

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA, PATOLOGIA COMPARATA E IGIENE
VETERINARIA

TESI DI LAUREA

**LA FIBROSI RENALE: EPITHELIAL-MESENCHYMAL
TRANSITION E RUOLO DELLE METALLOPROTEASI 2 E 9**

Relatore: **DOTT. LUCA ARESU**

Laureanda: **SILVIA LUCIA BENALI**

Matricola N°521497/MV

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE	5
1.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DEL RENE	5
1.1.1 GLOMERULO	5
1.1.2 LA PORZIONE TUBULARE	7
1.1.3 L'APPARATO JUXTAGLOMERULARE	8
1.2 VALUTAZIONE DELLE PATOLOGIE RENALI	9
1.3 PATOLOGIE GLOMERULARI	9
1.4 MALATTIA RENALE CRONICA ED END-STAGE KIDNEY	12
1.5 IL DANNO TUBULO-INTERSTIZIALE E LA FIBROSI RENALE	13
1.5.1 LA FIBROSI RENALE	13
1.6 EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION (EMT)	17
1.6.1 FATTORI CHE PROMUOVONO L'EMT	19
1.6.2 IL RUOLO DELLA MEMBRANA BASALE NELL'EMT	20
1.7 LE METALLOPROTEASI, GLI INIBITORI TISSUTALI DELLE METALLOPROTEASI E IL RUOLO NELLA FIBROSI	21
1.7.1 METALLOPROTEASI (MMP)	21
1.7.2 STRUTTURA E ATTIVAZIONE	22
1.7.3 INIBITORI TISSUTALI DELLE METALLOPROTEASI (TIMP)	23
1.7.4 RUOLO DELLE MMP	23
1.7.5 MMP NEL CANE	25
1.7.6 MMP NEL RENE	25
2. OBIETTIVI	27
3. MATERIALI E METODI	28
3.1 CAMPIONAMENTO	28
3.2 ISTOLOGIA	28
3.3 IMMUNOISTOCHEMICA (IHC)	33
3.4 ANALISI STATISTICHE	36
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	37

4.1	DIAGNOSI MORFOLOGICA E GRADING FIBROSI	37
4.2	EMT E FIBROSI	47
4.2.1	CITOCHERATINA	47
4.2.2	VIMENTINA	50
4.3	METALLOPROTEASI 2 E 9	61
4.3.1	METALLOPROTEASI 9	61
4.3.2	METALLOPROTEASI 2	66
5.	CONCLUSIONI	70
6.	BIBLIOGRAFIA	72

1. INTRODUZIONE

1.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DEL RENE

I reni sono organi pari deputati a diverse funzioni:

- *escretoria*: rimozione dal sangue delle sostanze di rifiuto destinate a costituire l'urina
- *endocrina*: produzione di diversi ormoni (eritropoietina, prostaglandine, renina)
- *regolazione bilancio idrico e salino dell'organismo e metabolismo vitamina D*
- *regolazione della pressione osmotica nel sangue e nei tessuti* (Clement, 1997; Maxie *et al.*, 2007; Nickel *et al.*, 1979).

L'unità morfo-funzionale del rene è il **nefrone** costituito da:

- glomerulo
- tubulo prossimale
- ansa di Henle
- tubulo distale

1.1.1 GLOMERULO

Il glomerulo è una struttura epiteliale e vascolare preposta all'ultrafiltrazione del sangue (Maxie *et al.*, 2007) (Fig. 1). **Istologicamente** si riconosce una capsula esterna, detta capsula di Bowman, costituita dalla membrana basale e da uno strato di cellule epiteliali parietali (Nickel *et al.*, 1979). Il glomerulo comprende il ciuffo capillare: una rete di capillari che si dipartono dall'arteriola afferente, che entra all'interno della capsula di Bowman a livello del polo vascolare (Henrikson, 2000). Nei capillari avviene la filtrazione del sangue e l'ultrafiltrato prodotto si raccoglie nello spazio urinario, tra epitelio viscerale e parietale, per poi defluire nel tubulo prossimale a livello del polo urinario; la componente ematica viene invece drenata dall'arteriola efferente ritornando nel circolo sistemico (Henrikson, 2000).

Il **filtro glomerulare** ha il compito di permettere il passaggio di molecole di diverso peso molecolare ed è costituito da tre strati:

- **Endotelio capillare**: riveste internamente i capillari. La membrana citoplasmatica delle cellule endoteliali è molto sottile e presenta fenestrature con diametro di 50-150 nm

(Clement, 1997; Maxie *et al.*, 2007). La superficie presenta carica negativa tale da impedire, e da respingere, il passaggio delle molecole proteiche con uguale polarità (Henrikson, 2000).

- **Membrana basale glomerulare:** dello spessore compresa tra 100 e 150 nm, si compone di lamina lucida interna (strato trasparente agli elettroni sita al di sotto dell'endotelio), lamina densa (strato elettrondenso centrale) e lamina lucida esterna (in contatto con i podociti). Tra i vari componenti, il collagene di tipo IV è particolarmente abbondante nella lamina densa, mentre nella lamina lucida sono più concentrati i proteoglicani. Sono inoltre presenti molecole glicoproteiche come laminina, fibronectina ed entactina (Clement, 1997; Henrikson, 2000; Maxie *et al.*, 2007).
- **Podociti:** cellule epiteliali caratterizzate dalla presenza di processi primari, che si dipartono dal corpo cellulare avvolgendo i capillari, e processi secondari, detti pedicelli, distanziati di 25-50 nm circa. Sono deputati alla produzione dei componenti della membrana basale (Henrikson, 2000).

Le **cellule mesangiali** sono cellule dalla forma irregolare con prolungamenti citoplasmatici dotate di attività contrattile. Esse possiedono dei recettori per sostanze ad azione vasocostrittrice, come l'angiotensina II, e sono in grado di regolare l'afflusso di sangue al glomerulo (Maxie *et al.*, 2007). Le cellule mesangiali, coinvolte nel turnover della matrice mesangiale, producono e sono target di prostaglandine, citochine e fattori di crescita (Maxie *et al.*, 2007). La matrice mesangiale è caratterizzata dalla presenza di una fitta rete di miofibrille immerse in un materiale amorfo simile a quello della membrana basale e composta prevalentemente da laminina e fibronectina (Henrikson, 2000). Il **mesangio** è un sottile strato di tessuto connettivale che rappresenta la struttura assile del glomerulo (Henrikson, 2000).

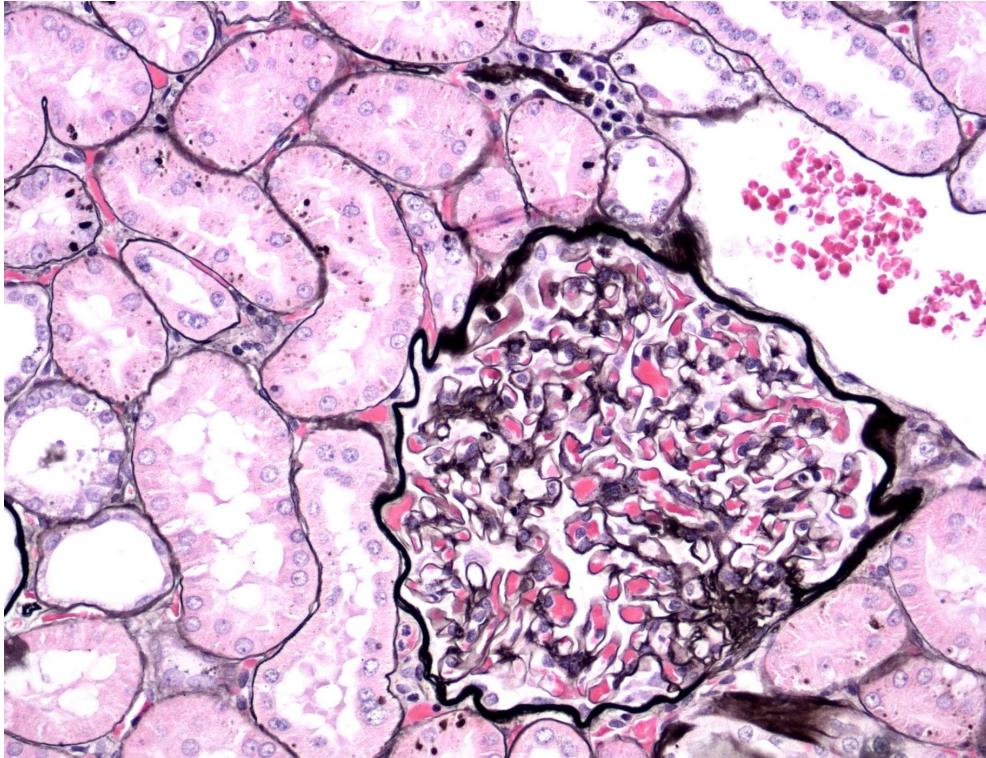


Fig. 1 Il glomerulo. (PASM 400x)

1.1.2 LA PORZIONE TUBULARE

Al glomerulo segue la porzione tubulare, caratterizzata istologicamente da un epitelio monostratificato variabile da cubico a cilindrico (Henrikson, 2000). Il transito dell'urina nel lume tubulare permette il riassorbimento da parte delle cellule epiteliali di acqua e soluti, che successivamente rientrano nel circolo ematico (Clement, 1997).

