



**Università degli Studi di Cagliari**

**DOTTORATO DI RICERCA**

Ingegneria Biomedica

**Ciclo XXVII**

**TITOLO TESI**

**Markers immunoistochimici delle cellule staminali/progenitrici nel rene umano in via di sviluppo.**

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza

Ing-Ind/24

Presentata da: Alice Sanna

Coordinatore Dottorato: Giacomo Cao

Relatore: Gavino Faa

Esame finale anno accademico 2013 – 2014

## **Indice**

Abstract.	Pag.2
Introduzione.	Pag.3
Capitolo 1: la nefrogenesi.	Pag.4
<b>1.1</b> Cenni storici.	Pag.4
<b>1.2</b> L'importanza dello studio della embriologia renale.	Pag.5
<b>1.3</b> Lo sviluppo del rene.	Pag.5
<b>1.4</b> MET: Transizione Mesenchimo-Epiteliale.	Pag.7
<b>1.5</b> Gli stadi dello sviluppo renale.	Pag.7
<b>1.6</b> La glomerulogenesi.	Pag.8
Capitolo 2: la funzione renale nei nati pretermine.	Pag.11
<b>2.1</b> Ridotta nefrogenesi.	Pag.11
<b>2.2</b> Effetti persistenti della prematurità sulla nefrogenesi.	Pag.11
Capitolo 3: le nicchie di cellule staminali/progenitrici nel rene umano pretermine.	Pag.13
<b>3.1</b> Capsula.	Pag.13
<b>3.2</b> Blue strip.	Pag.13
<b>3.3</b> Cap Mesenchima.	Pag.13
<b>3.4</b> Vescicole.	Pag.13
<b>3.5</b> Pecs.	Pag.14
<b>3.6</b> Cellule ilari.	Pag.14
<b>3.7</b> Progenitori non epiteliali.	Pag.14
Capitolo 4: parte sperimentale.	Pag.15
<b>4.1</b> Materiale e metodi.	Pag.15
<b>4.2</b> Risultati.	Pag.17
<b>4.3</b> Discussione.	Pag.35
Bibliografia.	Pag.37

## **Abstract**

The aim of this study was to better define, by immunohistochemistry, the molecular markers of renal stem/progenitor cells localized in the different niches of ten human preterm kidneys with gestational age ranging from 11 up to 25 weeks. Our data evidence the existence of multiple stem/progenitor pools in different zones of the human developing kidney that are characterized by different phenotypes: capsular stem cells were EMA (MUC1)+, MDM2+, Vimentin+ and Wnt1+; progenitors of the sub-capsular nephrogenic zone were MDM2+ and Wnt1+; cap mesenchymal cells were EMA (MUC1)+, CD15+, vimentin+, Wt1+, CD10+, Bcl2+, Wnt1+ and PAX2+; interstitial progenitor cells were Vimentin+, Wt1+ and  $\alpha$ 1Anti-trypsin +. Our data evidence the existence of multiple stem/progenitor cell pools in the fetal and neonatal human kidney. Progenitors of these different pools are characterized by a peculiar phenotype, indicating a different differentiation stage of these renal progenitors. A better knowledge of the molecular markers expressed by renal stem/progenitors might represent a relevant datum for researchers involved in renal regenerative medicine.

## **Introduzione.**

Ad oggi, almeno l'8% della popolazione europea (circa 40milioni) soffre di malattia renale cronica e questo comporta il rischio di sviluppare un danno renale [1,2]. Quando la malattia renale progredisce può causare insufficienza renale che impone la dialisi o il trapianto d'organo. Il trapianto renale rappresenta la forma più completa di terapia sostitutiva dell'insufficienza renale cronica. Tuttavia, il numero limitato di donatori d'organo per i pazienti adulti richiede la necessità di sviluppare strategie terapeutiche alternative per il trattamento della malattia. Eppure, l'approccio tradizionale basato sull'utilizzo delle cellule staminali è stato incapace di rigenerare l'organo danneggiato. L'incidenza della malattia renale cronica è aumentata insieme alla frequenza delle nascite pretermine, raggiungendo circa il 12-13% negli USA [3]; il numero dei prematuri per anno stima circa 15milioni [4]. Sebbene non esista ancora una prova definitiva che la nascita pretermine sia un fattore di rischio per questa malattia [5], l'associazione tra malattia renale cronica e prematurità osservata in diversi studi epidemiologici rafforza l'ipotesi di Barker sullo sviluppo delle malattie negli adulti [6] e in particolare dell'origine, nei primi anni di vita, di una suscettibilità a sviluppare in età adulta la malattia renale [7].

Il nostro programma di ricerca è incentrato sui neonati a basso peso alla nascita, confermando che sono caratterizzati da un ridotto numero di nefroni alla nascita e quindi da un aumentato rischio di sviluppare malattia renale cronica nell'infanzia o nell'età adulta [8].

Una possibile correlazione tra oligonefronia alla nascita e sviluppo di ipertensione e malattia renale progressiva in età adulta è stata identificata nella ipertrofia glomerulare compensatoria. Questa scoperta morfologica potrebbe costituire un fattore di rischio che, nel corso della vita, aumenterebbe la suscettibilità dei glomeruli all'esaurimento terminando con la progressione verso la malattia renale cronica [9].

Focalizzando l'attenzione sul rene pretermine, il fine di questa ricerca è stato quello di identificare la complessità delle cellule staminali/progenitrici localizzate nelle diverse nicchie del rene pretermine che potrebbero rappresentare il bersaglio di una potenziale terapia rigenerativa nelle prime settimane di vita postnatale. Lo scopo del lavoro è stato quello di definire i marcatori molecolari di cellule staminali/progenitrici renali nei neonati pretermine, in modo da evidenziare i possibili bersagli molecolari per una medicina rigenerativa "fisiologica" [10] da poter avviare nelle prime settimane di vita dopo la nascita.

## **Capitolo 1: la nefrogenesi.**

### **1.1 Cenni storici.**

I primi studi sulla frequenza di eventi che regolano la nefrogenesi umana risalgono al 1842, quando Bowman [11] descrisse l'invaginazione dell'ammasso di capillari all'interno del nefrone in via di sviluppo, da cui originano il glomerulo immaturo e la capsula.

Le prime fasi dello sviluppo renale nell'embrione umano furono meglio definite da Golgi [12], che descrisse i "corpi a forma di S" come una delle prime strutture che danno origine alla capsula glomerulare. Egli scoprì inoltre che il contemporaneo sviluppo dei vasi sanguigni e dei tubuli a forma di S sta alla base della glomerulogenesi e che le intime e complesse interazioni tra le cellule epiteliali e il ciuffo di capillari danno origine al ciuffo di capillari maturo.

Herring [13] ipotizzò che il nefrone avrebbe origine da un nido di cellule simil mesenchimali e non dalla gemma ureterica che si arborizza. Egli identificò, inoltre, i corpi a forma di virgola come i precursori dei corpi a forma di S e descrisse i diversi passaggi della differenziazione delle cellule di rivestimento della capsula glomerulare, che alla fine si differenziano in cellule parietali e podociti maturi.

Zimmermann [14] rivelò l'intima relazione tra le cellule endoteliali, le membrane basali e le cellule epiteliali capsulari invaginate, e diede il nome di cellule mesangiali alle cellule simil-fibroblasti interposte tra i capillari.

Noel e Pigeaud [15] ipotizzarono che il ciuffo di capillari poteva originare da un nodulo di blastema metanefrico in contatto con un tubulo a forma di S.

Secondo autori successivi la matassa capillare e la capsula glomerulare dovrebbero essere considerate, alla loro origine, come due entità separate che successivamente si fondono, dando origine al glomerulo maturo.

Montaldo e Murri [16] studiarono la relazione tra i capillari glomerulari, le cellule epiteliali attorno ai capillari glomerulari e le cellule mesangiali. Montaldo inoltre ipotizzò che le membrane basali potrebbero originare dall'attività di sintesi delle cellule epiteliali e di quelle mesangiali.

Hall [17] studiò l'ultrastruttura del glomerulo nel rene in via di sviluppo dei ratti e descrisse la differenziazione delle cellule interne della capsula in podociti maturi e rivelò la complessa struttura della membrana basale e la sua suddivisione in interna ed esterna lamina rara e lamina densa.

Kurtz [18] applicò la microscopia elettronica allo studio del rene umano fetale e mostrò che il glomerulo origina da un nido di cellule mesenchimali, che si differenziano in podociti e cellule endoteliali, contribuendo alla sintesi della membrana basale.

Benedetti e Marinozzi [19] contribuirono a una migliore conoscenza delle cellule mesangiali

durante lo sviluppo del rene. Essi ipotizzarono un'origine comune per le cellule mesangiali ed endoteliali e suggerirono che le prime potrebbero funzionare come periciti, regolando il calibro dei capillari glomerulari.

L'ipotesi di Benedetti e Marinozzi fu confermata da Farquahar e Palade [20], che evidenziarono l'esistenza di un "terzo" tipo di cellule nel glomerulo renale: il mesangio.

Nella sua tesi di dottorato Lazorthes-Herland [21] supportò la teoria di Herring e dimostrò che l'intero glomerulo origina dagli stessi progenitori mesenchimali.

### **1.2 L'importanza dello studio della embriologia renale.**

Lo sviluppo del rene è stato estesamente studiato in modelli animali, inclusi pesci, anfibi e topi, poiché la possibilità di portare avanti, in vitro, le prime fasi dello sviluppo dell'organo, di poterlo manipolare e osservare, ne ha fatto un potente modello di investigazione sulle basi cellulari e sull'organogenesi. Molti processi alla base dello sviluppo renale hanno ruoli analoghi in altri organi, come le interazioni tra cellule epiteliali e mesenchimali, la formazione delle ramificazioni, la differenziazione delle cellule staminali, la migrazione cellulare, la divisione delle cellule specializzate e le interazioni tra le cellule e la matrice extracellulare.

### **1.3 Lo sviluppo del rene.**

L'embriologia del rene include alcuni eventi che sono esclusivi di quest'organo, come la transizione mesenchimale-epiteliale che porta alla formazione del nefrone, e la differenziazione di strutture altamente specializzate come il glomerulo [22].

L'epitelio del nefrone e il sistema collettore derivano interamente dal mesoderma intermedio, mentre altre componenti, come quella vascolare, derivano da altre sorgenti.

Le cellule nella porzione dorsale del mesoderma intermedio si fondono per formare il dotto nefrico, chiamato anche dotto di Wolff [23], mentre la popolazione delle cellule mesenchimali della porzione ventrale del mesoderma intermedio, chiamata "corda nefrogenica", rimane indifferenziata.

Le interazioni tra il dotto nefrico e la corda nefrogenica portano alla formazione di un gruppo di cellule transitorie del tubulo renale primitivo, che fanno parte della prima rudimentale e più semplice forma di rene, il pronefro, che si sviluppa intorno al ventunesimo giorno di gestazione a partire dal celoma, con cui mantiene una comunicazione diretta.

Il pronefro potrebbe essere considerato un unico grande rudimentale glomerulo, costituito da una cavità, il nefrocele, che circonda un'unica unità di filtrazione, il glomo, e da una serie di tubuli corrispondenti ai tubuli contorti prossimali e distali e al collettore.

Dalla parete del nefrocele emerge una gemma solida al cui interno si crea una cavità che dà luogo a multipli dotti, i quali uniscono il nefrocele alla cloaca e al dotto pronefrico, da cui originerà poi il dotto mesonefrico e il dotto di Wolff [24,25].

Il filtrato del glomo confluisce nel nefrocele, e le cellule tubulari di rivestimento, fornite anch'esse di ciglia, facilitano il suo scorrimento verso il dotto pronefrico, che fa confluire il filtrato nella cloaca.

Le cellule tubulari pronefriche presentano un alto grado di differenziazione e, grazie alla presenza sul loro polo apicale di rudimentali microvilli, operano un primo riassorbimento selettivo di sostanze dal filtrato[26]. Esse sviluppano giunzioni aderenti intercellulari e mostrano un orletto a spazzola perfettamente funzionante. La differenziazione va di pari passo alla loro migrazione distale, con la formazione delle tipiche anse dei tubuli contorti. Il processo di allungamento dei tubuli e di differenziazione cellulare è in gran parte autoregolato e dipende dal flusso del filtrato renale che, mediante stimoli pressori, regola la differenziazione, la proliferazione e la migrazione delle cellule dei tubuli pronefrici, orchestrando la costruzione della prima unità tubulare renale [27].

La tecnica costruttiva alla base nella nefrogenesi è rappresentata dalla transizione mesenchimale-epiteliale, cioè dalla capacità delle cellule mesenchimali multipotenti, che costituiscono il pronefro, di differenziarsi non solo verso cellule mesenchimali, quali cellule vascolari che vanno a costituire il glomo, ma anche di dare origine a cellule epiteliali, tra cui quelle che rivestono il nefrocele e le cellule dei tubuli contorti. Questa trasformazione è regolata dal FGF (Fibroblast Growth Factor) [28].

Il pronefro va incontro a regressione attorno al venticinquesimo giorno di gestazione e simultaneamente si ha la comparsa del secondo organo escretore, il mesonefro.

Il mesonefro origina dal mesenchima mesonefrico che, sotto induzione del dotto di Wolff, subisce il processo di transizione mesenchimale-epiteliale, dando origine alle vescicole renali, la prima struttura epiteliale mesonefrica.

Il mesonefro consiste di multipli nefroni maturi, circa 40 negli umani, composto da glomeruli con tubuli prossimali e distali, che si fondono con il dotto di Wolff, in assenza dell'ansa di Henle e dell'apparato iuxtaglomerulare.

I nefroni completi del mesonefro producono piccole quantità di urina che viene convogliata direttamente nel dotto di Wolff [29].

Al trentatreesimo giorno di gestazione il mesonefro arriva al suo massimo grado di sviluppo e allo stesso tempo inizia la sua regressione, che nelle donne è completa, mentre nei maschi i tubuli mesonefrici danno origine ai tubuli efferenti del testicolo.

Tracce del mesonefro continuano ad esistere finché nelle ultime settimane di gestazione si sovrappone il metanefro in sviluppo.

Attorno al trentesimo giorno la regione caudale del dotto di Wolff dà origine alla gemma ureterica, che prolifera ed emerge dallo stesso, invadendo il mesenchima metanefrico circostante e dando origine al terzo organo escretorio negli umani: il metanefro [28].

Il mesenchima metanefrico compie un duplice ruolo: contiene le cellule progenitrici per i nefroni del rene metanefrico (dell'adulto) e produce segnali che inducono l'estroflessione del dotto nefrico, con la formazione di una unica gemma ureterica vicino alla regione caudale [30].

Il primitivo abbozzo ureterale origina, quindi, a partire dal ventottesimo giorno di gestazione [31], dal dotto di Wolff come un aggregato solido di cellule epiteliali, che proliferano, migrano e progressivamente invadono il mesenchima metanefrico circostante [32] (fig.1a).

La gemma ureterale, il cui sviluppo è legato alla produzione del GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor)[33], prodotto dal mesenchima metanefrico, si ramifica in maniera altamente ripetitiva, andando così a formare l'intero sistema collettore, inclusi i dotti collettori, la pelvi renale, l'uretere e il trigono vescicale [34].

Mentre i cordoni di cellule epiteliali derivanti dalla gemma ureterale stanno diramandosi nel mesenchima metanefrico, alcune cellule mesenchimali metanefriche, incluse le cellule staminali multipotenti [35], si riuniscono e aggregano attorno gli apici delle diramazioni epiteliali, trasformandosi in cellule del Cap-mesenchima [36], che si ritiene diano origine a una popolazione di cellule staminali multipotenti alla periferia della zona nefrogenica del rene in sviluppo [37].

#### **1.4 MET: Transizione Mesenchimo-Epiteliale.**

Il Cap-mesenchima va progressivamente incontro a un complesso processo di transizione, in cui cellule mesenchimali fusiformi si trasformano in cellule epiteliali con giunzioni aderenti. Questa differenziazione, meglio conosciuta come transizione mesenchimale-epiteliale (MET) [38] (fig.1b.), darà vita a gran parte dell'epitelio del nefrone [39] ed è dipendente dall'espressione di Wnt9b da parte dell'epitelio ureterico.

