, caratterizzati dalla presenza di "paired domain" per il legame al DNA. Vicino al "paired domain" le proteine Pax 3, 4, 6 e 7 hanno un omodominio completo, mentre le proteine Pax 2, 5 e 8 hanno solo un omodominio parziale. Questi due domini proteici insieme garantiscono il legame specifico al DNA (242). Tutti i membri della famiglia, fatta eccezione per Pax 4 e 6 contengono un ottapeptide che agisce come modulatore dell'interazioni proteina-proteina (243). Tutte queste proteine hanno poi in corrispondenza del C-terminale un dominio di trans attivazione ricco di serine/treonine che suscita l'attività trascrizionale (244).

Pax2 e Pax8 sono i primi marker specifici del lineage renale e i soli a essere poi espressi nel rene maturo. Nel rene adulto umano Pax8 è espresso dalle cellule epiteliali renali, nelle cellule epiteliali della capsula di Bowman e nella regione midollare (245).

Pax8 risulta quindi un ottimo promotore nel tessuto adulto in grado di attivarsi in tutte le cellule differenziate dei tubuli renali.

1.3.3 – Il transgene *Notch1*

Come precedentemente detto Notch è implicato in moltissimi processi fisiologici e patologici. Per studiarne l'effetto è stato scelto di utilizzare un transgene con una forma ingegnerizzata di Notch1. Questo produrrà il dominio intracellulare NICD sprovvisto del dominio PEST al C-terminale. Il segnale di Notch1 sarà quindi attivo in modo scoordinato dalla via canonica, l'attivazione sarà costitutiva e avrà una più lunga emivita, in quanto sarà riconosciuto più difficilmente dal proteasoma.

Mutazioni nel dominio PEST che possono condurre allo sviluppo di neoplasie sono state trovate: nella Leucemia Linfoblastica Acuta a cellule T (T-ALL), Carcinoma polmonare non microcitico (NSCLC) e nel Cancro al Seno (246) (247) (248).

Tramite l'utilizzo di questo transgene sarà possibile studiare l'effetto della presenza continua di Notch nelle cellule dell'epitelio tubulare renale.

2 – IPOTESI DI STUDIO

2.1 – Può l'attivazione di Notch1 essere un trigger per la formazione di neoplasie nel tessuto renale?

Data la centralità di Notch nello sviluppo embrionale e nell'omeostasi del tessuto renale adulto, senza dimenticare il ruolo di questa via di segnalazione nella carcinogenesi, ciò che sono andato a investigare è la possibilità di utilizzare *in vivo* l'attivazione continua di Notch1, nel solo compartimento delle cellule tubulari epiteliali nel topo adulto, come induttore per lo sviluppo tumorale.

Tramite l'utilizzo di questo modello murino innovativo che combina l'attività di un induttore tumorale in una specifica finestra temporale e spaziale ad un sistema di *lineage-tracing* potremo capire meglio i meccanismi di formazione e evoluzione delle alterazioni tissutali, ed eventuali ripercussioni sulla funzionalità renale.

3 – MATERIALI E METODI

3.1 – Creazione e selezione del modello murino

3.1.1 – Provenienza e breeding del modello murino transgenico Pax8-rtTA/TetO-Cre/ROSA26-Confetti/ROSA26-Notch1-GFP

Per valutare gli effetti dell'overespressione di Notch nelle cellule epiteliali del comparto tubulare del rene, abbiamo utilizzato un modello murino transgenico Pax8-rtTA/TetO-Cre/ROSA26-Confetti/ROSA26-Notch1-GFP.

In questo modello inducibile in seguito alla somministrazione da parte dell'operatore di Doxyciclina (analogo della tetraciclina), nelle cellule Pax8-positive si ha l'espressione della ricombinasi Cre, questa è posta sotto il controllo dell'elemento promotore rispondente alla tetraciclina (TRE o TetO). L'espressione della ricombinasi Cre, va a produrre nel DNA delle cellule Pax8-positive degli eventi di ricombinazione irreversibili di sequenze di DNA fiancheggiate da siti LoxP portando alla rimozione delle sequenze di STOP "a monte" del transgene Notch1 e del reporter Confetti.

L'attivazione del transgene ROSA26-Notch1-GFP porta alla sintesi del frammento NICD della proteina Notch1 privato del dominio PEST (per la sua degradazione) e alla sintesi di una GFP dotata di una sequenza IRES (Internal Ribosome Entry Site) di localizzazione nucleare.

L'attivazione del reporter Confetti porta all'espressione stocastica nelle cellule di una delle quattro proteine fluorescenti GFP, RFP, CFP e YFP, o alla rimozione completa del transgene facendo apparire le cellule "nere". La ricombinazione marca irrevocabilmente le cellule e ogni proteina ha una localizzazione cellulare diversa: GFP nucleare, RFP citoplasmatica, YFP citoplasmatica, CFP di membrana.

I topi Pax8-rtTA/TetO-Cre/ROSA26-Confetti/ROSA26-Notch1-GFP sono stati creati incrociando le linee:

- Gt(ROSA)26Sor^{tm1(CAG-Brainbow2.1)Cle}/J
- B6.Cg-Tg(TetO-Cre)1Jaw/J
- B6.Cg-Tg(Pax8-rtTA2S*M2)1Koes/J
- Gt(ROSA)26Sor^{tm1(Notch1)Dam}

I topi sono stati incrociati in vari tipi di accoppiamenti per raggiungere il più velocemente possibile l'animale quadruplo transgenico, tutti gli animali hanno un background C57Bl/6 al 100%. Durante la progettazione degli incroci è stato importante tenere conto che il transgene ROSA26-Notch1-GFP e il sistema ROSA26-Confetti essendo localizzati entrambi nel locus ROSA-26 non possono essere presenti in omozigosi, ma solo in eterozigosi.

Gli animali, derivanti dagli accoppiamenti, privi del sistema Confetti sono stati utilizzati come controllo dell'avvenuta espressione di Notch1 alla fine del periodo d'induzione.

Gli animali mancanti del transgene ROSA26-Notch1-GFP sono stati indotti e utilizzati come controllo di funzionalità del sistema Confetti alla fine del periodo d'induzione.

Tutti i topi sono stati acquistati dalla ditta The Jackson Laboratory.

Gli animali sono stati mantenuti, in condizioni conformi al Decreto Legislativo 116/92, nello stabulario CeSAL dell'Università degli Studi di Firenze. Gli esperimenti su animali sono stati eseguiti in accordo alle linee guida istituzionali, regionali e statali, nonché in accordo alla guida "for the Care and Use of Laboratory Animals" del NIH.

Gli animali derivanti da ogni cucciolata delle varie gabbie d'accoppiamento sono stati selezionati sulla base del genotipo tramite genotipizzazione per determinare l'eredità genetica.

3.1.2 – Selezione degli animali tramite genotipizzazione

Ad ogni nuovo nato, qualora derivasse dall'accoppiamento di due genitori non omozigoti per un dato transgene, è stato prelevato del DNA e analizzato tramite tecniche di PCR (polymerase chain reaction) e qPCR (quantitative polymerase chain reaction) per conoscere quali alleli fossero stati ereditati.

- **Estrazione del DNA** = Il DNA di ciascun topo è stato ottenuto a partire da un frammento reciso di coda. I topi sono stati anestetizzati con isoflurano (2-cloro-2,2,2-trifluoroetil-difluorometil-etere) per via inalatoria. Il frammento di tessuto è stato poi digerito in un buffer di lisi (SDS 20%, EDTA 0,5M, NaCl 5M pH 3.5, TRIS 1M pH 8.5), con aggiunta di proteinasi-K (0.05 mg/mL, SIGMA-ALDRICH®), e mantenuto a 55°C *over night*. Il campione è stato poi centrifugato per 10 minuti a 13000 rpm ed il surnatante è stato miscelato in un ugual volume di isopropanolo e agitato per ottenere il flocculo di DNA. Il DNA così ottenuto è stato poi recuperato e risospeso in 100 µL di ddH₂O (double distilled water) e conservato a -20°C per le successive analisi di PCR e qPCR.

- **PCR e Corsa Elettroforetica** = L'eventuale presenza del transgene nel DNA del topo è stata discriminata mediante la tecnica della PCR: tramite cicli ripetuti di denaturazione, rinaturazione e polimerizzazione è possibile amplificare migliaia di volte una determinata sequenza di DNA.

Per ogni transgene analizzato, la reazione di PCR è stata operata in tubi da 0,2 mL utilizzando una Taq polimerasi contenente l'addensante e il colorante (Dream Taq Green PCR Master Mix 2X, Thermo Fisher), i primers senso e antisenso alla concentrazione 10 µM ciascuno e DNase free ddH₂O per un volume totale di 25 µL di reazione a campione.

Per i transgeni sono state usate le condizioni in tabella 1.

<u>Pax-8-rtTA</u>
➤ Primer For (F): 5'-AACGCACTGTACGCTCTGTC -3'
➤ Primer Rev (R): 5'-GAATCGGTGGTAGGTGTCTC-3'
T° annealing dei primers: 53°C
Taglia del frammento di PCR: 100 bp
Taglia del frammento di controllo interno di PCR: 323 bp
<u>TetO-Cre</u>
➤ Primer Tg For: 5'-TCGCTGCATTACCGGTCGATGC-3'
➤ Primer Tg Rev: 5'-CCATGAGTGAACGAACCTGGTCCG-3'
➤ Primer int pos ctrl For: 5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT -3'
➤ Primer int pos ctrl Rev: 5'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3'
T° annealing dei primers: 57°C
Taglia del frammento di PCR: 420 bp
Taglia del frammento di controllo interno di PCR: 324 bp
<u>ROSA26-Confetti</u>
➤ Primer Tg For (F): 5'-GAATTAATCCGGTATAACTTCG-3'
➤ Primer Wt For: 5'-AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT-3'
➤ Primer common : 5'-CCAGATGACTACCTATCCTC-3'
T° annealing dei primers: 58°C
Taglia del frammento tg di PCR: 300 bp
Taglia del frammento wt di PCR: 386 bp
<u>ROSA26-Notch1-GFP</u>
➤ Primer WT For: 5'- CCAAAGTCGCTCTGAGTTGTTATC -3'
➤ Primer WT Rev: 5'- GAGCGGGAGAAATGGATATG -3'
➤ Primer MUT For: 5'- GAAAGACCGCGAAGAGTTTG -3'
➤ Primer MUT Rev: 5'- AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT -3'
T° annealing dei primers: 58°C
Taglia del frammento WT di PCR: 604 bp
Taglia del frammento MUT di PCR: 604 bp

Tabella 1 - Condizioni di PCR per i vari transgeni

Un processo di amplificazione prevede una fase iniziale di denaturazione a 94°C per 5 min, seguita da un'amplificazione di 35 cicli suddivisi nelle fasi:

1. Denaturazione: 94°C per 30 sec;

2. Annealing: T_m (variabile a seconda dei primers usati) per 30 sec;
3. Sintesi DNA: 72°C per 30 sec;
4. Hold: 72°C per 7 min.

Il risultato della PCR è stato poi valutato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% in EDTA-Tris-Borato (TBE, Sigma) 0,5X. Al gel è stato aggiunto un colorante che emette fluorescenza quando si lega al DNA (GreenSafe Premium, nzytech), più sicuro ed usato in sostituzione del più classico bromuro d'etidio, che invece risulta mutagenico.

Per la determinazione della lunghezza e del peso molecolare del frammento amplificato, è stato utilizzato un DNA Ladder 100bp a cui è stato aggiunto un colorante: 10 μ L ladder (100 bp DNA Ladder, G2101, Promega) + 2 μ L Loading Dye (Blue/Orange 6X Loading Dye, Promega) (Figura 16)

La corsa è stata effettuata per circa un'ora a voltaggio di 80 Volt (Sistema per elettroforesi orizzontale, Bio-Rad) per permettere la separazione delle bande per una lettura occhiometrica.

In base ai primers, alla loro specificità, alla presenza del transgene e alla sua taglia, come risultato di una corsa elettroforetica otterremo una serie di bande; queste saranno identificate tramite la taglia confrontandole con le bande a dimensione nota della ladder corse a fianco del campione.

Ogni campione sarà poi confrontato con i controlli positivi e negativi specifici inseriti appositamente in ogni reazione di PCR per determinare quali alleli siano stati ereditati.

In base alla specificità dei primers sarà possibile per alcuni geni determinare direttamente la condizione di omo o eterozigosi, per altri solo la presenza o assenza del gene. Sarà necessario quindi una più fine analisi in qPCR per determinare lo stato allelico.

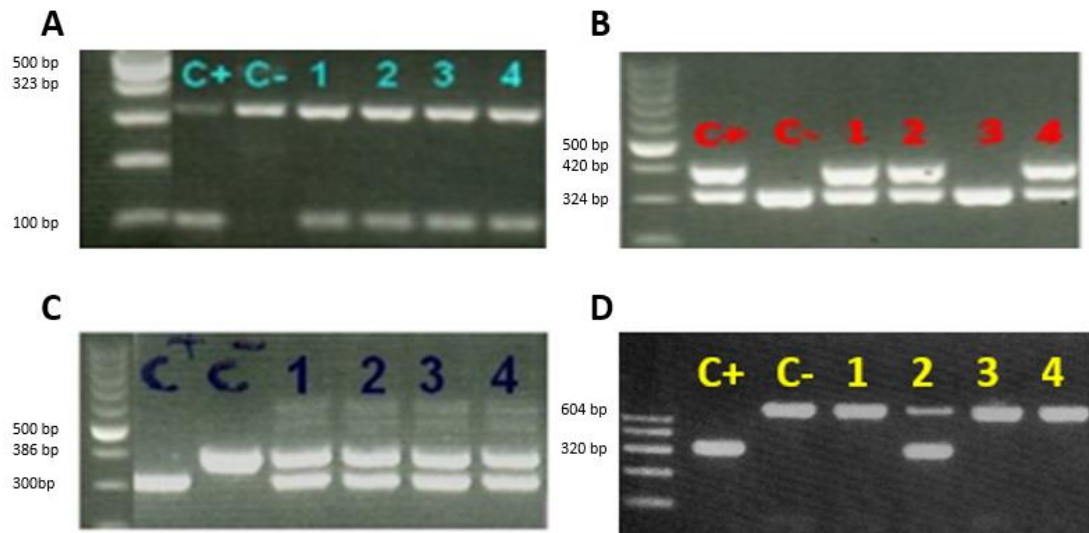


Figura 16 - Profilo di migrazione elettroforetica delle bande relative ai transgeni in un gel di agarosio al 2%. (A) Transgene Pax8-rtTA, (B) Transgene TetO-Cre, (C) Transgene ROSA26-Confetti, (D) Transgene ROSA26-Notch1-GFP. Campioni di controllo positivo e negativo sono indicati rispettivamente come C+ e C-. Campioni analizzati numerati da 1 a 4.

- **Real Time qPCR** = Come detto, per alcuni transgeni come Pax8-rtTA e TetO-Cre, la disposizione dei primers utilizzati in PCR non consente di discriminare la presenza del transgene in emizigosi o in omozigosi nel campione, pertanto è necessario fare un'analisi quantitativa che consenta di dosarlo.

La Real Time PCR è una variante della PCR che permette di quantificare il DNA o cDNA presente in un campione sia in modo assoluto (utilizzando una curva di calibrazione interna o esterna), che relativo (rapportando i valori di un gene bersaglio o target ad un gene di riferimento di solito un gene housekeeping). In questo caso è stata effettuata una quantificazione relativa (Figura 17).

Il gene di riferimento viene scelto tra i geni housekeeping la cui espressione è considerata stabile in vari tessuti. In questo caso è stato usato il TCR α (T-cell receptor di tipo alfa).

I campioni sono stati analizzati in triplicato e il valore medio di Ct (threshold cycle, Ct) è stato usato per l'analisi dei dati, seguendo il modello matematico della comparazione dei cicli soglia.

La reazione di Real Time PCR è stata effettuata con un LightCycler® 480 System (Roche Diagnostics).

La miscela di reazione è stata preparata usando per ogni campione:

- 0,3 µL di primer Forward (10 pM, stessi primer usati nella reazione di PCR)
- 0,3 µL di primer Reverse (10 pM, stessi primer usati nella reazione di PCR)
- 7,5 µL di Master Mix (LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Roche)
- 1 µL di DNA (5ng/ µL)
- DNase free ddH₂O fino ad arrivare ad un volume totale di 15 µL

Gene housekeeping TCR α :

Primer For (F): 5'-CAAATGTTGCTTGTCTGGTG-3'

Primer Rev (R): 5'-GTCAGTCGAGTGCACAGTTT-3'

Per la corsa sono stati usati i seguenti parametri:

- Fase iniziale di denaturazione: 95°C per 10 min.;
- Fase di amplificazione (40 cicli): 95°C per 15s., 60°C per 45s., 72°C per 60s.
- Curva di melting: 95°C per 10s., 65°C per 60s., 95°C continuous

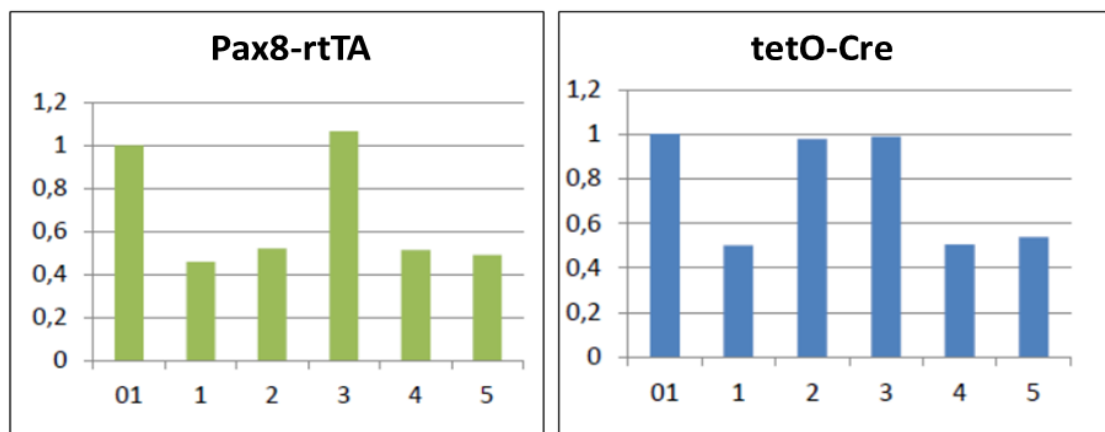


Figura 17 - Analisi quantitativa. La presenza del transgene Pax8-rtTA (a sinistra) e TetO-Cre (a destra) in singola copia o in doppia copia è riportata rispetto a un campione di riferimento omozigote (01). La presenza del transgene in singola copia è visibile dal valore 0,5, mentre la presenza del transgene in doppia copia è visibile dal valore 1. Campioni analizzati numerati da 1 a 5.

3.2 – La lunga strada della sperimentazione: dall'induzione al sacrificio dell'animale

3.2.1 – Induzione del modello murino transgenico

Per attivare l'azione della ricombinasi Cre in cellule Pax8-positive i topi sono stati indotti, a partire dalla 5° settimana di vita postnatale, con Doxiciclina (Doxycycline hyclate, Sigma) 2 mg/mL disciolta in acqua addizionata con sucrosio al 2,5% che permette di addolcire il sapore amaro del farmaco.

Lo studio ha coinvolto 5 gruppi di topi Pax8-rtTA/TetO-Cre/ROSA26-Confetti/ROSA26-Notch1-GFP (Pax8-Notch1 da qui in poi).

A 4 gruppi distinti in base ad etero/omozigosi del gene Pax8 e in base al sesso nei seguenti gruppi:

- 16 animali Pax8^(+/-)-Notch1 di sesso maschile
- 13 animali Pax8^(+/-)-Notch1 di sesso femminile
- 15 animali Pax8^(+/+)-Notch1 di sesso maschile
- 13 animali Pax8^(+/+)-Notch1 di sesso femminile

E' stata somministrata Doxiciclina per 10 giorni, dopo i quali l'animale è tornato alla normale acqua

Per il quinto gruppo di controllo composto da 17 animali non è stata somministrata Doxiciclina.

Data la difficoltà di ottenere un animale quadruplo transgenico, prevedendo il disegno sperimentale tempi molto lunghi per l'invecchiamento dell'animale ed essendo l'esperimento ancora in corso più gruppi sperimentali sono stati indotti in momenti diversi.

A questi sono stati aggiunti tre gruppi di animali:

- 3 topi Pax8-rtTA/TetO-Cre/ROSA26-Notch1-GFP indotti per verificare l'avvenuta espressione di NOTCH1

- 3 topi Pax8-rtTA/TetO-Cre/ROSA26-Confetti indotti per verificare la distribuzione delle cellule Pax8 (nelle diverse regioni del rene) e l'attivazione del transgene Confetti
- 3 topi Pax8-rtTA/TetO-Cre/ROSA26-Confetti/ROSA26-Notch1-GFP non indotti per controlli di leakage (espressione dei transgeni in assenza di attivazione specifica da parte dell'operatore)

3.2.2 – Monitoraggio della funzionalità renale

La funzionalità renale, di ciascun animale sperimentale Pax8-Notch1 e del gruppo di controllo è stata valutata tramite la misurazione dei livelli di azoto ureico (azotemia) nel sangue (*blood urea nitrogen*, BUN).

Agli animali è stato prelevato del sangue dal plesso sottomandibolare, usando un *blood lancet* a: 1, 3, 5, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, settimane dopo la fine dell'induzione.

Data le difficoltà elencate precedentemente e quindi la presenza di gruppi di topi con tempi sperimentali "sfalsati" nella presente tesi non mediamo i risultati derivanti da tempi successivi alla 35esima settimana non essendo presenti i dati per tutti i gruppi.

Al momento del prelievo il sangue è stato miscelato con 5 μ L di anticoagulante Eparina sodica 100 U/mL (Eparina Vistar, Marvecs Pharma) e poi centrifugato a 13000 rpm per 10 minuti e raccolto il plasma dal surnatante.

Il test per la determinazione quantitativa dell'urea in campioni di sangue murino è stato effettuato mediante l'ausilio dello strumento *Reflotron* (Roche Diagnostics) su 32 μ L di plasma previo congelamento.