La **parte tubulare prossimale** è preposta al riassorbimento della maggior parte delle molecole in grado di passare il filtro glomerulare (glucosio, amminoacidi e proteine, acido urico, ioni come calcio, fosfati, sodio e potassio). Per esplicitare tale funzione, le cellule epiteliali tubulari (CET) di questo tratto sono provviste di microvilli sulla superficie apicale (orletto a spazzola), i quali ampliano la superficie cellulare che entra in contatto con la pre-urina (Henrikson, 2000). Questo riassorbimento si verifica sia per meccanismi di trasporto passivo (canali sodio e cloro, co-trasporto sodio-glucosio), sia per l'azione di pompe energetiche (Clement, 1997).

Anatomicamente, segue l'**ansa di Henle**, struttura che principalmente permette la concentrazione dell'urina e la regolazione della pressione osmotica; attraverso una diversa permeabilità della membrana a ioni ed acqua (Clement, 1997).

L'ultimo tratto della porzione tubulare, il **tubulo distale**, è preposto prevalentemente al riassorbimento di acqua e ioni Na e K per meccanismi di trasporto ormono-dipendenti (Clement, 1997; Maxie *et al.*, 2007).

1.1.3 L'APPARATO JUXTAGLOMERULARE

L'apparato juxtaglomerulare è coinvolto nel meccanismo di autoregolazione della pressione ematica renale ed è costituito da quattro componenti:

- *arteriola afferente*: le cellule juxtaglomerulari sono cellule muscolari lisce modificate capaci di registrare la pressione sanguigna
- *arteriola efferente*
- *mesangio extraglomerulare*: cellule mesangiali localizzate tra arteriola afferente ed arteriola efferente
- *macula densa*: cellule epiteliali del tubulo distale di tipo cilindrico, dotate di funzione chemiorecettoriale, in grado di percepire la concentrazione di sodio nel sangue (Clement *et al.*, 1997).

1.2 VALUTAZIONE DELLE PATOLOGIE RENALI

In medicina veterinaria, la diagnosi delle patologie renali viene di routine effettuata tramite la microscopia ottica su campioni di tessuto (biopsie o prelievi durante necropsopia) fissati in formalina e colorati in ematossilina eosina (Aresu *et al.*, 2008; Vilafranca *et al.*, 1994). Nella patologia renale umana invece, oltre all'esame istologico, si ricorre all'esame di immunofluorescenza e alla microscopia elettronica (Janette *et al.*, 2007). L'immunofluorescenza viene effettuata su campioni congelati e risulta fondamentale per evidenziare i meccanismi patogenetici delle malattie e per la definizione di una diagnosi precisa in caso di malattie immunomediate renali o sistemiche (Janette *et al.*, 2007). L'utilizzo della sola microscopia ottica come tecnica diagnostica e il mancato utilizzo di colorazioni istochimiche speciali per la valutazione del tessuto renale, può comportare la formulazione di una diagnosi approssimativa (Aresu *et al.*, 2008; Vilafranca *et al.*, 1994).

1.3 PATOLOGIE GLOMERULARI

Le malattie glomerulari rivestono un ruolo importante nella patologia renale. Primariamente il danno glomerulare si riflette sulla filtrazione del sangue e compromette la funzionalità del nefrone, in secondo luogo, interferendo con il flusso ematico renale, porta ad un indebolimento del flusso peritubulare comportando la perdita dell'intero nefrone (Maxie *et al.*, 2007).

Nel caso in cui le lesioni interessino esclusivamente il glomerulo si parla di *glomerulopatia*; con il termine *glomerulonefrite* s'intende invece, la presenza di danno tubulointerstiziale e vascolare secondario ad un danno glomerulare primario (Maxie *et al.*, 2007). Il glomerulo può inoltre, essere target di malattie sistemiche come amiloidosi, lupus eritematoso sistemico (LES), diabete mellito, vasculiti ed endocarditi batteriche (Maxie *et al.*, 2007).

Dal punto di vista istologico le lesioni glomerulari sono classificate in base al grado di diffusione nel glomerulo:

- *diffuse*: coinvolgono tutti i glomeruli
- *focali*: coinvolgono alcuni glomeruli
- *globali* o *panglomerulari*: coinvolgono interamente il glomerulo
- *segmentali*: coinvolgono parte del glomerulo
- *mesangiali*: coinvolgono primariamente il mesangio

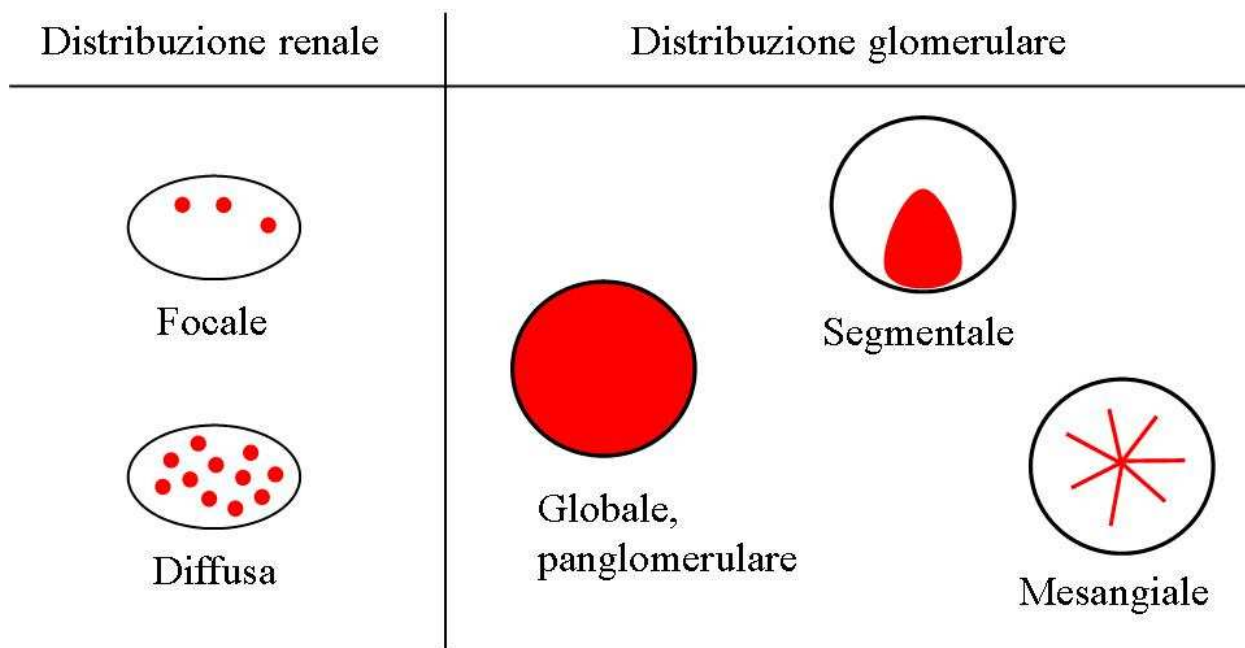


Fig. 2 Valutazione della distribuzione delle lesioni a livello renale e glomerulare.

Le patologie glomerulari possono venire classificate in base al sito di lesione:

- **Cellule endoteliali e membrana basale:** deposizione di immunocomplessi che possono localizzarsi a livello subendoteliale, intramembranoso o sottoepiteliale con l'ispessimento della membrana basale.