#### **1.5 Gli stadi dello sviluppo renale.**

Le vescicole renali sono le prime strutture epiteliali che originano dal Cap-mesenchima [40]. Esse derivano dalla trasformazione degli aggregati solidi di cellule mesenchimali in strutture epiteliali rotonde con un lume centrale (fig.1c).

Segmentazioni delle vescicole renali danno origine prima ai corpi a forma di virgola, poi ai corpi a forma di S [28] (fig.1d).



Nello stadio del corpo a forma di virgola, il nefrone, che si sta sviluppando, potrebbe essere suddiviso in un segmento prossimale e uno distale [33], caratterizzati rispettivamente dall'espressione di molecole di adesione intercellulari come la caderina-6 e la e-caderina [41,42]. I corpi a forma di S sono organizzati in tre segmenti: distale, mediano e prossimale. Le cellule del segmento prossimale si differenziano ulteriormente a formare l'epitelio parietale (capsula di Bowman) e viscerale (podociti) del glomerulo, quelle del segmento mediano danno origine al tubulo prossimale, mentre quelle del segmento distale guidano il processo di fusione con i tubuli collettori [43].

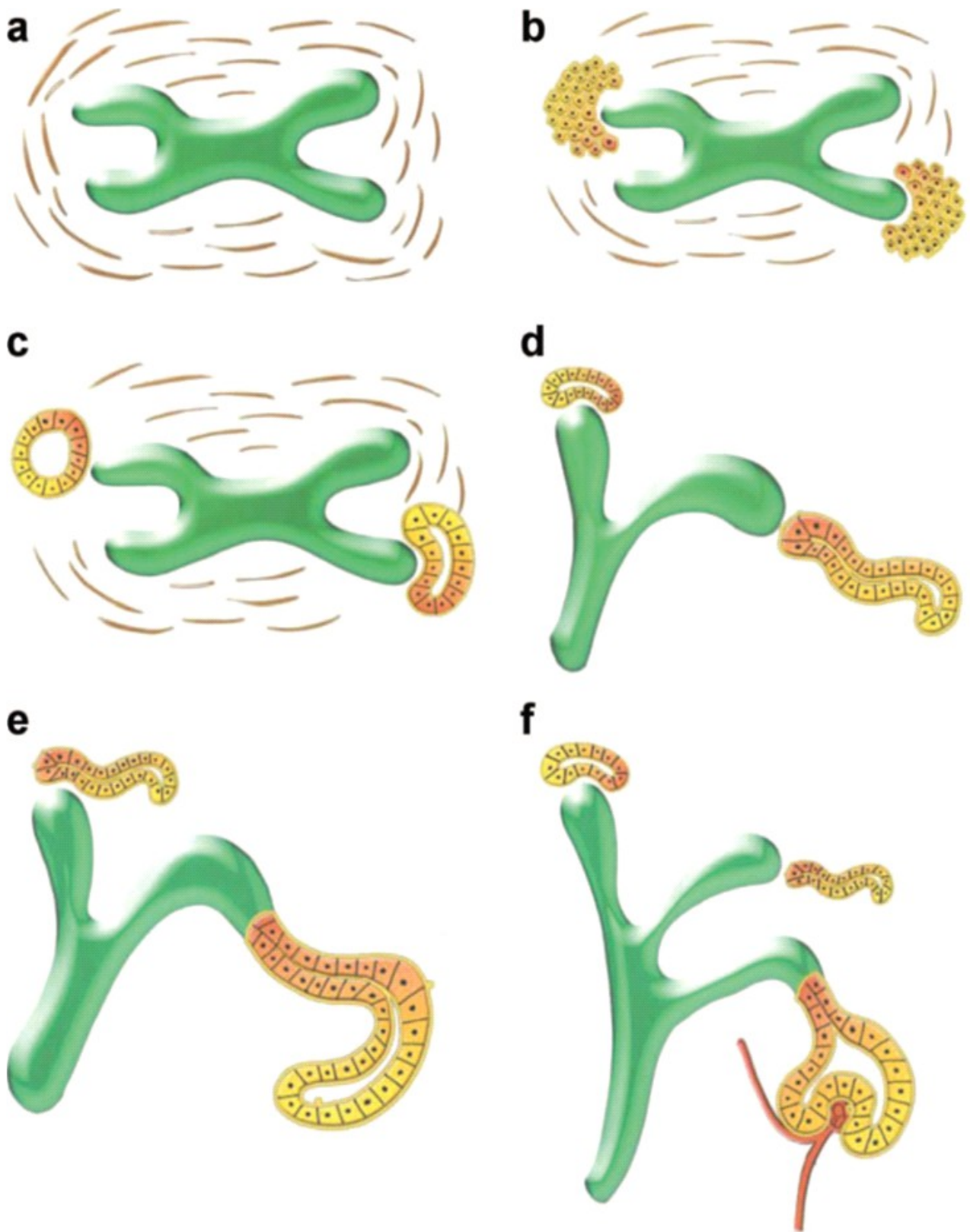
Nello stadio dell'ansa capillare, si ha la comparsa e lo sviluppo, nella corticale renale, della primitiva ansa di Henle, successivamente alla suddivisione della midollare in interna ed esterna. Durante questa fase la vascolarizzazione renale subisce rapidi cambiamenti, tra cui la comparsa del sistema capillare, la differenziazione del presunto endotelio del corpuscolo renale e lo sviluppo delle arterie e vene renali [28].

Infine si ha la differenziazione dei principali componenti dei corpuscoli renali, dei segmenti tubulari, inclusi i tubuli prossimali, l'ansa di Henle, i tubuli distali, e lo sviluppo del complesso iuxtaglomerulare, macula densa, mesangio, e parte delle arteriole afferenti. Durante questo stadio, l'interstizio renale si differenzia in diversi componenti, tra cui la porzione corticale, midollare, perilare e l'interstizio nefrogenico [43].

### **1.6 La glomerulogenesi.**

Il processo di glomerulo genesi inizia con l'invasione da parte delle cellule endoteliali immature, gli angioblasti [44], della seconda incisione del corpo a forma di S, attratte dal VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), prodotto dai precursori dei podociti localizzati nei corpi a forma di S [45](fig.1f).

I podociti originano dalle cellule dell'epitelio colonnare e, all'interno del glomerulo, con i loro pedicelli danno vita a una struttura arborizzata connessa alla membrana basale glomerulare [28]. La nefrogenesi umana si conclude alla trentacinquesima-trentaseiesima settimana di gestazione [46], ne consegue che, nei neonati a termine, dopo la nascita non compaiono nuovi nefroni, perciò nessuna delle cellule staminali post natali è capace di differenziarsi e dare origine a nuove unità funzionali del rene [28].



*Fig.1: Le diverse fasi della nefrogenesi umana.*

*a) La gemma ureterica e un aggregato solido di cellule epiteliali proliferano e invadono il mesenchima metanefrico circostante;*

- b) cellule mesenchimali metanefriche aggregate attorno alle estremità delle ramificazioni epiteliali, dando origine al processo di transizione mesenchimale-epiteliale (MET);*
- c) cellule epiteliali appena formate dalla transizione MET danno origine alle vescicole renali e ai corpi a forma di virgola;*
- d) una seconda incisura trasforma i corpi a forma di virgola in corpi a forma di S;*
- e) l'estremità prossimale di ciascun corpo a forma di S si trasforma nel tubulo prossimale e distale che si fonde con l'estremità della gemma ureterica la quale va incontro a cavitazione dando vita al dotto collettore;*
- f) il processo di glomerulogenesi inizia con l'invasione da parte delle cellule endoteliali della seconda incisura del corpo a forma di S, generando il glomerulo vascolare primitivo e l'arteriola efferente ed afferente [47].*

## **Capitolo 2: la funzione renale nei nati pretermine.**

### **2.1 Ridotta nefrogenesi.**

La maturazione del rene si realizza attraverso il complesso processo della nefrogenesi, che è controllato da fattori genetici ed ambientali a partire dal periodo preconcezionale fino alla 34-36° settimana di età gestazionale. Il numero totale di nefroni nell'uomo è mediamente 1 milione per rene, con una variabilità da 200.000 a oltre 2 milioni.

La riduzione del numero di nefroni può alterare la funzione renale in modo permanente e condurre allo sviluppo di ipertensione e, in alcune casistiche, allo sviluppo a distanza di patologie cardiovascolari e renali. Le dimensioni del rene e il numero di nefroni sono direttamente proporzionali al peso alla nascita; è stato osservato inoltre che soggetti nati pretermine o con ritardo di crescita intrauterino hanno maggior rischio di sviluppare patologie renali in età adulta [48,49,50]. Vista la complessità del processo di nefrogenesi, è controverso se un ridotto numero di nefroni sia la sola conseguenza di alterazioni della circolazione materno-fetale; tuttavia è probabile che un ambiente intrauterino sfavorevole possa condurre ad alterazioni funzionali e strutturali tra cui alterata regolazione del sodio, potassio e cloro o attivazione aumentata del sistema renina-angiotensina-aldosterone e di altri sistemi vasoregolatori che possono influire sulla funzione renale a lungo termine.

### **2.2 Effetti persistenti della prematurità sulla nefrogenesi.**

La nascita pretermine influenza lo sviluppo e la maturazione del rene dal momento che la nefrogenesi si completa verso le 34-36 settimane. La nascita prima della 34° settimana interrompe il processo di nefrogenesi e determina anche l'esposizione del rene agli eventi patogeni in epoca neonatale (farmaci, ipotensione, ecc.) che oltre a provocare un danno renale acuto possono causare modificazioni morfologiche e funzionali permanenti che possono coinvolgere le diverse strutture del rene [51]. Queste alterazioni funzionali nelle età successive possono avere ripercussioni sullo stato di salute anche in età adulta, in cui si osserva negli "ex pretermine" una maggior incidenza di insufficienza renale cronica ed ipertensione. Numerosi autori hanno documentato che la prematurità ed il basso peso alla nascita determinano una riduzione permanente del numero di nefroni e delle dimensioni del rene [52,53]. Tale dato è stato confermato anche da studi autoptici in cui è stata riscontrata una forte correlazione tra peso alla nascita e numero di glomeruli [54]. La riduzione della massa renale in seguito alla nascita pretermine (oligonefropatia del pretermine) è diventata successivamente oggetto di studi di follow-up su coorti di pretermine per individuare precocemente

i soggetti a rischio e mettere in atto ove possibile interventi di prevenzione [55,56]. Tale riduzione del numero di glomeruli si traduce, secondo l'ipotesi di Brenner, in un'iperfiltrazione compensatoria messa in atto dai glomeruli funzionanti che a lungo termine determina ipertensione e proteinuria che possono danneggiare progressivamente il parenchima renale fino all'insufficienza renale cronica. E' stato anche ipotizzato che questa interdipendenza tra funzione renale e regolazione della pressione arteriosa determini un incremento del rischio cardiovascolare nei soggetti con ridotto numero di nefroni per qualsiasi causa congenita o acquisita che abbia interferito con la nefrogenesi [57,58,59,60,61].

La filtrazione glomerulare (GFR) alla nascita risulta notevolmente ridotta rispetto all'età adulta, aumentando progressivamente da 30 ml/min/1,73m<sup>2</sup> a 120 ml/min/1,73m<sup>2</sup> a causa del progressivo aumento della superficie filtrante. Tale riduzione della GFR alla nascita risulta ancora più marcata nel pretermine, in cui il numero di nefroni è ridotto rispetto ai neonati a termine e possono coesistere altri fattori di rischio (ipotensione, farmaci, PDA).

Il tubulo prossimale svolge la funzione di riassorbire diverse sostanze filtrate a livello glomerulare (aminoacidi, bicarbonati, glucosio) attraverso meccanismi di trasporto attivo e passivo. Questi sistemi di trasporto sono immaturi nel neonato pretermine; la riduzione del riassorbimento di queste sostanze può determinare acidosi metabolica, glicosuria; viceversa, il sistema di riassorbimento tubulare del fosforo è più attivo nel neonato rispetto all'adulto e può pertanto condurre ad iperfosforemia.

Il dotto collettore è invece responsabile della regolazione della sodiemia e della potassiemia: l'immaturità di questi sistemi di trasporto fa sì che nel neonato pretermine si osservi frequentemente iperpotassiemia.

Infine il rene del neonato, in particolare del neonato pretermine, presenta una ridotta capacità di diluire e concentrare le urine in risposta all'apporto di fluidi. Tale capacità tende a raggiungere i livelli dell'età adulta dopo i 2 anni di vita.

Oltre alla prematurità, è stato osservato che il ritardo di crescita intrauterino può alterare la maturazione del rene, interferendo con la nefrogenesi e determinando una riduzione delle dimensioni del rene rispetto ai valori di riferimento [49].

## **Capitolo 3: le nicchie di cellule staminali/progenitrici nel rene umano pretermine.**

### **3.1 Capsula.**

La più importante nicchia è probabilmente rappresentata dalla capsula, particolarmente ricca di cellule staminali mesenchimali indifferenziate. Il ruolo della capsula renale come nicchia di cellule staminali/progenitrici continua anche dopo la nascita e rappresenta la presunta riserva principale dei progenitori renali anche nel rene adulto [10,62,63].

### **3.2 Blue strip.**

La Blue strip rappresenta un aggregato di cellule indifferenziate staminali / progenitrici che occupa la zona sottocapsulare. La larghezza della Blue strip dà informazioni pertinenti riguardanti la valutazione del carico di cellule staminali nel rene neonatale, rappresentando così la capacità residua del rene di originare nuovi nefroni dopo la nascita. [62,63,64].

### **3.3 Cap mesenchima.**

I progenitori staminali, indirizzati verso il destino epiteliale, che condensano attorno alla gemma ureterica rappresentano un altro comparto di progenitori renali. La loro valutazione accurata può dare informazioni sull'entità della nefrogenesi reale; ciascun cap mesenchima rappresenta un nefrone prossimale nella fase molto precoce della sua differenziazione [62,63,65].

### **3.4 Vescicole.**

Le vescicole renali sono le prime strutture epiteliali che originano dal cap mesenchima e rappresentano un importante step nella formazione del nefrone [63]. Il conteggio delle vescicole renali, dei corpi a virgola e ad S consente al patologo di valutare l'efficacia effettiva della nefrogenesi; queste strutture rappresentano fasi intermedie della formazione del nefrone [65]. Questo argomento è stato ampiamente descritto dal nostro gruppo di ricerca in diversi articoli scientifici [47].

### **3.5 Pecs (cellule epiteliali parietali).**

Cellule staminali/progenitrici possono trovarsi mescolate tra le cellule epiteliali parietali della capsula di Bowman dei glomeruli in via di sviluppo. Sono considerate una riserva di cellule multipotenti che possono essere mantenute anche in età adulta; infatti, grazie alla loro capacità di ripristinare le cellule morte, potrebbero essere responsabili di formare nefroni maturi [62,63]. È stato ipotizzato che queste cellule possono mantenere la loro capacità di differenziarsi in podociti, e potrebbero rappresentare l'unico meccanismo di difesa del rene adulto per arrestare la progressione della podocitopatia nell'infanzia e in età adulta. Studi condotti in una scimmia fetale indicano che le Pecs possono funzionare come cellule progenitrici per rimodellare i collettori dilatati [66].

### **3.6 Cellule ilari.**

Una quantità enorme di cellule staminali mesenchimali indifferenziate si può trovare nelle parti più profonde del rene neonatale, nel midollo profondo e nelle regioni peri-ilari. Questi progenitori ilari sono morfologicamente diversi dalle cellule staminali/progenitrici che possono essere osservate nella zona della blue strip: sono caratterizzati da un nucleo allungato e da un corpo cellulare allungato e sono immersi in una abbondante matrice intercellulare. [28].

### **3.7 Progenitori non epiteliali.**

I progenitori non epiteliali sono cellule progenitrici che si osservano nell'interstizio che separa glomeruli e tubuli in via di sviluppo nella corteccia; sono anche rilevabili nella zona midollare e nell'ilo renale [62].