Il campione applicato sulla striscia reattiva *Reflotron Urea* penetra nella zona di reazione costituita da ureasi (*canavaglia ensiforme*, $\geq 4,7$ U), tetraclorofenoltetrabromosulfaleina (indicatore, 20,4 μ g) ed un tampone. L'Urea contenuta nel campione viene idrolizzata in carbonato di ammonio che sviluppa ammoniaca nell'ambiente tamponato a pH alcalino. L'ammoniaca causa un viraggio parziale dell'indicatore tamponato in una colorazione che passa dal giallo al verde e quindi al blu che è proporzionale alla concentrazione di urea presente nel campione.

Il principio su cui si basa questo test è descritto dalla reazione:



Ad una temperatura di 37°C il colore sviluppato dalla reazione viene misurato a 642 nm. La concentrazione di Urea viene espressa in unità convenzionali (mg/dL).

3.2.3 – Il sacrificio della cavia: l'acquisizione del tessuto renale

Dopo l'induzione alcuni animali sono stati sacrificati per il controllo della corretta attivazione transgenica, mentre gli altri animali sono stati lasciati invecchiare e sono stati sacrificati agli *end-point* di 3, 6 e 9 mesi.

Data le difficoltà elencate precedentemente e quindi la presenza di gruppi di topi con tempi sperimentali "sfalsati" al momento della scrittura della presente tesi, dei 5 gruppi di topi Pax8-rtTA/TetO-Cre/ROSA26-Confetti/ROSA26-Notch1-GFP sono stati sacrificati numeri di animali diversi come riportato in Tabella 2.

	3 Mesi	6 Mesi	9 Mesi
Pax8 ^(+/-) -Notch1 di sesso maschile	1	3	2
Pax8 ^(+/-) -Notch1 di sesso femminile	1	4	3
Pax8 ^(+/+) -Notch1 di sesso maschile	5	3	1
Pax8 ^(+/+) -Notch1 di sesso femminile	2	3	0
Controlli	2	2	3

Tabella 2 – Riepilogo animali scarificati

In aggiunta a questi sono stati sacrificati i seguenti animali:

- 3 topi Pax8-rtTA/TetO-Cre/ROSA26-Notch1-GFP alla fine del periodo d'induzione, a seguito di un periodo di washout di 7 giorni, per verifica dell'espressione di Notch1
- 3 topi Pax8-rtTA/TetO-Cre/ROSA26-Confetti alla fine del periodo d'induzione, a seguito di un periodo di washout di 7 giorni, per verifica della distribuzione delle cellule Pax8 (nelle diverse regioni del rene) e dell'attivazione del transgene Confetti

- 3 topi Pax8-rtTA/TetO-Cre/ROSA26-Confetti/ROSA26-Notch1-GFP non indotti a 8 settimane d'età (età paragonabile a quella dei topi sacrificati al termine dell'induzione) per controlli di leakage

Al tempo stabilito, gli animali sono stati sacrificati in camera a CO2 ed i reni sono stati asportati.

In visione di un'analisi istologica i reni destri degli animali ai vari tempi sono stati scapsulati, tagliati a metà lungo il piano sagittale e fissati in Formalina Neutra tamponata pH 7,2-7,4 al 4% (Diapath Spa) over-night e dal giorno successivo hanno affrontato la procedura di preparazione per la paraffinatura. In visione di un'analisi al microscopio confocale i reni sinistri degli animali ai vari tempi sono stati fissati con paraformaldeide al 4% per 2 ore, in seguito immersi in una soluzione di sucrosio al 15% per 2 ore per preservare la morfologia del rene e successivamente trasferiti in una soluzione di sucrosio al 30% per 16 ore (over night), infine congelati in azoto liquido e conservati a -80°C.

3.3 – Preparazione e studio del tessuto renale

3.3.1 – *Analisi Istologica: taglio, colorazione e acquisizione tramite microscopia ottica*

I reni dopo essere stati fissati per una notte in Formalina 4% devono essere disidratati per la paraffinatura necessaria per il taglio. Il protocollo prevede:

- 2 incubazioni del tessuto in una soluzione al 50% di Etanolo (EtOH \geq 99,8%, Sigma-Aldrich) e dH₂O (distilled water) in un rapporto volumetrico di 1:20 rispetto al tessuto, ognuna per 1 ora a temperatura ambiente
- 2 incubazioni del tessuto in una soluzione al 75% di Etanolo e dH₂O in un rapporto volumetrico di 1:20 rispetto al tessuto, per 1 ora e poi over-night a temperatura ambiente
- 3 incubazioni del tessuto in una soluzione al 95% di Etanolo e dH₂O in un rapporto volumetrico di 1:20 rispetto al tessuto, ognuna per 40 minuti a temperatura ambiente
- 3 incubazioni del tessuto in Etanolo assoluto in un rapporto volumetrico di 1:20 rispetto al tessuto, ognuna per 40 minuti a temperatura ambiente
- 2 incubazioni del tessuto in Bio-Clear (Bio-Optica) per la diafanizzazione in un rapporto volumetrico di 1:20 rispetto al tessuto, per 1 ora e poi per 15-30 minuti
- Copertura con olio di paraffina (Sigma-Aldrich) per impedire reazioni con l'aria

I campioni sono stati paraffinati. Tramite incubazione in paraffina liquida (Paraffina Bio Plast Plus, Bio-Optica) per 16 ore in stufa e sempre nella paraffina liquida sarà formato il blocchetto che verrà modellato e poi tagliato. Per la colorazione Ematossilina (Bio-Optica)-Eosina (Eosina Yellowish, Certistain) dai tessuti sono state prese fette dello spessore di 7 μ m tramite microtomo (Boeckeler Mod.0712MR2). Le sezioni che saranno poi analizzate

corrispondono al piano sagittale dell'organo nella sua massima superficie in modo che tutte le aree del rene siano rappresentate.

Le sezioni montate su vetrini (Thermo-Scientific, Superfrost Plus 25x75x1,0 mm) dopo una notte in stufa possono passare ai processi di sparaffinatura e colorazione:

- 3 passaggi in Bio-Clear, per rimuovere la paraffina, di 8 minuti
- 1 passaggio in etanolo assoluto di 2 minuti
- 1 passaggio in etanolo 95% di 2 minuti
- 1 passaggio in etanolo 75% di 2 minuti
- 1 passaggio in etanolo 50% di 2 minuti
- 1 passaggio in dH₂O di 2 minuti
- 1 passaggio in Ematossilina di 2 minuti
- Ammollo in H₂O "di fonte" di 10 minuti
- 1 passaggio in dH₂O di 2 minuti
- 1 passaggio in etanolo 50% di 2 minuti
- 1 passaggio in etanolo 75% di 2 minuti
- 1 passaggio in Eosina di 1,5 minuti
- 1 passaggio in etanolo 95% di 3 minuti
- 1 passaggio in etanolo assoluto di 3 minuti
- 3 passaggi in Bio-Clear, per ripulire, di 8 minuti
- Montaggio

Per sigillare i vetrini è stato usato il Mounting Medium della Thermo-Scientific. I tessuti sono stati poi osservati tramite microscopio ottico Evos XL (AMG), sono state prese immagini più significative delle lesioni ad ingrandimento 40X, mentre sono state prese immagini continue delle sezioni ad ingrandimento 4X e 20X con parte della superficie sovrapposta per la ricostruzione computerizzata di panoramiche delle sezioni per l'analisi quantitativa e qualitativa delle lesioni.

Le immagini sono state ricostruite per sovrapposizione delle immagini tramite il programma PhotoShop CS5,1, in base alla taglia della sezione le ricostruzioni a ingrandimento 4X corrisponde alla somma di 8-12 immagini, mentre le ricostruzioni a ingrandimento 20X corrispondono alla somma di circa 120-300 immagini.

3.3.2 – *Analisi di Espansione Clonale: taglio, marcatura e acquisizione tramite microscopia confocale*

Dopo il congelamento i reni sono stati tagliati in sezioni dello spessore di 10 μm tramite un criostato Leica (CM1850) e allestiti i vetrini. Le sezioni analizzate corrispondono al piano sagittale dell'organo nella sua massima superficie in modo che tutte le aree del rene siano rappresentate.

Marcatura di verifica attivazione di Notch1: Anti-GFP+DAPI

I vetrini sono stati marcati con marcatura indiretta utilizzando un anticorpo primario Anti-GFP rabbit IgG Fraction (Life Technologies) 1:400 per 15 minuti a 37°C e over night a 4°C; un anticorpo secondario Alexa Fluor 488 Goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) 1:1000 per 30 minuti a RT al buio + DAPI (Life Technologies) 1:500 in PBS + BSA (Albumina Sierica Bovina, Sigma-Aldrich) + Saponina (Saponina da Quillaja Saponaria, Sigma-Aldrich) per 30 minuti a RT al buio.

La marcatura indiretta tramite anticorpo Anti-GFP permetterà d'identificare le cellule GFP positive, il DAPI marcherà i nuclei permettendo di determinare il numero delle cellule in una precisa zona del tessuto.

I vetrini sono stati montati con il medium di montaggio Vectashield (Vector) ed analizzati ad un Microscopio Confocale SP5 AOBS (Leica) equipaggiato con laser a due-fotoni Chameleon Ultra-II (Coherent).

Per l'acquisizione delle immagini del topo Confetti sono state utilizzate le seguenti condizioni di eccitazione (ecc) ed emissione (em):

CFP λ_{ecc} 458 nm λ_{em} 460-510 nm

RFP λ_{ecc} 543 nm λ_{em} 555-600 nm

YFP λ_{ecc} 514 nm λ_{em} 520-570 nm

Il DAPI è stato eccitato con il laser a due-fotoni ad 689nm.

E' stato utilizzato l'obbiettivo ad ingrandimento 25X ad immersione in acqua o a 63X ad immersione in glicerina e le immagini sono state acquisite ad una risoluzione 1024x1024 pixel con una velocità di acquisizione di 100Hz.

Marcatura per panoramica: falloidina+DAPI

I vetrini sono stati marcati con falloidina Alexa Fluor 633 (Molecular Probes, A-12379) 1:40 + DAPI (Life Technologies, 689 nm) 1:500 in PBS + BSA (Albumina Sierica Bovina, Sigma-Aldrich) + Saponina (Saponina da Quillaja Saponaria, Sigma-Aldrich) per 30 minuti a RT al buio. La falloidina marcherà i filamenti di actina permettendo l'identificazione del citoscheletro cellulare e dando un'idea della struttura del tessuto.

I vetrini sono stati montati con il medium di montaggio Vectashield (Vector) ed analizzati ad un Microscopio Confocale SP5 AOBS (Leica) equipaggiato con laser a due-fotoni Chameleon Ultra-II (Coherent).

Per l'acquisizione delle immagini del topo Confetti sono state utilizzate le condizioni di eccitazione (ecc) ed emissione (em) descritte sopra.

E' stato utilizzato l'obbiettivo ad ingrandimento 25X ad immersione in acqua, le immagini sono state acquisite ad una risoluzione 1024x1024 pixel con una velocità di acquisizione di 100-200Hz.

Sono state acquisite immagini rappresentative delle varie lesioni per la valutazione della clonogenicità e poi l'intero rene è stato acquisito tramite immagini con delle aree di sovrapposizione per permettere poi la ricostruzione computerizzata dell'intera sezione.

Le immagini sono state ricostruite per sovrapposizione delle immagini tramite il programma PhotoShop CS5,1, in base alla taglia della sezione le ricostruzioni a ingrandimento 25x corrispondono alla somma di circa 200-300 immagini.

Per le panoramiche le immagini delle varie fluorescenze sono state sovrapposte senza il canale del DAPI, i nuclei avrebbero impedito di

apprezzare la distribuzione globale dei colori derivati dal reporter ROSA26-Confetti.

3.4 – Criteri d'analisi e metodologia statistica

3.4.1 – Istologia: Analisi quantitativa e qualitativa del tessuto

Le panoramiche ricostruite sono state analizzate tramite il programma ImageJ 1,49 (249). Per ogni ricostruzione è stata calcolato il numero e l'area di tutte le lesioni distinte in: Cisti semplici, Cisti Glomerulari, Iperplasia tubulare semplice, Iperplasia tubulare atipica, Adenoma, Carcinoma, Lesioni non identificate.

Sono stati conteggiati tutti i tubuli e le cisti al di sopra di 8000 pixel di area, in quanto sopra questa taglia diventava evidente la dilatazione. Per i tubuli e le cisti comprese tra 8000 e 15000 pixel, è stato contato il numero e confrontata la taglia occhiometricamente con dei retini a dimensione nota per approssimarne la superficie nel calcolo, sopra i 15000 pixel ogni alterazione è stata misurata singolarmente.

Per l'identificazione di: Iperplasia tubulare atipica, Adenoma, Carcinoma, mi sono affidato al riconoscimento delle caratteristiche descritte per ogni lesione nell'introduzione.

Le lesioni che non rientravano nei criteri catalogativi sono state catalogate come "Lesioni non identificate".

3.4.2 – *Espansione Clonale: Analisi e conta della clonogenicità del tessuto*

Per ogni rene acquisito ai vari *end-point* sperimentali sono stati analizzati 20 campi rappresentativi.

Per le lesioni “aperte”, ovvero corrispondenti a strutture dilatative-proliferanti, come cisti tubulari e tubuli iperplastici è stato quantificato il numero delle proliferazioni monoclonali (cloni) che componevano ogni lesione e per ogni lesione è stato quantificato il numero di cellule che componevano ogni clone.

Allo stesso modo sono stati analizzati altrettanti campi rappresentativi dei topi del gruppo di controllo Pax8-rtTA/TetO-Cre/ROSA26-Confetti sacrificati subito dopo il periodo di induzione. Ho osservato cloni fino a 3 cellule, che corrispondono all’espressione stocastica dei fluorocromi del transgene ROSA26-Confetti e non ad un’espansione clonale; i cloni formati da 1, 2 o 3 cellule saranno esclusi dell’analisi quantitative dei topi Pax8-Notch1

Per le lesioni “chiuse” come gli adenomi queste sono state analizzate tramite il programma ImageJ 1,49 (249), per ogni lesione è stata valutata l’area e il numero di cloni che la componevano.

3.4.3 – *Analisi statistica dei dati*

I risultati sono stati espressi come media \pm SEM. Il confronto tra i gruppi in studio è stato valutato mediante utilizzo del Mann-Whitney *test*. Sono stati considerati statisticamente significativi risultati con $p < 0.05$.

L'analisi statistica è stata realizzata mediante l'utilizzo del software OriginPro 9.0.0 (OriginLab Corporation).

4 – RISULTATI

4.1 – La validazione del modello, la conferma dell'attivazione condizionale

Per valutare l'effetto dell'overespressione di Notch1 nelle cellule tubulari del rene nel topo, e potere studiare un'eventuale origine clonogenica delle lesioni tumorali, abbiamo utilizzato il modello murino transgenico Pax8-rtTA/TetO-Cre/ROSA26-Confetti/ROSA26-Notch1-GFP in cui il promotore Pax8, caratteristico delle cellule tubulari, è stato associato al sistema Confetti. I topi sono stati indotti con una dose di Doxyciclina disciolta in acqua (2 mg/mL) per 10 giorni a partire dalla 5° settimana di vita. Per accertarci del corretto funzionamento dell'animale, è stato necessario fare una serie di verifiche preliminari.

4.1.1 – Verifica dell’attivazione del transgene ROSA26-Confetti e distribuzione delle cellule Pax8 nel rene.

Per verificare che il transgene ROSA26-Confetti funzioni correttamente sono stati indotti topi Pax8-rtTA/TetO-Cre/ROSA26-Confetti (n=3) tramite doxiciolina per 10 giorni, al termine dei quali, a seguito di un periodo di washout di 7 giorni, gli animali sono stati sacrificati e i reni raccolti.

Analizzato il tessuto abbiamo notato l’espressione di tutte le proteine fluorescenti, con una più bassa espressione della GFP, come infatti riportato da Snipper et al. (239): negli animali emizigoti per il transgene ROSA26-Confetti l’espressione della GFP risulta meno probabile, mentre RFP, CFP e YFP risultano equiprobabili.

Le cellule marcate risultano distribuite in tutta la struttura renale e appartengono a tutto il compartimento tubulare, risultano invece negative le cellule della capsula di Bowman e del tuft glomerulare (Figura 18).

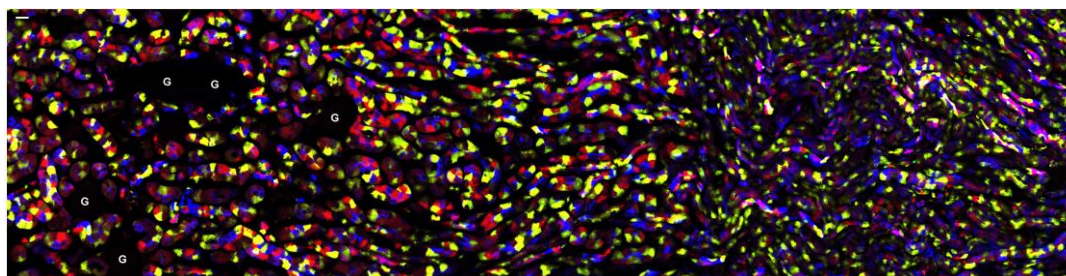


Figura 18 - Immagine panoramica rappresentativa della localizzazione delle cellule Pax8 positive in un topo sano Pax8-rtTA/TetO-Cre/ROSA26-Confetti, ottenuta affiancando una serie di immagini acquisite con l’obiettivo 25X del microscopio confocale. n=3. Le cellule Pax8 positive, marcate dal reporter Confetti appaiono gialle, verdi, rosse e blu. I glomeruli appaiono “neri” (non marcati) identificati dalla lettera G.

4.1.2 – Verifica dell'avvenuta espressione del transgene ROSA26-Notch1-GFP

Per verificare l'avvenuta espressione del transgene ROSA26-Notch1-GFP dopo induzione e distinguerlo dal segnale derivante dal Notch1 endogeno si è deciso di andare a marcare la GFP con localizzazione nucleare che viene espressa insieme all'NICD di Notch1 una volta attivato. Il segnale fluorescente derivante da questa proteina è troppo debole per essere rilevato tramite microscopia confocale senza un'adeguata marcatura, questa però risulta impossibile nel caso sia presente il transgene Confetti, in quanto il nostro anticorpo riconosce tutte le proteine fluorescenti (inclusi YFP, CFP, RFP) risultando in un segnale non specifico per la GFP.

La marcatura è stata effettuata su animali Pax8-rtTA/TetO-Cre/ROSA26-Notch1-GFP (n=3), quindi privi del transgene ROSA26-Confetti. I topi sono stati indotti per 10 giorni, e hanno passato un periodo di washout di 7 giorni, al termine dei quali gli animali sono stati sacrificati e i reni raccolti.

Analizzando il tessuto ho osservato la co-localizzazione del segnale nucleare della GFP (magenta) con il marcatore nucleare DAPI (ciano), confermando l'espressione del transgene ROSA26-Notch1-GFP (Figura 19).

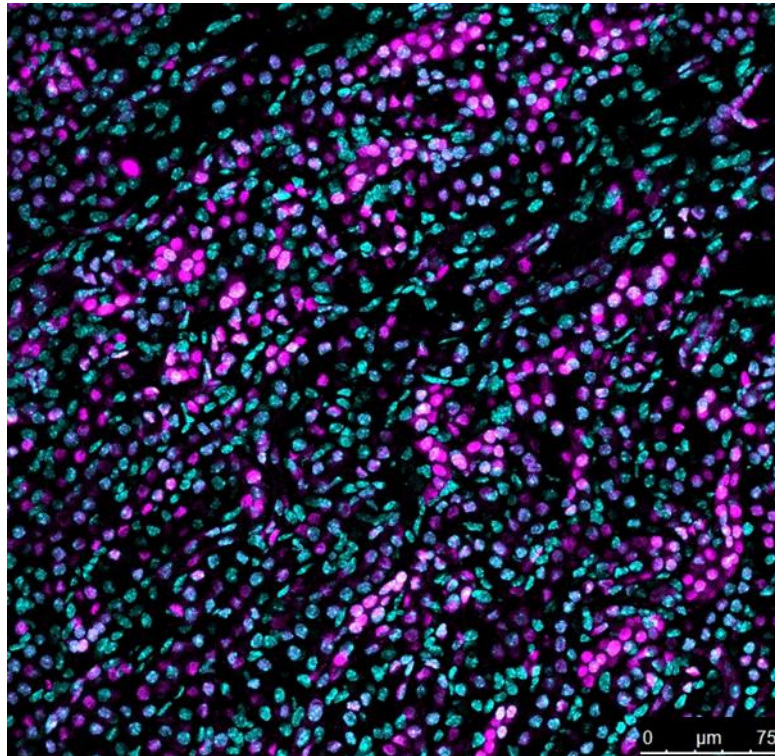


Figura 19 – Colocalizzazione del segnale nucleare di DAPI (ciano) e marcatura anti-GFP (magenta) nel topo Pax8-rtTA/TetO-Cre/ROSA26-Notch1-GFP (n=3). Immagine rappresentativa acquisita con obiettivo 25X al microscopio confocale.

4.1.3 – Controllo leakage del sistema transgenico

Per verificare che non vi fosse alcun leakage nel sistema transgenico creato, topi Pax8-rtTA/TetO-Cre/ROSA26-Confetti/ROSA26-Notch1-GFP sono stati sacrificati a 8 settimane senza che fossero stati indotti (n=3), (Figura 20). Non ho osservato nessuna fluorescenza derivante dai transgeni.