L'aspetto istologico dell'ispessimento può essere diffuso o irregolare (con spike). La deposizione di immunocomplessi è evidenziata alla microscopia ottica attraverso colorazioni istochimiche speciali oppure attraverso il ricorso alla microscopia elettronica. L'ispessimento della membrana basale è l'elemento caratteristico della glomerulonefrite membranosa: nel cane è stata descritta come forma primaria/idiopatica e forma secondaria ad infezioni protozoarie (sostenute da *Leishmania spp.*) (Poli *et al.*, 1991; Zatelli *et al.*, 2003), ad infestazioni da parassiti appartenenti al genere *Dirofilaria spp.* (Casey *et al.*, 1975) e come sindrome paraneoplastica (Maxie *et al.*, 2007).

La presenza di **infiltrato infiammatorio** è caratteristica della glomerulonefrite post infettiva, con la presenza a livello di capillari glomerulari di granulociti neutrofili e monociti (glomerulonefrite essudativa).

- **Cellule e matrice mesangiale:** iperplasia della cellularità mesangiale e aumento della matrice mesangiale sono evidenziabili in corso di glomerulonefrite mesangioproliferativa e di glomerulonefrite membranoproliferativa (Janette *et al.*, 2007; Maxie *et al.*, 2007).
Nella glomerulonefrite membranoproliferativa l'ipercellularità mesangiale e l'aumento di matrice sono associate ad ispessimento irregolare delle membrane basali glomerulari. È stata descritta ampiamente in cani con infezioni da *Leishmania spp.* (Poli *et al.*, 1991; Zatelli *et al.*, 2003), LES (Maxie *et al.*, 2007), Malattia di Lyme (Maxie *et al.*, 2007, Dambach *et al.*, 1997), infezioni da Adenovirus (CAV1) (Maxie *et al.*, 2007) e infestazioni da *Dirofilaria spp.* (Maxie *et al.*, 2007).

- **Podociti:** la fusione dei pedicelli vascolari che compongono il filtro glomerulare è una lesione precoce ed evidenziabile esclusivamente all'esame ultrastrutturale (Maxie *et al.*, 2007). È l'unica alterazione che viene riscontrata in corso di Malattia a lesioni minime descritta nel cane in seguito ad infezione sperimentale da *Ehrlichia canis* (Codner *et al.*, 1992). La perdita di podociti porta all'esposizione della membrana basale glomerulare (MBG) con conseguente adesione all'epitelio parietale, creando aderenze (sinechie) (Maxie *et al.*, 2007). Si verifica in corso di Glomerulosclerosi focale segmentale (FSGS), in cui le aree di aderenza vanno incontro a sclerosi di tipo segmentale (Fogo *et al.*, 2005). Questa lesione è stata descritta nel cane durante malattia renale cronica in forma idiopatica, dopo nefrectomia e associata a iperlipemia ed obesità (Brown *et al.*, 1997).

- **Sclerosi glomerulare:** deposizione di collagene che implica aumento del tessuto fibroso e della matrice mesangiale, che comprime i capillari glomerulari provocandone l'occlusione. In corso di malattie croniche si verifica ischemia glomerulare con conseguente perdita in toto del nefrone (Fogo *et al.*, 2005).

1.4 MALATTIA RENALE CRONICA ED END-STAGE KIDNEY

La **malattia renale cronica** (MRC) è una patologia progressiva caratterizzata da insufficienza renale per perdita di nefroni e alterazioni tissutali fino allo stadio terminale (Yabuki *et al.*, 2009).

L'**eziologia** della MRC è molto eterogenea e diverse sono le cause che sono già state identificate: infiammazioni, disordini immunitari, amiloidosi, neoplasie, infezioni (Illman *et al.*, 2006). È stato evidenziato che il danno tubulointerstiziale svolge un ruolo primario nella progressione della MRC, più che la lesione glomerulare (Brown *et al.*, 1997; Nath, 1998; Tanaka *et al.*, 2004). In seguito ad un danno glomerulare primario, s'innescano una risposta adattativa con l'obiettivo di mantenere la glomerular filtration rate (GFR); tuttavia, si osserva un continuo deterioramento della funzione renale fino allo stadio terminale. La "*self-perpetuation hypothesis*" postulata da Brenner *et al.* (1982) prevede che, oltre una certa soglia di danno, si inneschi un meccanismo di autoperpetuazione ed aggravamento del danno stesso (Brown *et al.*, 1997). Si distinguono fattori che promuovono l'aumento della GFR e fattori che portano diminuzione della GFR. Il livello soglia da cui poi s'innescano l'autoperpetuazione del danno coincide con il momento in cui viene perso l'equilibrio tra queste due categorie di fattori, con il predominio della componente che porta diminuzione della GFR (Brown *et al.*, 1997).

L'**End-stage Kidney** rappresenta l'aspetto istologico dell'ultimo stadio di malattia renale cronica che si osserva quando il parenchima funzionante residuo è inferiore al 5% (Yhee *et al.*, 2008). Indipendentemente dalla causa che ha scatenato il danno renale, si verifica una progressione della lesione: inizialmente si osservano ispessimento della capsula di Bowman e delle membrane basali glomerulari, fusione dei pedicelli e proliferazione mesangiale; successivamente si evidenziano glomerulosclerosi globale e atrofia glomerulare cistica. A livello tubulointerstiziale si osserva atrofia tubulare, infiammazione e un grave accumulo di matrice extracellulare (Janette *et al.*, 2007).

1.5 IL DANNO TUBULO-INTERSTIZIALE E LA FIBROSI RENALE

Un danno glomerulare primario è causa di alterazioni a carico del comparto tubulo interstiziale secondo meccanismi diversi:

- *alterazione del filtro glomerulare, che permette il passaggio di molecole che dovrebbero essere trattenute (proteinuria) e danneggiano le cellule epiteliali*
- *alterazioni emodinamiche, a carico di arteriola afferente ed efferente, che si riflettono sulla vascolarizzazione tubulare causando ischemia*
- *cellule infiammatorie e mediatori chimici dal glomerulo migrano nell'interstizio, innescando infiammazione tubulointerstiziale (Nath, 1998; Schlondorff, 2008).*

Per ragioni ancora da comprendere completamente, la rigenerazione del tessuto renale danneggiato avviene solo nel feto; mentre nell'adulto il recupero morfo-funzionale del parenchima è solo parziale e legato al tentativo dei nefroni sani di compensare il danno subito (Hewitson, 2009). Superata una certa soglia di danno, si innesca un meccanismo progressivo che porta alla sostituzione del parenchima renale con tessuto cicatriziale e si evidenziano atrofia tubulare e fibrosi tubulo interstiziale progressiva (Hewitson, 2009).

1.5.1 LA FIBROSI RENALE

La **fibrosi tubulo-interstiziale** è definibile come un processo patologico cronico, progressivo, multifattoriale. È caratterizzato dall'accumulo di matrice extracellulare (MEC) in seguito ad un aumento della sintesi di matrice, una diminuzione del suo riassorbimento o la combinazione di entrambi i fattori (Hewitson, 2009). Classicamente si ritiene che la fibrosi sia dovuta ad un'esagerata produzione di collagene rilevata istologicamente con il progressivo aumento di matrice (Hewitson, 2009) (Fig. 3). Un altro elemento tipico della MRC è la riduzione di volume, che difficilmente trova spiegazione ammettendo il semplice aumento della produzione di MEC. Secondo Hewitson (2009), oltre a questo elemento, si assiste ad una riduzione del tessuto renale mediato dall'azione dei miofibroblasti, i quali contraendosi portano una maggior rigidità e densità della matrice, come avviene nei processi di riparazione delle ferite cutanee.