#### **Capitolo 4: parte sperimentale.**

Lo sviluppo del rene prende origine da un susseguirsi di complessi processi che hanno luogo contemporaneamente nella zona nefrogenica, una sottile striscia di tessuto in stretta prossimità con la capsula renale. Come conseguenza di ciò l'immagine istologica del rene perinatale appare tanto complessa e caotica da indurre in errore durante la sua osservazione e interpretazione, soprattutto quando ci si basa esclusivamente sulla morfologia.

Una ovvia soluzione a questo problema sembra essere l'individuazione dei diversi tipi di cellule coinvolti nella nefrogenesi, attraverso l'identificazione immunistochemica delle proteine espresse a livello citoplasmatico o nucleare [63,67].

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di definire, a livello immunistochemico, i marcatori molecolari delle cellule staminali/progenitrici renali localizzate nelle diverse nicchie del rene umano pretermine al fine di evidenziare i possibili target molecolari per una medicina rigenerativa fisiologica da attuare nelle prime settimane di vita post-natale.

#### **4.1 Materiali e metodi.**

Nel presente studio sono stati inclusi dieci feti umani con età gestazionale compresa dalla undicesima alla venticinquesima settimana di gestazione. I campioni di rene sono stati fissati in formalina tamponata (10%), regolarmente processati e inclusi in paraffina liquida.

L'immunocolorazione è stata eseguita su sezioni dello spessore di 4µm. Lo smascheramento dell'antigene, calore-indotto, è stato effettuato su sezioni non colorate usando la "Target Retrieval Solution" (Dako Denmark A / S, Glostrup, Danimarca) per 30 minuti. Gli anticorpi monoclonali e policlonali, con le loro diluizioni, utilizzati per questo lavoro sono riportati in tabella 1. Gli anticorpi sono stati incubati per 20 minuti a temperatura ambiente. Le sezioni sono state elaborate utilizzando il complesso sistema streptavidina-biotina marcata (LSAB2, Dako) in un Autostainer Dako (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA). Come campioni di controllo negativi sono state utilizzate sezioni di rene fetale, incubate senza anticorpi. Le sezioni sono state colorate con l'ematosilina di Mayer. L'immunoreattività per tutti gli anticorpi è stata valutata nei seguenti compartimenti del rene in via di sviluppo: capsula, zona sottocapsulare, vescicole renali, glomerulo (cellule epiteliali parietali, podociti, mesangio), tubuli distali, tubuli prossimali, collettori e ansa di Henle.



Tabella 1. Anticorpi usati nel presente studio.

<b>Anticorpo</b>	<b>Diluizione</b>	<b>Animale</b>	<b>Casa produttrice</b>
EMA(MUC1)	1:150	Mouse	Dako
Galectina 3	1:50	Mouse	Genetex
S100	1:2000	Rabbit	Dako
CD20	1:400	Mouse	Dako
Ki67	1:100	Mouse	Dako
HBME1	1:50	Mouse	Dako
Sinaptofisina	1:20	Mouse	Dako
CD79a	1:200	Mouse	Dako
Cromogranina a	1:300	Mouse	Dako
CD5	1:50	Mouse	Dako
Carletina	1:50	Mouse	Dako
p16	1:50	Mouse	Santa Cruz
p63	1:50	Mouse	Sigma
CD21	1:50	Mouse	Dako
TTF1	1:100	Mouse	Dako
p53	1:50	Mouse	Dako
CK20	1:50	Mouse	Dako
Melan A	1:50	Mouse	Dako
CD23	1:500	Mouse	Dako
CD30	1:40	Mouse	Dako
CD3	1:200	Rabbit	Dako
Inibina $\alpha$	1:50	Mouse	Dako
CD15	1:500	Mouse	Dako
MDM2	1:10	Mouse	Santa Cruz
CK8-18	1:50	Mouse	Dako
CK7	1:150	Mouse	Dako
Glypican 3	1:200	Mouse	Dako
Vimentina	1:1000	Mouse	Dako

<b>Anticorpo</b>	<b>Diluizione</b>	<b>Animale</b>	<b>Casa produttrice</b>
WT1	<i>1:100</i>	<i>Mouse</i>	<i>Dako</i>
$\alpha$ 1 Anti-tripsina	<i>1:2000</i>	<i>Rabbit</i>	<i>Dako</i>
Nestin	<i>1:200</i>	<i>Mouse</i>	<i>Santa Cruz</i>
CD10	<i>1:1000</i>	<i>Mouse</i>	<i>Dako</i>
BCL2	<i>1:150</i>	<i>Mouse</i>	<i>Dako</i>
Wnt1	<i>1:50</i>	<i>Rabbit</i>	<i>Abnova</i>
PAX2	<i>1:400</i>	<i>Mouse</i>	<i>Abnova</i>
CD133	<i>1:200</i>	<i>Rabbit</i>	<i>Abnova</i>

## **4.2 Risultati**

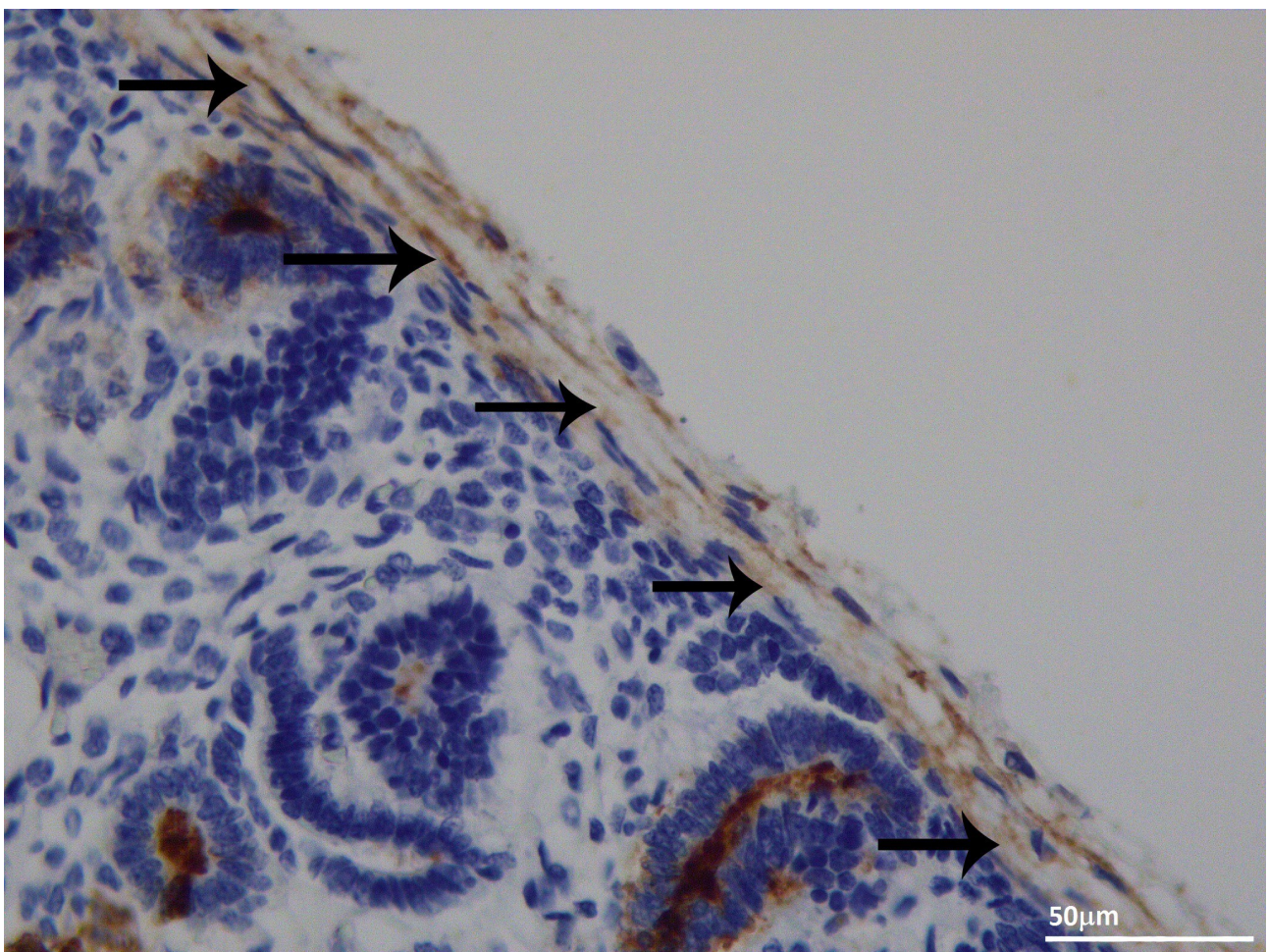
I dati più rilevanti riguardanti l'immunoreattività delle cellule staminali/progenitrici renali e delle cellule renali differenziate nei reni fetali e neonatali analizzati in questo studio sono riportati nella Tabella 2. Non sono state rilevate differenze significative di immunoreattività per i marcatori utilizzati nelle diverse nicchie di cellule staminali/progenitrici renali tra i soggetti di età gestazionale differente. I dati ottenuti evidenziano l'esistenza di più nicchie di cellule staminali/progenitrici in diverse zone del rene umano in via di sviluppo. Al fine di mostrare al meglio i patterns immunoistochimici delle diverse nicchie di cellule staminali, esse vengono riportate separatamente.

Tabella 2. Immunoreattività delle cellule staminali e delle cellule mature renali.

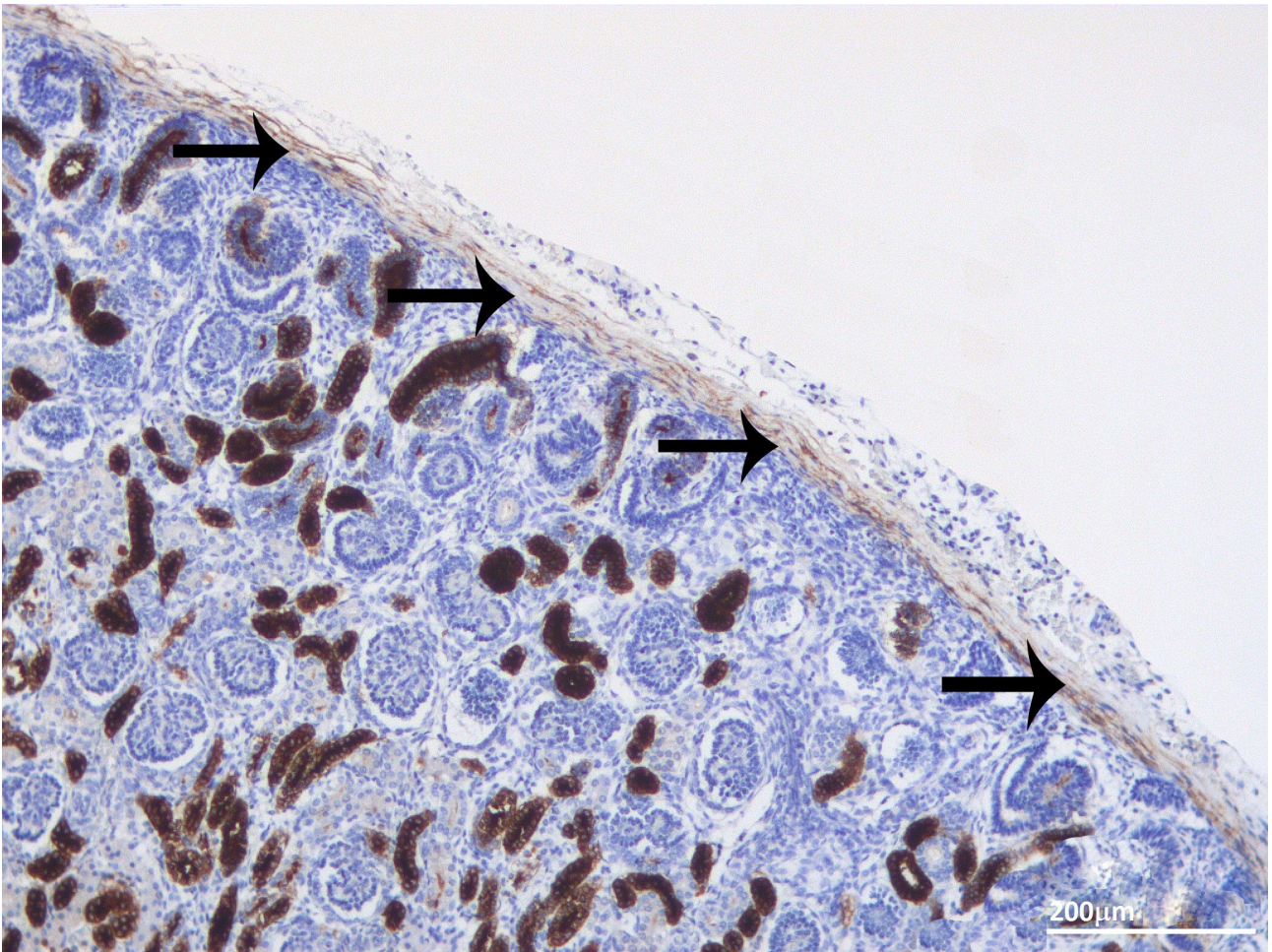
Anticorpo	Capsula	Blue Strip	Cap-mesenchima	Vescicole renali	Cellule interstiziali	Pecs	Podociti	Cellule mesangiali	Tubuli distali	Tubuli prossimali	Dotto collettore	Ansa di Henle
EMA(MUC1)	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Galectina 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ki67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HBME1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sinaptofisina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD79a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cromogranina a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carletina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
p16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
p63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TTF1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
p53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CK20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melan A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibina $\alpha$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD15	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
MDM2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CK8-18	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
CK7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Glypican 3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Vimentin	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
WT1	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
$\alpha$ 1 Anti-tripsina	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
Nestin	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
CD10	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+
BCL2	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
Wnt1	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+

Anticorpo	Capsula	Blue Strip	Cap-mesenchima	Vescicole renali	Cellule interstiziali	Pecs	Podociti	Cellule mesangiali	Tubuli distali	Tubuli prossimali	Dotto collettore	Ansa di Henle
PAX2	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
CD133	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Capsula. La capsula renale è una importante nicchia di cellule staminali/progenitrici nel rene umano in via di sviluppo in tutte le epoche gestazionali analizzate nel presente studio. Le cellule staminali/progenitrici della capsula sono immunoreattive per EMA (MUC1) (fig.2a) e Vimentina (fig.2b). Inoltre, sparse piccole cellule indifferenziate sono state rilevate nella capsula, caratterizzate da un fenotipo differente, essendo reattive per MDM2 (fig.3a) e Wnt1 (fig.3b).