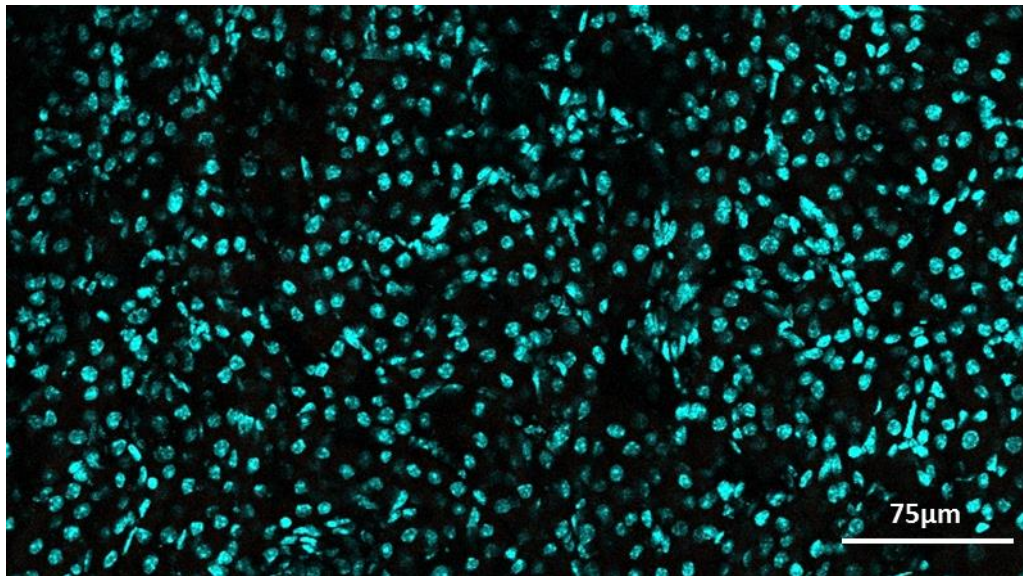


Figura 20 - Immagine rappresentativa di un topo Pax8-rtTA/TetO-Cre/ROSA26-Confetti/ROSA26-Notch1-GFP non indotto e sacrificato per appurare che non vi fosse leakage da parte di nessuno dei transgeni impiegati nel modello murino. In ciano la colorazione nucleare con DAPI.

4.2 – Monitoraggio della funzione renale nel tempo: i fattori influenti

Per valutare l'effetto dell'overespressione di Notch1 sulla funzionalità renale, i topi Pax8-rtTA/TetO-Cre/ROSA26-Confetti/ROSA26-Notch1-GFP (abbreviati Pax8-Notch1) indotti e i corrispettivi controlli non indotti sono stati monitorati tramite la misurazione dei livelli di BUN nel sangue a 1, 3, 5, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35 settimane dopo la fine dell'induzione.

Nei topi sani di controllo, i livelli di BUN rimangono stabili nel tempo (49,7 mg/dL \pm 2,96 a 1 settimana vs 57,9 mg/dL \pm 11,68 a 35 settimane, non significativo (n.s.)), come riportato in letteratura (250).

I topi Pax8-Notch1 mostrano una diminuzione significativa della funzionalità renale nel tempo rispetto ai controlli (Figura 21A). Già dopo una settimana dall'induzione si può osservare un lieve aumento della BUN (58,76 mg/dL \pm 1,55 vs 49,7 mg/dL \pm 2,96, $p < 0.05$), mentre a 35 settimane l'aumento è nettamente più elevato, ovvero 2,69 volte maggiore (155,53 mg/dL \pm 20,41 vs 57,88 mg/dL \pm 11,68, n.s.).

E' però interessante notare che la presenza del promotore Pax8-rtTA in omozigosi (+/+) o in emizigosi (+/-) influisca sulla funzionalità renale dei topi Pax8-Notch1 (Figura 21B). In effetti, i topi Pax8^(+/-)-Notch1 non superano mai una BUN di 121,32 mg/dL \pm 24,15, mentre i topi Pax8^(+/+)-Notch1 raggiungono una BUN di 241,5 mg/dL \pm 41,5 a 35 settimane, circa due volte più alta. Questo dato potrebbe indicare che: la presenza di un numero maggiore di copie del promotore Pax8-rtTA permetta di raggiungere il livello soglia necessario all'attivazione del sistema transgenico ROSA26-Confetti e ROSA26-Notch1-GFP in un numero maggiore di cellule e tramite la sua azione ad una ridotta attività filtrante.

Analizzando poi l'influenza del sesso del topo sulla funzionalità renale, ho osservato che gli animali di sesso femminile non superano mai una BUN di 110,3 mg/dL \pm 41,7, mentre gli animali di sesso maschile raggiungono una

BUN di 178,15 mg/dL \pm 46,38 a 35 settimane, ovvero 1,61 volte maggiore (Figura 21C), in accordo con quanto presente in letteratura. Osservazioni effettuate in modelli sperimentali e in uomo hanno dimostrato che la progressione della malattia renale è influenzata dal sesso. Il deterioramento della funzione renale nei pazienti con malattia renale cronica è più rapido negli uomini che nelle donne, indipendentemente dalle differenze nella pressione sanguigna o nei livelli sierici di colesterolo (251).

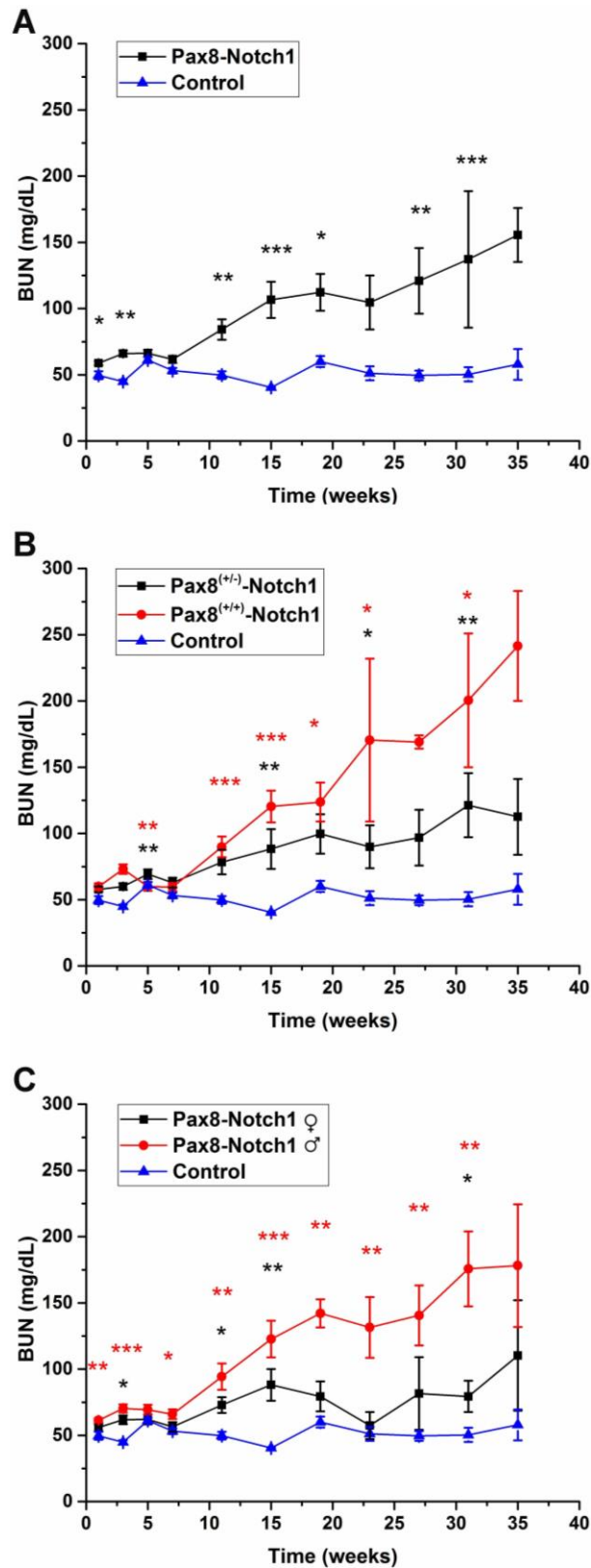


Figura 21 – Grafici delle BUN in funzione del tempo. A = Grafico BUN Gruppo Pax8-Notch1 vs Gruppo di controllo. B= Grafico BUN Gruppo Pax8^(+/-)-Notch1 vs Gruppo Pax8^(+/+)-Notch1 vs Gruppo di controllo. C = Grafico BUN Gruppo Pax8-Notch1 ♀ vs Gruppo Pax8-Notch1 ♂ vs Gruppo di controllo. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

4.3 – La distribuzione delle alterazioni nella struttura renale

Per effettuare l'analisi istologica dei reni, questi sono stati prelevati agli animali dopo sacrificio ai vari *end-point* sperimentali. In seguito sono stati paraffinati, tagliati e processati tramite colorazione Ematossilina/Eosina (Figura 22). Le sezioni scelte per l'analisi al microscopio ottico e per l'acquisizione corrispondono al piano sagittale dell'organo e quindi corrispondenti alla sezione di maggior area e con rappresentate tutte le componenti dell'organo.

Le ricostruzioni panoramiche dell'intera sezione del rene sono state quindi analizzate tramite ImageJ. Per ogni sezione di rene analizzata, per gli animali di controllo e per gli animali indotti sono state calcolate il numero e l'area delle lesioni distinte nei gruppi: Cisti semplici, Cisti Glomerulari, Iperplasia tubulare semplice, Iperplasia tubulare atipica, Adenoma, Carcinoma, Lesioni non identificate.

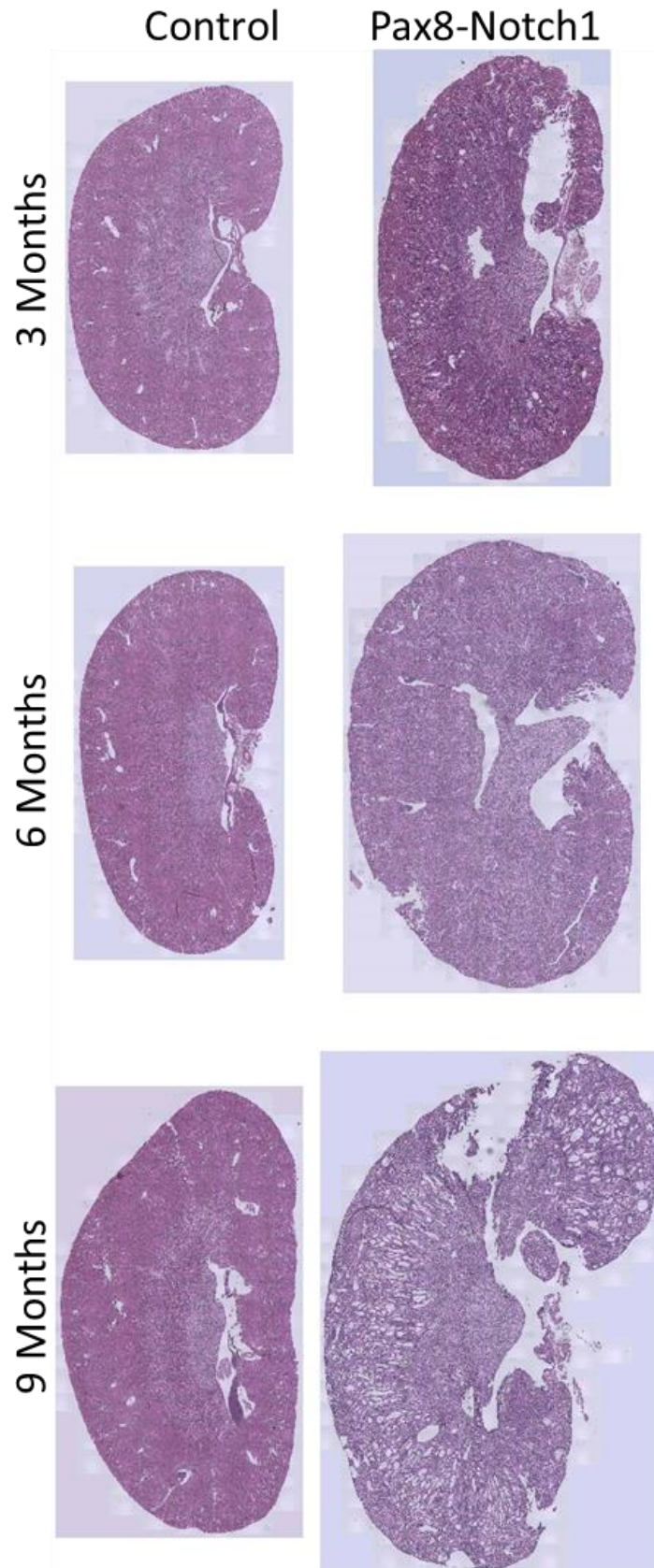


Figura 22 – *Immagini panoramiche a confronto.* Per il gruppo Pax8-Notch1 e il gruppo di controllo è stata selezionata un immagine rappresentativa per ogni *time-point* sperimentale. Le immagini acquisite a microscopi ottico con obiettivo 20X parzialmente sovrapposte sono state ricostruite al computer.

Le ricostruzioni sono state affiancate mantenendone le proporzioni.

Da una valutazione occhiometrica delle superfici delle sezioni renali ai vari tempi in entrambi i gruppi è possibile osservare un aumento progressivo delle dimensioni del rene nel tempo. E' stato infatti descritto in letteratura che i reni dei topi in background C57Bl/6 aumentano di volume dalla nascita fino alla maturità (circa 2 mesi di età) e continuano a crescere fino alla vita adulta (circa 7 mesi) prima di diminuire nei topi più anziani (circa 15 mesi) (252).

Gli animali del gruppo Pax8-Notch1 confrontati con gli animali corrispondenti del gruppo di controllo ai vari *end-point* sperimentali mostrano sempre una taglia molto maggiore.

Dall'osservazione dei tessuti al microscopio, ho notato che nel gruppo di controllo non sono presenti alterazioni se non qualche rara dilatazione tubulare o piccola ciste nei campioni a 9 mesi d'invecchiamento. Nei topi Pax8-Notch1 ho invece riscontrato la presenza di molteplici alterazioni diverse per tipo e gravità, che vanno a peggiorare nel tempo (Figura 22). Le alterazioni interessano quasi esclusivamente il compartimento tubulare e si localizzano maggiormente nella zona esterna della midollare esterna. L'area lesionata tende ad aumentare le proprie dimensioni a discapito principalmente della zona corticale ai tempi più alti. A 9 mesi sono visibili lesioni diffuse anche nella zona midollare.

Le cisti tubulari appaiono diffuse in tutte le zone del rene con maggiore frequenza nella zona corticale. Sono riconoscibili dal lume espanso con un epitelio a singolo strato composto di cellule assottigliate che va ad accentuarsi ulteriormente quando la cisti aumenta di dimensioni, mentre le cisti tubulari più piccole appaiono composte da un classico epitelio tubulare (Figura 23).

Quando di dimensioni notevoli le cisti sono caratterizzate da uno strato di fibrosi interstiziale di spessore variabile che le circonda e le distingue dal

tessuto circostante. La composizione della zona fibrotica è variabile, solitamente con poco materiale cellulare e ampia produzione di matrice extracellulare (Figura 23C).

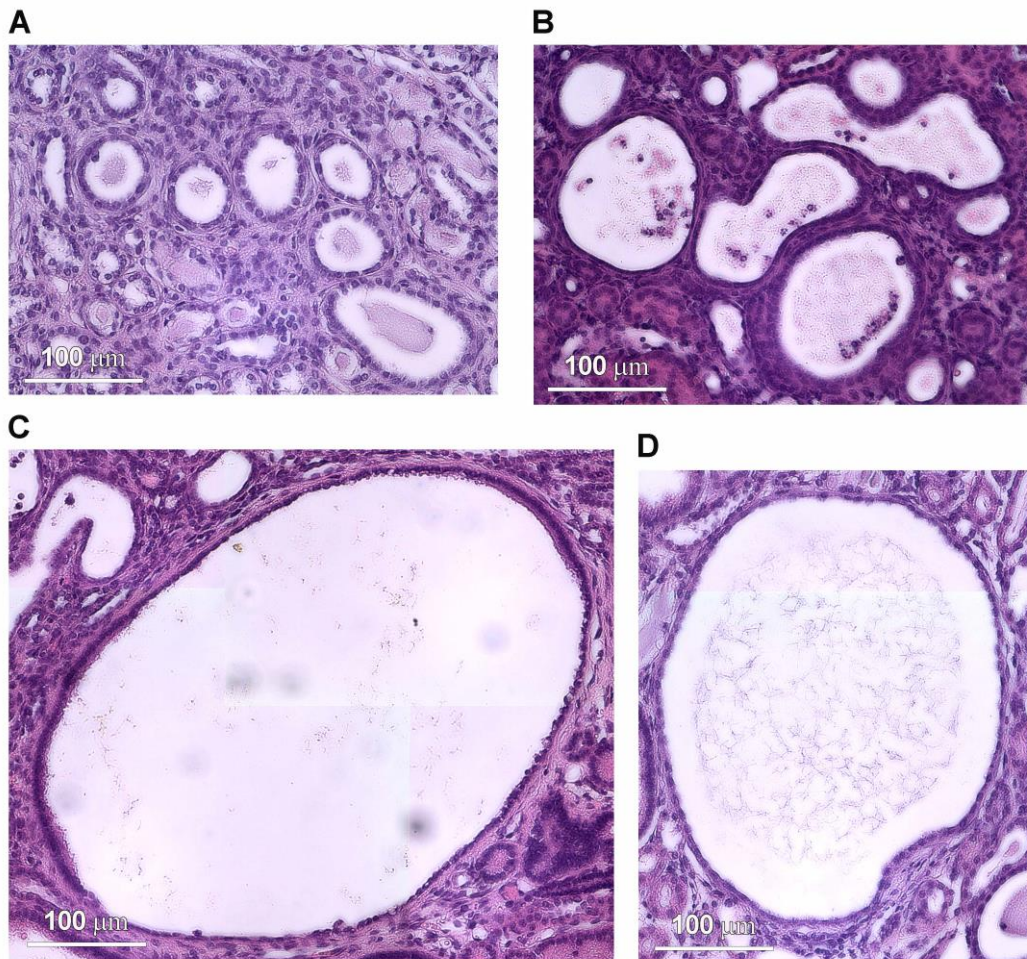


Figura 23 – Immagini rappresentative di Cisti tubulari. A= Gruppo di cisti di piccole dimensioni, notare l'epitelio cuboidale. B= Gruppo di cisti di dimensione media dall'epitelio assottigliato. C= Ciste di grossa taglia con epitelio frastagliato circondata da un sottile strato di fibrosi. D= Ciste di grande dimensione con presenza di essudato nel lume.

Di natura simile sono le alterazioni della capsula di Bowman che si ritrovano nella zona corticale. E' possibile notare accanto ai glomeruli sani, glomeruli caratterizzati da: una marcata dilatazione dello spazio di Bowman, metaplasia/iperplasia delle cellule della capsula, e aumento delle dimensioni fino allo stadio di cisti glomerulare (Figura 24).

Quando l'alterazione delle capsule è ancora lieve, è più frequente la dilatazione della capsula; che aumenta il proprio diametro senza variazioni delle dimensioni del *tuft* glomerulare e, più raramente, la parete di cellule squamose tende ad ispessirsi acquisendo caratteristiche dell'epitelio cuboidale dei tubuli.

Le cisti glomerulari possono raggiungere dimensioni estremamente elevate, in seguito a proliferazione delle cellule della capsula.

Raramente è possibile incontrare cellule mucinose che compongono queste capsule dilatate e proliferanti (Figura 24E).

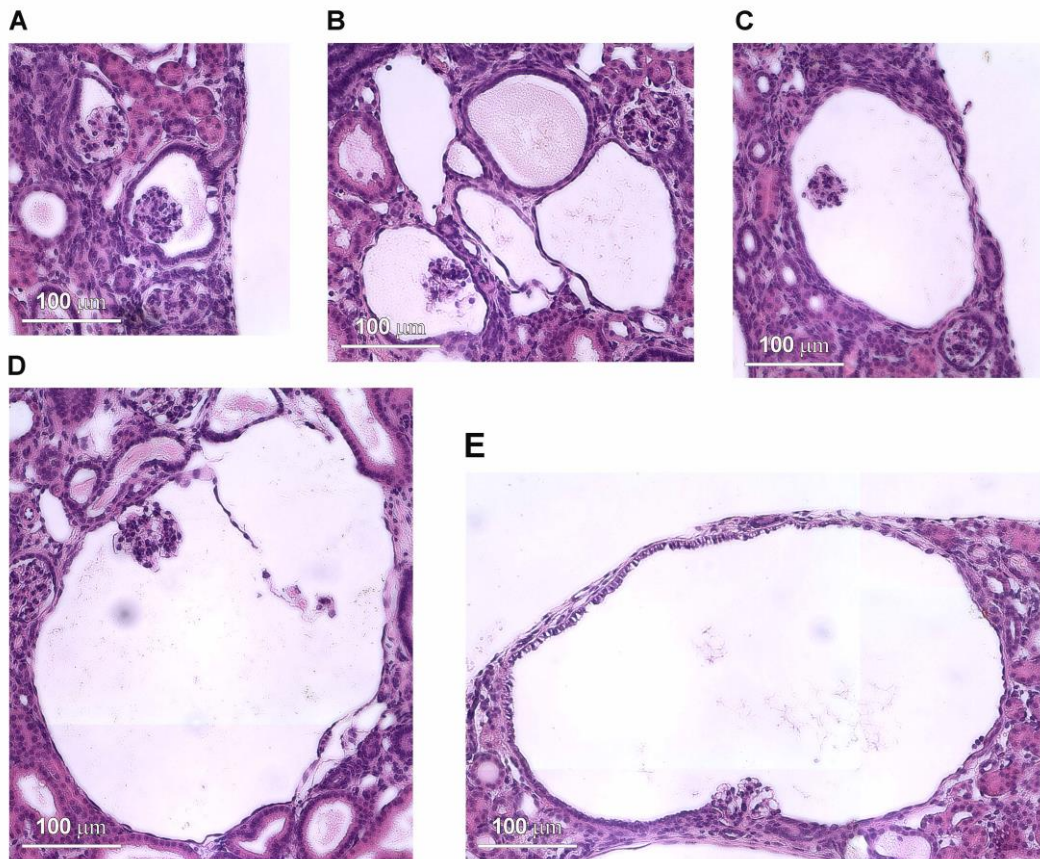


Figura 24 – Immagini rappresentative di Cisti Glomerulari. A= I glomeruli sono caratterizzati da una lieve dilatazione dello spazio di Bowman e dall'iperplasia/metaplasia dell'epitelio costituente la capsula. B = Cisti glomerulare affiancata da altre cisti probabilmente anche loro di origine glomerulare. C= Ciste glomerulare di media dimensione in corrispondenza del bordo esterno della zona Corticale. D = Ciste glomerulare di grande dimensione. E = Ciste glomerulare di grande dimensione in corrispondenza del bordo esterno della zona Corticale. Notare le cellule dell'epitelio che appaiono aver acquisito caratteristiche di cellule mucinose.