La progressione del danno tubulointerstiziale in direzione della fibrosi renale si può riassumere in 3 fasi:

1. *Fase d'induzione*
2. *Fase infiammatoria*
3. *Fase post infiammatoria*

1. **Fase d'induzione:** è caratterizzata dalla sintesi e secrezione di fattori pro infiammatori che portano l'attivazione e la proliferazione di fibroblasti. Le cellule epiteliali tubulari in seguito a proteinuria o ad ischemia producono chemochine: una famiglia di molecole di piccole dimensioni coinvolte nella risposta infiammatoria. Queste, per chemiotassi, richiamano a livello interstiziale cellule infiammatorie prevalentemente di tipo mononucleato (macrofagi e linfociti) (Yhee *et al.*, 2008). I leucociti attivati sono responsabili della sintesi e secrezione di molteplici fattori pro infiammatori, i quali attivano i fibroblasti residenti (Yhee *et al.*, 2008). In uno studio nel cane in corso di malattia renale, è stato evidenziato che il numero di linfociti T è doppio rispetto al numero dei linfociti B ed in particolare i T-helper svolgono un'intensa attività di secrezione di citochine: *interferone C*, *tumor necrosis factor* (TNF) e *interleuchine* (IL 2, IL 4, IL 5, IL 6, IL 10) (Yhee *et al.*, 2008).
2. **Fase infiammatoria:** le citochine, prodotte dalle cellule infiammatorie e dai fibroblasti, stimolano l'attività dei fibroblasti stessi portando la produzione di matrice e fibrosi interstiziale (Strutz *et al.*, 2003). Molte sono state le molecole dimostrate in grado di agire con azione profibrotica:
 - **Transforming growth factor β 1** (TGF β 1): è una molecola considerata il principale promotore dell'instaurarsi della fibrosi interstiziale. È un modulatore dell'attività di fibroblasti e miofibroblasti e stimola la sintesi di proteine della matrice (fibronectina e collagene tipo I) (El-Nahas, 2003). La sua sintesi avviene ad opera sia delle cellule residenti sia delle cellule infiammatorie ed è indotta da molteplici fattori quali *angiotensina II*, *endothelina 1* (ET 1), *glucosio*, *insulin-like growth factor 1* (IGF 1), il *fattore natriouretico atriale*, il *fattore attivante le piastrine* (PAF), i *trombossani* e alcuni farmaci come le ciclosporine. Inoltre è stato dimostrato anche un fenomeno di autoinduzione (Strutz *et al.*, 2003; Forino *et al.*, 2006).
 - **Angiotensina II:** oltre alla sua funzione vasoattiva nel sistema renina-angiotensina, per la regolazione della pressione ematica renale, è coinvolta nel meccanismo di progressione della

fibrosi inducendo la sintesi di TGF β 1 (Iwano *et al.*, 2004). Inoltre, è stato dimostrato *in vitro* che induce direttamente la produzione di collagene da parte dei fibroblasti e delle cellule epiteliali tubulari (Strutz *et al.*, 2003).

- **Epidermal growth factor (EGF)**: è una molecola dal ruolo controverso. Sebbene sia riportata una riduzione della fibrosi renale in seguito alla somministrazione di EGF in ratti con nefropatia ostruttiva, altri autori segnalano un ruolo profibrotico dell'EGF nel corso di sperimentazione su topi transgenici (Strutz *et al.*, 2003).
- **Interleuchina 2 (IL 2)**: linfocina che agisce come cofattore e contribuisce all'attivazione dei linfociti (T, B e Natural Killer). Viene inizialmente prodotta da macrofagi, monociti e fibroblasti, successivamente sintetizzata anche dai linfociti T. In corso di End-stage kidney la sua espressione è notevolmente aumentata (fino a 25 volte) (Yhee *et al.*, 2008).
- **Interleuchina 6 (IL 6)**: prodotta da linfociti T, cellule epiteliali e fibroblasti attivati, anch'essa riconosce un aumento dell'espressione direttamente proporzionale al grado di fibrosi presente nel tessuto (fino a 150 volte) (Yhee *et al.*, 2008).
- Altri fattori considerati implicati nello stimolo alla produzione di MEC e nella progressione della fibrosi tubulointerstiziale sono *connective tissue growth factor (CTGF)*, *platelet-derived growth factor (PDGF)*, *basic fibroblast growth factor (FGF 2)*, *endothelina 1 (ET 1)*, la *triptasi* prodotta dai mastociti (Strutz *et al.*, 2003; Strutz *et al.*, 2002).

3. Fase post infiammatoria: l'infiammazione primaria è ridotta a poche aree con continua progressione della fibrosi.

Si conoscono diverse ipotesi:

- le rimanenti cellule infiammatorie possono produrre una quantità di citochine sufficiente al perpetuarsi dello stimolo profibrotico
- stimoli autocrini possono portare i fibroblasti ad autoalimentare la loro attività
- intercomunicazione tra cellule epiteliali tubulari e fibroblasti attivati (Yhee *et al.*, 2008).

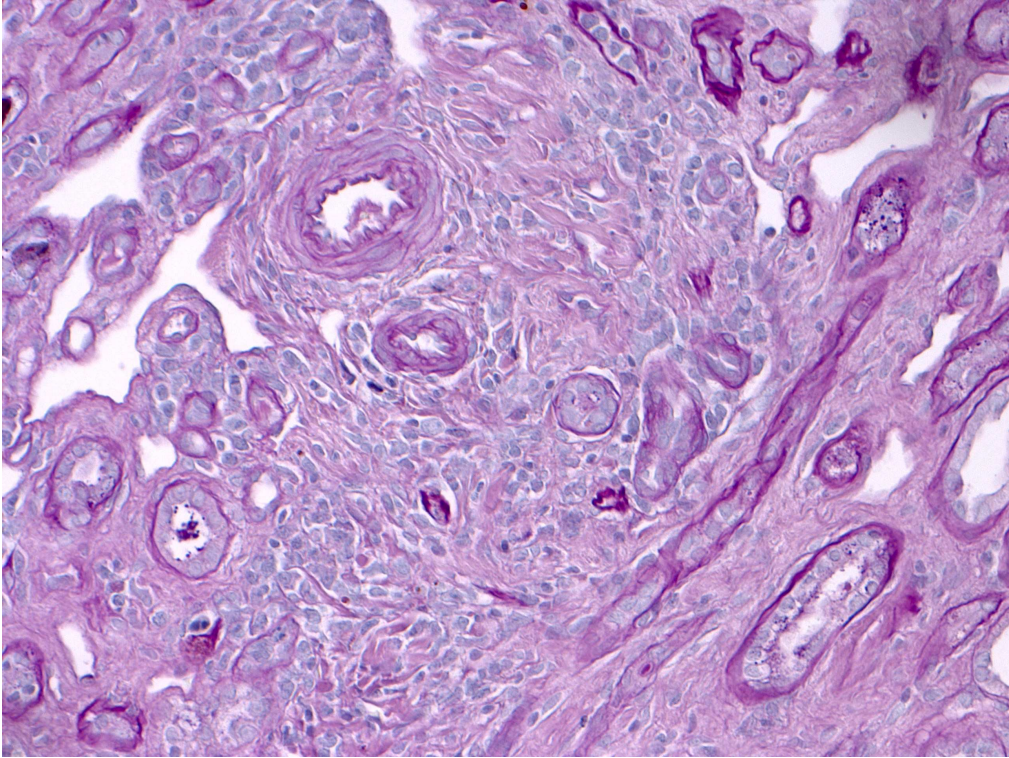


Fig. 3 Fibrosi interstiziale. (PAS 50x)

1.6 EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION (EMT)

L'**epithelial mesenchymal transition** è un processo in cui, in seguito ad uno stimolo cronico, le cellule epiteliali perdono il loro fenotipo e acquisiscono le caratteristiche delle cellule mesenchimali (Forino *et al.*, 2006; Strutz *et al.*, 2002). Tale processo è stato evidenziato in diversi tessuti tra cui rene, cuore e polmoni (Ilman *et al.*, 2006; Wyatt *et al.*, 2007).

La prima evidenza di EMT delle cellule epiteliali tubulari (CET) fu dimostrata in uno studio su ratti nefrectomizzati: con il progredire della patologia, le CET perdono le loro caratteristiche di polarizzazione funzionale, assumendo forma allungata e migrando nell'interstizio peritubulare proporzionalmente all'aggravarsi della fibrosi interstiziale (Lan, 2003). Secondo Meguid *et al.* (2003), il processo di EMT si verifica anche a livello dell'epitelio glomerulare parietale.

Dal punto di **vista patogenetico**, a seguito del danno cellulare s'innescano una serie di reazioni che portano l'alterazione delle giunzioni cellulari (cellula-cellula e cellula-membrana basale) (Aresu *et al.*, 2008; Lan, 2003). In condizioni di normalità, le CET sono adese le une alle altre e alla membrana basale tramite giunzioni aderenti e giunzioni occludenti (tight junctions) (Henrikson, 2000). Le prime sono presenti a livello basolaterale e sono caratterizzate dalla presenza di proteine transmembranarie, appartenenti alla famiglia delle caderine. Le tight junctions, localizzate a livello basale, riconoscono una struttura analoga ma sono costituite da proteine transmembranarie specifiche (occludine e claudine) e legate a proteine del citoscheletro (Zonula Occludens) (Harten *et al.*, 2009). Le molecole che compongono le giunzioni cellulari non svolgono esclusivamente una funzione di adesione meccanica, ma sono anche responsabili del mantenimento dell'integrità strutturale e della polarità cellulare (Lan, 2003). Per β -catenina, inoltre, è stata evidenziata una funzione aggiuntiva come fattore di trascrizione nucleare (Aresu *et al.*, 2008). Nel **danno tubulo-interstiziale** cronico, queste giunzioni cellulari vengono modificate e la loro espressione alterata: si assiste alla perdita di coesione delle cellule tra loro e il distaccamento dalla membrana basale (El-Nahas, 2003).