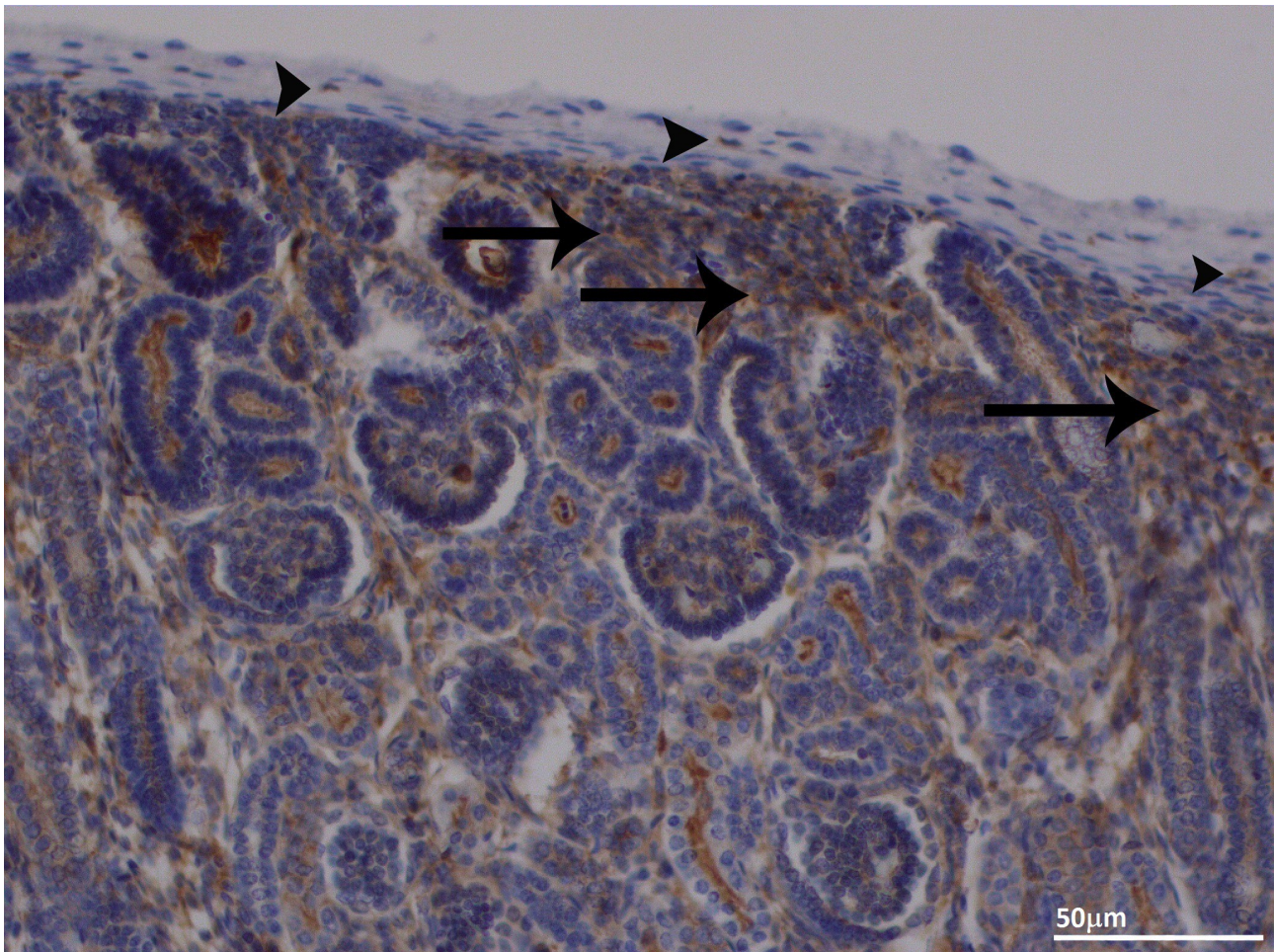


*Fig.2a. Immunoreattività per EMA (MUC1) nelle cellule staminali/progenitrici all'interno della capsula renale (freccie) in un rene a 25 settimane. L'immunoreattività per il peptide è localizzata nel citoplasma delle cellule capsulari.*

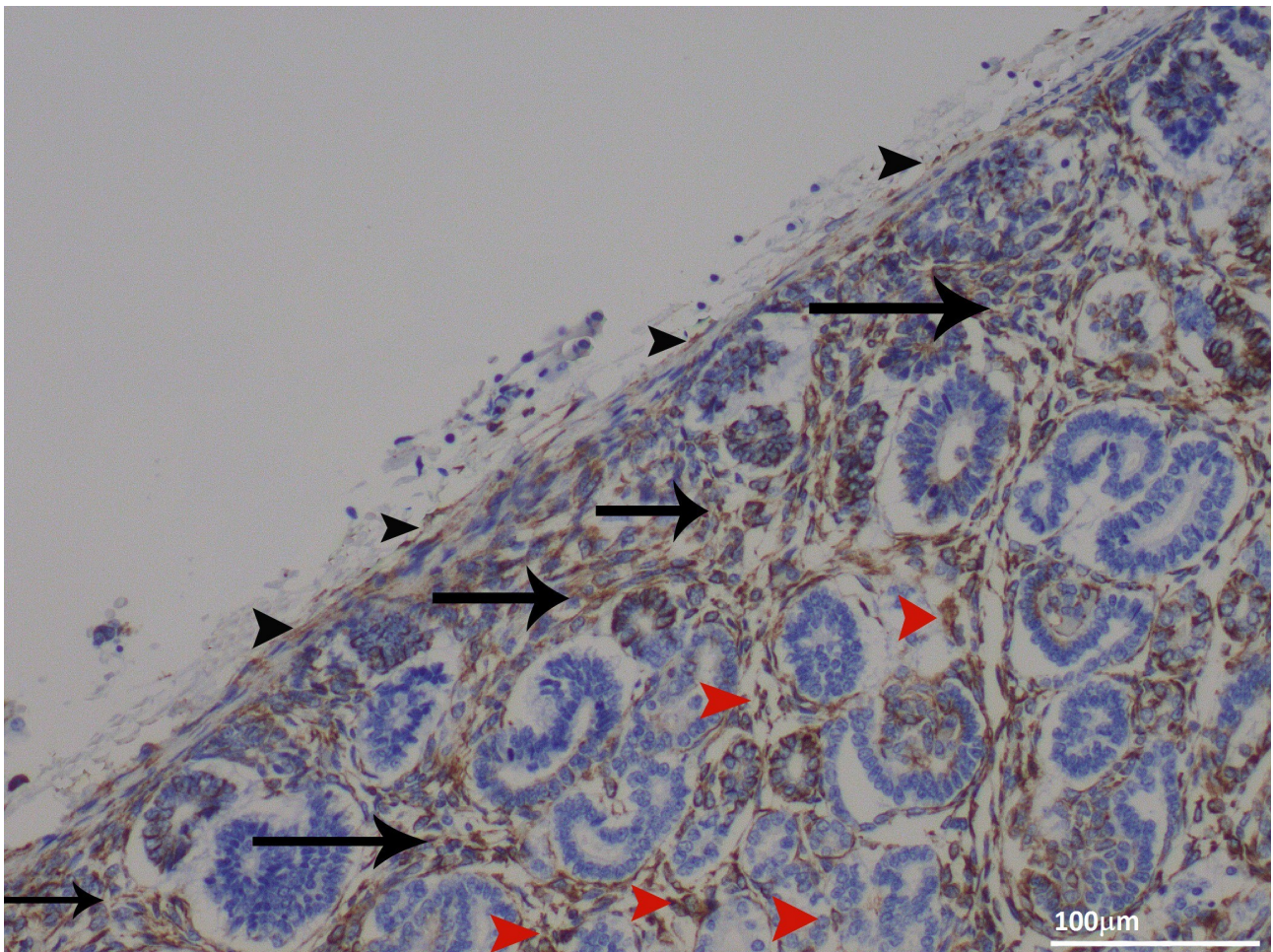


*Fig.2b. Cellule progenitrici capsulari renali (frecce) vengono immuno-colorate con vimentina, proteina localizzata nel citoplasma.*

Blue Strip. La Blue Strip rappresenta un aggregato di cellule staminali/progenitrici indifferenziate che occupano la zona sottocapsulare. In questo studio, il fenotipo di queste cellule staminali/progenitrici è stato caratterizzato dall'immunoreattività per MDM2 (fig.3a) e Wnt1 (Fig.3b).



*Fig.3a. Immunoreattività citoplasmatica per MDM2 caratterizza le cellule staminali/progenitrici della Blue strip (freccie) nella zona sub-capsulare di un rene fetale a 11 settimane di gestazione. MDM2 marca anche cellule isolate nella capsula renale (punte di freccia).*



*Fig.3b. Reattività di Wnt1 in un rene a 11 settimane. L'immuno-colorazione per Wnt1 è limitata principalmente alle cellule della Blue strip (freccce) e dei progenitori interstiziali (punte di freccia rosse). Wnt1 marca anche cellule isolate nella capsula renale (punte di freccia nere).*

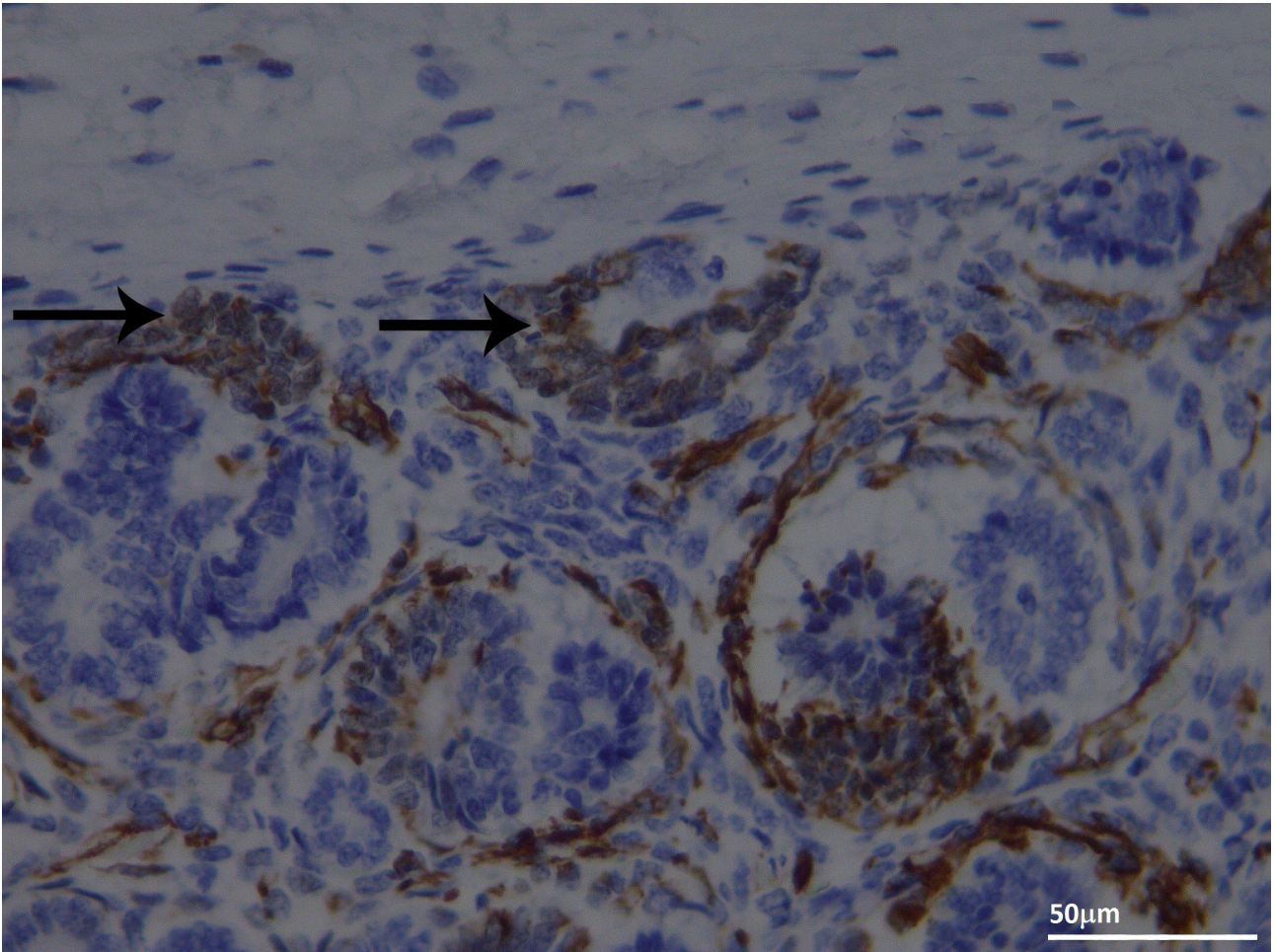
Cap mesenchima. Le cellule del cap mesenchima sono progenitori staminali della linea epiteliale che si aggregano e condensano attorno alla gemma ureterica. EMA (MUC1), CD15, Vimentin, WT1 (Fig.4a), CD10, BCL2 (Fig.4b), Wnt1 e PAX2 sono stati espressi nelle cellule cap mesenchima.

Vescicole renali. Le vescicole renali sono le prime strutture epiteliali provenienti dalle cellule del cap-mesenchima, che rappresentano una fase intermedia nella formazione nefrone. In questo studio, le cellule che danno origine alle vescicole renali sono positive per EMA (MUC1), CD15, CK8-18, glypican 3, WT1, CD10, BCL2 (fig. 5a), Wnt1 (Fig.5b) e PAX2.

Cellule interstiziali. Sparse cellule interstiziali scarsamente differenziate, spesso di forma ovale, sono immunoreattive per Vimentina (Fig. 6), WT1 e  $\alpha$ 1Anti-tripsina. Questo fenotipo peculiare ha permesso la loro differenziazione da istiociti interstiziali e fibroblasti.

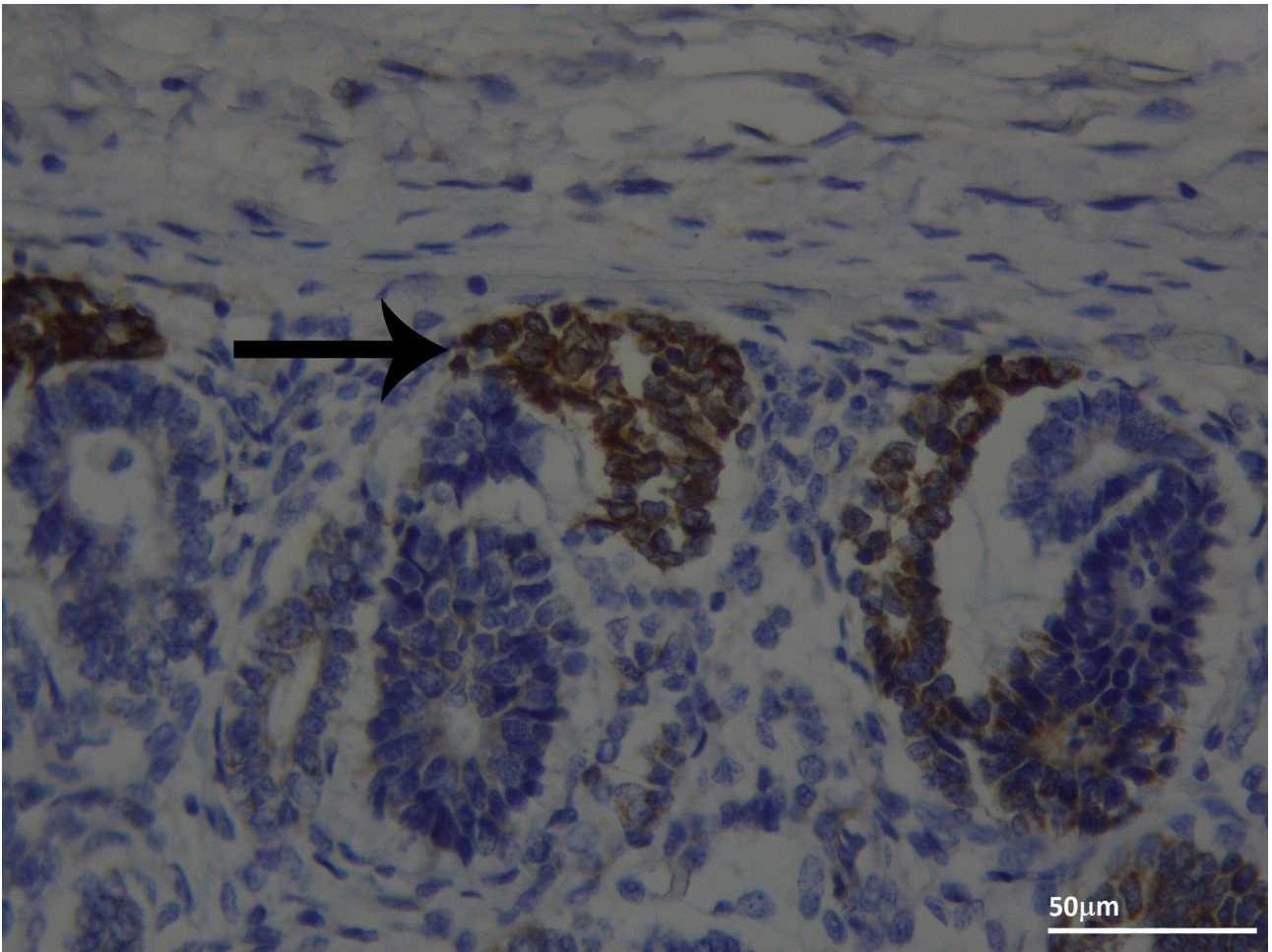
Pecs. Cellule staminali/ progenitrici sono rilevabili mescolate tra le cellule epiteliali parietali della capsula di Bowman dei glomeruli in via di sviluppo. Questi progenitori situati tra le Pecs sono stati

positivi per più marcatori, tra cui Vimentina, WT1, CD10 (fig.7a), BCL2 (Fig.7b) e Wnt1.