La dilatazione tubulare è l'alterazione maggiormente presente ed è diffusa in tutte le zone del rene a vari gradi. Il lume appare espanso, al suo interno si ritrovano occasionalmente detriti ed essudato secreto dalle cellule epiteliali. Queste, in alcuni casi, appaiono più sottili rispetto al normale epitelio cuboidale (Figura 25A).

I tubuli sopra una certa taglia acquisiscono caratteristiche di lesioni proliferanti. L'iperplasia tubulare è concentrata principalmente nella zona esterna della midollare esterna appena sotto la zona corticale.

Sono presenti due tipi principali di iperplasia:

- Semplice = il tubulo aumenta di dimensioni e appare dilatato a causa della proliferazione delle cellule epiteliali su un singolo strato, il citoplasma appare leggermente più basofilo (più viola nella colorazione Ematossilina/Eosina) (Figura 25). Anche in questo caso è possibile incontrare cellule mucinose (Figura 25E) e molto spesso all'interno dei tubuli è presente essudato.

- Atipica = in questi tubuli la proliferazione avviene su più strati di cellule che si espandono nel lume del tubulo dilatato con una conformazione di tipo principalmente papillare (Figura 26). E' possibile incontrare cellule mucinose anche in questi tubuli (Figura 26C). In base al grado di proliferazione il lume può venire completamente oblitterato. Comuni sono le invaginazioni della parete cellulare nel lume. Le cellule appaiono iperplastiche e basofile. In base alla taglia e al grado di alterazione il tubulo può essere circoscritto da una zona fibrotica più o meno spessa.

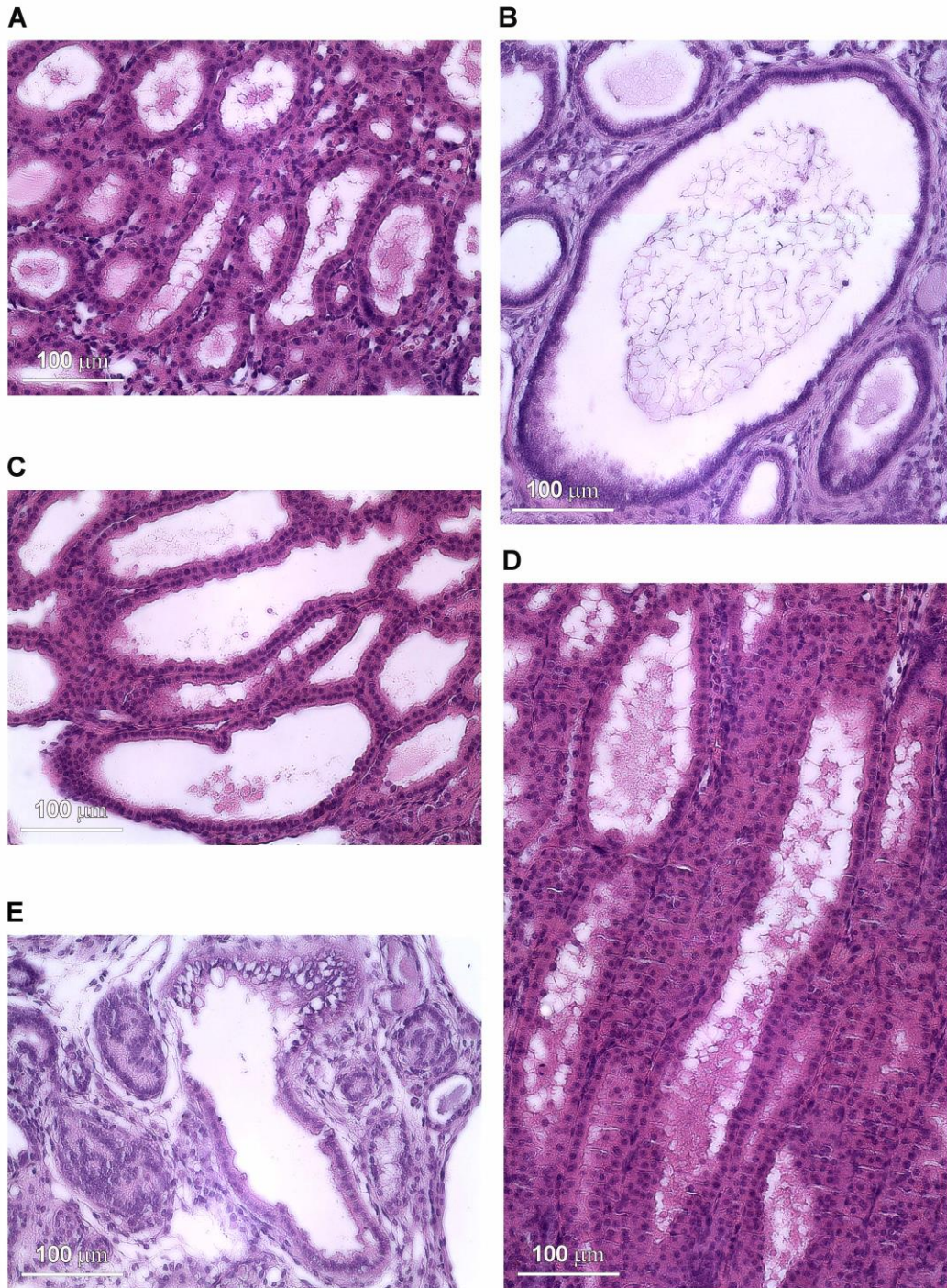


Figura 25 - Immagini rappresentative di Iperplasia tubulare semplice. A = Gruppo di tubuli Iperplastici di piccola dimensione. B = Tubulo iperplastico di grande dimensione con presenza di essudato nel lume. C = Gruppo di tubuli iperplastici di media dimensione. D = Tubuli iperplastici di medie dimensioni nella zona midollare interna con presenza di essudato nel lume. E = Tubulo iperplastico di media dimensione, le cellule dell'epitelio appaiono aver acquisito caratteristiche di cellule mucinose.

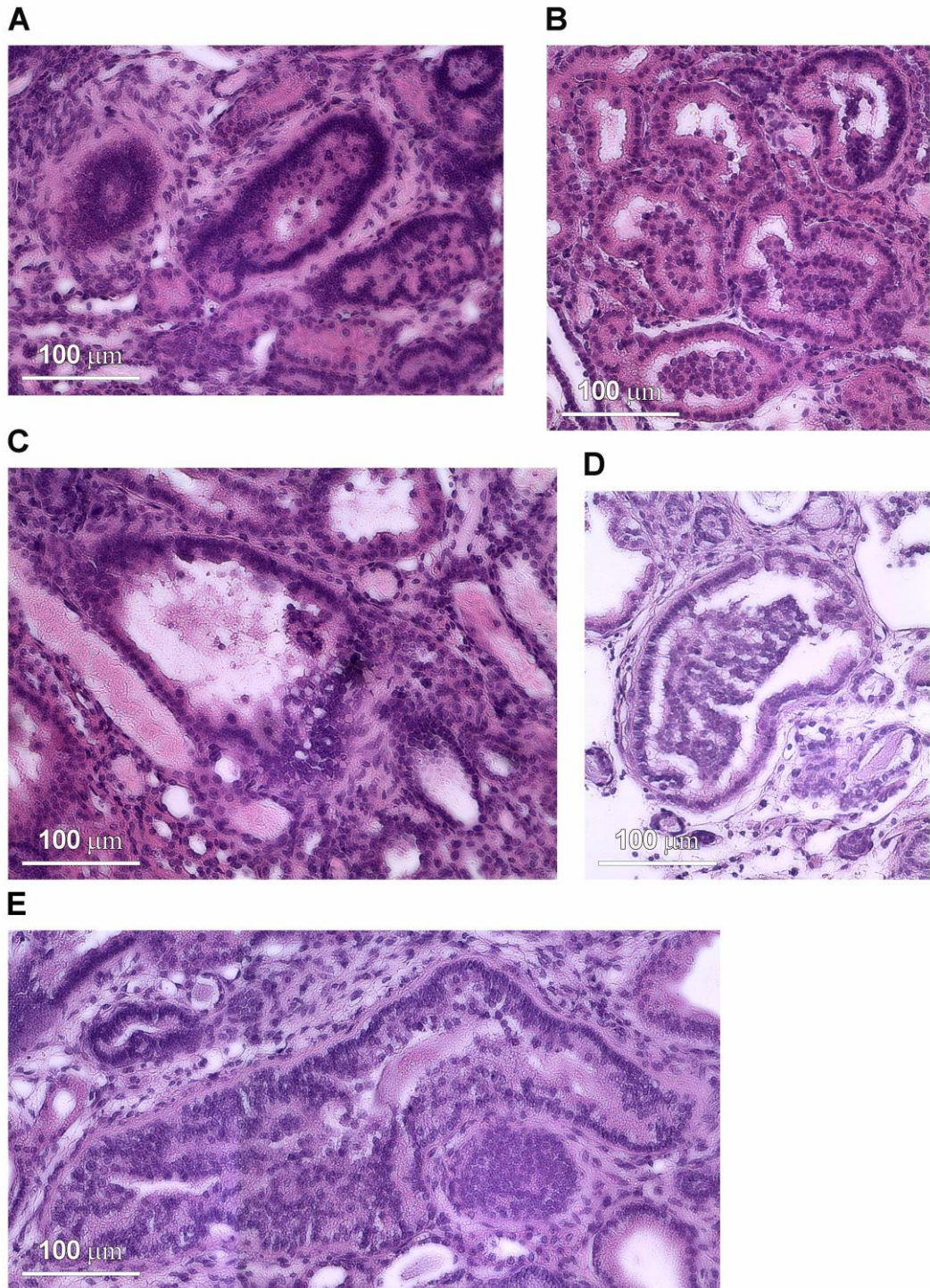


Figura 26 - Immagini rappresentative di Iperplasia tubulare atipica. A = Gruppo di tubuli di media dimensione con Iperplasia tubulare atipica. Notare il multistrato cellulare che costituisce l'epitelio, l'obliterazione del lume e la presenza di fibrosi peri-tubulare. B = Tubuli Iperplastici di media dimensione con presenza di materiale cellulare estroflesso nel lume. C = Tubulo Iperplastico con multi strato cellulare con probabile acquisizione di caratteristiche di cellule mucinose. D = Tubulo iperplastico di media dimensione con elevata presenza di materiale cellulare nel lume. E = Tubulo iperplastico di grande dimensione con numerose zone di estroflessione nel lume e spessa zona fibrosa peri-tubulare.

Alterazioni distinte risultano quelle di stampo adenomatoso. Queste sono ben circoscritte da zone di fibrosi e risalta la compressione del tessuto circostante. Hanno una crescita di tipo nodulare, appaiono compatte e dal bordo frastagliato, ricco di invaginazioni. La proliferazione è evidente in ogni parte della struttura (Figura 27).

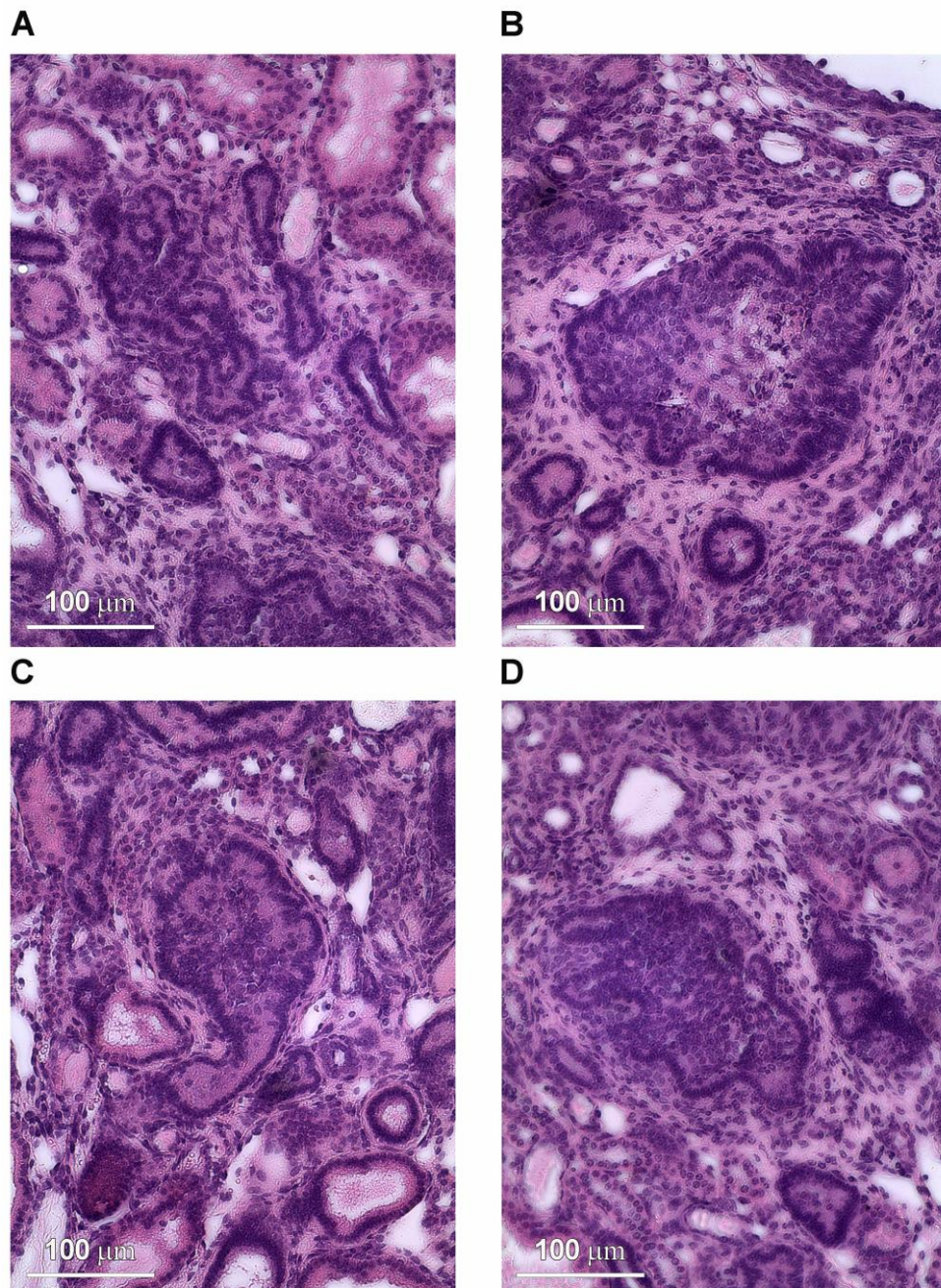


Figura 27 - Immagini rappresentative di strutture adenomatose. A = Strutture adenomatose di piccola taglia. Notare la fibrosi e le numerose invaginazioni. B = Struttura Adenomatosa di grande dimensione. Notare la compattezza della zona esterna e la zona fibrosa. C = Struttura adenomatosa di medie dimensioni. D = Struttura adenomatosa di medie dimensioni. Notare l'architettura solida e la fibrosi.

Sono individuabili anche strutture con caratteristiche diverse da quelle sopraelencate, si ritrovano nei campioni di età maggiore.

Alcune hanno crescite espansive o infiltrative, hanno di solito strutture solide ma non risultano incapsulate e non hanno strutture definite e riconoscibili. La proliferazione cellulare è evidente e non potendo riconoscere nessuna membrana basale probabilmente si tratta di strutture iniziali di adenocarcinoma (Figura 28).

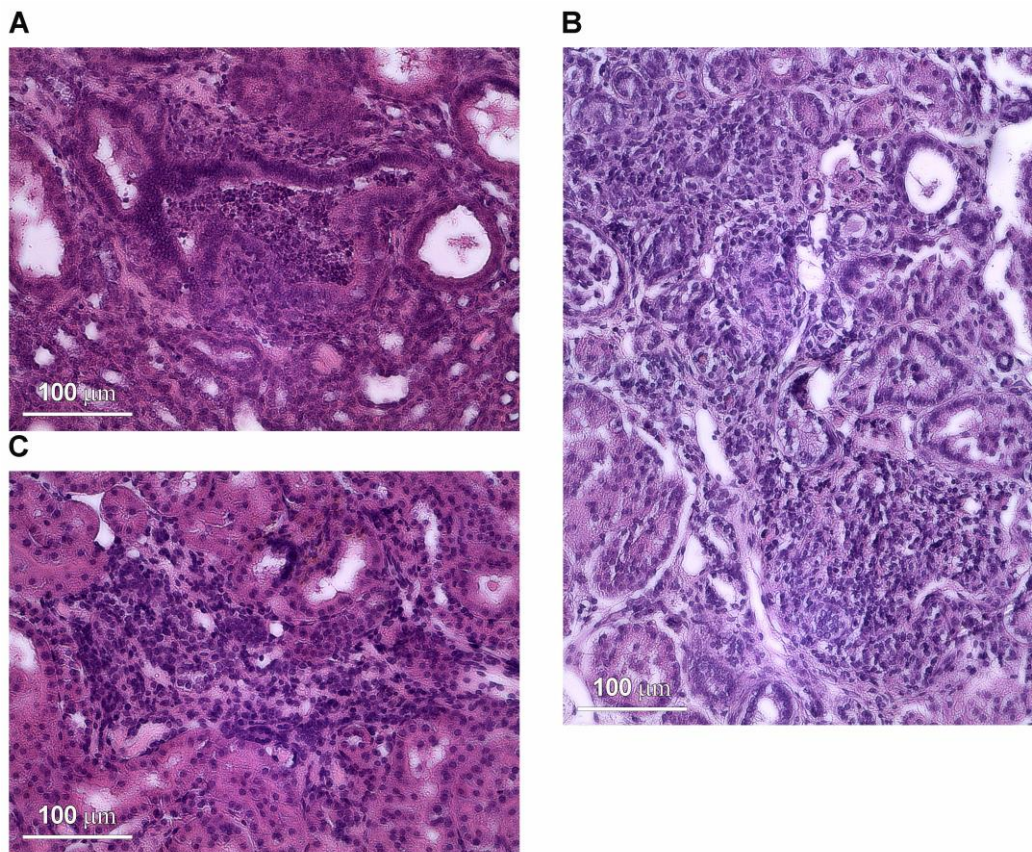


Figura 28 - Immagini rappresentative di strutture adeno-carcinomatose. A = La lesione appare con un architettura compatta, dai confini della struttura sembra che le cellule stiano per superare la membrana basale. B = La struttura non è più riconoscibile, le cellule si stanno diffondendo nel parenchima verso le strutture tubulari a fianco. C = La struttura non è riconoscibile e le cellule appaiono in crescita nel parenchima.

Dopo aver identificato i vari tipi di lesioni ho contato i loro numeri e valutato l'area di ogni singola lesione (Figura 22). Nelle conte numeriche e nelle valutazioni delle superfici non sono state prese in considerazione le dilatazioni

tubulari (in quanto troppo diffuse e di scarso interesse rispetto agli altri tipi di lesione), le aree fibrotiche e le aree presentanti infiltrato infiammatorio.

Nei campioni a tutti i tempi sono presenti una serie di strutture la cui morfologia non rientra nei criteri utilizzati per la classificazione delle lesioni. Ne è stato quindi contato il numero e valutata l'area complessiva. Dato il significato importante che tale studio riveste per la determinazione della patogenesi delle lesioni preneoplastiche e neoplastiche renali, è attualmente in corso una valutazione specifica da parte di un anatomopatologo. .

A 3 mesi dall'induzione le lesioni più comuni appaiono essere la dilatazione tubulare e l'iperplasia tubulare semplice (496 unità). Meno rappresentate ma comunque presenti risultano essere: la cisti tubulare di piccola taglia (101 unità), l'iperplasia tubulare atipica (92 unità) e la lesione di tipo adenomatoso (54 unità). La cisti glomerulare è assente, e non sono chiaramente individuabili lesioni di tipo carcinomatoso. La maggior parte dei glomeruli appare sana anche se sono presenti casi di iperplasia della capsula e lievi dilatamenti dello spazio di Bowman (Figura 29A).

A 6 mesi dall'induzione aumentano di numero e dimensione delle lesioni come l'iperplasia tubulare semplice (758 unità) e la ciste (215 unità), compaiono le prime cisti glomerulari e si notano zone di infiltrazione dell'interstizio da parte di cellule infiammatorie, soprattutto in zone perivascolari (Figura 29A). Aumentano anche le zone fibrotiche che tendono ad incapsulare le alterazioni di maggiore diametro, si ha quindi accumulo nell'interstizio di matrice extracellulare.

A 9 mesi dall'induzione l'alterazione del tessuto ha raggiunto un livello massivo. La zona corticale risulta pressoché scomparsa. Le lesioni sono diffuse a tutta la zona midollare esterna ed interna, anche se quella più colpita rimane la parte esterna. Sono numerose le cisti glomerulari nella zona corticale, anche di ampio diametro (11 unità). È possibile notare una diminuzione dei tubuli iperplastici semplici (594 unità) in confronto al tempo precedente,

contemporanea ad un aumento dei tubuli iperplastici atipici (298 unità) e delle strutture adenomatose (152 unità). E' possibile ipotizzare a questo punto un meccanismo evolutivo di malignità tra le lesioni di diverso tipo. Cominciano a ritrovarsi vari casi di strutture adenomatose con caratteri di sospetta malignità (5 unità). Le strutture proliferanti appaiono solide con intorno ampie zone d'infiltrato e fibrosi. Molte strutture, dalle iperplastiche semplici a quelle adenomatose, manifestano un mutamento qualitativo dell'epitelio che vira verso un fenotipo mucinoso, caratterizzato da vacuoli intracellulari, che appaiono non colorati dopo la marcatura.

Andando a valutare la superficie complessiva di ogni tipo di lesione ai vari tempi (Figura 29B) possiamo notare che la superficie totale lesionata è in aumento nel tempo (30566,6 μm^2 a 3 mesi, 42336,91 μm^2 a 6 mesi, 81087,44 μm^2 a 9 mesi). Come descritto precedentemente per il loro numero notiamo un aumento della superficie delle lesioni per quanto riguarda l'iperplasia tubulare semplice (16444,64 μm^2 a 3 mesi, 29219,26 μm^2 a 9 mesi), atipica (6853,07 μm^2 a 3 mesi, 31530,46 μm^2 a 9 mesi) e le strutture adenomatose (3759,93 μm^2 a 3 mesi, 10126,58 μm^2 a 9 mesi).