Nel cane, in corso di glomerulonefrite è stato riscontrata una diminuzione dell'espressione di E-caderina e la traslocazione di β -catenina a livello nucleare, che può giustificare la perdita della contatto cellula-cellula (Aresu *et al.*, 2008). A seguito dell'alterazione a carico delle giunzioni cellulari, le cellule perdono di coesione sia tra loro, sia rispetto alla membrana basale, perdendo la polarità funzionale delle diverse superfici cellulari e acquisendo mobilità. Successivamente, come fibroblasti, fuoriescono dalla membrana basale e producono matrice extracellulare, con conseguente aumento della fibrosi interstiziale e atrofia tubulare (El-Nahas, 2003).

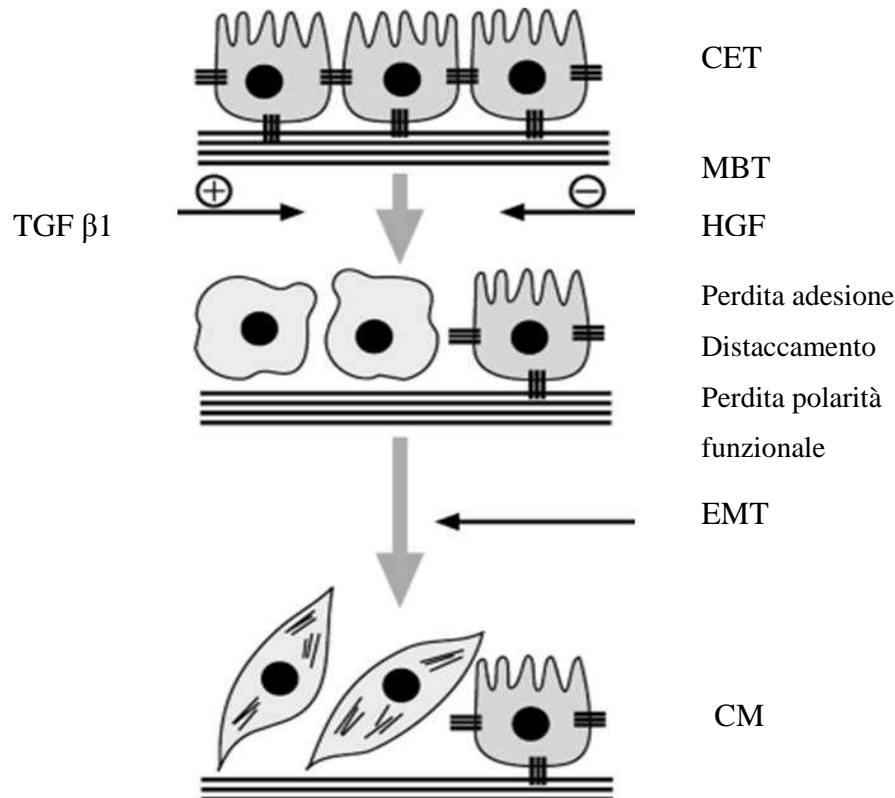


Fig. 4 Schema di epithelial-mesenchymal transition. Abbreviazioni: CET: cellule epiteliali tubulari; MBT: membrana basale tubulare; TGF β 1, transforming growth factor β 1; HGF, hepatocyte growth factor; CM, cellule a fenotipo mesenchimale.

Dal punto di vista **immunoistochimico** si evidenzia a carico delle CET la perdita dell'espressione dei tipici marker epiteliali (citocheratina) e la espressione *de novo* di marker mesenchimali (vimentina e α smooth muscle actin α -SMA: proteina citoscheletrica espressa dalle fibre muscolari dei vasi e dai fibroblasti) (Lan, 2003). Secondo Cheng *et al.* (2006) si verifica una fase di transizione in cui la positività a citocheratina e vimentina è ridotta e in cui si evidenzia l'espressione di *fibroblast-specific protein 1* (FSP/S-100) e di *heat shock protein 47* (HSP-47). La prima è una molecola citoscheletrica coinvolta nella motilità cellulare e presente nelle cellule mesenchimali (Strutz *et al.*, 2002); la seconda è una molecola controllo coinvolta nella processazione e secrezione di collagene. (Cheng *et al.*, 2003). Successivamente, i fibroblasti così originati subiscono un'ulteriore differenziazione in miofibroblasti, resa evidente dall'espressione di α SMA (Forino *et al.*, 2006).

1.6.1 FATTORI CHE PROMUOVONO L'EMT

Fattori di crescita, citochine, molecole di adesione, metalloproteasi, mediatori dell'inflammazione, leucociti, proteinuria e ipossia sono elementi coinvolte nell'instaurarsi del processo dell'EMT:

- **Transforming growth factor β 1** (TGF β 1): modula l'attività di fibroblasti e miofibroblasti (D'amico, 1998). L'azione del TGF β 1 si esplica a livello di membrana dove innesca una serie di reazioni che coinvolgono le proteine Smad: queste formano complessi proteici, portandosi a livello intranucleare dove fungono da fattori di trascrizione (Forino *et al.*, 2006). Il TGF β 1 ha anche funzione regolatrice stimolando la sintesi di metalloproteasi 2, caderina 11 (molecola di adesione mesenchimale) e tenascina (proteina coinvolta nella nefrogenesi) (Forino *et al.*, 2006). Uno studio su colture di CET umane ha evidenziato che il trattamento con TGF β 1 induce una modificazione nella morfologia delle cellule, le quali acquisiscono forma allungata e fusata, sebbene dal punto di vista immunoistochimico continuano ad esprimere marker epiteliali (citocheratina ed E-caderina) (Forino *et al.*, 2006).
- **Basic fibroblast growth factor** (FGF 2): il suo ruolo nell'EMT è stato analizzato su colture cellulari *in vitro*, comparandoli con gli effetti indotti da TGF β 1 e da *epidermal growth factor* (EGF): i risultati hanno portato gli autori a riconoscere che FGF 2 può indurre EMT portando effetti simili a quelli di TGF β 1. Gli è stata attribuita inoltre la capacità di indurre l'espressione delle gelatinasi (MMP 2 e 9) (Strutz *et al.*, 2002).
- **Ipossia**: diversi studi inducono a considerare l'ipossia un fattore che promuove lo sviluppo di EMT: la sua azione si esplicherebbe attraverso l'attivazione del fattore Twist. Quest'ultimo sembra portare *down expression* delle caderine e innescare l'EMT (Sun *et al.*, 2009).
- Altri fattori studiati, dei quali però non è ancora chiarito il ruolo, sono *interleuchina 1* (IL 1) (Yhee *et al.*, 2008), *angiotensina II*, *hipoxia inducible factor 1 α* (HIF 1 α), *epidermal growth factor* (EGF), *connective tissue growth factor* (CTGF) (Forino *et al.*, 2006).

Si conoscono alcuni fattori che impediscono o riducono la progressione dell'EMT, il più studiato in medicina sperimentale è *hepatic growth factor* (HGF).

1.6.2 IL RUOLO DELLA MEMBRANA BASALE NELL'EMT

Nell'EMT il ruolo della membrana basale rimane ancora da chiarire: secondo alcuni autori la disgregazione della membrana basale avviene a seguito della produzione di proteasi (MMP), dopo che le CET hanno già assunto caratteristiche mesenchimali e, una volta eliminato il limite fisico della membrana basale, le cellule sono in grado di migrare a livello interstiziale (El-Nahas, 2003). Secondo altri autori la lisi della membrana basale avverrebbe prima della transizione delle CET e anzi, la membrana basale integra sarebbe un elemento essenziale per il mantenimento delle caratteristiche dell'epitelio (Cheng *et al.*, 2006).

Infine secondo Cheng *et al.* (2006) si può parlare di 2 pattern diversi e compresenti:

- **EMT intratubulare:** caratterizzata da cellule a vari gradi di differenziazione mesenchimale, deposizione peritubulare di collagene e integrità della membrana basale tubulare
- **EMT extratubulare:** in cui si osserva rottura della membrana in più punti e invasione dell'interstizio da parte di cellule mesenchimali di provenienza intratubulare.