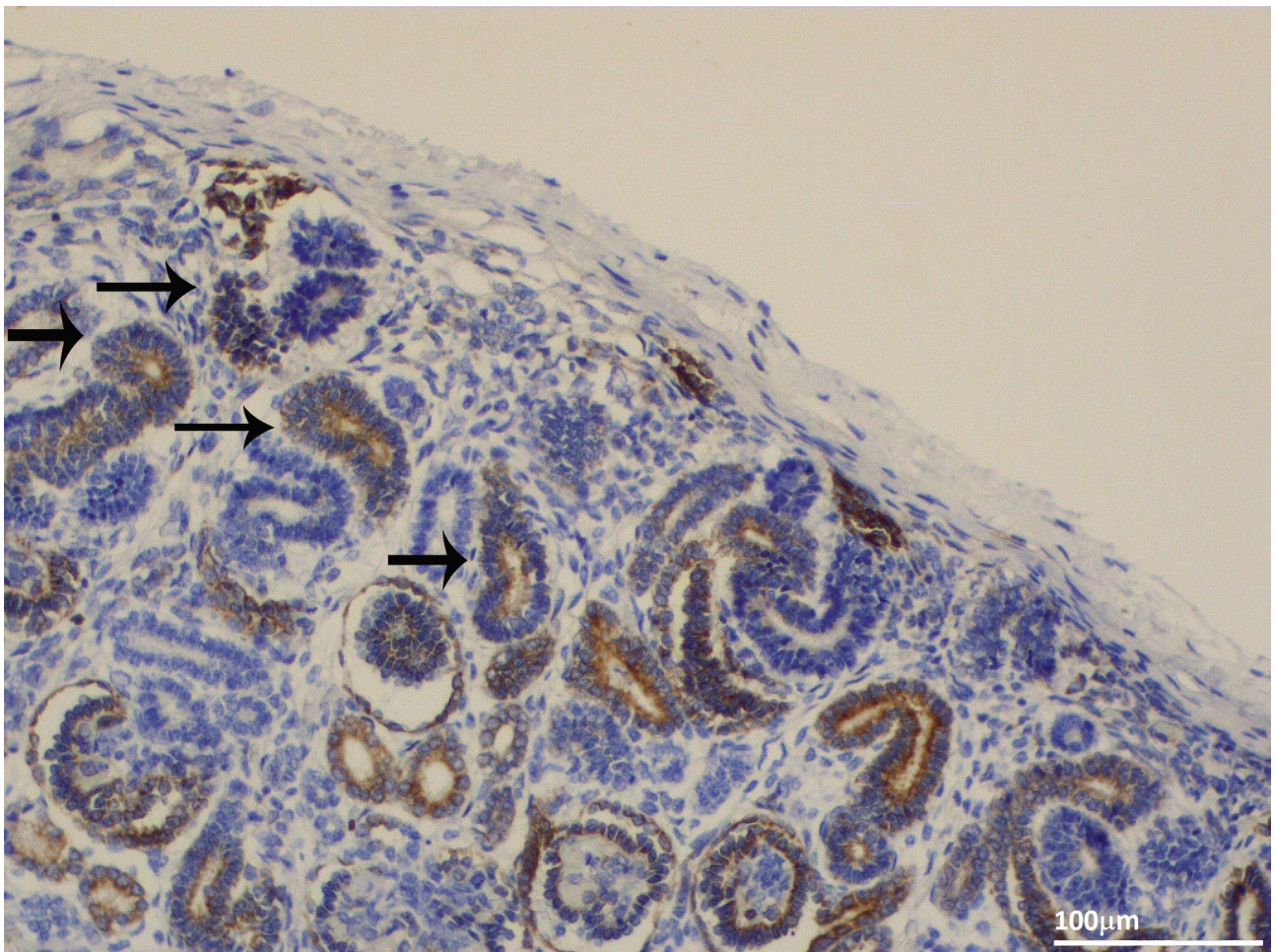


*Fig.4a. Espressione di WT1 nelle cellule del cap-mesenchima (freccie), in un rene a 15 settimane. L'immagine mostra le cellule WT1-reattive con diffusa immuno-colorazione citoplasmatica.*

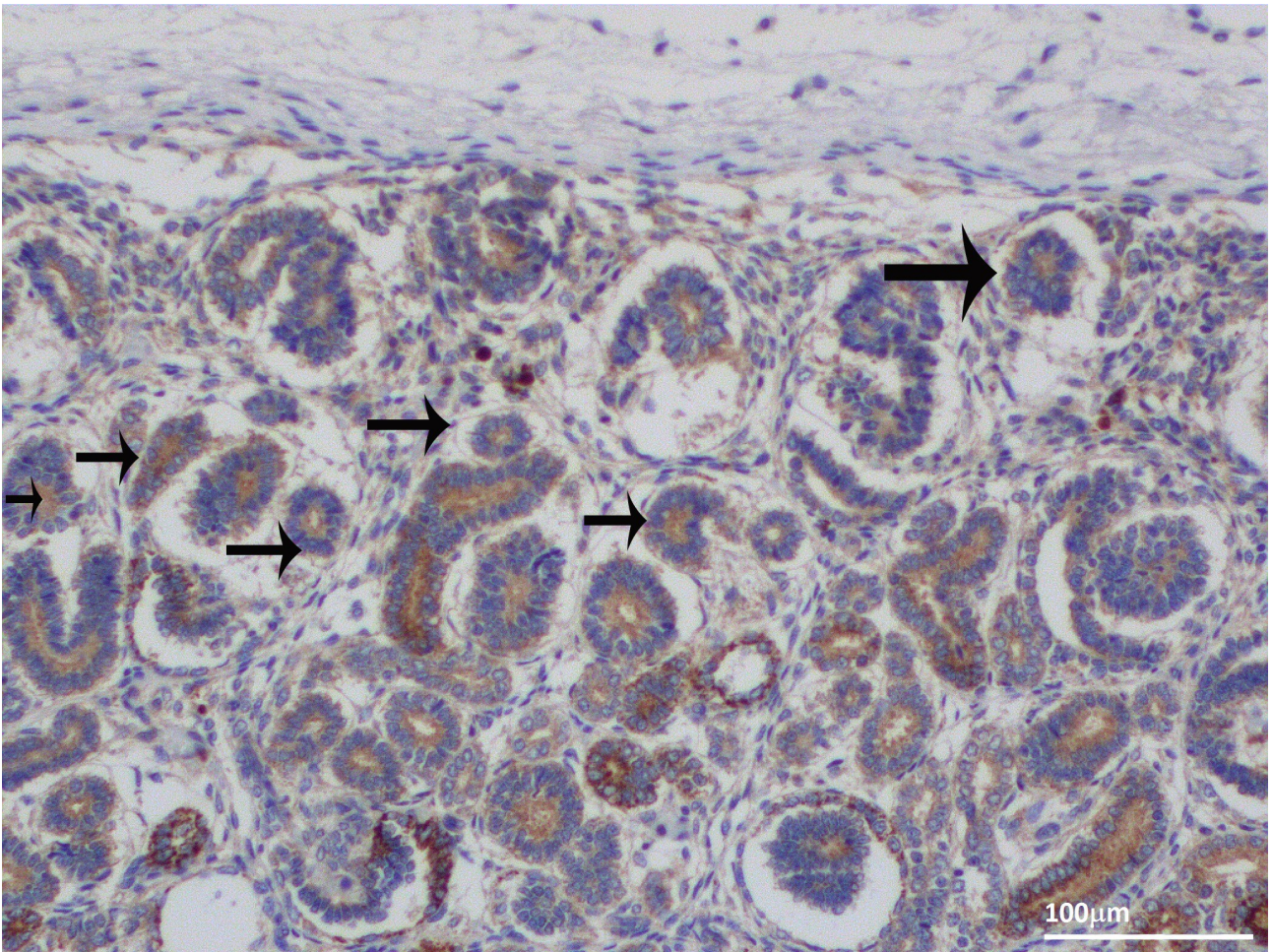




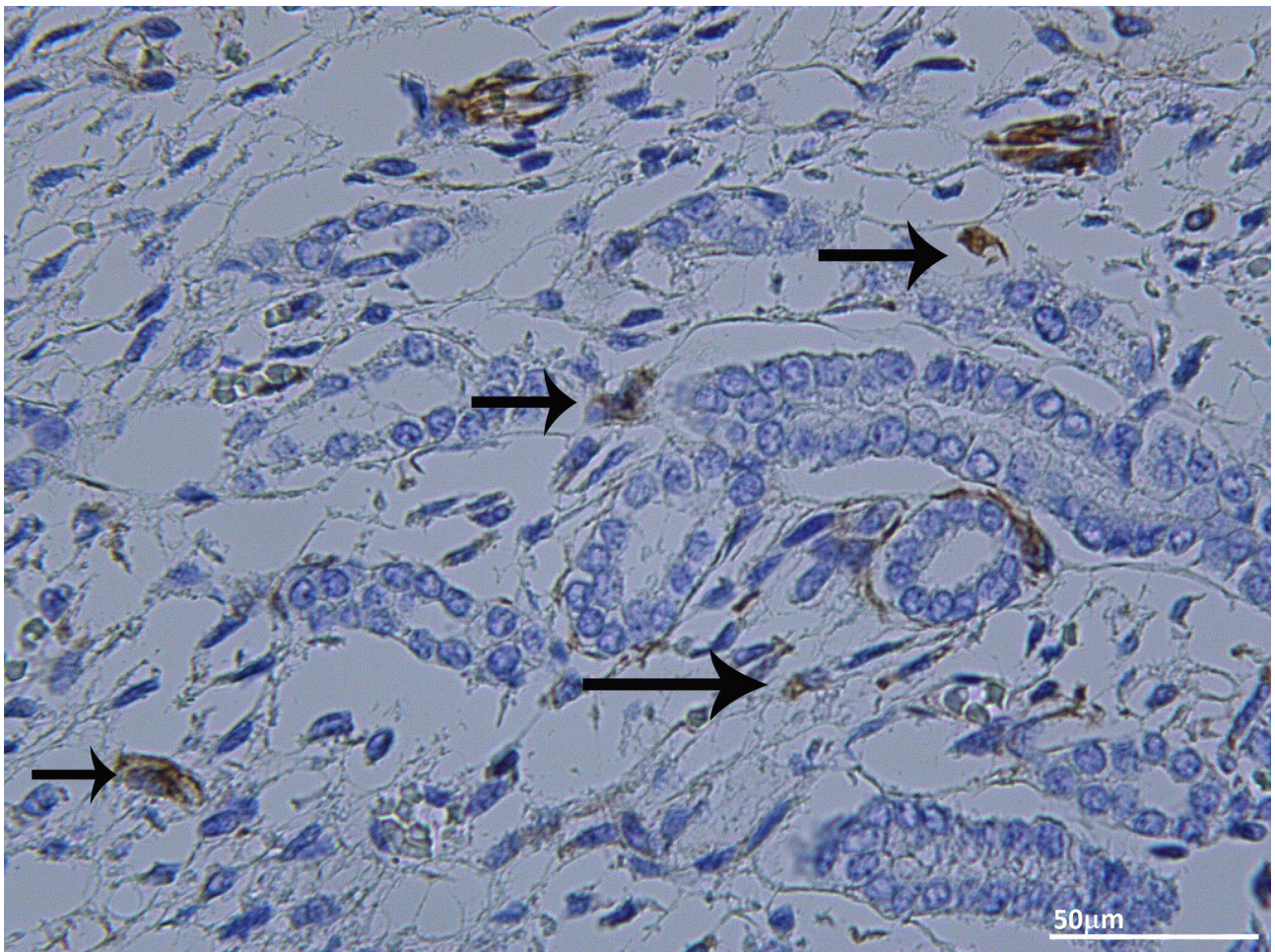
*Fig.4b. BCL 2 è espressa prevalentemente nelle cellule del cap-mesenchima (freccia) in un rene a 15 settimane. La reattività è citoplasmatica.*



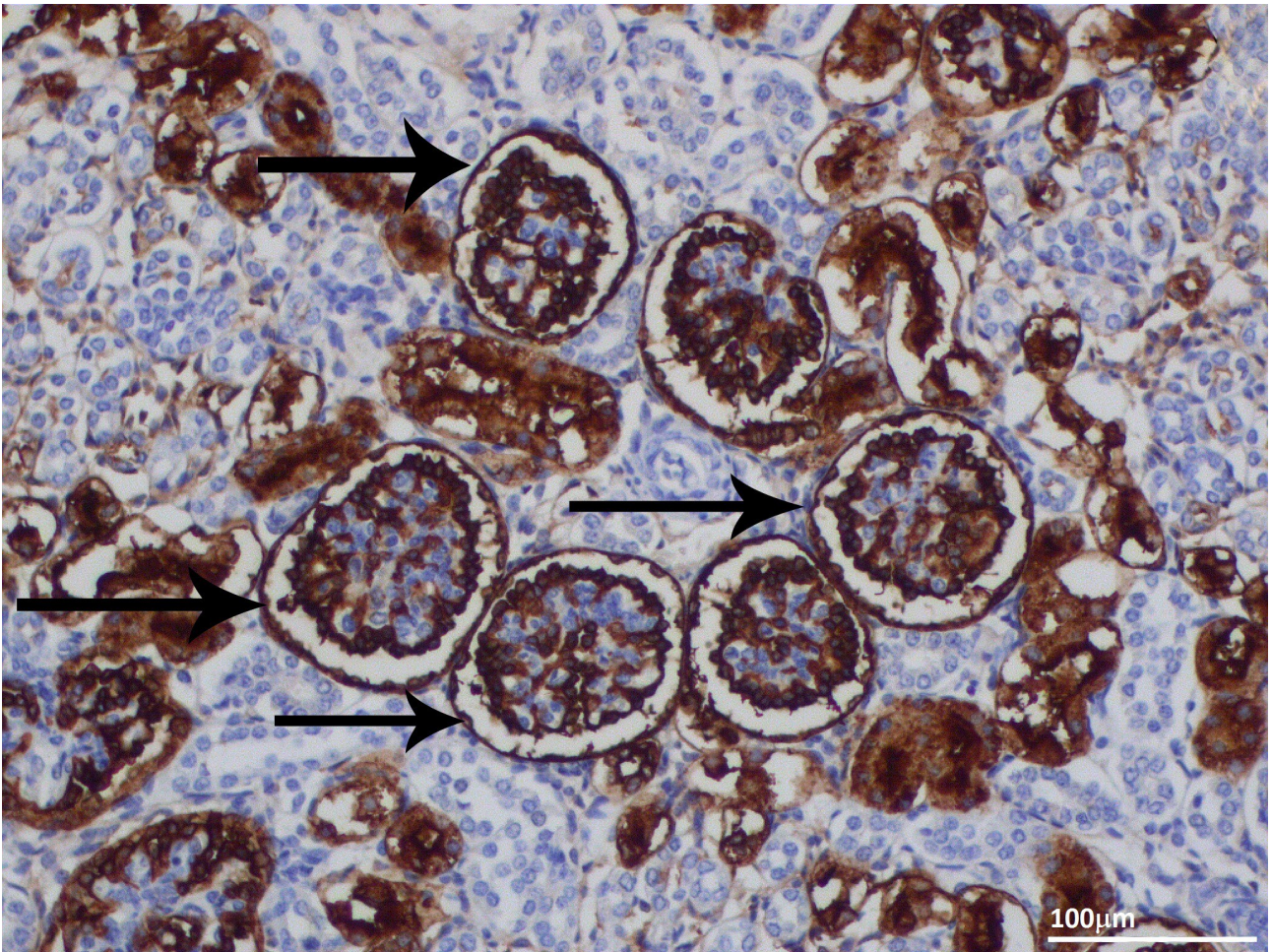
*Fig.5a. In un rene a 17 settimane, le vescicole renali (frece) sono immuno-colorate dall' anticorpo anti-BCL2. Le cellule positive mostrano immunoreattività citoplasmatica.*