Analogamente è interessante rapportare il numero di ogni tipo di lesione con la corrispettiva area totale. Ai vari tempi notiamo un aumento della dimensione media delle cisti (20,72 unità/ μm^2 a 3 mesi, 60,47 unità/ μm^2 a 9 mesi), cisti glomerulari (0 unità/ μm^2 a 3 mesi, 159,08 unità/ μm^2 a 9 mesi), dei tubuli iperplastici semplici (33,15 unità/ μm^2 a 3 mesi, 49,19 unità/ μm^2 a 9 mesi) e atipici (74,49 unità/ μm^2 a 3 mesi, 105,81 unità/ μm^2 a 9 mesi) (Figura 29C).

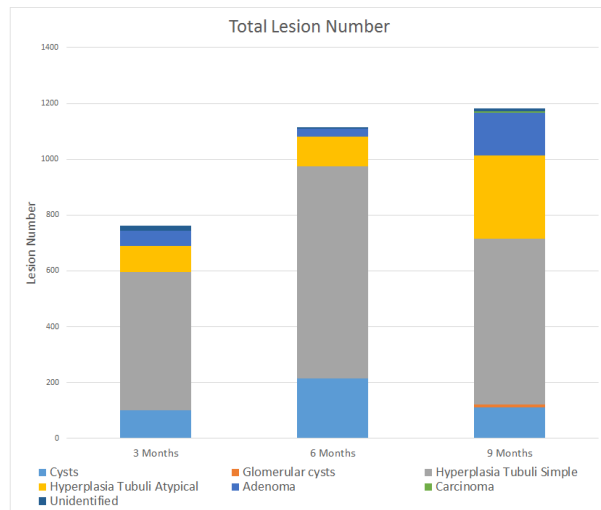
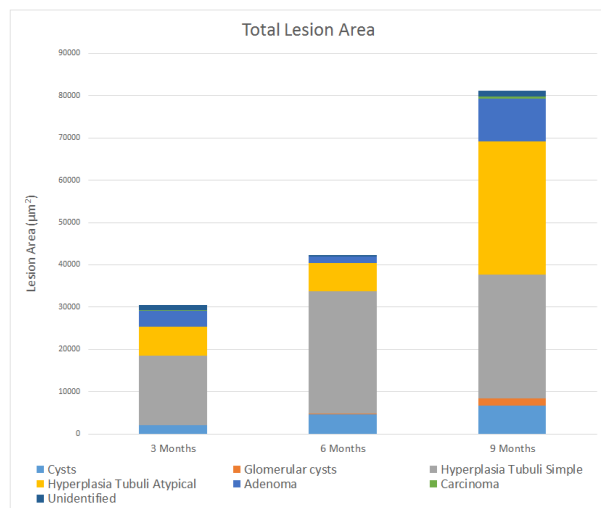
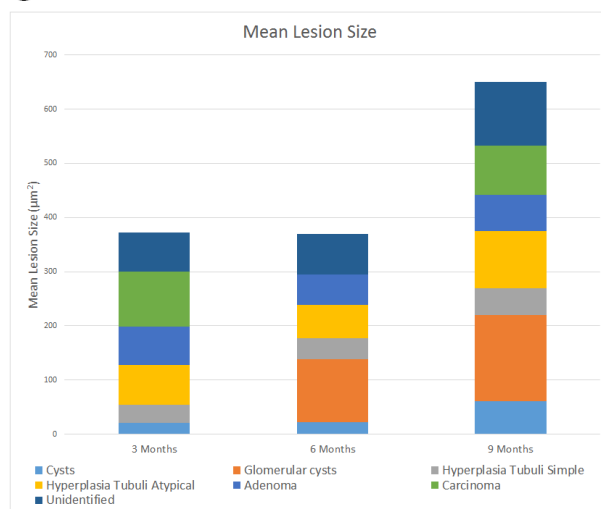
A**B****C**

Figura 29 – Analisi quantitativa del numero e della superficie dei vari tipi di lesione presenti nei topi *Pax8-Notch1* ai vari tempi.

A = Grafico dei numeri totali dei tipi di lesione. B = Grafico della superficie totale dei tipi di lesione.

C = Grafico della dimensione media di ogni tipo di lesione.

4.4 – Studio della clonogenicità nel tumore

Per effettuare l'analisi della clonogenicità delle lesioni, i reni sono stati prelevati agli animali dopo sacrificio ai vari *end-point* sperimentali. Per mantenere inalterato il segnale derivante dalle proteine fluorescenti e analizzare le sezioni tramite microscopio confocale i reni sono stati fissati con paraformaldeide e processati fino al congelamento in azoto liquido.

I reni Pax8-Notch1 selezionati ai vari tempi sono stati quindi tagliati, e le sezioni corrispondenti al piano sagittale dell'organo, quindi con maggior area e con rappresentate tutte le componenti dell'organo, sono state marcate per falloidina e DAPI.

L'intero rene è stato poi acquisito per la ricostruzione computerizzata della sezione (Figura 30). Il segnale del DAPI è stato escluso per permettere una maggiore visibilità dei colori.

Osservando le sezioni appare evidente l'aumento delle dimensioni con il passare del tempo, e le lesioni si concentrano nella zona esterna della midollare esterna, come già descritto nelle analisi istologiche.

La dimensione della dilatazione tubulare e della proliferazione dei tubuli iperplastici, visualizzabile tramite le cellule marcate dal reporter Confetti, raggiungendo dimensioni notevoli nel campione a 9 mesi.

La struttura a 9 mesi risulta sempre più alterata e fibrotica, questo si traduce in una diminuzione dell'espressione dei marcatori fluorescenti nelle strutture più danneggiate, portando a "spegnersi" praticamente tutte le zone del rene tranne un sottile spessore della corticale.

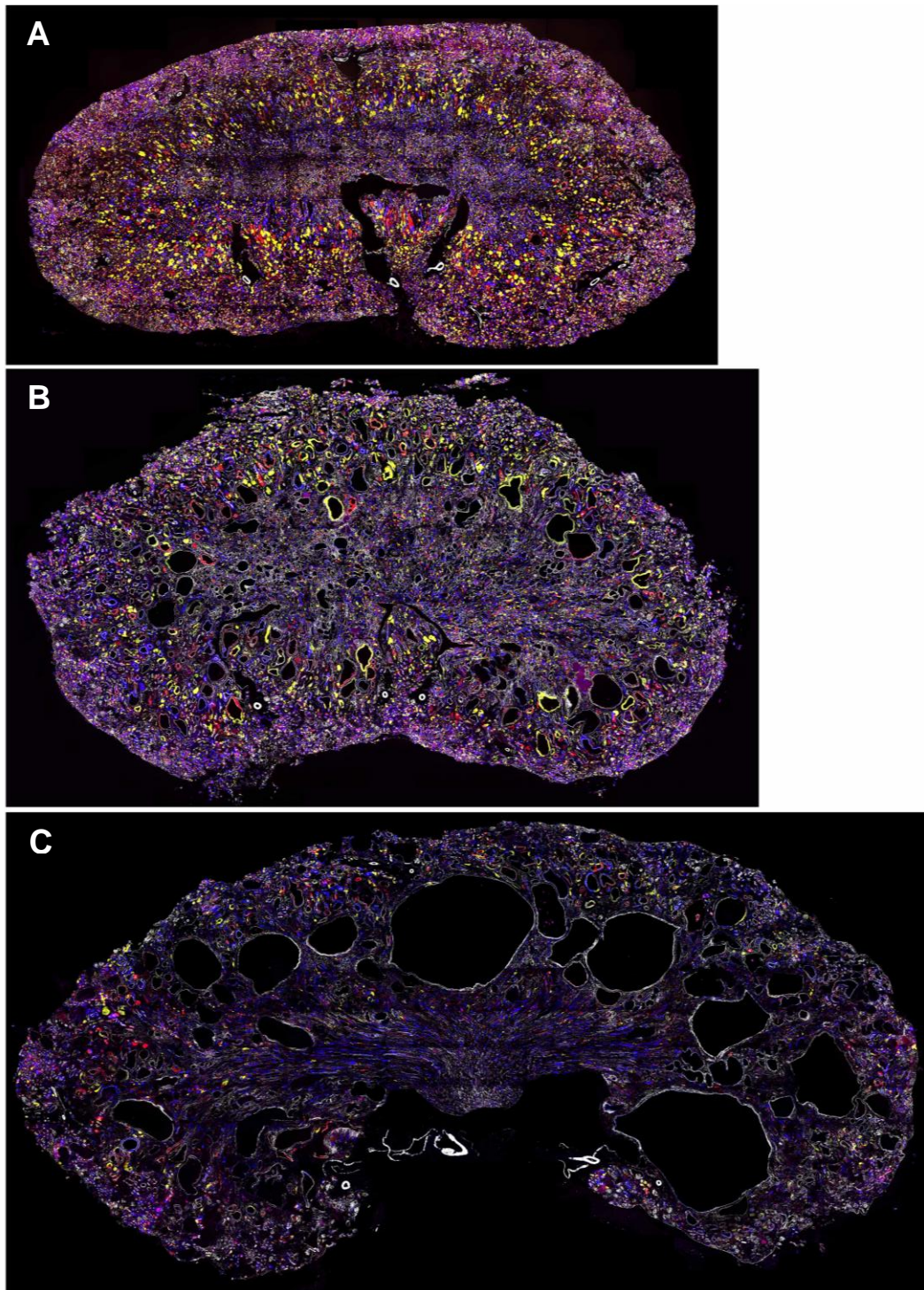


Figura 30 - Immagini panoramiche a confronto. A= Pax8-Notch1 a 3 mesi dall'induzione. B= Pax8-Notch1 a 6 mesi dall'induzione. C= Pax8-Notch1 a 9 mesi dall'induzione. Dopo marcatura con falloidina le immagini acquisite a microscopio confocale a due fotoni, con obiettivo 25X parzialmente sovrapposte, sono state ricostruite al computer e affiancate mantenendone le proporzioni.

E' possibile identificare vari tipi di lesioni come visualizzabile in Figura 31.

Le cisti ci appaiono caratterizzate da un epitelio più sottile. Queste aumentano come presenza e dimensioni nel tempo in modo analogo al tessuto analizzato in istologia con marcatura Ematossilina/Eosina (Figura 31A).

Già a 6 mesi, e maggiormente a 9, appaiono capsule di Bowman iperplastiche e metaplastiche caratterizzate da un epitelio di tipo cuboidale marcato dal reporter Confetti (Figura 3B e 31C). Nella figura 31B, la capsula è formata da cellule di un unico colore, indicando l'origine clonogenica dell'iperplasia. E' interessante notare che le capsule di Bowman sane presentano cellule marcate con il reporter Confetti solo al polo urinario, quindi possiamo ipotizzare che una di queste cellule abbia originato tale proliferazione. Questo è visibile anche in figura 31C, dove vediamo una cisti glomerulare e il polo urinario del glomerulo.

Analogamente, cisti glomerulari di varia dimensione composte da un numero variabile di cloni appaiono diffuse nel tessuto (Figura 31C).

I tubuli iperplastici semplici appaiono spesso composti di cloni di grandi dimensioni (Figura 31D, 31E).

I tubuli iperplastici atipici sono caratterizzati dalla crescita di numerosi strati di cellule e da una superficie del lume frastagliata (Figura 31F, 31G). A volte all'interno del lume si ritrova materiale cellulare come in Figura 31G.

Sono identificabili varie strutture "chiuse" di tipo adenomatoso caratterizzate da un'architettura solida e da una superficie irregolare ricca di invaginazioni identificabile tramite la marcatura nucleare del DAPI (Figura 31H). Interessante è la scomparsa del segnale della falloidina intorno e dentro queste strutture.

Analogamente in quelle che con molta difficoltà nell'analisi al microscopio confocale potrebbero essere alterazioni carcinomatose (Figura 31I) si ha la scomparsa del segnale della falloidina e strutture non riconoscibili. Ma per esserne sicuri servirebbe il parere anatomo-patologico sulle analisi istologiche marcate con ematossilina e eosina.

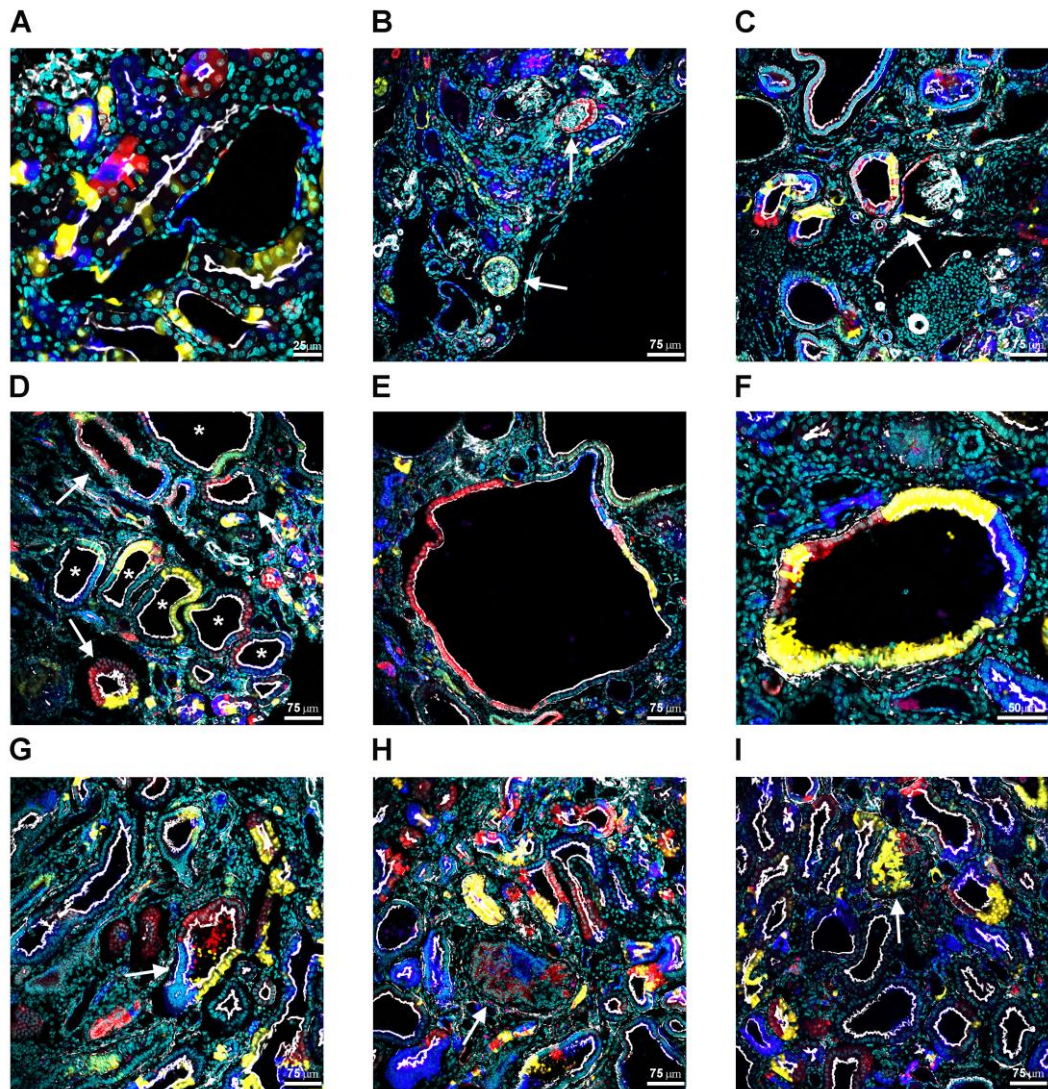


Figura 31 - Immagini rappresentative delle alterazioni. A= Gruppo di cisti tubulari, notare l'epitelio sottile. B= Glomeruli iperplastici e metaplastici, notare l'epitelio cuboidale marcato in giallo e in rosso dalle proteine fluorescenti (freccie). C= Ciste glomerulare, lo spazio di Bowman appare dilatato, il tuft invariato e le cellule della capsula esprimono vari marcatori (freccia indica il polo urinario). D= Gruppo di dilatazioni tubulari, tubuli iperplastici semplici (*) e tubuli iperplastici atipici (freccie). E= Tubulo iperplastico semplice di grandi dimensioni, notare la lunghezza dei cloni. F= Tubulo iperplastico atipico, la superficie interna del tubulo appare frastagliata. G= Tubulo iperplastico atipico con materiale marcato nel lume (freccia). H= Struttura adenomatosa biconale marcata in rosso e blu (freccia), il segnale della falloidina non è visibile. I= Probabile struttura micro carcinomatosa (freccia).

Sono state acquisite immagini per la valutazione della clonogenicità ai vari tempi. Per le lesioni "aperte" come cisti tubulari e tubuli iperplastici, è stato

quantificato il numero dei cloni che componevano ogni lesione. Per ogni clone è stato quantificato il numero di cellule che lo componevano, escludendo dall'analisi i cloni composti da 1 a 3 cellule, derivanti dall'accostamento stocastico di cellule dello stesso colore e non da un'espansione clonogenica, come osservato anche nei topi sani.

L'analisi della lunghezza dei cloni nelle cisti tubulari e tubuli iperplastici rivela un aumento progressivo del numero di cellule che formano i cloni nel tempo (13,43 cellule \pm 1,5 a 3 mesi, 20,84 cellule \pm 2,22 a 6 mesi, 25,95 cellule \pm 2,9 a 9 mesi, $p < 0,001$ tra 3 e 9 mesi) (Figura 32). Questo dato sottolinea la proliferazione clonogenica delle cellule.

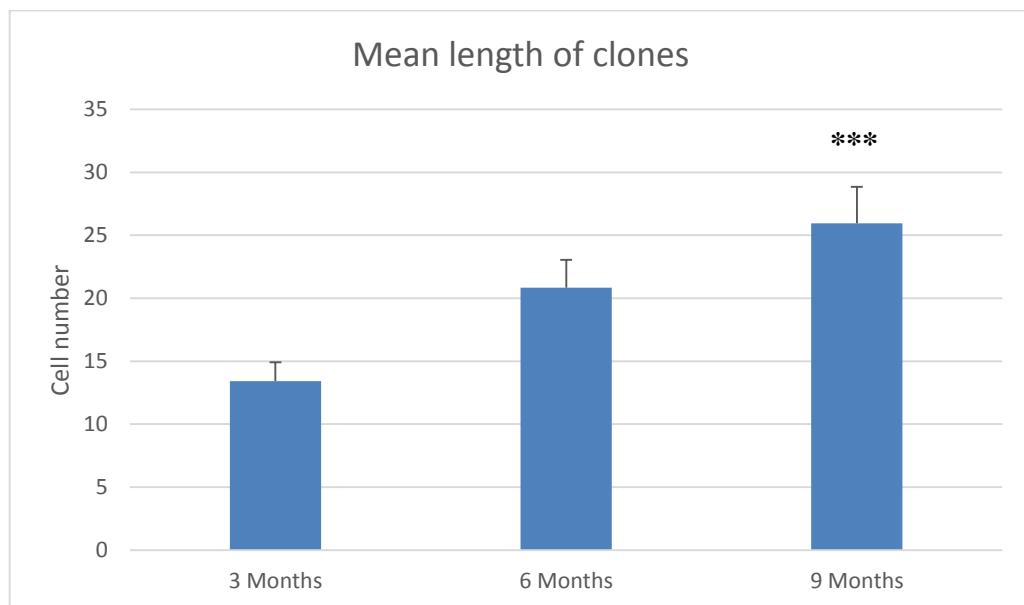


Figura 32 - Grafico rappresentante la lunghezza media dei cloni nelle cisti tubulari e tubuli iperplastici. *** $p < 0,001$ tra 3 e 9 mesi.

Per le lesioni "chiuse" come gli adenomi queste sono state analizzate tramite ImageJ: per ogni lesione è stata valutata l'area e il numero di cloni che la componevano. Non ho tenuto conto del numero dei nuclei in quanto per una corretta analisi di una struttura tridimensionale di tipo adenomatoso dovrebbero essere conteggiate le cellule su più piani della struttura stessa, cosa

che non ho potuto fare nella presente tesi. Inoltre, è interessante notare che il numero di cloni per adenoma non varia significativamente nel tempo (1,69 cloni \pm 0,26 a 3 mesi, 1,88 cloni \pm 0,26 a 6 mesi, 1,90 cloni \pm 0,22 a 9 mesi, differenze non significative n.s.) (Figura 33A), essendo la lesione una struttura solida proliferante sarà originata dalla selezione di un preciso numero di cellule che andranno incontro a proliferazione clonale.

Tuttavia, la superficie media degli adenomi aumenta nel tempo (56,74 $\mu\text{m}^2 \pm$ 9,00 a 3 mesi, 70,72 $\mu\text{m}^2 \pm$ 17,33 a 6 mesi, 85,27 $\mu\text{m}^2 \pm$ 8,41 a 9 mesi, $p < 0.05$ tra 3 e 9 mesi e tra 6 e 9 mesi) (Figura 33B). L'insieme dei dati raccolti suggerisce una proliferazione di tipo clonale prolungata nel tempo.