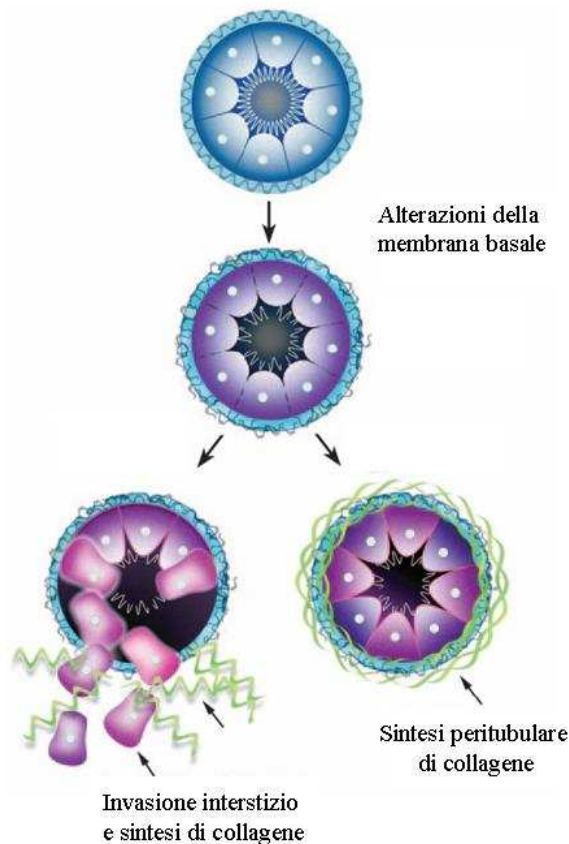


Fig. 4 Schema di EMT extratubulare ed intratubulare

1.7 LE METALLOPROTEASI, GLI INIBITORI TISSUTALI DELLE METALLOPROTEASI E IL RUOLO NELLA FIBROSI

1.7.1 METALLOPROTEASI (MMP)

Le metalloproteasi (MMP) sono proteine enzimatiche zinco-dipendenti coinvolte nel processo di degradazione della matrice extracellulare (Catania *et al.*, 2007; Visse *et al.*, 2003). Sono state identificate 24 diverse metalloproteasi, **classificate** in 6 gruppi sulla base della loro sequenza amminoacidica e dei substrati con i quali interagiscono (classificazione riportata in Tab 1). Le MMP vengono prodotte dalla cellula come precursori (proMMP) e, dopo escitosi, **attivate** nel comparto extracellulare, anche se per alcune MMP, l'attivazione è stata evidenziata a livello intracellulare (MMP 11) (Visse *et al.*, 2003).

La loro espressione è regolata da diversi mediatori infiammatori: citochine (IL 5), e fattori di crescita (TGF β 1) e dall'azione degli inibitori tissutali della metalloproteasi (TIMP 1, 2, 3) (Inkinen *et al.*, 2005).

COLLAGENASI (MMP 1, 8, 13, 18)	Attività collagenolitica su collagene tipo I, II e III.
GELATINASI (MMP 2, 9)	Attività collagenolitica, degradazione di laminina, gelatina e fibronectina. Responsabili dell'attivazione di molte citochine e di altre MMP.
STROMALISINE (MMP 3, 10)	Degradazione di collagene, fibronectina, laminina, gelatina, caseina e altre MMP.
MATRILISINE (MMP 7, 26)	Responsabili della degradazione di diversi componenti della matrice ma anche di molecole di superficie come l'E-caderina.
MEMBRANE-TYPE METALLOPROTEASI (MMP 14, 15, 16, 17, 24, 25 anche chiamate MT1, MT2, MT3, MT4, MT5, MT6MMP)	Proteine transmembranarie coinvolte nel meccanismo di attivazione di altre MMP.
ALTRE MMP (MMP 11, 12, 19, 20, 21, 22, 23, 28)	Difficile classificazione, tipicamente espresse in un singolo tessuto oppure in particolari condizioni.

Tab. 1 Classificazione delle metalloproteasi

1.7.2 STRUTTURA E ATTIVAZIONE

Sono generalmente costituite da un prodominio, un sito catalitico, una *hinge region* e un dominio *hemopexin-like*. Il sito catalitico è caratterizzato dalla presenza di un atomo di zinco, che nella forma non attiva della proteina non è disponibile alla formazione di legami per la presenza di una cisteina (proMMP) (Catania *et al.*, 2007; Visse *et al.*, 2003). L'attivazione consiste nell'esposizione del sito catalitico e quindi nella possibilità di interagire con i substrati. L'attivazione può essere di tipo enzimatico oppure non enzimatico: nel primo caso avviene per l'azione di enzimi proteolitici, fra i quali plasmina o altre MMP (Visse *et al.*, 2003). *In vitro* è stata evidenziata l'attivazione delle MMP in condizioni di pH acido e alte temperature, dovuta all'azione destabilizzante di questi fattori sul legame tra cisteina e zinco, favorendone la rottura. (Visse *et al.*, 2003)

Un meccanismo di attivazione particolare è stato riconosciuto per MMP 2: essa avviene nello spazio extracellulare in corrispondenza della superficie cellulare e necessita della presenza di due molecole di MT1 MMP e di una molecola di TIMP 2 (Visse *et al.*, 2003). MT1 MMP è una molecola transmembranaria. In presenza di TIMP 2, si ha la formazione di un dimero di MT1 MMP cui si lega la molecola di TIMP 2. La proMMP 2 si lega al complesso, la cisteina viene scissa e l'enzima attivato (Visse *et al.*, 2003).

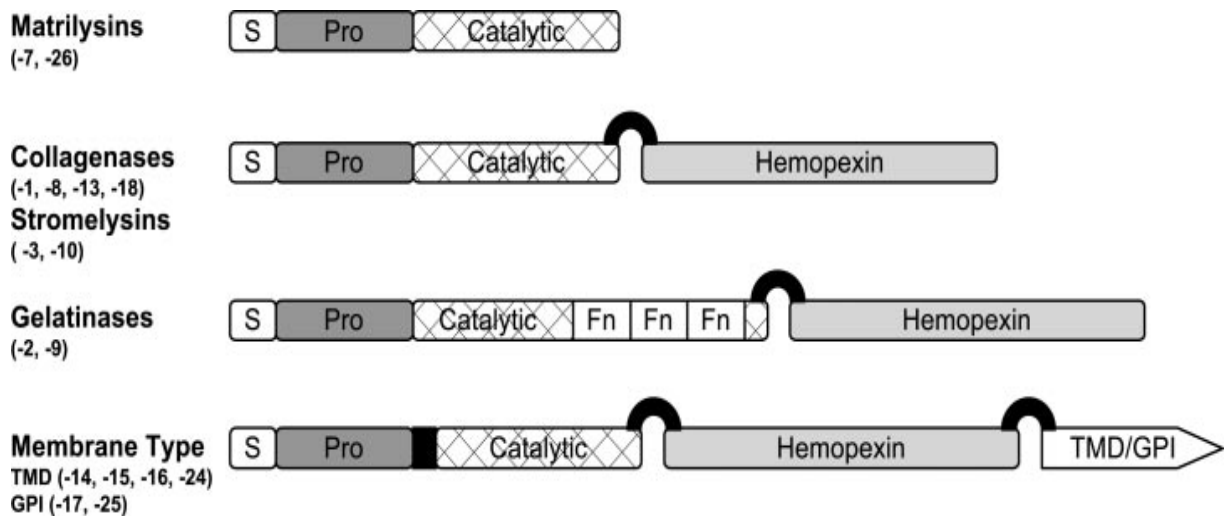


Fig. 5 Struttura delle metalloproteasi. Abbreviazioni: S, sequenza di secrezione; Pro, prodominio; Catalytic, sito catalitico; Fn, dominio fibronectin-like; TMD, dominio transmembrana; GPI, glycosylphosphatidylinositol anchor. (Catania *et al.*, 2007)

1.7.3 INIBITORI TISSUTALI DELLE METALLOPROTEASI (TIMP)

Gli inibitori tissutali delle metalloproteasi (TIMP) sono enzimi specifici, endogeni, coinvolti nella regolazione dell'attività delle MMP (Visse *et al.*, 2003). Dal punto di vista strutturale hanno conformazione a cuneo, si legano al sito attivo dell'enzima bloccandolo e impedendo il legame con i substrati con cui normalmente interagiscono (Visse *et al.*, 2003). Fino ad ora nei vertebrati sono stati identificati quattro TIMP; ognuno di essi riconosce dei substrati specifici, ma allo stesso tempo, l'assenza di uno di essi può essere compensata dall'azione degli altri (Visse *et al.*, 2003). Oltre a regolare l'attività delle MMP, diversi studi hanno riconosciuto ai TIMP altre funzioni biologiche:

- durante l'organogenesi renale
- inibizione di fattori quali l'EGF e il basic FGF 2
- nell'apoptosi con azione antiapoptotica (Visse *et al.*, 2003).