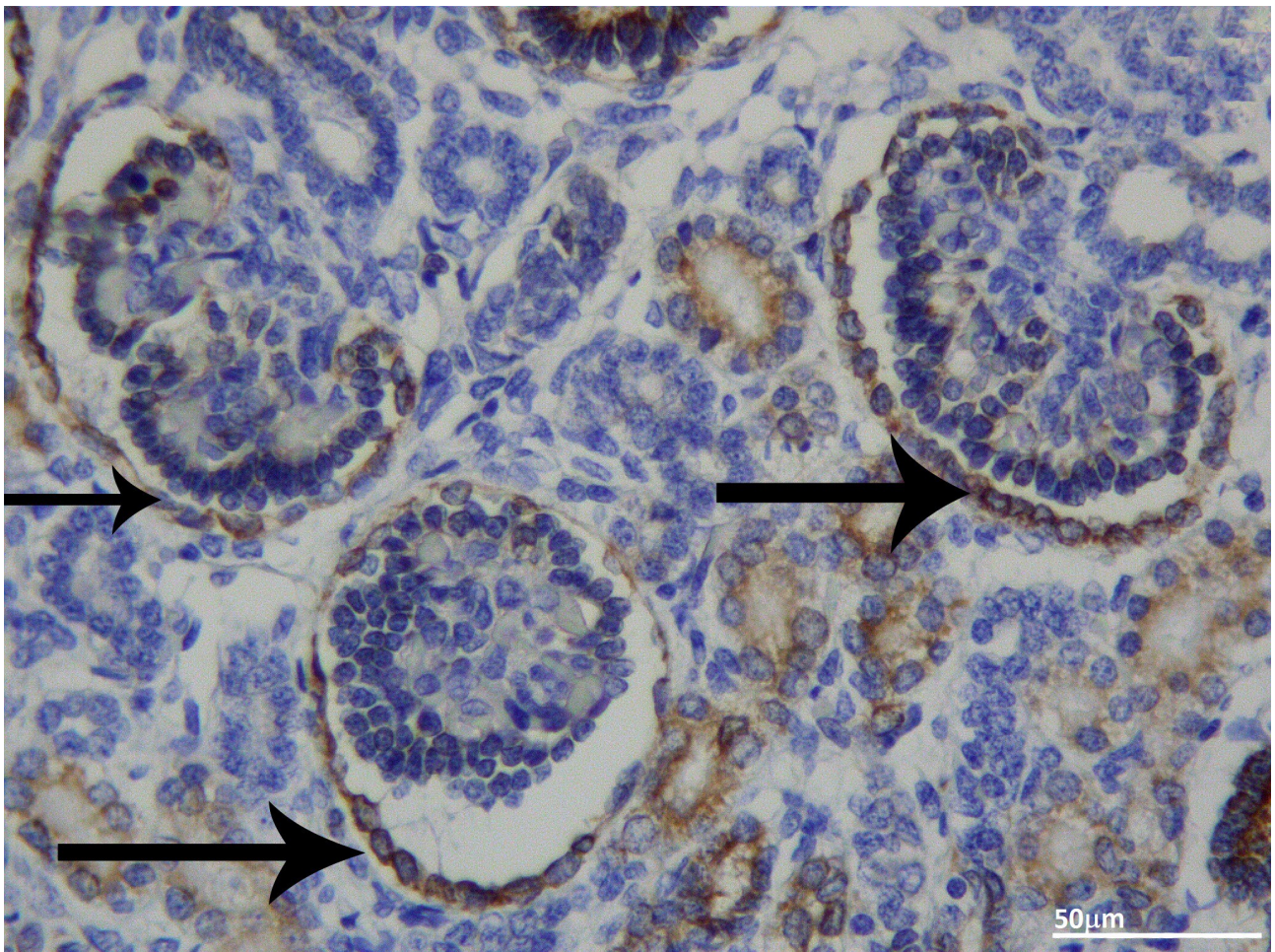
*Fig.5b. La reattività del Wnt1 in rene a 17 settimane è principalmente granulare e localizzata nel citoplasma delle vescicole renali (freccie).*



*Fig.6. Vimentina è espressa in sparse cellule interstiziali (freccie) in un rene a 22 settimane. L'immagine mostra focale e lieve reattività citoplasmatica.*



*Fig.7a. In un neonato 25 settimane di età, le Pecs della capsula di Bowman (freccie) sono immunocolorate da CD10. La reattività di CD10 è localizzata principalmente nel citoplasma. Anche i podociti sono marcati da CD10.*

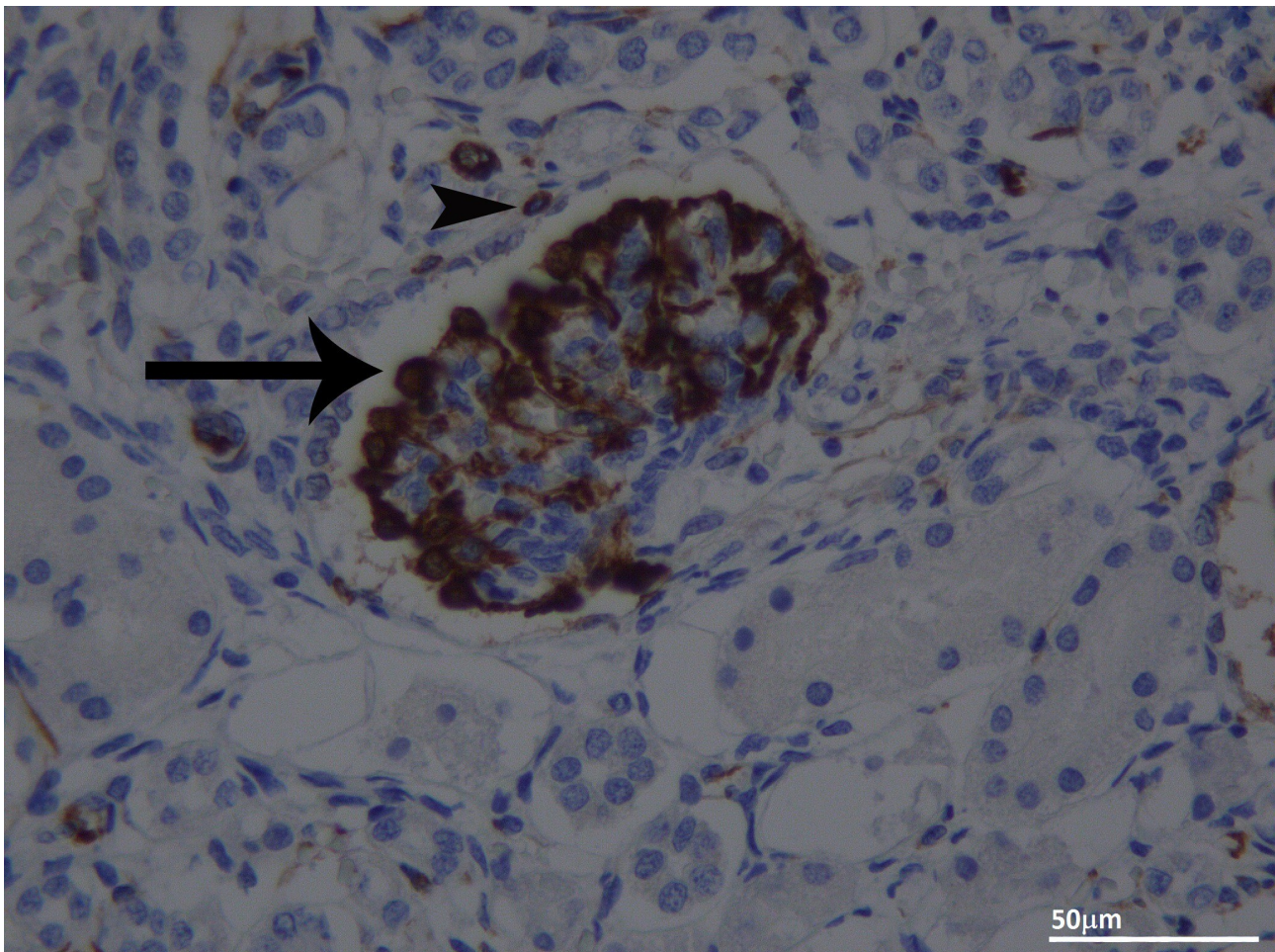


*Fig.7b. L'immuno-colorazione per BCL 2 in un rene a 25 settimane è limitata principalmente alle Pecos (freccie), essendo assente nei podocoti. L'immagine mostra una lieve reattività citoplasmatica.*

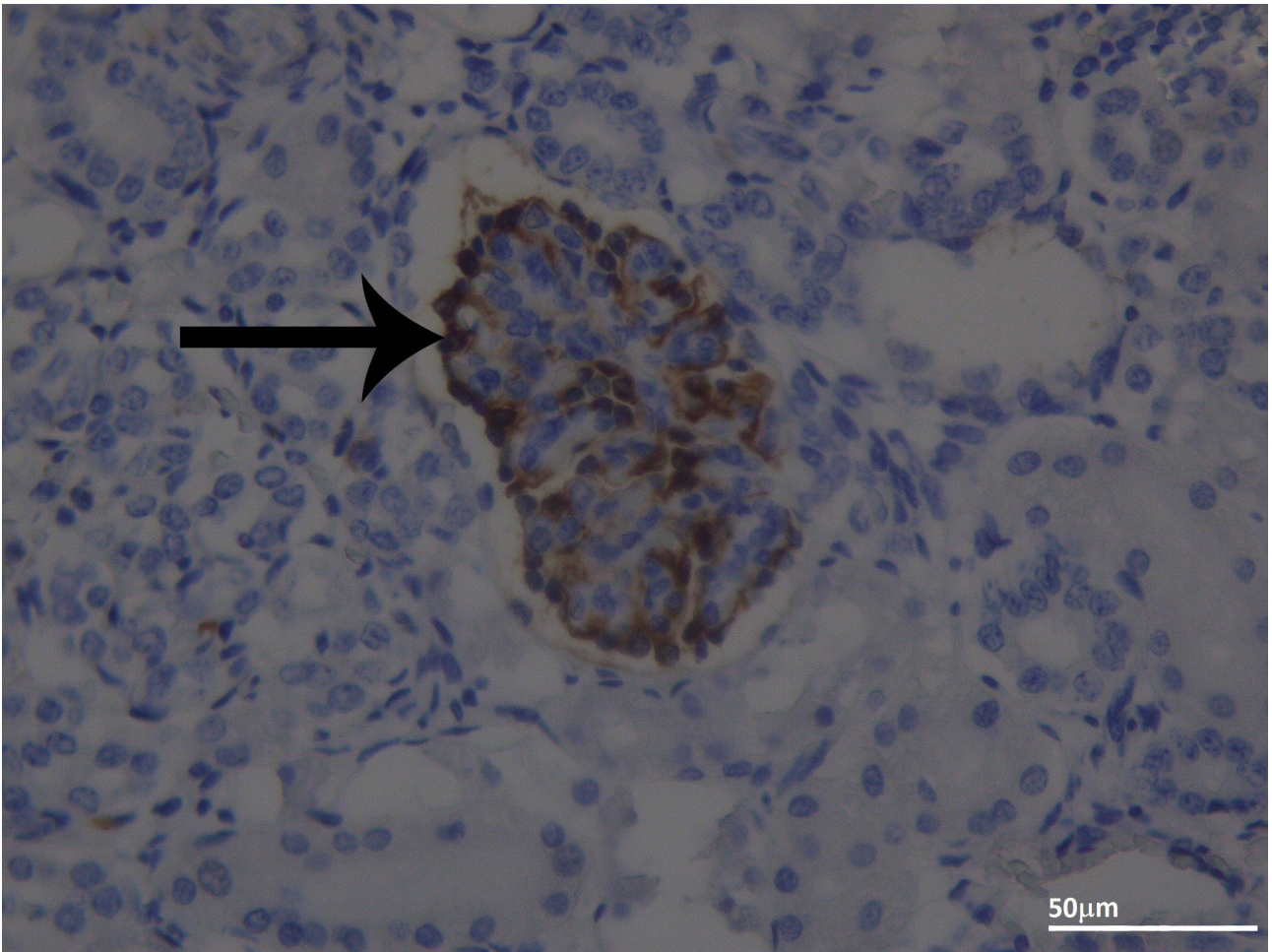
Podociti. Vimentina, WT1 (fig.8a), Nestin (fig.8b) e CD10 sono espressi nei precursori dei podociti.

Cellule mesangiali. Non è stata rilevata nessuna reattività nelle cellule mesangiali per i marcatori immunostochimici utilizzati in questo studio.

Tubuli distali. Sparse cellule staminali/progenitrici renali sono state rilevate all'interno dei tubuli distali. Queste cellule progenitrici mostrano immunoreattività per più marcatori, tra cui EMA (MUC1), CD15, CK8-18 (fig.9),  $\alpha$ 1 Antitripsin, Bcl 2, Wnt1 e PAX2.

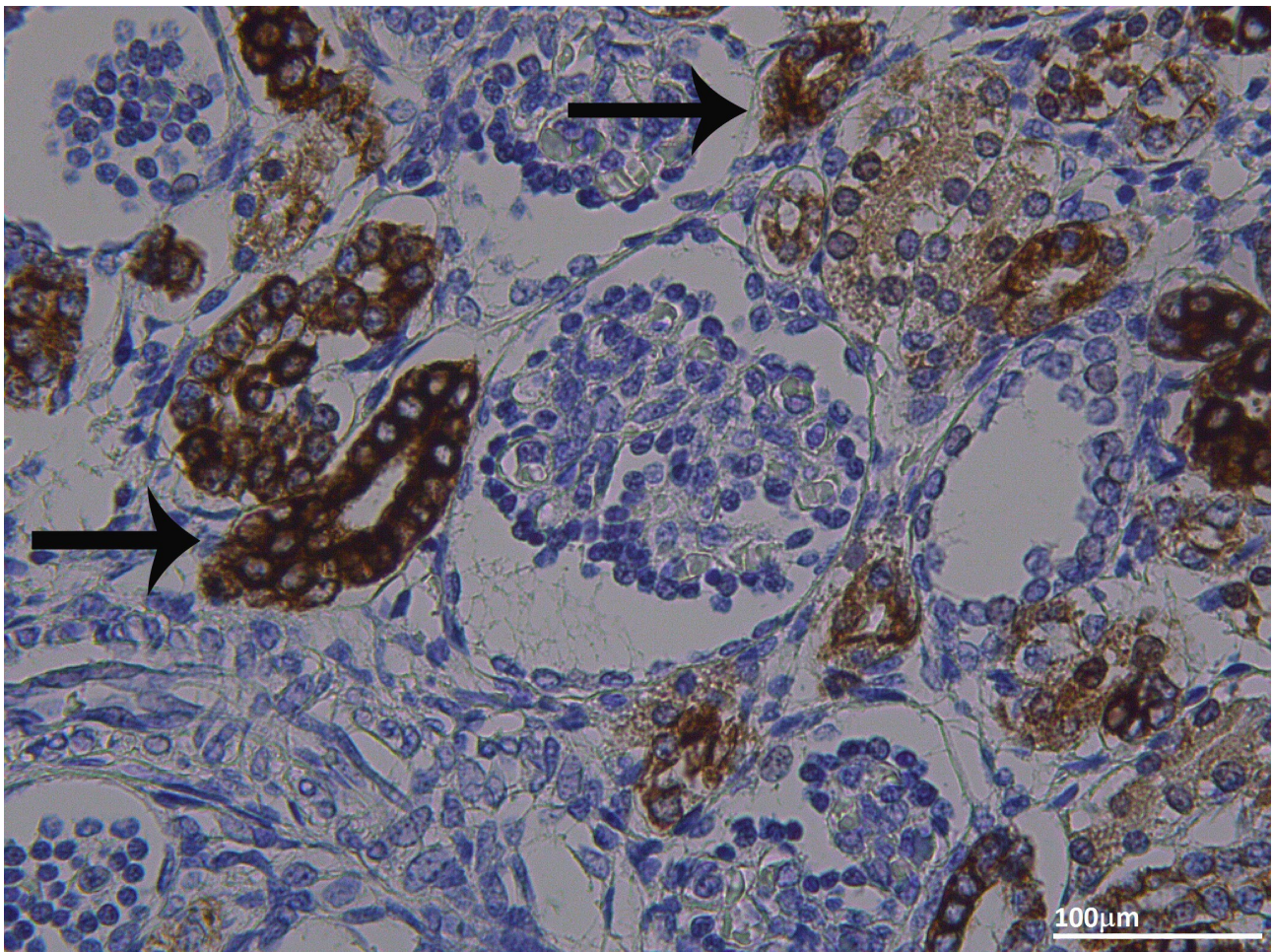


*Fig.8a. Podociti (freccia) sono marcati da WT1 in un rene a 25 settimane. L'immunoreattività è nucleare. WT1 marca anche piccole cellule indifferenziate, di forma ovale (punta di freccia) negli spazi interstiziali, suggestivi per cellule staminali/progenitrici.*