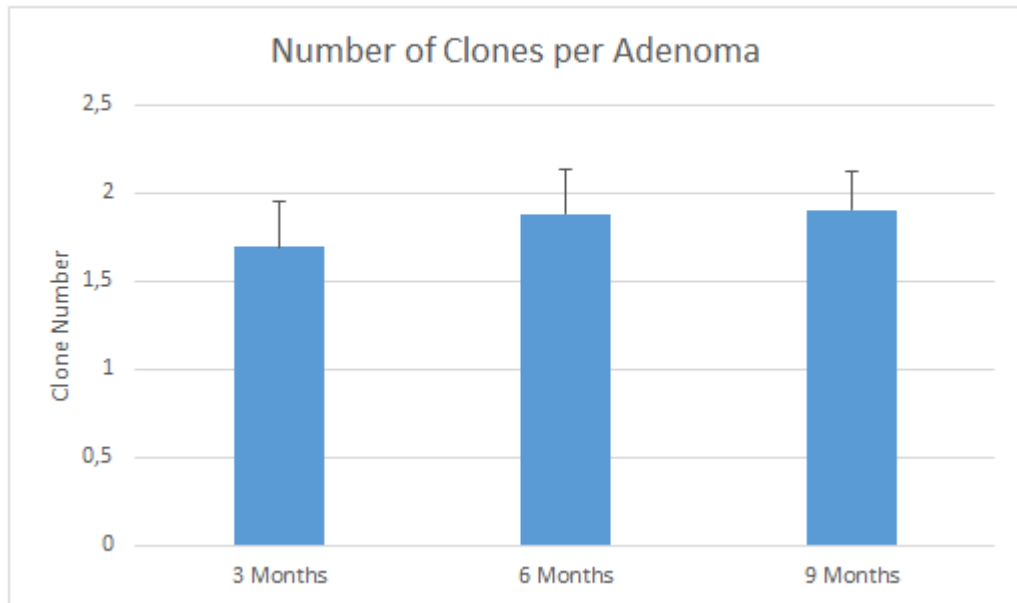
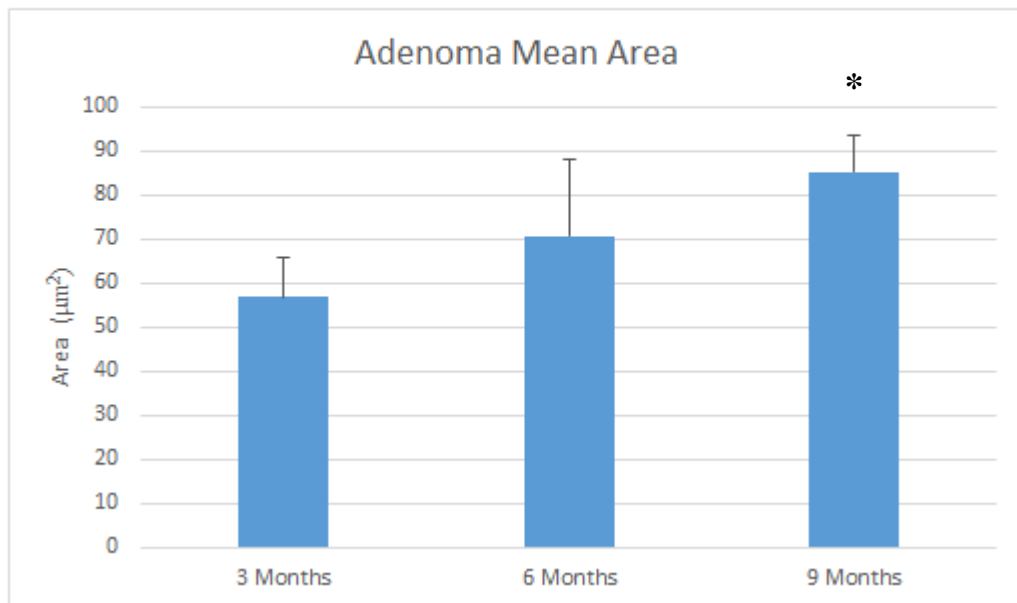
A**B**

Figura 33 – Grafici rappresentante il numero di cloni per adenoma (A) e la superficie media degli adenomi (B) ai vari tempi. In B, * $p < 0,05$ tra 3 e 9 e tra 6 e 9 mesi.

5 – DISCUSSIONE

I meccanismi che regolano la nascita e lo sviluppo tumorale sono spesso difficili da investigare. Ho proposto in questa tesi il nuovo modello murino di tumorigenesi Pax8-rtTA/TetO-Cre/ROSA26-Confetti/ROSA26-Notch1-GFP.

Tramite questo studio ho potuto capire la localizzazione, osservare il fenotipo e la tempistica con cui le cellule del comparto tubulare del rene possono dare origine a lesioni di tipo tumorale, se sottoposte ad un determinato stimolo.

Il transgene ROSA26-Notch1-GFP mima l'effetto dell'attivazione continua della via di segnalazione canonica di Notch1 già vista come centrale nella tumorigenesi in generale e specificatamente nella tumorigenesi renale (225).

Nella progettazione dello studio è stato necessario tenere conto di alcuni fattori:

- Essendo Notch1 fondamentale nello sviluppo embrionale del rene, nello studio è stato basilare attivare il transgene solo nell'esemplare adulto. Il sistema tet On mi ha garantito questa possibilità: è infatti l'operatore a decidere quando attivare il compartimento transgenico, permettendo un controllo temporale.
- Analogamente, dato il coinvolgimento di Notch nella tumorigenesi in altri organi, è stato fondamentale attivarlo solo nell'organo d'interesse evitando che i dati ottenuti fossero falsati da effetti sistemici dovuti allo sviluppo tumorale in altri distretti dell'organismo. Il promotore specifico Pax8-rtTA mi ha garantito un controllo spaziale, confinando l'azione al solo comparto tubulare del rene.

Dalle analisi istologiche dei campioni appare evidente l'effetto dell'attivazione di Notch1 nel gruppo degli animali Pax8-Notch1 indotti, rispetto ai controlli.

I reni degli animali prelevati agli *end-point* sperimentali di 3, 6 e 9 mesi d'invecchiamento dall'induzione appaiono di dimensioni aumentate in maniera proporzionale all'invecchiamento. Data la comparsa già a 3 mesi di

vari tipi di lesioni nella struttura renale degli animali indotti, l'aumento delle dimensioni sembra essere dovuto alle lesioni stesse.

Le lesioni tendono a concentrarsi nella zona esterna della midollare esterna. Questa zona va ad ampliarsi nel tempo, principalmente a discapito della zona corticale che viene a scomparire, alcune lesioni si possono comunque ritrovare anche più in profondità nella zona midollare.

Lo stesso andamento crescente è riscontrabile nell'aumento del numero delle lesioni e della loro complessità.

Ho quindi visto un'evoluzione nella malignità delle lesioni renali a partire dalla semplice dilatazione tubulare fino alla formazione di strutture probabilmente adenocarcinomatose, con una forte compromissione del tessuto circostante, ricco di zone fibrotiche e d'infiltrato derivante da cellule mononucleate di verosimile origine infiammatoria.

Questo dato ci viene complementato anche dal monitoraggio degli animali sperimentali tramite l'analisi dell'azotemia, ovvero della capacità di eliminazione dell'azoto ureico dal sangue, che utilizziamo come misura indiretta della capacità funzionale renale (BUN).

La BUN è in continuo aumento con il passare del tempo negli animali Pax8-Notch1 rispetto ai controlli, correlata ad una minore capacità filtrante dell'organo. Risulta interessante operare due distinzioni principali:

- Gli animali in cui il promotore Pax8 si trova su un solo allele hanno nel tempo una BUN significativamente superiore ai controlli, ma significativamente inferiore agli animali con il transgene in omozigosi. Questo probabilmente dipende dall'attività del transgene che essendo presente in due copie porta a raggiungere il livello soglia necessario per l'attivazione del transgene Notch1-GFP in un numero maggiore di cellule, portando allo sviluppo di un danno maggiore nello stesso periodo temporale.

- Gli animali maschi hanno una BUN media più alta rispetto alle femmine. Questo dato si ricollega alla natura più resistente del sesso femminile allo sviluppo del danno renale come presente in letteratura.

E' interessante riscontrare che l'incidenza annuale del carcinoma a cellule renali è due volte maggiore nei maschi rispetto alle femmine. Il gruppo di lavoro di Yu CP propone sulla base dei dati ottenuti *in vitro* che questa differente incidenza sia ricollegabile alla presenza e all'azione degli estrogeni; nelle linee cellulari di carcinoma a cellule renali che analizzano il trattamento con estrogeni inibisce proliferazione, migrazione e invasione, andando ad aumentare l'apoptosi (253).

Gli estrogeni potrebbero quindi fornire una protezione al rene contro lo sviluppo del danno e rallentare la nascita di alterazioni tubulari di vario grado.

Questa variazione della funzione renale nel tempo con una diminuzione della capacità di filtrazione ai tempi più lunghi ci fornisce la base per ragionare su una possibile linea evolutiva di queste lesioni.

Le lesioni vanno nel tempo ad inasprirsi dilatandosi in cisti tubulari, diventando poi lesioni di tipo proliferante.

I tubuli iperplastici semplici cominciano ad apparire già a 3 mesi insieme ad un numero minore di tubuli iperplastici atipici, il numero dei tubuli semplici aumenta notevolmente a 6 mesi e diminuisce lievemente a 9 mesi a differenza dei tubuli atipici che rimangono stabili a 6 mesi ed aumentano notevolmente a 9. Ciò suggerisce l'esistenza di un meccanismo evolutivo continuo: con l'avanzare del tempo sempre più tubuli vengono a dilatarsi, in seguito progrediscono verso un'alterazione di natura iperplastica, prima semplice e a tempi maggiori atipica caratterizzata dalla crescita cellulare multistrato di tipo papillare; questa evolve poi verso una struttura adenomatosa.

Il sistema ROSA26-Confetti tramite l'acquisizione stocastica irreversibile (di ogni cellula attivata) di una determinata colorazione fluorescente e il mantenimento di questa in tutte le cellule figlie, rende possibile studiare le strutture cellulari interessate nei loro meccanismi di espansione clonogenica. Tramite uno studio di *lineage tracing*, ho potuto investigare come le cellule agiscano e si riproducano nelle lesioni proliferanti causate dall'overespressione di Notch1.

Quelli che ci appaiono sono grandi tratti o intere dilatazioni tubulari di un solo colore. Analogamente per le strutture solide adenomatose si possono riscontrare intere aree mono/bicolori. E' quindi possibile ipotizzare che queste derivino dalla proliferazione nel tempo di solo alcune cellule e che la maggior parte delle lesioni sia di natura clonale. Le cellule sottoposte allo stimolo continuo di Notch1 vanno a selezionarsi e replicandosi formano grandi cloni monocolori.

Ipotizzando che le lesioni viste finora si realizzino non in tutte le cellule tubulari, ma solo in una o più specifiche sottopopolazioni di cellule tubulari Pax8-positive, queste per generare una crescita clonale del tipo ottenuto dovrebbero avere un'aumentata capacità proliferativa che possa essere modulata dall'attivazione di Notch. Tale proprietà è caratteristica delle cellule progenitrici renali. Nel lavoro di Lasagni *et al.* (254) pubblicato nel 2010 è stato dimostrato *in vitro* che l'attivazione di Notch induce la proliferazione di una popolazione di cellule progenitrici umane. È pertanto suggestivo ipotizzare che le lesioni pretumorali e tumorali clonali che si osservano in questo modello sperimentale siano originate da tali progenitori. Ulteriori studi sono necessari per verificare questa ipotesi e sono attualmente in corso. Nel frattempo, i risultati del nostro studio suggeriscono un nuovo modello patogenetico per molteplici lesioni preneoplastiche e neoplastiche di origine renale.

6 – BIBLIOGRAFIA

1. *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. Eble J. N., Sauter G., Epstein J. I., Isabell A. Sesterhenn. Lyon : IARC Press, 2004, IARC Press.
2. *Trends in cancer incidence and mortality*. Coleman MP, Esteve J, Damiecki P, Arslan A, Renard H. 1-806, s.l. : IARC Sci Publ, 1993, Vol. 121.
3. *Cancer Incidence in Five Continents*. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. 155, Lyon : IARC Press, 2003, Vol. IARC Scientific Publications.
4. *At least one in seven cases of cancer is caused by smoking*. Parkin DM, Pisani P, Lopez AD, Masuyer E (1994). 494-504, s.l. : Int J Cancer, 1994, Vol. 59.
5. IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. Lyon : IARC Press, 1987.
6. —. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Hormonal contraception and postmenopausal hormonal therapy. Lyon : IARC Press, 1999.
7. —. IARC Handbooks of Cancer Prevention. Weight control and physical activity. Lyon : IARC Press, 2002.
8. *Birth weight and risk of renal cell cancer*. Bergstrom A, Lindblad P, Wolk A. 1110-1113, s.l. : Kidney Int, 2001, Vol. 59.
9. *Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men*. Chow WH, Gridley G, Fraumeni JF Jr, Jarvholm B. 1305-1311, s.l. : N Engl J Med, 2000, Vol. 343.
10. *Is there an association between hypertension and cancer mortality?* Grossman E, Messerli FH, Boyko V, Goldbourt U. 479-486, s.l. : Am J Med, 2002, Vol. 112.
11. *Hypertension, obesity and their medications in relation to renal cell carcinoma*. Yuan JM, Castela JE, Gago-Dominguez M, Ross RK, Yu MC. 1508-1513, s.l. : Br J Cancer, 1998, Vol. 77.
12. *Family history and risk of renal cell carcinoma*. Gago-Dominguez M, Yuan JM, Castela JE, Ross RK, Yu MC. 1001-1004, s.l. : Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, Vol. 10.
13. *Birth weight and risk of renal cell cancer*. Bergstrom A, Lindblad P, Wolk A. 1110-1113, s.l. : Kidney Int, 2001, Vol. 59.
14. Research, World Cancer Research Fund in Association with American Institute for Cancer. Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington, DC : WCRF, 1997.
15. *Gene-environment interactions in renal cell carcinoma*. Semenza JC, Ziogas A, Largent J, Peel D, Anton-Culver H. 851-859, s.l. : Am J Epidemiol, 2001, Vol. 153.
16. *Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms as risk factors for renal cell carcinoma: a case-control study*. Sweeney C, Farrow DC, Schwartz SM, Eaton DL, Checkoway H, Vaughan TL. 449-454, s.l. : Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2000, Vol. 9.
17. *Manifestations of renal cell carcinoma*. Gibbons RP, Monte JE, Correa RJJr, Mason JT. 201-206, s.l. : Urology, 1976, Vol. 8.
18. *Erythrocyte sedimentation rates in patients with renal cell carcinoma*. Donmez T, Kale M, Ozyurek Y, Atalay H. 51-52, s.l. : Eur Urol, 1992, Vol. 21 Suppl 1.
19. *Systemic effects of hypernephroma*. Cherukuri SV, Jochenning PW, Ram MD. 93-97, s.l. : Urology, 1977, Vol. 10.
20. *Paraneoplastic manifestations of renal cell carcinoma*. Gold PJ, Fefer A, Thompson JA. 855-858, s.l. : Semin Urol Oncol, 1996, Vol. 117.
21. Laski ME, Vugrin D. Paraneoplastic syndromes in hypernephroma. s.l. : Semin Nephrol, 1987. Vol. 7, 123-130.
22. Lipponen P, Eskelinen M. Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long-term prognosis. s.l. : Br J Cancer, 1994. Vol. 69, 1120-1125.
23. Delahunt B, Thornton A. Renal cell carcinoma. A historical perspective. s.l. : J Urol Pathol, 1996. Vol. 4, 31-49.
24. Cornil, Ranvier. *Special pathological histology*. London : Smith Elder, 1886. Vol II, 551.
25. *The Heidelberg classification of renal cell tumours*. Kovacs G, Akhta rM, Beckwith JB, et al. 131-133, s.l. : J Pathol., 1997, Vol. 183.
26. *Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC)*. Störkel S, Eble JN, Adlakha K, et al. 987-989, s.l. : Cancer, 1997, Vol. 80.
27. *The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia*. Srigley JR, Delahunt B, Eble JN, Egevad L, Epstein JI, Grignon D, Hes O, Moch H, Montironi R, Tickoo SK, Zhou M, Argani P, and The ISUP Renal Tumor Panel. 10, s.l. : Am J Surg Pathol, 2013 October, Vol. 37.
28. *Renal neoplasia and acquired cystic kidney disease in patients receiving long-term dialysis*. Hughson MD, Buchwald D, Fox M. 592-601, s.l. : Arch Pathol Lab Med, 1986, Vol. 110.

29. *DNA ploidy pattern in papillary renal cell carcinoma. Correlation with clinicopathological parameters and survival.* del Vecchio MT, Lazzi S, Bruni A, Mangiavacchi P, Cevenini G, Luzi P. 325-333, s.l. : Pathol Res Pract, 1998, Vol. 194.
30. *The small tumor-like lesions of the kidney.* Reese AJM, Winstanley DP. 507-516, s.l. : Br J Cancer, 1958, Vol. 12.
31. *Renal oncocytoma: a reappraisal of morphologic features with clinicopathologic findings in 80 cases.* Amin MB, Crotty TB, Tickoo SK, Farrow GM. 1-12, s.l. : Am J Surg Pathol, 1997, Vol. 21.
32. *Renal oncocytoma. A clinicopathologic study.* Choi H, Almagro UA, McManus JT, Norback DH, Jacobs SC. 1887-1896, s.l. : Cancer, 1983, Vol. 51.
33. *Renal oncocytoma. Clinicopathological study of 166 patients.* Davis CJ Jr, Mostofi FK, Sesterhenn IA, Ho CK. 41-52, s.l. : J Urogen Pathol, 1991, Vol. 1.
34. *Renal oncocytoma: a clinicopathologic study of 70 cases.* Perez-Ordóñez B, Hamed G, Campbell S, Erlandson RA, Russo P, Gaudin PB, Reuter VE. 871-883, s.l. : Am J Surg Pathol, 1997, Vol. 21.
35. *Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases.* Delahunt B, Eble JN, McCredie MR, Bethwaite PB, Stewart JH, Bilous AM. 590-595, s.l. : Hum Pathol, 2001, Vol. 32.
36. *Analysis of papillary renal adenocarcinoma.* Mydlo JH, Bard RH. 529-534, s.l. : Urology, 1987, Vol. 30.
37. *Papillary (chromophil) renal cell carcinoma: histomorphologic characteristics and evaluation of conventional pathologic prognostic parameters in 62 cases.* Amin MB, Corless CL, Renshaw AA, Tickoo SK, Kubus J, Schultz DS. 621-635, s.l. : Am J Surg Pathol, 1997, Vol. 21.
38. *Papillary renal cell carcinoma: a clinical, radiologic, and pathologic study of 34 cases.* Mancilla-Jimenez R, Stanley RJ, Blath RA. 2469-2480, s.l. : Cancer, 1976, Vol. 38.
39. *Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors.* Delahunt B, Eble JN. 537-544, s.l. : Mod Pathol, 1997, Vol. 10.
40. *Solid variants of papillary (chromophil) renal cell carcinoma: clinicopathologic and genetic features.* Renshaw AA, Zhang H, Corless CL, Fletcher JA, Pins MR. 1203-1209, s.l. : Am J Surg Pathol, 1997, Vol. 21.
41. *Synchronous bilateral renal cell carcinoma: total surgical excision.* Jacobs SC, Berg SI, Lawson RK. 2341-2345, s.l. : Cancer, 1980, Vol. 46.
42. JL, Bennington. *Tumors of the kidney.* In: Surgical Pathology of Urologic disease. Baltimore : In: Surgical Pathology of Urologic Williams and Wilkins, 1987.
43. *Renal cell carcinoma with heterotopic bone formation. Case report and review of the Japanese literature.* Fukuoka T, Honda M, Namiki M, Tada Y, Matsuda M, Sonoda T. 458-160, s.l. : Urol Int, 1987, Vol. 42.
44. *Cystic renal tumors: new entities and novel concepts.* H, Moch. 209-214, s.l. : Adv Anat Pathol, 2010, Vol. 17.
45. *Multilocular cystic renal cell carcinoma: clinicopathological features and preoperative prediction using multiphase computed tomography.* You D, Shim M, Jeong IG, et al. 1444-1449, s.l. : BJU Int, 2011, Vol. 108.
46. *VHL mutations and dysregulation of pVHL- and PTEN-controlled pathways in multilocular cystic renal cell carcinoma.* von Teichman A, Compe´rat E, Behnke S, et al. 571-578, s.l. : Mod Pathol, 2011, Vol. 24.
47. *Chromophobe cell renal carcinoma: clinicopathological features of 50 cases.* Crotty TB, Farrow GM, Lieber MM. 964-967, s.l. : J Urol, 1995, Vol. 154.
48. *Chromophobe cell renal carcinoma and its variants—a report on 32 cases.* Thoenes W, Storkel S, Rumpelt HJ, Moll R, Baum HP, Werner S. 277-287, s.l. : J Pathol, 1988, Vol. 155.
49. *Birt-Hogg-Dube syndrome: clinicopathologic findings and genetic alterations.* Adley BP, Smith ND, Nayar R, et al. 1865-1870, s.l. : Arch Pathol Lab Med, 2006, Vol. 130.
50. *Hybrid tumour ‘oncocytoma-chromophobe renal cell carcinoma’ of the kidney: a report of seven sporadic cases.* Delongchamps NB, Galmiche L, Eiss D, et al. 1381-1384, s.l. : BJU Int, 2009, Vol. 103.
51. *Sporadic hybrid oncocytic/chromophobe tumor of the kidney: a clinicopathologic, histomorphologic, immunohistochemical, ultrastructural, and molecular cytogenetic study of 14 cases.* Gobbo S, Eble JN, Delahunt B, et al. 620-626, s.l. : Am J Surg Pathol, 2010, Vol. 34.
52. *Hybrid chromophobe renal cell neoplasm.* Mai KT, Dhamanaskar P, Belanger E, et al. 385-389, s.l. : Pathol Res Pract, 2005, Vol. 201.
53. *Renal tumors in the Birt-Hogg-Dube syndrome.* Pavlovich CP, Walther MM, Eyler RA, et al. 1542-1552, s.l. : Am J Surg Pathol, 2002, Vol. 26.