1.7.4 RUOLO DELLE MMP

Le metalloproteasi sono le principali responsabili dell'attività collagenolitica a carico della matrice extracellulare (MEC). La MEC è la componente acellulare dei tessuti connettivi ed è costituita da una componente fibrillare (collagene, fibronectina, elastina, laminina) e una componente amorfa (costituita da una fase acquosa e da una miscela di enzimi, glicoproteine e proteoglicani) (Rosati *et al.*, 1997). È il risultato di un equilibrio che si instaura tra la produzione e la degradazione degli elementi che la compongono ed è sottoposta ad un continuo turnover finemente regolato dai fibroblasti interstiziali, i quali producono la matrice stessa, gli enzimi che portano al suo riassorbimento e molti dei fattori responsabili del mantenimento di questo equilibrio (Rosati *et al.*, 1997).

Oltre alla funzione strutturale, l'azione proteolitica delle MMP è coinvolta in diversi meccanismi in quanto può favorire la liberazione di molecole della MEC o frammenti di molecole con diverse attività biologiche (McCawley *et al.*, 2001; Mott *et al.*, 2004).

La **proliferazione cellulare** è regolata dall'azione di fattori di crescita, i quali interagiscono con recettori della superficie cellulare. Le MMP possono intervenire favorendo la liberazione o l'attivazione di questi fattori (Ahmed *et al.*, 2007). Per citare alcuni esempi: l'azione proteolitica che MMP 1 e 3 esercitano sui proteoglicani favorisce il rilascio di FGF 2; MMP 2, 3 e 7 attaccando la decorina stimolano la liberazione di TGF β 1 (McCawley *et al.*, 2001). L'azione delle MMP si esplica anche a carico di substrati che non fanno parte della matrice: le proteine che legano gli *Insuline-like Growth Factor* (IGF) vengono lisate dalle MMP e gli IGF vengono attivati.

(McCawley *et al.*, 2001) In alcuni casi l'azione delle MMP è diretta su fattori di crescita per attivarli, come nel caso dell'azione delle gelatinasi (MMP 2 e 9) sul TGF β 1 o sull'interleuchina 1 (McCawley *et al.*, 2001).

La membrana basale svolge un ruolo fondamentale per la sopravvivenza delle cellule in quanto presenta diversi fattori che, se persi, portano le cellule all'**apoptosi**. L'azione delle MMP in questo processo potrebbe riguardare tali fattori, i quali una volta modificati dall'azione enzimatica diverrebbero promotori del processo apoptotico (Ahmed *et al.*, 2007; McCawley *et al.*, 2001). È stato evidenziato che le MMP siano coinvolte nella **comunicazione intercellulare**, in quanto necessarie per l'azione di molecole ad azione chemiotattica o per stimolare le cellule a produrre l'uno o l'altro fattore (McCawley *et al.*, 2001). In corso di infezioni batteriche intestinali, è stato evidenziato l'aumento dell'espressione di MMP 7 da parte delle cellule di Paneth, cui segue il rilascio di pro-difensina, molecola coinvolta nella risposta immunitaria innata che agisce distruggendo i batteri (McCawley *et al.*, 2001).

Il ruolo delle MMP è stato indagato anche nell'ambito delle **patologie tumorali** partendo dall'ipotesi che, degradando la matrice e le membrane basali, porterebbero un maggior invasività della neoplasia e faciliterebbero lo sviluppo di metastasi. Diversi studi sono stati condotti utilizzando animali geneticamente modificati per le MMP in cui l'espressione era stata soppressa. In alcuni lavori sul carcinoma squamoso in topi, in cui non venivano espresse MMP 9 e MMP 11 si è osservato una riduzione della crescita neoplasia (McCawley *et al.*, 2001). Tuttavia nel processo di degradazione della MEC diverse molecole sono coinvolte e l'eliminazione di una sola di queste non evita la capacità di invasione o di dare metastasi.

Un altro ruolo indiretto attribuito alle MMP è quello di promuovere la **migrazione cellulare** attivando diversi fattori ad azione chemiotattica: ad esempio il *vascular endothelial growth factor* (VEGF), coinvolto nello sviluppo delle ossa lunghe, il cui rilascio è permesso dall'azione della MMP (McCawley *et al.*, 2001). La **motilità e la migrazione cellulare** sono meccanismi complessi che coinvolgono sia le interazioni cellula-cellula sia quelle cellula-matrice. Sicuramente le MMP, portando la degradazione della MEC, favoriscono il movimento delle cellule rompendo legami che ancorano le cellule alla matrice o alla membrana basale o ancora, alterando le membrane giunzionali.

Alcuni studi attribuiscono a queste molecole, soprattutto alla metalloproteasi 2 (MMP 2), un ruolo decisivo nel processo di **EMT** delle cellule epiteliali del tubulo renale (Cheng *et al.*, 2003). Principalmente si ritiene che questo enzima sia responsabile della degradazione della membrana

basale permettendo la fuoriuscita nello spazio interstiziale delle cellule epiteliali in transizione. (El-Nahas, 2003).

1.7.5 MMP NEL CANE

Un interesse sempre maggiore si evidenzia nella ricerca scientifica per questi enzimi che ricoprono molteplici funzioni nel mantenimento nell'omeostasi dell'organismo e il cui ruolo, come abbiamo già descritto, non si limita alla degradazione della MEC. Sono presenti lavori in letteratura veterinaria sull'espressione delle MMP nell'endocardiosi valvolare (Aupperle *et al.*, 2008; Aupperle *et al.*, 2009), nella sindrome di Alport (Rao *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2005), a livello uterino durante la gravidanza (Beceriklisoy *et al.*, 2007).

Come in medicina umana, diversi studi si sono concentrati sullo studio delle MMP nell'ambito delle **neoplasie** nel cane (emangiosarcoma, neoplasie oronasali, linfoma) (Loukopoulus *et al.*, 2003; Murakami *et al.*, 2009; Nakaichi *et al.*, 2007; Newman *et al.*, 2008), con l'obiettivo di identificare il ruolo di questi enzimi nella progressione tumorale, nella neoangiogenesi e nella capacità di metastatizzare (Nowak *et al.*, 2008). In diversi tumori è stata evidenziata *up-regulation* delle MMP (Loukopoulus *et al.*, 2003); MMP 2 è stata associata ad un elevato grado di malignità nell'osteosarcoma ed ad un'alta capacità invasiva nel mastocitoma cutaneo (Nakaichi *et al.*, 2007). Uno studio sul potenziale ruolo di MMP 2 e 9 nelle neoplasie oronasali ha evidenziato una correlazione positiva tra la presenza di MMP e la capacità infiltrante della neoformazione (Nakaichi *et al.*, 2007). Nelle neoplasie mammarie è stata evidenziata una positività delle cellule tumorali per MMP 2 e 9 (Kawai *et al.*, 2006). È stato suggerito anche un loro ruolo come marker prognostici, osservando un aumento della loro concentrazione plasmatica in casi di linfoma. Sono presenti in letteratura studi che hanno valutato l'espressione delle MMP in corso di malattie parassitarie (Lai *et al.*, 2007).

1.7.6 MMP NEL RENE

A livello renale, fisiologicamente sono state evidenziate MMP 1, 2, 3, 8, 9, 13, 14, 24, 25, 27, 28 e TIMP 1, 2, 3 anche se la loro espressione e localizzazione precisa non è stata ancora chiaramente individuata (Catania *et al.*, 2007). Diversi studi in medicina umana hanno cercato di analizzare l'espressione e la localizzazione delle MMP in corso di patologia renale (Catania *et al.*, 2007), tuttavia i risultati sono molto diversificati e non sempre in accordo tra loro. In studi sul **danno acuto**, attraverso meccanismi di ischemia-riperfusion e di rigetto in animali da laboratorio (Laplante *et al.*, 2003), è riportato un aumento della concentrazione di MMP 9 e di proMMP 2 ma

una riduzione della MMP 2 attiva (Catania *et al.*, 2007). Queste modificazioni sono state evidenziate sia a livello tubulare, sia a livello glomerulare ed in associazione ad aumento del TIMP 2 (Catania *et al.*, 2007). Per quanto riguarda lo studio sul ruolo delle MMP in condizioni di **danno renale cronico** sono stati utilizzati diversi modelli: ratti in cui è stata indotta sperimentalmente l'ostruzione ureterale bilaterale o ratti sottoposti a nefrectomia 5/6. Nel primo caso i risultati hanno mostrato un aumento nell'espressione di MMP 2 e TIMP, ma una riduzione di MMP 1 e 9. (Catania *et al.*, 2007)

2. OBIETTIVI

In questo studio sono stati esaminati 20 campioni di tessuto renale di cani manifestanti segni clinici di insufficienza renale di vario grado.