*Fig.8b. Nestina marca solo i podociti (freccia) nei glomeruli del rene a 25 settimane.  
L'immunoreattività è citoplasmatica.*



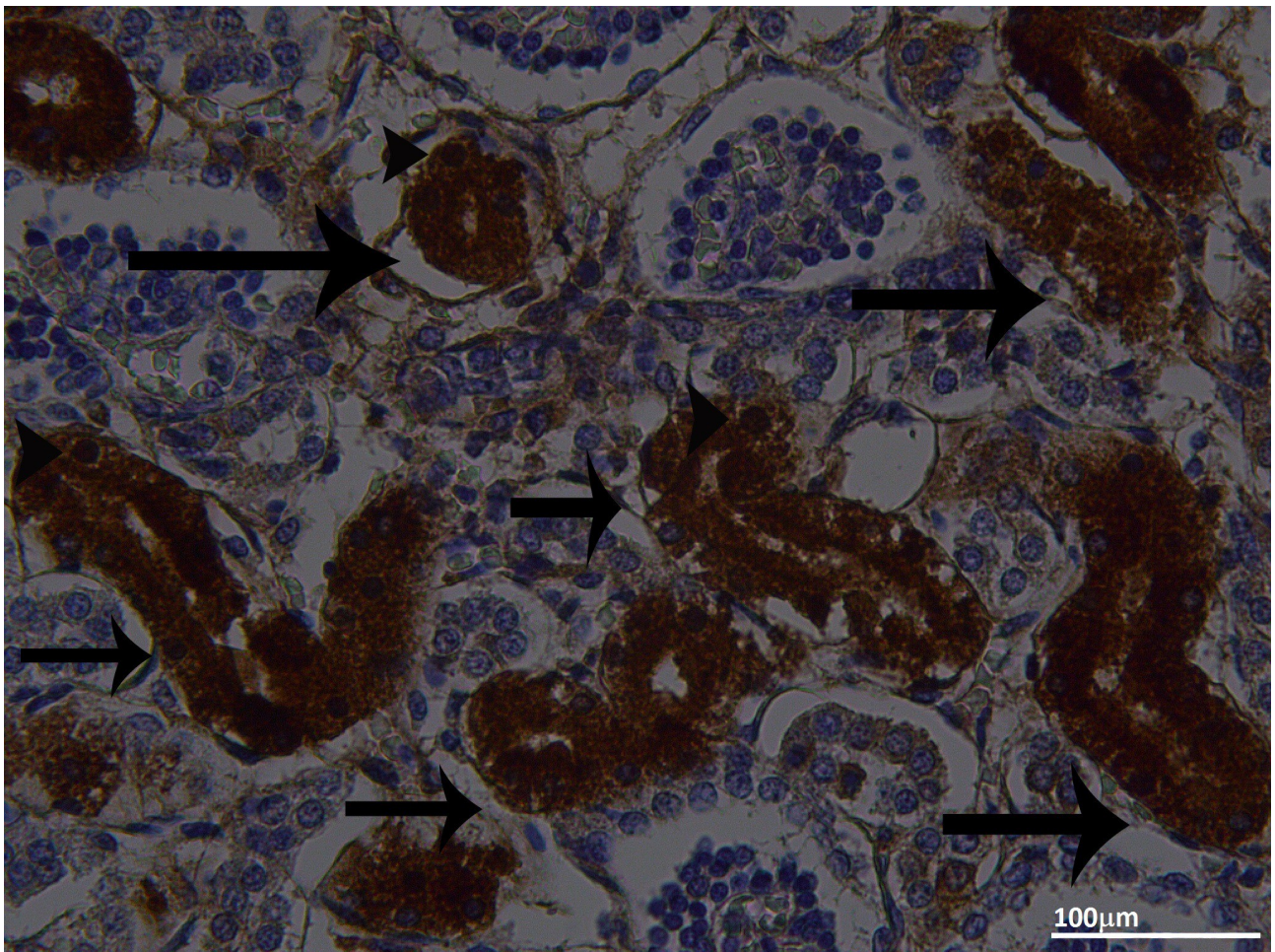


*Fig. 9. L'immunoreattività per CK8-18 è limitata principalmente ai tubuli distali (frecce) in un rene di 23 settimane.*

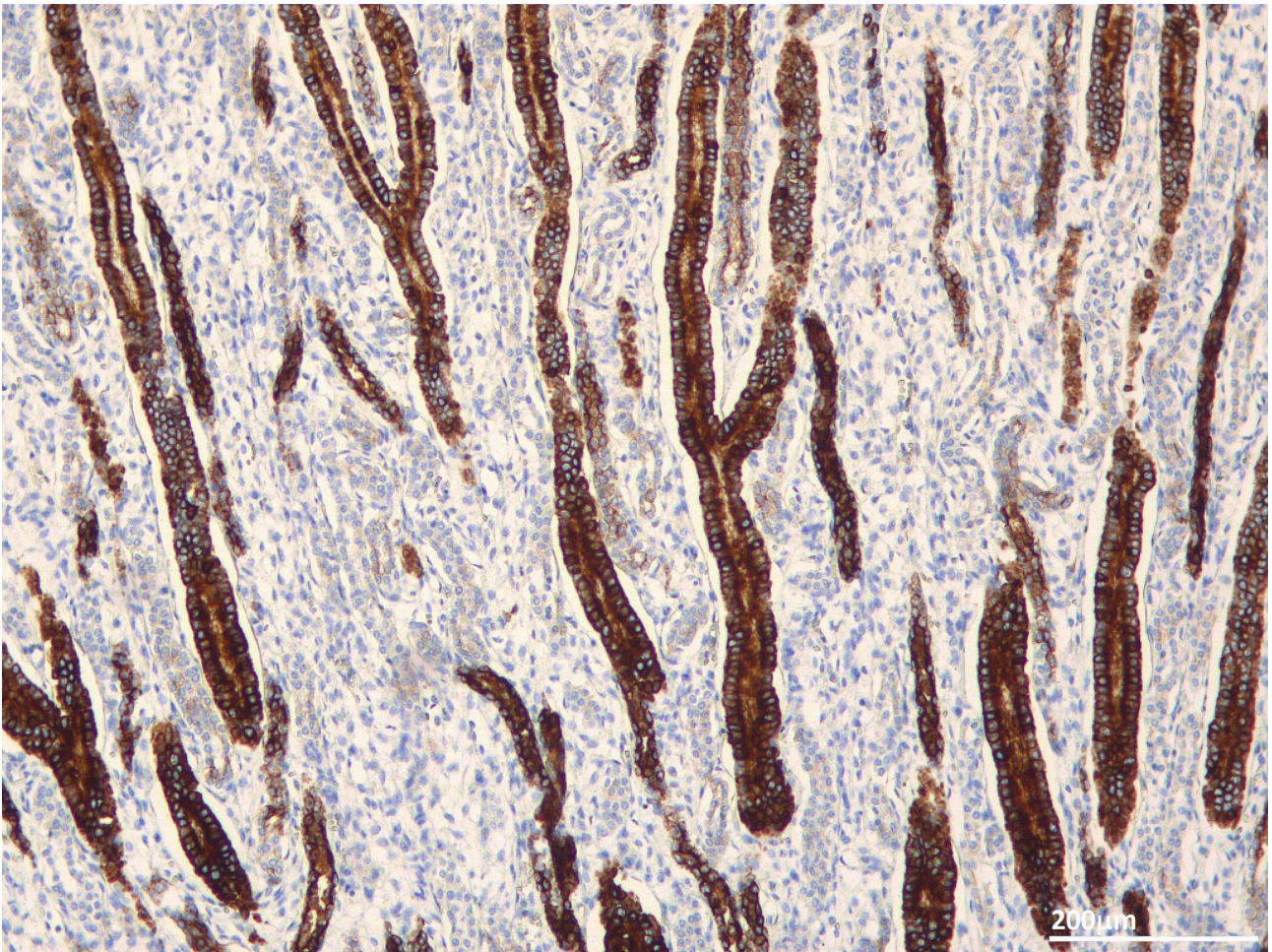
Tubuli prossimali. Isolate cellule staminali/progenitrici renali sono state trovate all'interno dei tubuli prossimali. I seguenti marcatori sono stati espressi in questi progenitori tubolari: EMA (MUC1), CD15, MDM2, CK8-18,  $\alpha$ 1Anti-tripsina (fig.10), CD10, BCL2 e Wnt1.

Dotto collettore. Cellule staminali/progenitrici renali sono state rilevate anche all'interno dotti collettori. L'immunofenotipo di queste cellule progenitrici è stato caratterizzato dalla reattività per più marcatori, tra cui EMA (MUC1), CK8-18, CK-7 (fig.11),  $\alpha$ 1Anti-tripsina, BCL 2 e Wnt1.

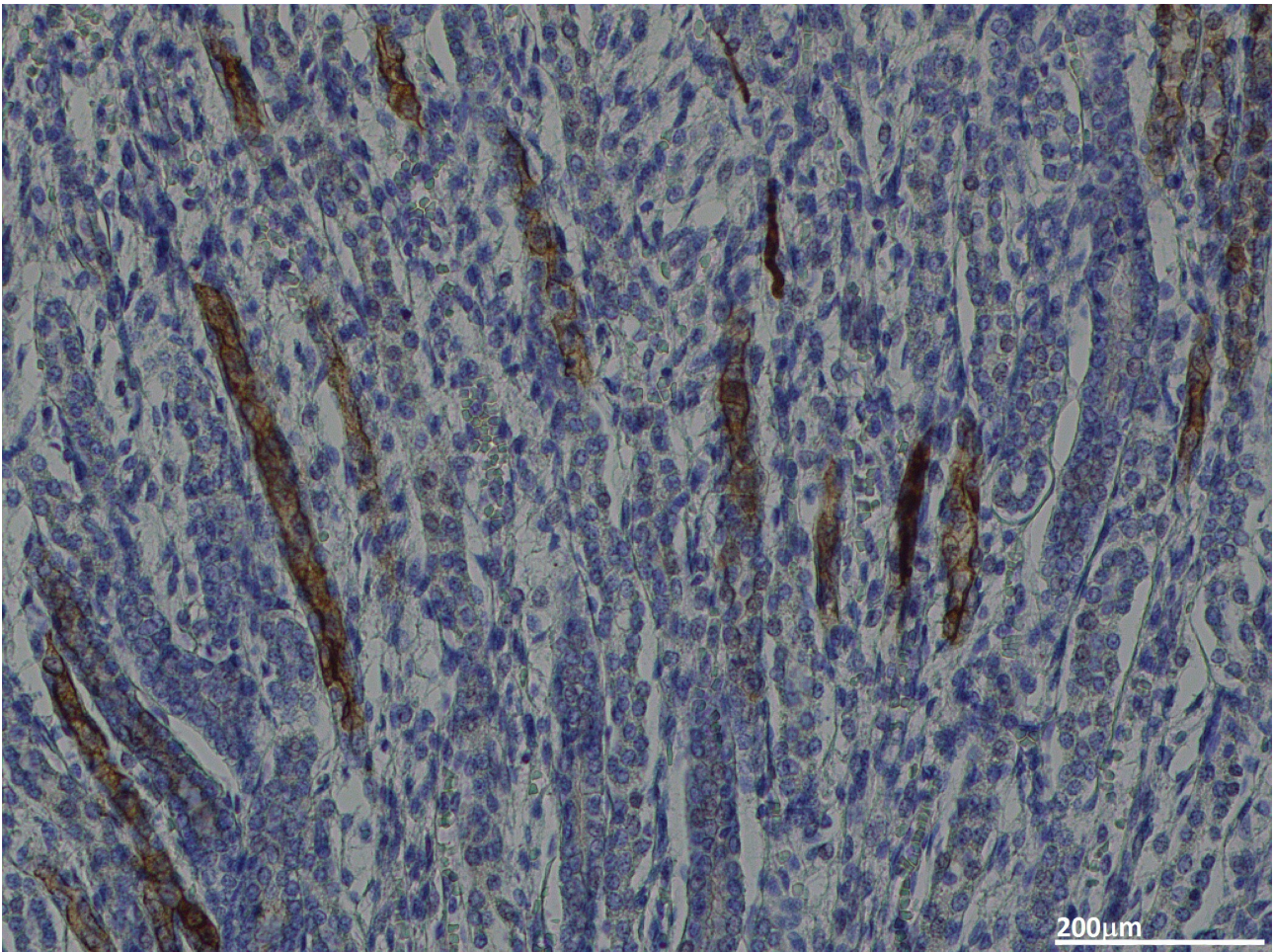
Ansa di Henle. Le anse di Henle sono positive per EMA (MUC1), CD15, CK8-18,  $\alpha$ 1Anti-tripsina, CD10, BCL2, Wnt1 e CD133 (fig.12).



*Fig.10. Un forte immunoreattività per  $\alpha$ 1Anti-tripsina è localizzata nelle cellule tubulari prossimali in un rene a 23 settimane di gestazione (freccie). La reattività è rilevata sia nel citoplasma che nel nucleo (punta di freccia).*



*Fig.11. Nella regione midollare del rene a 16 settimane, la reattività citoplasmatica di CK-7 è limitata ai dotti collettori.*



*Fig.12. Reattività focale e citoplasmatica per CD133 nelle anse di Henle in un rene a 25 settimane.*

### **4.3 Discussione.**

La presenza di cellule staminali/progenitrici nel rene umano in via di sviluppo dei neonati prematuri potrebbe rappresentare, in futuro, una fantastica opportunità per modificare il numero di glomeruli, o meglio il numero di nefroni, che caratterizzeranno per tutta la vita un soggetto nato prematuramente. Nei neonati prematuri la nefrogenesi viene interrotta circa quattro settimane dopo il parto. Di conseguenza, in un prematuro nato a 28 settimane di gestazione, la nefrogenesi si interrompe a 32 settimane di età post-concezionale. Poiché, in condizioni fisiologiche la nefrogenesi è ancora attiva intorno alla 38<sup>o</sup> settimana di gestazione, in questo caso il pretermine sarà privato di 6 settimane di nefrogenesi [47]. Il risultato finale è oligonephronia, che caratterizzerà il suo rene o i suoi reni nella vita adulta, data l'incapacità dell'adulto di rigenerare un nefrone malato.

Recentemente, è stata ipotizzata dal nostro gruppo la possibilità di contrastare l'oligonephronia nei neonati pretermine. Il progetto è stato intitolato "medicina rigenerativa fisiologica" poiché è

caratterizzato dallo scopo di indurre la funzione delle cellule staminali renali fisiologicamente presenti nei reni pretermine, con fattori stimolanti che normalmente si trovano nel nostro corpo [10].