54. *Sporadic hybrid oncocytic/chromophobe tumor of the kidney: a clinicopathologic, histomorphologic, immunohistochemical, ultrastructural, and molecular cytogenetic study of 14 cases.* Petersson F, Gatalica Z, Grossmann P, et al. 355-365, s.l. : Virchows Arch, 2010, Vol. 456.
55. *Renal oncocytosis: a morphologic study of fourteen cases.* Tickoo SK, Reuter VE, Amin MB, et al. 1094-1101, s.l. : Am J Surg Pathol, 1999, Vol. 23.
56. *Hybrid renal cell carcinomas containing histopathologic features of chromophobe renal cell carcinomas and oncocytomas have excellent oncologic outcomes.* Waldert M, Klatte T, Haitel A, et al. 661-665, s.l. : Eur Urol, 2010, Vol. 57.
57. *Renal oncocytomatosis.* Warfel KA, Eble JN. 1179-1180, s.l. : J Urol, 1982, Vol. 127.
58. *The genetics of renal oncocytosis: a possible model for neoplastic progression.* Al-Saleem T, Cairns P, Dulaimi EA, et al. 23-28, s.l. : Cancer Genet Cytogenet, 2003, Vol. 152.
59. *Interphase cytogenetic analysis with centromeric probes for chromosomes 1, 2, 6, 10, and 17 in 11 tumors from a patient with bilateral renal oncocytosis.* Cossu-Rocca P, Eble JN, Zhang S, et al. 498-504, s.l. : Mod Pathol, 2008, Vol. 21.
60. *Renal oncocytosis presenting in childhood: a case report.* Chen TS, McNally M, Hulbert W, et al. 325-329, s.l. : Int J Surg Pathol, 2003, Vol. 11.
61. *Collecting duct carcinoma of kidney.* Strigley JR, Eble JN. 54-67, s.l. : Semin Diagn Pathol, 1998, Vol. 15.
62. *Collecting duct carcinoma of the kidney.* Fleming S, Lewi HJ. 1131-1141, s.l. : Histopathology, 1986, Vol. 10.
63. —. Kennedy SM, Merino MJ, Linehan WM, Roberts JR, Robertson CN, Neumann RD. 449-456, s.l. : Hum Pathol, 1990, Vol. 21.
64. *Bellini duct carcinoma: further evidence for this rare variant of renal cell carcinoma.* Rumpelt HJ, Storkel S, Moll R, Scharfe T, Thoenes W. 115-122, s.l. : Histopathology, 1991, Vol. 18.
65. *Renal medullary carcinoma. The seventh sickle cell nephropathy.* Davis CJ Jr, Mostofi FK, Sesterhenn IA. 1-11, s.l. : Am J Surg Pathol, 1995, Vol. 19.
66. *Renal medullary carcinoma: sonographic, computed tomography, magnetic resonance and angiographic findings.* Khan A, Thomas N, Costello B, Jobling L, de Kretser D, Broadfield E, O'Shea S. 1-7, s.l. : Eur J Radiol, 2000, Vol. 35.
67. *Mitf and Tfe3: members of a b-HLH-ZIP transcription factor family essential for osteoclast development and function.* Hershey CL, Fisher DE. 689-696, s.l. : Bone, 2004, Vol. 34.
68. *MiT family traslocation renal cell carcinoma.* P, Agrani. 103-113, s.l. : Seminars in Diagnostic Pathology, 2015, Vol. 32.
69. *PRCC-TFE3 renal carcinomas: Morphologic, immunohistochemical, ultrastructural, and molecular analysis of an entity associated with the t(X;1)(p11.2;q21).* Argani P, Antonescu CR, Couturier J, et al. 1553-1566, s.l. : Am J Surg Pathol, 2002, Vol. 26.
70. *Primary renal neoplasms with the ASPL-TFE3 gene fusion of alveolar soft part sarcoma: a distinctive tumor entity previously included among renal cell carcinomas of children and adolescents.* Argani P, Antonescu CR, Illei PB, et al. 179-192, s.l. : Am J Pathol, 2001, Vol. 159.
71. *The der(17)t(X;17) (p11;q25) of human alveolar soft part sarcoma fuses the TFE3 transcription factor gene to ASPL, a novel gene at 17q25.* Ladanyi M, Lui MY, Antonescu CR, et al. 48-57, s.l. : Oncogene, 2001, Vol. 20.
72. *Fusion of splicing factor genes PSF and NonO (p54nrb) to the TFE3 gene in papillary renal cell carcinoma.* Clark J, Lu YJ, Sidhar SK, et al. 2233-2239, s.l. : Oncogene, 1997, Vol. 15.
73. *A novel CLTC-TFE3 gene fusion in pediatric renal adenocarcinoma with t(X;17)(p11.2;q23).* Argani P, Lui MY, Couturier J, et al. 5374-5378, s.l. : Oncogene, 2003, Vol. 22.
74. *Xp11 translocation renal cell carcinoma in adults: expanded clinical, pathologic, and genetic spectrum.* Argani P, Olgac S, Tickoo SK, et al. 1149-1160, s.l. : Am J Surg Pathol, 2007, Vol. 31.
75. *Adult Xp11 translocation renal cell carcinoma diagnosed by cytogenetics and immunohistochemistry.* Komai Y, Fujiwara M, Fujii Y, et al. 1170-1176, s.l. : Clin Cancer Res, 2009, Vol. 15.
76. *Dual-color, break-apart FISH assay on paraffin-embedded tissues as an adjunct to diagnosis of Xp11 translocation renal cell carcinoma and alveolar soft part sarcoma.* Zhong M, De Angelo P, Osborne L, et al. 757-766, s.l. : Am J Surg Pathol, 2010, Vol. 34.
77. *Translocation carcinomas of the kidney after chemotherapy in childhood.* Argani P, Lae´ M, Ballard ET, et al. 1529-1534, s.l. : J Clin Oncol, 2006, Vol. 24.
78. *A distinctive pediatric renal neoplasm characterized by epithelioid morphology, basement membrane production, focal HMB45 immunoreactivity, and t(6;11)(p21.1;q12) chromosome translocation.* Argani P, Hawkins A, Griffin CA, et al. 2089-2096, s.l. : Am J Pathol, 2001, Vol. 158.

79. *Renal carcinomas with the t(6;11)(p21;q12). Clinicopathologic features and demonstration of the specific Alpha-TFEB gene fusion by immunohistochemistry, RT-PCR, and DNA-PCR.* Argani P, Lae´ M, Hutchinson B, et al. 230-240, s.l. : Am J Surg Pathol, 2005, Vol. 29.
80. *Molecular confirmation of the t(6;11)(p21;q12) renal cell carcinomas in archival paraffinembedded material using a break-apart TFEB FISH assay expands its clinicopathologic spectrum.* Argani P, Yonescu R, Morsberger L, et al. 1516-1526, s.l. : Am J Surg Pathol, 2012, Vol. 36.
81. *Renal translocation carcinomas: clinicopathologic, immunohistochemical, and gene expression profiling analysis of 31 cases with a review of the literature.* Camparo P, Vasiliu V, Molinie V, et al. 656-670, s.l. : Am J Surg Pathol, 2008, Vol. 32.
82. *Cloning of an Alpha-TFEB fusion in renal tumors harboring the t(6;11)(p21;q13) chromosome translocation.* Davis IJ, Hsi BL, Arroyo JD, et al. 6051-6056, s.l. : Proc Natl Acad Sci USA, 2003, Vol. 100.
83. *Diverse fusion patterns and heterogeneous clinicopathologic features of renal cell carcinoma with t(6;11) translocation.* Inamura K, Fujiwara M, Togashi Y, et al. 35-42, s.l. : Am J Surg Pathol, 2012, Vol. 36.
84. *Upregulation of the transcription factor TFEB in t(6;11)(p21;q13)-positive renal cell carcinomas due to promoter substitution.* Kuiper RP, Schepens M, Thijssen J, et al. 1661-1669, s.l. : Hum Mol Genet, 2003, Vol. 12.
85. *Metachronous renal cell carcinoma in a child cured of neuroblastoma.* Kato K, Ijiri R, Tanaka Y, Kigasawa H, Toyoda Y, Senga Y. 423-433, s.l. : Med Pediatr Oncol, 1999, Vol. 33.
86. *Long-term urological complications in survivors younger than 15 months of advanced stage abdominal neuroblastoma.* Koyle MA, Hatch DA, Furness PD3rd, Lovell MA, Odom LF, Kurzrock EA. 1455-1458, s.l. : J Urol, 2001, Vol. 166.
87. *Anaplastic renal cell carcinoma following neuroblastoma.* Krigman HR, Bentley RC, Strickland DK, Miller CR, Dehner LP, Washington K. 52-59, s.l. : Med Pediatr Oncol, 1995, Vol. 25.
88. *Risk of second tumors in survivors of childhood cancer.* Li FP, Cassady JR, Jaffe N. 1230-1235, s.l. : Cancer, 1975, Vol. 35.
89. *Oncocytoid renal cell carcinoma after neuroblastoma: a report of four cases of a distinct clinicopathologic entity.* Medeiros LJ, Palmedo G, Krigman HR, Kovacs G, Beckwith JB. 772-780, s.l. : Am J Surg Pathol, 1999, Vol. 23.
90. *Radiation induced renal cell cancer: a report of 4 cases and review of the literature.* Vogelzang NJ, Yang X, Goldman S, Vijayakumar S, Steinberg G. 1987-1990, s.l. : J Urol, 1998, Vol. 160.
91. *Low-grade myxoid renal epithelial neoplasms with distal nephron differentiation.* Parwani AV, Husain AN, Epstein JI, Beckwith JB, Argani P. 506-512, s.l. : Hum Pathol, 2001, Vol. 32.
92. *Phenotypic, molecular and ultrastructural studies of a novel low-grade renal epithelial neoplasm possible related to the loop of Henle.* Srigley J, Kapusta L, Reuter V, Amin M, Grignon DJ, Eble JN, Weber A, Moch H. 182A, s.l. : Mod Pathol, 2002, Vol. 15.
93. *Murphy WM, Beckwith JB, Farrow GM. Atlas of Tumor Pathology Fascicle 11, Tumors of the Kidney, Bladder and Related Urinary Structures.* Washington, DC : Armed Forces Institute of Pathology, 1994.
94. *Low-grade collecting duct carcinoma of the kidney: report of 13 cases of low-grade mucinous tubulocystic renal carcinoma of possible collecting duct origin.* MacLennan GT, Farrow GM, Bostwick DG. 679-684, s.l. : Urology, 1997, Vol. 50.
95. *Tubulocystic carcinoma of the kidney: a new entity among renal tumors.* Azoulay S, Viellefond A, Paraf F, et al. 905-909, s.l. : Virchows Arch, 2007, Vol. 451.
96. *Tubulocystic carcinoma of the kidney; clinicopathologic and molecular characterization.* Yang XJ, Zhou M, Hes O, et al. 177-187, s.l. : Am J Surg Pathol, 2008, Vol. 32.
97. *Tubulocystic carcinoma of the kidney; clinicopathologic analysis of 31 cases of a distinctive rare subtype of renal cell carcinoma.* Amin MB, MacLennan GT, Gupta R, et al. 384-392, s.l. : Am J Surg Patol, 2009, Vol. 33.
98. *Renal Tubulocystic carcinoma is closely related to papillary renal cell carcinoma: implications for pathologic classification.* Zhou M, Yang XJ, Lopez JI, et al. 1840-1849, s.l. : Am J Surg Pathol, 2009, Vol. 33.
99. *Spectrum of epithelial neoplasms in end-stage renal disease: an experience from 66 tumor-bearing kidneys with emphasis on histologic patterns distinct from those in sporadic adult renal neoplasia.* Tickoo SK, dePeralta-Venturina MN, Harik LR, et al. 141-153, s.l. : Am J Surg Pathol, 2006, Vol. 30.
100. *Differential diagnosis of renal tumors with papillary architecture.* Tickoo SK, Reuter VE. 120-132, s.l. : Adv Anat Pathol, 2011, Vol. 18.

101. *Renal cell carcinoma in patients with end-stage renal disease: relationship between histological type and duration of dialysis.* Nouh MA, Kuroda N, Yamashita M, et al. 620-627, s.l. : BJU Int, 2010, Vol. 105.
102. *Renal cell carcinomas in haemodialysis patients: does haemodialysis duration influence pathological cell types and prognosis?* Sassa N, Hattori R, Tsuzuki T, et al. 1677-1682, s.l. : Nephrol Dial Transplant, 2011, Vol. 26.
103. *Renal-cell carcinomas in end-stage kidneys: a clinicopathological study with emphasis on clear-cell papillary renal-cell carcinoma and acquired cystic kidney disease-associated carcinoma.* Bhatnagar R, Alexiev BA. 19-28, s.l. : Int J Surg Pathol, 2012, Vol. 20.
104. *Clear cell papillary renal cell carcinoma: a distinct histopathologic and molecular genetic entity.* Gobbo S, Eble JN, Grignon DJ, et al. 1239-1245, s.l. : Am J Surg Pathol, 2008, Vol. 32.
105. *Clear cell tubulopapillary renal cell carcinoma: a study of 36 distinctive low-grade epithelial tumors of the kidney.* Aydin H, Chen L, Cheng L, et al. 1608-1621, s.l. : Am J Surg Pathol, 2010, Vol. 34.
106. *Clear-cell papillary renal cell carcinoma: 24 cases of a distinct low-grade renal tumour and a comparative genomic hybridization array study of seven cases.* Adam J, Couturier J, Molinie V, et al. 1064-1071, s.l. : Histopathology, 2011, Vol. 58.
107. *Clear-cell papillary renal cell carcinoma: molecular and immunohistochemical analysis with emphasis on the von Hippel-Lindau gene and hypoxia-inducible factor pathway-related proteins.* Rohan SM, Xiao Y, Liang Y, et al. 1207-1220, s.l. : Mod Pathol, 2011, Vol. 24.
108. *Clear cell renal cell carcinoma with focal renal angiomyomatous tumorlike area.* Kuroda N, Hosokawa T, Michal M, et al. 202-206, s.l. : Ann Diagn Pathol, 2011, Vol. 15.
109. *Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer: a syndrome associated with an aggressive form of inherited renal cancer.* Grubb RL, Franks ME, Toro J, et al. 2074-2079, s.l. : J Urol, 2007, Vol. 177.
110. *The morphologic spectrum of kidney tumors in hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma (HLRCC) syndrome.* Merino MJ, Torres-Cabala C, Pinto P, et al. 1578-1585, s.l. : Am J Surg Pathol, 2007, Vol. 31.
111. SW, Barthold. *Chronic progressive nephropathy rat. Monographs on Pathology of Laboratory Animals. Urinary System.* Berlin : Springer-Verlag, 1998.
112. *A contemporary overview of chronic progressive nephropathy in the laboratory rat, and its significance for human risk assessment.* Hard GC, Khan KN. 171-180, s.l. : Toxicol Pathol, 2004, Vol. 32.
113. *Proliferative lesions of the kidney in rats.* Hard GC, Alden CL, Stula EF, Trump BF. 1-19, s.l. : TP/ARP/AFIP, 1995, Vol. Guides for Toxicologic Pathology.
114. *Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Urinary System.* al., Frazier KS et. 14s-86s, s.l. : Toxicologic Pathology, 2012, Vol. 40.
115. —, Frazier KS, Seely JC, Hard GC, Graham B, et al. 14s-86s, s.l. : Toxicologic Pathology, 2012, Vol. 40.
116. *Lithium-induced uremia in rats. Survival and renal function and morphology after one year.* Christensen S, Ottensen PD. 339-347, s.l. : Acta Pharmacol Toxicol, 1986, Vol. 58.
117. *The pathophysiology of acute renal failure.* N, Lameire. 197-210, s.l. : Crit Care Clinics, 2005, Vol. 21.
118. *Pathogenesis of human cystic renal disease.* Jr, Gardner KD. 185-191, s.l. : Ann Rev of Med, 1988, Vol. 39.
119. *The pathophysiology of acute renal failure.* N, Lameire. 197-210, s.l. : Crit Care Clinics, 2005, Vol. 21.
120. *Polycystic renal disease: A new experimental model.* Perey DYE, Herdman RC, Good RA. 494-496, s.l. : Science, 1967, Vol. 158.
121. *Development of polycystic kidney disease in juvenile cystic kidney mice: Insights into pathogenesis, ciliary abnormalities, and common features with human disease.* Smith LA, Bukanov NO, Husson H, Russo RJ, Barry TC, Taylor AL, Beier DR, Ibraghimov-Beskrovnaya O. 2821-2831, s.l. : J Am Soc Nephrol, 2006, Vol. 17.
122. Gopinath C, Prentice DE, Lewis DJ. *The Urinary System. In: Atlas of Experimental Toxicologic Pathology.* Norwell, MA : MTP Press, 1987.
123. *Recommendations for the interpretation of renal tubule proliferative lesions occurring in rat kidneys with advanced chronic progressive nephropathy (CPN).* Hard GC, Seely JC. 641-649, s.l. : Toxicol Pathol, 2005, Vol. 33.
124. *Spontaneous nephropathies in rats.* Peter CP, Burek JD, Van Zwieten MJ. 91-100, s.l. : Toxicol Pathol, 1986, Vol. 14.
125. *The renal cortical interstitium: Morphological and functional aspects.* Kaissling B, Le Hir M. 247-262, s.l. : Histochem Cell Biol, 2008, Vol. 130.

126. *Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis.* Yang J, Liu Y. 1465-1475, s.l. : Am J Pathol, 2001, Vol. 159.
127. *Molecular insights into renal interstitial fibrosis.* AA, Eddy. 2495-2508, s.l. : J Am Soc Nephrol, 1996, Vol. 7.
128. *Connective tissue growth factor expression in the rat remnant kidney model and association with tubular epithelial cells undergoing transdifferentiation.* Frazier KS, Dube P, Paredes A, Styer E. 328-335, s.l. : Vet Pathol, 2000, Vol. 37.
129. *Sequential cellular changes during chemical carcinogenesis.* P, Bannasch. 11-16, s.l. : J Cancer Res Clin Oncol, 1984, Vol. 108.
130. Frith CH, Terracini B, Turusov VS. *Tumours of the kidney, renal pelvis and ureter. In Pathology of Tumours in Laboratory Animals, Vol. 2, Tumours of the Mouse.* Lyon : IARC Scientific Publications, 1994.
131. *High-frequency, single-dose model of renal adenoma/carcinoma induction using dimethylnitrosamine in Crl:(W)BR rats.* GC, Hard. 1047-1050, s.l. : Carcinogenesis, 1984, Vol. 5.
132. *Identification of a high frequency model for renal carcinoma by the induction of renal tumors in the mouse with a single dose of streptozotocin.* GC, Hard. 1551-1558, s.l. : Carcinogenesis, 1985, Vol. 6.
133. *Collecting duct origin of rat renal clear cell tumors.* Nogueira E, Klimek F, Weber E, Bannasch P. 275-283, s.l. : Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Path, 1989, Vol. 57.
134. *Cellular origin of rat renal oncocytoma.* Nogueira E, Bannasch P. 337-343, s.l. : Lab Invest, 1988, Vol. 59.
135. *Renal oncocytoma: Renlund, R. C., Barsoum, N. J., and Smith, G. S. (1992).* Zerban H, Nogueira E, Riedasch G, Bannasch P. 375-387, s.l. : Virchows Arch B (Cell Pathol), 1987, Vol. 52.
136. *Preneoplastic lesions in rodent kidney induced spontaneously or by non-genotoxic agents: Predictive nature and comparison to lesions induced by genotoxic carcinogens.* Dietrich DR, Swenberg JA. 239-260, s.l. : Mutation Res, 1991, Vol. 248.
137. *Morphologic characteristics of benign and malignant renal cell tumors in control and 2-acetylaminofluorenetreated BALB/c female mice.* Shinohara Y, Frith CH. 455-468, s.l. : Am J Pathol, 1980, Vol. 100.
138. Alden CL, Hard GC, Krieg K, Takahashi M, Turusov VS. *International classification of rodent tumours, Part 1: The Rat, 3: Urinary System.* Lyon : IARC Scientific Publications, 1992.
139. Hard GC, Durchfeld-Meyer B, Short B, Bube K, Krieg K, Creasey D, Everitt J, Frith CH, Glaister J, Seely JC, Tsuda H, Turusov VS. *Urinary system. In International Classification of Rodent Tumors. The Mouse.* Berlin : Springer-Verlag, 2001.
140. Montgomery CA, Seely JC. *Kidney. In Pathology of the Fischer Rat. Reference and Atlas.* San Diego : Academic Press, 1990.
141. GC, Hard. *Tumours of the kidney, renal pelvis and ureter. In Pathology of Tumours in Laboratory Animals, Vol. 1, Tumours of the Rat.* Lyon : ARC Scientific Publications, 1990.
142. JC, Seely. *Kidney. In Pathology of the Mouse. Reference and Atlas.* Vienna : Cache River Press, 1999.
143. B, Sass. *Adenoma, adenocarcinoma, kidney, mouse. In Monographs on Pathology of Laboratory Animals. Urinary System.* Berlin : Springer-Verlag, 1988.
144. *Mechanisms of chemically induced renal carcinogenesis in the laboratory rodent.* GC, Hard. 104-112, s.l. : Toxicol Pathol, 1998, Vol. 26.
145. *SnapShot: notch signaling pathway.* Ilagan MX, Kopan R. 1246, s.l. : Cell, 2007, Vol. 128.
146. *Notch signaling: cell fate control and signal integration in development.* Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. 770-776, s.l. : Science, 1999, Vol. 284.
147. *The story of Notch and chronic kidney disease.* Sharma S, Sirin Y, Susztak K. 56-61, s.l. : Curr Opin Nephrol Hypertens, 2011, Vol. 20.
148. *The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism.* Kopan R, Ilagan MX. 216-233, s.l. : Cell, 2009, Vol. 137.
149. *Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways.* Shi S, Stanley P. 5234-5239, s.l. : Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, Vol. 100.
150. *Fringe modulation of Jagged1-induced Notch signaling requires the action of beta 4galactosyltransferase-1.* Chen J, Moloney DJ, Stanley P. 13716-13721, s.l. : Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, Vol. 98.
151. *Cell surface presenilin-1 participates in the gamma-secretase-like proteolysis of Notch.* Ray WJ, Yao M, Mumm J, Schroeter EH, Saftig P, Wolfe M, Selkoe DJ, Kopan R, Goate AM. 36801-36807, s.l. : J Biol Chem, 1999, Vol. 274.

152. *A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain.* De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, et al. 518-522, s.l. : Nature, 1999, Vol. 398.
153. *A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1.* Mumm JS, Schroeter EH, Saxena MT, Griesemer A, Tian X, Pan DJ, Ray WJ, Kopan R. 197-206, s.l. : Mol Cell, 2000, Vol. 5.
154. *Signalling downstream of activated mammalian Notch.* Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A. 355-358, s.l. : Nature, 1995, Vol. 377.
155. *Notch1 signaling inhibits growth of human hepatocellular carcinoma through induction of cell cycle arrest and apoptosis.* Qi R, An H, Yu Y, Zhang M, Liu S, Xu H, Guo Z, Cheng T, Cao X. 8323-8329, s.l. : Cancer Res, 2003, Vol. 63.
156. *Notch activation induces apoptosis in neural progenitor cells through a p53-dependent pathway.* Yang X, Klein R, Tian X, Cheng HT, Kopan R, Shen J. 81-94, s.l. : Dev Biol, 2004, Vol. 269.
157. *Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism.* Ciofani M, Zuniga-Pflucker JC. 881-888, s.l. : Nat Immunol, 2005, Vol. 6.
158. *Notch2, but not Notch1, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron.* Cheng HT, Kim M, Valerius MT, Surendran K, Schuster-Gossler K, Gossler A, McMahon AP, Kopan R. 801-811, s.l. : Development, 2007, Vol. 134.
159. *Notch and vascular smooth muscle cell phenotype.* Morrow D, Guha S, Sweeney C, Birney Y, Walshe T, O'Brien C, Walls D, Redmond EM, Cahill PA. 1370-1382, s.l. : Circ Res, 2008, Vol. 103.
160. *A Notch updated.* Tien AC, Rajan A, Bellen HJ. 621-629, s.l. : J Cell Biol, 2009, Vol. 184.
161. *Characterization of the human and mouse HEY1, HEY2, and HEYL genes: cloning, mapping, and mutation screening of a new bHLH gene family.* Steidl C, Leimeister C, Klamt B, Maier M, Nanda I, Dixon M, Clarke R, Schmid M, Gessler M. 195-203, s.l. : Genome, 2000, Vol. 66.
162. *Screen for genes regulated during early kidney morphogenesis.* Leimeister C, Bach A, Woolf AS, Gessler M. 273-283, s.l. : Dev Genet, 1999, Vol. 24.
163. *Notch signaling in mammary development and oncogenesis.* Callahan R, Egan SE. 145-163, s.l. : J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2004, Vol. 9.
164. *Renal abnormalities and their developmental origin.* A, Schedl. 791-802, s.l. : Nat Rev Genet, 2007, Vol. 8.
165. *Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development.* Costantini F, Kopan R. 698-712, s.l. : Dev Cell, 2010, Vol. 18.
166. *Morphogenesis of the metanephric kidney.* JA, Davies. 1937-1950, s.l. : ScientificWorldJournal, 2002, Vol. 2.
167. *Glial cell line-derived neurotrophic factor activates the receptor tyrosine kinase RET and promotes kidney morphogenesis.* Vega QC, Worby CA, Lechner MS, Dixon JE, Dressler GR. 10657-10661, s.l. : Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, Vol. 93.
168. *Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF.* Moore MW, Klein RD, Farinas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, Reichardt LF, Ryan AM, Carver-Moore K, Rosenthal A. 76-79, s.l. : Nature, 1996, Vol. 382.
169. *Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF.* Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, Drago J, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Saarma M, Hoffer BJ, et al. 73-76, s.l. : Nature, 1996, Vol. 382.
170. *Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF.* Sanchez MP, Silos-Santiago I, Frisen J, He B, Lira SA, Barbacid M. 70-73, s.l. : Nature., 1996, Vol. 382.
171. *GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase.* Durbec P, Marcos-Gutierrez CV, Kilkenny C, Grigoriou M, Wartiovaara K, Suvanto P, Smith D, Ponder B, Costantini F, Saarma M, et al. 789-793, s.l. : Nature, 1996, Vol. 381.
172. *Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system.* Carroll TJ, Park JS, Hayashi S, Majumdar A, McMahon AP. 283-292, s.l. : Dev Cell, 2005, Vol. 9.
173. *Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4.* Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP. 679-683, s.l. : Nature, 1994, Vol. 372.
174. *Wnt11 and Ret/Gdnf pathways cooperate in regulating ureteric branching during metanephric kidney development.* Majumdar A, Vainio S, Kispert A, McMahon J, McMahon AP. 3175-3185, s.l. : Development, 2003, Vol. 130.
175. *Segmental expression of Notch and Hairy genes in nephrogenesis.* Chen L, Al-Awqati Q. F939-952, s.l. : Am J Physiol Renal Physiol, 2005, Vol. 288.

176. *Expression of Hairy/Enhancer of Split genes, Hes1 and Hes5, during murine nephron morphogenesis.* Piscione TD, Wu MY, Quaggin SE. 707-711, s.l. : Gene Expr Patterns, 2004, Vol. 4.
177. *Notch signaling in kidney development.* B, McCright. 5-10, s.l. : Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003, Vol. 12.
178. *Expression of Notch1 to -4 and their Ligands in Renal Cell Carcinoma: A Tissue Microarray Study.* Aparicio LM, Villaamil VM, Gallego GA, Cainzos IS, Campelo RG, Rubira LV, Estevez SV, Mateos LL, Perez JL, Vazquez MR, et al. 93-101, s.l. : Cancer Genomics Proteomics, 2011, Vol. 8.
179. *Age-related properties of the tumour vasculature in renal cell carcinoma.* Meehan B, Appu S, St Croix B, Rak-Poznanska K, Klotz L, Rak J. 416-424, s.l. : BJU Int, 2011, Vol. 107.
180. *Expression and clinical significance of Notch receptors in human renal cell carcinoma.* Sun S, Du R, Gao J, Ning X, Xie H, Lin X, Liu J, Fan D. 335-341, s.l. : Pathology, 2009, Vol. 41.
181. *Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display.* Rae FK, Stephenson SA, Nicol DL, Clements JA. 726-732, s.l. : Int J Cancer, 2000, Vol. 88.
182. *Gamma-secretase activity is dispensable for mesenchyme-to-epithelium transition but required for podocyte and proximal tubule formation in developing mouse kidney.* Cheng HT, Miner JH, Lin M, Tansey MG, Roth K, Kopan R. 5031-5042, s.l. : Development, 2003, Vol. 130.
183. *Presenilins are required for the formation of comma- and S-shaped bodies during nephrogenesis.* Wang P, Pereira FA, Beasley D, Zheng H. 5019-5029, s.l. : Development, 2003, Vol. 130.
184. *Defects in development of the kidney, heart and eye vasculature in mice homozygous for a hypomorphic Notch2 mutation.* McCright B, Gao X, Shen L, Lozier J, Lan Y, Maguire M, Herzlinger D, Weinmaster G, Jiang R, Gridley T. 491-502, s.l. : Development, 2001, Vol. 128.
185. *A mouse model of Alagille syndrome: Notch2 as a genetic modifier of Jag1 haploinsufficiency.* McCright B, Lozier J, Gridley T. 1075-1082, s.l. : Development, 2002, Vol. 129.
186. *Structural-functional relationship along the distal nephron.* Madsen KM, Tisher CC. F1-F15, s.l. : Am J Physiol, 1986, Vol. 250.
187. *Physiology and pathophysiology of renal aquaporins.* Nielsen S, Kwon TH, Christensen BM, Promeneur D, Frokiaer J, Marples D. 647-663, s.l. : J Am Soc Nephrol, 1999, Vol. 10.
188. *Inactivation of Notch signaling in the renal collecting duct causes nephrogenic diabetes insipidus in mice.* Jeong HW, Jeon US, Koo BK, Kim WY, Im SK, Shin J, Cho Y, Kim J, Kong YY. 3290-3300, s.l. : J Clin Invest, 2009, Vol. 119.
189. *Regeneration and the kidney.* Lazzeri E, Mazzinghi B, Romagnani P. 248-253, s.l. : Curr Opin Nephrol, 2010, Vol. 19.
190. *Notch signaling in kidney development.* B, McCright. 5-10, s.l. : Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003, Vol. 12.
191. *Expression and function of the Delta-1/Notch-2/Hes-1 pathway during experimental acute kidney injury.* Kobayashi T, Terada Y, Kuwana H, Tanaka H, Okado T, Kuwahara M, Tohda S, Sakano S, Sasaki S. 1240-1250, s.l. : Kidney Int, 2008, Vol. 73.
192. *Epithelial Notch Signaling Regulates Interstitial Fibrosis Development in Kidneys of Mice and Man.* Bielez B, Sirin Y, H, S, Niranjan T, Gruenwald A, Ahn S, Kato H, Pullman J, Gessler M, Haase VH, et al. 4040-4054, s.l. : J Clin Invest, 2010, Vol. 120.
193. *Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease.* 1-150, s.l. : Kidney Int Suppl, 2013, Vol. 3.
194. *Chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification.* (NFKKDOQI), National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. s.l. : http://www2.kidney.org/professionals/KDOQI/guidelines_ckd/toc.htm, 2002, Vol. Accessed Aug 2015.
195. *Chronic kidney disease: the global challenge.* MeguidElNahas A, Bello AK. 331-340, s.l. : Lancet, 2005, Vol. 365.
196. *Prevalence of chronic kidney disease in the United States.* Coresh J, Selvin E, Stevens LA. 2038-2047, s.l. : JAMA, 2007, Vol. 298.
197. *The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major noncommunicable diseases.* Couser WG, Remuzzi G, Mendis S, Tonelli M. 1258-1270, s.l. : Kidney Int, 2011, Vol. 80.
198. *Chronic kidney disease in US adults with type 2 diabetes: an updated national estimate of prevalence based on Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) staging.* Bailey RA, Wang Y, Zhu V, Rupnow MF. 415, s.l. : BMC Res Notes, 2014, Vol. 7.

199. *US Renal Data System 2014 annual data report: epidemiology of kidney disease in the United States*. Saran R, Li Y, Robinson B, et al. s1-s306, s.l. : Am J Kidney Dis, 2015, Vol. 66.
200. *Molecular mechanisms of diabetic kidney disease*. Reidy K, Kang HM, Hostetter T, Susztak K. 2333-1340, s.l. : J Clin Invest, 2014, Vol. 124.
201. *K/DOQI clinical practice guidelines for Chronic Kidney Disease: evaluation, classification, and stratification*. s1, s.l. : Am J Kidney Dis, 2002, Vol. 39.
202. *Projecting the United States ESRD population: issues regarding treatment of patients with ESRD*. Szczech LA, Lazar IL. s3-s7, s.l. : Kidney IntSuppl, 2004, Vol. 90.
203. *Albumin signals the coming of age of proteinuric nephropathy*. NJ, Brunskill. 504-505, s.l. : J Am SocNephrol, 2004, Vol. 15.
204. *Proteinuria and progression in human glomerular disease*. JS, Cameron. 81-87, s.l. : Am J Nephrol, 1990, Vol. 10.
205. *Loss of glomerular function and tubulointerstitial fibrosis: cause or effect?* Ong AC, Fine LG. 345-351, s.l. : Kidney Int, 1994, Vol. 45.
206. *Secondary factors and progression of chronic kidney disease*. Sheridan AM, Rose BD. s.l. : Reperibile on-line sul sito internet www.uptodate.com, 2010.
207. *Expression of Notch pathway proteins correlates with albuminuria, glomerulosclerosis, and renal function*. Murea M, Park JK, Sharma S, Kato H, Gruenwald A, Niranjana T, Si H, Thomas DB, Pullman JM, Melamed ML, et al. 514-522, s.l. : Kidney Int, 2010, Vol. 78.
208. *Co-regulation of Gremlin and Notch signalling in diabetic nephropathy*. Walsh DW, Roxburgh SA, McGettigan P, Berthier CC, Higgins DG, Kretzler M, Cohen CD, Mezzano S, Brazil DP, Martin F. 10-21, s.l. : Biochim Biophys Acta, 2008, Vol. 1782.
209. *Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition*. Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, Bottinger EP. 1155-1165, s.l. : Embo J, 2004, Vol. 23.
210. *Cancer risk in patients on dialysis and after renal transplantation*. Birkelan SA, Lokkegaard H, Storm HH. 1886-1887, s.l. : Lancet, 2000, Vol. 355.
211. *Malignancy after transplantation*. Buell J.F.,Gross,T.G.,andWoodle ES. s254-s264, s.l. : Transplantation, 2005, Vol. 80.
212. *Are chronic dialysis patients at increased risk for cancer?* Mandayam S, Shahinian VB. 166-174, s.l. : J. Nephrol, 2008, Vol. 21.
213. *Association of CKD and Cancer Risk in Older People*. Wong G, et al. 1341-1350, s.l. : J Am Soc Nephrol, 2009, Vol. 20.
214. *Prevalence of renal insufficiency in cancer patients and implications for anti cancer drug management. The renal insufficiency and anticancer medications study (IRMA)*. Launay-Vacker V, et al. 1376-1384, s.l. : Cancer, 2007, Vol. 110.
215. *Chronic kidney disease after nephrectomy in patients with renal cortical tumors: a retrospective cohort study*. Huang, W.C, et al. 735-740, s.l. : Lancet Oncol, 2006, Vol. 7.
216. *Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time*. Ranganathan P, Weaver KL, Capobianco AJ. 338-351, s.l. : Nat Rev Cancer, 2011, Vol. 11.
217. *Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation*. ME, Fortini. 633-647, s.l. : Dev Cell, 2009, Vol. 16.
218. *Notch signaling: control of cell communication and cell fate*. EC, Lai. 633-647, s.l. : Development, 2009, Vol. 16.
219. *Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by Drosophila vestigial gene*. Kim J, Sebring A, Esch JJ, Kraus ME, Vorwerk K, Magee J, Carroll SB. 133-138, s.l. : Nature, 1996, Vol. 382.
220. *An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells*. Nye JS, Kopan R, Axel R. 2421-2430, s.l. : Development, 1994, Vol. 120.
221. *Developmental signaling. Vertebrate ligands for Notch*. Nye JS, Kopan R. 966-969, s.l. : Curr Biol, 1995, Vol. 5.
222. *Notch signaling in cancer*. Miele L, Golde T and Osborne B. 905-918, s.l. : Curr Mol Med, 2006, Vol. 8.
223. *Notch signaling in cancer*. Allenspach EJ, Maillard I, Aster JC, Pear WS. 466-476, s.l. : Cancer Biol Ther, 2002, Vol. 5.
224. *Sox9-Positive Progenitor Cells Play a Key Role in Renal Tubule Epithelial Regeneration in Mice*. Kang HM, Huang S, Reidy K, Han SH, Chinga F, Susztak K. 1-11, s.l. : Cell Reports, 2016, Vol. 14.
225. *Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of Notch signaling in vitro and in vivo*. Sjolund J, Johansson M, Manna S, Norin C, Pietras A, Beckman S, Nilsson E, Ljungberg B, Axelson H. 217-228, s.l. : J Clin Invest, 2008, Vol. 118.

226. *KRT6 interacting with notch1 contributes to progression of renal cell carcinoma, and aliskiren inhibits renal carcinoma cell lines proliferation in vitro.* Hu J, Zhang LC, Song X, Lu JR, Jin Z. 9182-9188, s.l. : Int J Clin Exp Pathol, 2015, Vol. 8.
227. *KyoT3, an isoform of murine FHL1, associates with the transcription factor RBP-J and represses the RBP-J-mediated transactivation.* Liang L, Zhang HW, Liang J, Niu XL, Zhang SZ, Feng L, Liang YM, Han H. 805-810, s.l. : Biochim Biophys Acta, 2008, Vol. 1779.
228. *Expression and clinical significance of Notch receptors in human renal cell carcinoma.* Sun S, Du R, Gao J, Ning, X, Xie H, Lin X, Liu J, Fan D. 335-341, s.l. : Pathology, 2009, Vol. 41.
229. *Genetically modified animals for use in research and biotechnology.* Chaible LM, et al. 1469-1482, s.l. : Genet Mol Res, 2010, Vol. 9.
230. *Transgenic Strategies to Study Podocyte Loss and Regeneration.* Lombardi D, Lasagni L. 678347, s.l. : Stem Cells Int, 2015, Vol. 2015.
231. *Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr.* Barker N, et al. 1003-1007, s.l. : Nature, 2007, Vol. 449.
232. *Spatial organization within a niche as a determinant of stem-cell fate.* Rompolas P, Mesa KR, Greco V. 513-518, s.l. : Nature, 2013, Vol. 502.
233. *The use of lineage tracing to study kidney injury and regeneration.* Romagnani P, Rinkevich Y, Dekel B. 420-431, s.l. : Nat Rev Nephrol, 2015, Vol. 11.
234. *Lineage tracing.* Kretschmar K, Watt FM. 33-45, s.l. : Cell, 2012, Vol. 148.
235. *Lineage-tracing methods and the kidney.* Humphreys BD, DiRocco DP. 481-488, s.l. : Kidney Int, 2014, Vol. 86.
236. *The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination.* Hoess RH, Wierzbicki A, Abremski K. 2287-2300, s.l. : Nucleic Acids Res, 1986, Vol. 14.
237. *Genetically modified animals for use in research and biotechnology.* Chaible LM, et al. 1469-1482, s.l. : Genet Mol Res, 2010, Vol. 9.
238. *Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system.* Livet J, et al. 56-62, s.l. : Nature, 2007, Vol. 450.
239. *Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells.* Snippert HJ, et al. 134-144, s.l. : Cell, 2010, Vol. 143.
240. *Intestinal crypt homeostasis revealed at single-stem-cell level by in vivo live imaging.* Ritsma L, et al. 362-365, s.l. : Nature, 2014, Vol. 507.
241. *PAX proteins and fables of their reconstruction.* DA, Underhill. 161-177, s.l. : Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr, 2012, Vol. 22.
242. *Pax genes and their roles in celldifferentiation and development.* Mansouri A, Hallonet M, Gruss P. 851-857, s.l. : Curr. Opin. Cell Biol, 1996, Vol. 8.
243. *Transcriptional repression by Pax5 (BSAP) through interaction with corepressors of the Groucho family.* Eberhard D, Jimenez G, Heavey B, Busslinger M. 2292-2303, s.l. : EMBO J, 2000, Vol. 19.
244. *Pax genes: regulators of lineage specification and progenitor cell maintenance.* Blake JA, Ziman MR. 737-751, s.l. : Development, 2014, Vol. 141.
245. *Expression of PAX8 in normal and neoplastic renal tissues: an immunohistochemical study.* Tong GX, Yu WM, Beaubier NT, Weeden EM, Hamele-Bena D, Mansukhani MM, et al. 1218-1227, s.l. : Mod. Pathol, 2009, Vol. 22.
246. *Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia.* eng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, et al. 269-271, s.l. : Science, 2004, Vol. 306.
247. *Functionally recurrent rearrangements of the MAST kinase and Notch gene families in breast cancer.* obinson DR, Kalyana-Sundaram S, Wu Y-M, Shankar S, Cao X, Ateeq B, et al. 1646-1651, s.l. : Nat Med, 2011, Vol. 17.
248. *Structure of the Notch1-negative regulatory region: implications for normal activation and pathogenic signaling in T-ALL.* ordon WR, Roy M, Vardar-Ulu D, Garfinkel M, Mansour MR, Aster JC, et al. 4381-4390, s.l. : Blood, 2009, Vol. 113.
249. *Image Processing with ImageJ.* Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ. 36-42, s.l. : Biophotonics International, 2004, Vol. 11.
250. *Age-Related Reference Intervals of the Main Biochemical and Hematological Parameters in C57BL/6J, 129SV/EV and C3H/HeJ Mouse Strains.* al., Mazzaccara C et. e3772, s.l. : PLoS ONE, 2008, Vol. 3(11).
251. *The impact of gender on the progression of chronic renal disease.* Silbiger SR, Neugarten J. 515-533, s.l. : Am J Kidney Dis, 1995, Vol. 25(4).
252. *Changes with age in renal function and morphology in C57BL/6, CBA/HT6, and B6CBAF1 mice.* Hackbarth H, Harrison DE. 540-547, s.l. : J Gerontol, 1982, Vol. 37(5).

253. *Estrogen inhibits renal cell carcinoma cell progression through estrogen receptore-B activation.* Yu CP, Ho JY, Huang YT, Cha TL, Sun GH, Yu DS, CHang FW, Chen SP, Hsu RJ. e5667, s.l. : PLoS One, 2013, Vol. 8.

254. *Podocyte Regeneration Driven by Renal Progenitors Determines Glomerular Disease Remission and Can Be Pharmacologically Enhanced.* al, Lasagni L et. 248-263, s.l. : Stem Cell Reports, 2015, Vol. 5.

7 – RINGRAZIAMENTI

Come mi è naturale, alla fine di un lavoro e di un ciclo importante della mia vita, mi concentro su quanto è stato, per tirarne le somme.

Questo che presento è il risultato di notevoli sforzi e dell'impegno che ho messo giornalmente nel mio lavoro.

In un mondo interiore ed esteriore in continuo mutamento penso di aver affrontato con coraggio i cambiamenti e le sfide che si sono presentate. Questo è successo sul piano personale come sul piano lavorativo.

Tutto ciò è dipeso per metà dalla mia testardaggine, caratteristica che distingue molto spesso le mie azioni, e per metà da tutta una serie di Maestri che hanno a volte dato forza, a volte guidato e a volte impedito alcuni passi nel mio cammino.

Senza togliere niente a quelli che non nominerò per necessità di spazio e di attinenza al lavoro presentato procederò ad alcuni ringraziamenti.

Ringrazio la Professoressa Paola Romagnani, per la possibilità di crescita personale che mi ha dato, per gli input concettuali che guidano questo lavoro e la possibilità di svolgere materialmente questa ricerca.

Ringrazio le mie colleghe del laboratorio per il loro lavoro e la loro esperienza che mi hanno permesso di condurre questo studio. Vorrei ricordare tra tutte Anna Peired per il suo supporto, il suo impegno in qualità di tutor e per la sua vicinanza nei momenti di sconforto.

Ringrazio i ragazzi e le ragazze del laboratorio, per il loro aiuto, ma soprattutto per ciò che abbiamo condiviso oltre il rapporto lavorativo, da un semplice caffè, a una confidenza, a una vacanza.

Ringrazio i miei amici, vicini o lontani che fossero. Loro hanno spesso permesso di "ri-settarmi" e confrontarmi con altri aspetti della vita importanti nella mia crescita come essere umano.

Ringrazio per ultima la mia famiglia, un nucleo bizzarro, a volte percepito invasivo, a volte distante, ma mai dimenticato o lasciato lontano dal cuore. Un rifugio sicuro, un abbraccio caldo.

Per ciò che è stato, per ciò che sono, per ciò che sarà: semplicemente grazie.