Un passo fondamentale in questo progetto è rappresentato dalla identificazione delle molecole espresse dai diversi progenitori staminali rilevati nelle molteplici nicchie di cellule staminali che caratterizzano il rene umano in via di sviluppo [62,63]. Questo studio si focalizza sulla diversità di markers immunoistochimici espressi dai diversi pool di cellule staminali/progenitrici renali.

Mentre Vimentina e EMA (MUC1) sono stati espressi nelle cellule staminali capsulari, MDM2 e WT1 caratterizzano le cellule multipotenti della "blue strip" nella zona sottocapsulare. La differenziazione verso il cap mesenchima è stata caratterizzata dall'acquisizione di Bcl2 e Wnt1, mentre il passaggio alla fase successiva di transizione mesenchimale-epiteliale è stata ben evidenziata da immuno-colorazione per EMA (MUC1), CD15, PAX2, Glypican3 e CK8-18.

Nei glomeruli in via di sviluppo, le cellule staminali/progenitrici interposte tra le cellule epiteliali parietali (Pecs) della capsula di Bowman sono state immunocolorate da CD10, mentre i precursori dei podociti sono stati evidenziati dalla reattività per WT1 e Nestina.

Da tutti questi dati emerge un quadro complesso, caratterizzato da molteplici cellule staminali/progenitrici che caratterizzano probabilmente più passaggi del processo di differenziazione che, partendo dal mesenchima metanefrico, termina con più di venti tipi di cellule differenziate tipiche del rene umano maturo.

In conclusione, i marcatori qui riportati, possono rappresentare la base per l'uso, a livello sperimentale, di un bersaglio di medicina rigenerativa volto a stimolare uno o più pool di cellule staminali in modo da mantenere la loro attività nefrogenica anche dopo la nascita.

Questo potrebbe consentire a tutti i bambini prematuri di fronteggiare l'insorgenza dell'oligonefrosia durante l'infanzia o l'età adulta.

Il progetto per una medicina rigenerativa renale "fisiologica" rappresenta una nuova sfida per i neonatologi. Un successo in questo campo potrebbe aprire nuovi scenari per un approccio rigenerativo neonatale ad altri organi tra cui il pancreas endocrino, che ridurrà l'insorgere del diabete in età adulta.

## **Bibliografia.**

- [1] Hsu CY, Vittinghoff E, Lin F, Shlipak MG. The incidence of end-stage renal disease is increasing faster than the prevalence of chronic renal insufficiency. *Ann Intern Med.* 2004; 141(2):95-101.
- [2] Turin TC, Tonelli M, Manns BJ, Ahmed SB, Ravani P, James M, Hemmelgarn BR. Lifetime risk of ESRD. *J Am Soc Nephrol.* 2012; 23(9):1569-78.
- [3] Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet.* 2008; 371(9606):75-84.
- [4] Blencowe H, Cousens S, Chou D, Oestergaard M, Say L, Moller AB, Kinney M, Lawn J. Born too soon preterm birth action group. Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births. *Reprod Health.* 2013;10 (1):S2.
- [5] Remuzzi G, Perico N. International Society of Nephrology's perspective on the emergence of chronic kidney diseases of unknown/undetermined etiology. *MEDICC Rev.* 2014;16(2):75-6.
- [6] Barker DJ. Developmental origins of adult health and disease. *J Epidemiol Community Health.* 2004;58(2):114-5.
- [7] S, Corrado C, Maringhini G, Cusumano R, Azzolina V, Leone F. Early origin of adult renal disease. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010;23 (3):84-6.
- [8] Puddu M, Fanos V, Podda F, Zaffanello M. The kidney from prenatal to adult life: perinatal programming and reduction of number of nephrons during development. *Am J Nephrol.* 2009;30(2):162-70.
- [9] Brenner BM, Chertow GM. Congenital oligonephropathy and the etiology of adult hypertension and progressive renal injury. *Am J Kidney Dis.* 1994; 23(2):171-5.
- [10] Fanni D, Gerosa C, Nemolato S, Mocchi C, Pichiri G, Coni P, Congiu T, Piludu M, Piras M, Frascini M, Zaffanello M, Iacovidou N, Van Eyken P, Monga G, Faa G, Fanos V. "Physiological" renal regenerating medicine in VLBW preterm infants: could a dream come true? *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012;25 (3):41-8.
- [11] Bowman W. On the structure and use of the malpighian bodies of the kidney with observations on circulation through that gland. *Philos Trans R Soc Lond.* 1842; 57:132.
- [12] Golgi C. Annotazioni intorno all'Istologia dei reni dell'uomo e di altri mammiferi e sull'istogenesi dei canalicoli uriniferi. *Rend R Acad Lincei.* 1889; 5:545-557.
- [13] Herring R. The development of the malpighian bodies of the kidney and its relation to pathological changes which occur in them. *J Path Bacteriol.* 1900; 6:459-474.
- [14] Zimmermann K. Über den Bau des Glomerulus der Säugerniere; Weite e Mitteilungen. *Ztschr Mikr Anat Forsch.* 1933; 32:176-278.
- [15] Noel R, Pigeaud M. Sur le développement du floccule glomérulaire dans le rein foetal. *Bull*

Histol Appl Physiol Pathol Tech Microsc. 1932; 9:302–312.

[16]Montaldo G, Murri C. Rilievi sullo sviluppo del glomerulo renale in particolare sulla formazione della parete del capillare glomico, nell'uomo. Biol Lat. 1958; 11:148–161.

[17]Hall BV. Observations on the organization development and ultra microscopic structure of the capillaries of the renal glomerulus. Am J Pathol. 1956; 32:646–647.

[18]Kurtz SM. The electron microscopy of the developing human renal glomerulus. Exp Cell Res. 1958; 14:355–367.

[19]Benedetti EL, Marinozzi V. Sulla fine struttura del tessuto intercapillare nel glomerulo di Malpighi. Rass Fisiopat Clin. 1958; 30:1–10.

[20]Farquhar MG, Palade GE. Functional evidence for the existence of a third cell type in the renal glomerulus. Phagocytosis and filtration residues by a distinctive “third” cell. J Cell Biol. 1962; 13:55–87.

[21]Lazorthes-Herland A. Etude embryologique du glome'rule re'nal. Thesis at the University of Toulouse. 1961; 1-50.

[22]Quaggin SE, Kreidberg JA. Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences. Development. 2008; 135:609-620.

[23]Saxen L. Organogenesis of the Kidney. Cambridge University Press; Cambridge. 1987.

[24]Moritz KM, Wintour EM, Black MJ, Bertram JF, Caruana G. Factors influencing mammalian kidney development: implications for health in adult life. Adv Anat Embryol Cell Biol. 2008;196:1–78.

[25]Faa G, Fanni D, Gerosa C, Nemolato S, Ottonello G, Dessì A, Pusceddu E, Locci A, Fanari M, Di Felice E, Van Eyken P, Iacovidou N, Monga G, Fanos V. Embriologia renale: una finestra interpretativa delle nefropatie infantili e delle neoplasie renali.

[26]Vize PD, Carrol TJ, Wallingford JB. Induction development, and physiology of the pronephric tubules. In: Vize PD; Woolf AS, Bard JBL Eds, The kidney:from normal development to congenital disease, Academic Press,London. 2003;19-50.

[27]Drummond I, Vasilyev A. Epithelial cell movements during tubulogenesis. Oral presentation at the 11<sup>th</sup> International Workshop on Developmental Nephrology, New Paltz, NY. 2010.

[28]Faa G, Gerosa C, Fanni D, Monga G, Zaffanello M, Van Eyken P, Fanos V. Morphogenesis and molecular mechanisms involved in human kidney development. J Cell Physiol. 2012; 227:1257–1268.

[29]Ludwig KS, Landmann L. Early development of the human mesonephros. Anat Embryol. 2005; 209:439–447.

- [30]Frank Costantini, Raphael Kopan Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development. *Dev Cell*. 2010; 18(5): 698–712.
- [31]Yosypiv IV. A new role for the renin-angiotensin system in the development of the ureteric bud and renal collecting system. *Keio J Med*. 2008; 57:184–189.
- [32]Watanabe T, Costantini F. Real-time analysis of ureteric bud branching morphogenesis in vitro. *Dev Biol*. 2004; 271:98–108.
- [33]Kopan R, Cheng HT, Surendran K. Molecular insights into segmentation along the proximal-distal axis of the nephron. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18:2014-20.
- [34]Reidy KJ, Rosenblum ND. Cell and molecular biology of kidney development. *Semin Nephrol*. 2009; 29:321–337.
- [35]Boyle S, Misfeldt A, Chandler KJ, Deal KK, Southard-Smith EM, Mortlock DP, Baldwin HS, de Caestecker M. Fate mapping using *Cited1-CreERT2* mice demonstrates that the cap mesenchyme contains self-renewing progenitor cells and gives rise exclusively to nephronic epithelia. *Dev Biol*. 2008; 313:234–245.
- [36]Sariola H. Nephron induction revisited: From caps to condensates. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002; 11:17–21.
- [37]Bard JBL, McConnell JE, Davies JA. Towards a genetic basis for kidney development. *Mech Dev*. 1994; 48:3–11.
- [38]Kispert A, Vainio S, McMahon AP. Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development*. 1998; 123:4223–4234.
- [39]Carroll TJ, Park JS, Hayashi S, Majumdar A, McMahon AP. Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Dev Cell*. 2005;9:283–292.
- [40]Georgas K, Rumballe B, Valerius MT, Chiu HS, Thiagarajan RD, Lesieur E, Aronow BJ, Brunskill EW, Combes AN, Tang D, Taylor D, Grimmond SM, Potter SS, McMahon AP, Little MH. Analysis of early nephron patterning reveals a role for distal RV proliferation in fusion to the ureteric tip via a cap mesenchyme-derived connecting segment. *Dev Biol*. 2009; 332:273–286.
- [41]E.A. Cho, L.T. Patterson, W.T. Brookhiser, S. Mah, C. Kintner, G.R. Dressler Differential expression and function of cadherin-6 during renal epithelium development. *Development*. 1998; 125(5):803–812.
- [42]S.P. Mah, H. Saueressig, M. Goulding, C. Kintner, G.R. Dressler Kidney development in cadherin-6 mutants: delayed mesenchyme-to-epithelial conversion and loss of nephrons *Dev. Biol*. 2000; 223(1):38–53.
- [43]Little MH, Brennan J, Georgas K, Davies JA, Davidson DR, Baldock RA, Beverdam A,



Bertram JF, Capel B, Chiu HS, Clements D, Cullen-McEwen L, Fleming J, Gilbert T, Houghton D, Kaufman MH, Kleymenova E, Koopman PA, Lewis AG, McMahon AP, Mendelsohn CL, Mitchell EK, Rumballe BA, Sweeney DE, Valerius MT, Yamada G, Yang Y, Yu J. A high-resolution anatomical ontology of the developing murine genitourinary tract. *Gene Expr Patterns* 2007;7:680–699.

[44]Gao X, Chen X, Taglienti M, Rumballe B, Little MH, Kreidberg JA. Angioblast-mesenchyme induction of early kidney development is mediated by *Wt1* and *Veg1a*. *Development*. 2005;132:5437–5449.

[45]Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, Gerber HP, Kikkawa Y, Miner JH, Quaggin SE. Glomerular specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest*. 2003; 111:707–716.

[46]Symonds ME, Stephenson T, Budge H. Early determinants of cardiovascular disease: the role of early diet in later blood pressure control. *Am J Clin Nutr*. 2009;89:1518–1522.

[47]Faa G, Gerosa C, Fanni D, Nemolato S, Locci A, Cabras T, Marinelli V, Puddu M, Zaffanello M, Monga G, Fanos V. Marked interindividual variability in renal maturation of preterm infants: lessons from autopsy. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2010; 23 Suppl 3:129-33.

[48]Abitbol CL, Bauer CR, Montané B, Chandar J, Duara S, Zilleruelo G. Long-term follow-up of extremely low birth weight infants with neonatal renal failure. *Pediatr Nephrol*. 2003 ;18(9):887-93.

[49]Dötsch J, Plank C, Amann K, Ingelfinger J. The implications of fetal programming of glomerular number and renal function. *J Mol Med*. 2009; 87(9):841-8.

[50]White SL, Perkovic V, Cass A, Chang CL, Poulter NR, Spector T, Haysom L, Craig JC, Salmi IA, Chadban SJ, Huxley RR. Is low birth weight an antecedent of CKD in later life? A systematic review of observational studies. *Am J Kidney Dis*. 2009; 54(2): 248-61.

[51]Quigley R. Developmental changes in renal function. *Curr Opin Pediatr*. 2012; 24(2):184-90.

[52]Luyckx VA, Brenner BM. The clinical importance of nephron mass. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(6):898-910.

[53]Mañalich R, Reyes L, Herrera M, Melendi C, Fundora I. Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study. *Kidney Int*. 2000;58(2):770-3.

[54]Hughson M, Farris AB 3rd, Douglas-Denton R, Hoy WE, Bertram JF. Glomerular number and size in autopsy kidneys: the relationship to birth weight. *Kidney Int*. 2003;63(6):2113-22.

[55]Kandasamy Y, Smith R, Wright IM, Lumbers ER. Relationships between glomerular filtration rate and kidney volume in low-birth-weight neonates. *J Nephrol*. 2012.

- [56]Bagby SP. Developmental origins of renal disease: should nephron protection begin at birth? *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4(1):10-3.
- [57]Schreuder MF. Safety in glomerular numbers. *Pediatr Nephrol.* 2012; 27(10):1881-7.
- [58]Gubhaju L, Sutherland MR, Black MJ. Preterm birth and the kidney: implications for long-term renal health. *Reprod Sci.* 2011;18(4):322-33.
- [59]Simeoni U, Ligi I, Buffat C, Boubred F. Adverse consequences of accelerated neonatal growth: cardiovascular and renal issues. *Pediatr Nephrol.* 2011; 26(4):493-508.
- [60]Baum M. Role of the kidney in the prenatal and early postnatal programming of hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010; 298(2):F235-47.
- [61]Zandi-Nejad K, Luyckx VA, Brenner BM. Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming. *Hypertension.* 2006; 47(3): 502-8.
- [62]Faa G, Sanna A, Gerosa C, Fanni D, Puddu M, Ottonello G et al. Renal physiological regenerative medicine to prevent chronic renal failure: should we start at birth?. *Clin Chim Acta.* 2015; 444: 156-162.
- [63]Sanna A, Fanos V, Gerosa C, Vinci L, Puddu M, Loddo C, Faa G. Immunohistochemical markers of stem/progenitor cells in the developing human kidney. *Acta Histochem.* 2015; doi: 10.1016 [Epub ahead of print].
- [64]Faa G, Fanni D, Gerosa C, Fraschini M, Nemolato S, Ottonello G, Messana I, Cabras T, Monga G, Van Eyken P, Castagnola M, Fanos V. “The subcapsular blue strip width: a new marker for evaluating the residual potential nephrogenesis in the newborn kidney”. *USCAP MEETING, 2013.*
- [65]Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature.* 1994; 372: 679–683.
- [66]Butt MJ, Taranta A.F., Jmenez DF, Matsell DG. Collecting duct epithelial-mesenchymal transition in fetal urinary tract obstruction. *Kidney int.* 2007; 72(8): 936-44.
- [67]Faa G, Gerosa C, Fanni D, Nemolato S, Di Felice E, Van Eyken P, Monga G, Iacovidu N, Fanos V. The role of immunohistochemistry in the study of the newborn kidney. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012; 25 (4):135-8.

## **Ringraziamenti**

*Desidero ringraziare sinceramente Professor Gavino Faa per i suoi preziosi insegnamenti, per la sua grande disponibilità, per le opportunità offerte, per il lavoro fatto assieme in questi meravigliosi tre anni.*

*Ringrazio inoltre la Dott.ssa Clara Gerosa per l'importante aiuto fornitomi durante la stesura della tesi.*

*Ringrazio Dott. Coni, Giusi e Monica per la loro stima e il loro affetto e per aver condiviso, durante questo cammino, un'infinità di gioiosi momenti.*

*Infine, ringrazio tutto il personale per l'affetto e la simpatia dimostrata in questi anni.*

*La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Ingegneria Biomedica dell'Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2013/2014 - XXVII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività 1.3.1*

*“Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali”.*