Per ogni caso è stata effettuata la valutazione istologica tramite colorazioni specifiche ed è stata inoltre formulata una diagnosi morfologica secondo i parametri della *World Health Organization* (WHO) e della WSAVA (Churg, 1982). L'esame al microscopio ottico ha permesso di effettuare la valutazione del grado di fibrosi tubulointerstiziale.

Gli obiettivi di questo lavoro sono stati:

- valutare la **fibrosi tubulointerstiziale** nel cane in corso di malattia renale cronica, in relazione alla positività immunohistochimica per citocheratina e vimentina, per evidenziare il processo di **EMT** nelle cellule tubulari renali in corso di danno tubulo interstiziale cronico
- individuare la localizzazione dell'**espressione di metalloproteasi 2 e 9** in campioni renali di cane nei diversi gradi di danno tubulo interstiziale cronico, attraverso l'esame immunohistochimico
- valutare la relazione tra il grado di **fibrosi** e la positività immunohistochimica per **MMP 9**

3. MATERIALI E METODI

3.1 CAMPIONAMENTO

Lo studio è stato svolto su 20 campioni renali provenienti da cani di diverse età, appartenenti a varie razze. I soggetti presentavano segni clinici di insufficienza renale di entità variabile.

Dei 20 campioni, 19 erano il risultato di prelievi di tessuto renale durante necropsia (forma a cuneo con base corrispondente alla corticale di 2 cm e 1 cm di altezza) ed 1 era una biopsia effettuata in vivo (trucut). Tutti i campioni sono stati esaminati dal laboratorio di istopatologia della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli studi di Padova durante gli anni 2006-2009.

3.2 ISTOLOGIA

Il tessuto renale è stato valutato esaminando i quattro principali compartimenti funzionali del parenchima: i glomeruli, i tubuli, l'interstizio e i vasi.

Per la **microscopia ottica**, i campioni renali sono stati tagliati in fette dello spessore di 3 micron in modo da ottenere sezioni a singolo strato di cellule e poter valutare alterazioni anche minime del parenchima. Inizialmente, per effettuare una corretta diagnosi è stata valutata l'adeguatezza del campione: perché fosse considerato significativo dovevano essere presenti almeno 8 glomeruli. L'esame di sezioni seriali e consecutive ha permesso di ottenere glomeruli aggiuntivi e di identificare patologie specifiche che possono presentare alterazioni anche minime.

Per valutare in maniera corretta i diversi compartimenti si è ricorsi all'utilizzo di colorazioni istochimiche specifiche.

I campioni sono stati fissati in formalina (10%) e inclusi in paraffina. Sono state effettuate sezioni (microtomo Leica RM 2145) colorate con Ematossilina-Eosina, Periodic Acid Schiff (PAS), Acid Fuchsin and Orange G (AFOG), Tricromica di Masson, Periodic Acid Schiff Methanamina (PASM). Per la diagnosi di amiloidosi sono state effettuate colorazione Rosso Congo e trattamento con permanganato di potassio per evidenziare la presenza di amiloide e classificarne il tipo.

EMATOSSILINA- EOSINA

Colorazione istochimica classicamente utilizzata per la valutazione morfologica di campioni istologici, nell'ambito della patologia renale permette l'analisi del comparto tubulo-interstiziale. L'ematossilina basica permette la colorazione del nucleo, che assume una colorazione blu, mentre l'eosina colora il citoplasma di colore rosa-rosso.

La procedura è stata effettuata tramite coloratore automatico (Leica Autostainer XL) seguendo il seguente procedimento:

1. Deparaffinare e idratare le sezioni in acqua deionizzata.
2. Colorare in ematossilina per 7 minuti
3. Risciacquare in acqua corrente per 5 minuti
4. Colorare in eosina per 1 minuto
5. Disidratare in soluzioni crescenti di alcool (50%, 70%, 90%, 100%) e xilene
6. Montare con Eukit

PERIODIC ACID SCHIFF (PAS)

Tecnica d'elezione nella valutazione della struttura glomerulare che permette di evidenziare i mucopolisaccaridi, i quali assumono una colorazione tra il rosa e il rosso. L'acido periodico permette la reazione di ossidazione dei glicoli in aldeidi. Dopo la reazione con il reattivo di Schiff, viene rilasciato un reagente che colora i componenti cellulari contenenti glicole.

Procedimento:

1. Deparaffinare e idratare le sezioni in acqua deionizzata.
2. Immergere i vetrini nella soluzione di acido periodico all'1% per 10 minuti
3. Lavare in acqua di fonte per 2-3 minuti
4. Lavare in acqua distillata
5. Immergere nel reagente di Schiff per 16 minuti
6. Lavare in acqua di fonte per 5 minuti
7. Lavare in acqua distillata
8. Colorare in ematossilina per 5 minuti
9. Risciacquare in acqua corrente per 10 minuti
10. Lavare in acqua distillata
11. Disidratare in soluzioni crescenti di alcool (50%, 70%, 90%, 100%) e xilene
12. Montare con Eukit

ACID FUCHSIN AND ORANGE G (AFOG)

Si basa su una colorazione nucleare ottenuta con ematossilina ferrica, associata ad una colorazione del citoplasma con arancio G ed una colorazione del collagene con blu di anilina. In particolare è fondamentale il ruolo dell'acido fosfomolibdico, che agisce da ponte fra il blu di anilina (colorante anfotero) e le strutture tissutali, a cui selettivamente si lega (fibrille del collagene, membrane cellulari). L'altro componente della miscela AFOG, l'arancio G, colora le strutture che non hanno formato legami con l'acido fosfomolibdico. La fucsina acida evidenzia in rosso brillante eventuali depositi.

Procedimento:

1. Deparaffinare e idratare le sezioni in acqua deionizzata.
2. Mordenzare in Bouin in termostato a 60 °C per 3 ore
3. Lasciare a temperatura ambiente per 30 minuti
4. Immergere in acqua di fonte per 10 minuti
5. Colorare con ematossilina di Weigert per 10 minuti
6. Lavare in acqua distillata
7. Immergere in acqua per 20 minuti
8. Passare in acido fosfomolibdico per 5 minuti
9. Lavare in acqua distillata
10. Immergere in soluzione AFOG per 6 minuti
11. Lavare in acqua distillata
12. Disidratare rapidamente in soluzioni crescenti di alcool (50%, 70%, 90%, 100%) e xilene
13. Montare con Eukit

TRICROMICA DI MASSON

Colorazione utilizzata per la valutazione del tessuto connettivo. Il metodo associa una colorazione nucleare ottenuta con ematossilina di Weigert, una colorazione delle emazie con acido picrico e una colorazione del connettivo con due differenti coloranti acidi: blu di anilina per il collagene e strutture ricche in mucopolisaccaridi, fucsina di Ponceau per le fibre muscolari.

Procedimento:

1. Deparaffinare e idratare le sezioni in acqua deionizzata
2. Colorazione in ematossilina ferrica per 10 minuti
3. Lavare in acqua distillata
4. Passare in acqua di fonte per 5 minuti

5. Lavare in acqua distillata
6. Colorazione in acido picrico in soluzione satura alcolica per 1 minuto
7. Lavare in acqua distillata
8. Colorazione in fucsina di Ponceau per 1 minuto
9. Lavare in acqua distillata
10. Immersione in acido fosfomolibdico all'1% per 5 minuti
11. Colorazione in blu di anilina per 1 minuto
12. Lavare in acqua distillata
13. Disidratare in soluzioni crescenti di alcool (50%, 70%, 90%, 100%) e xilene
14. Montare con Eukit

PERIODIC ACID SILVER METHANAMINE (PASM)

Colorazione renale specifica che permette di evidenziare le membrane basali glomerulari e tubulari. L'acido periodico ossida i carboidrati che compongono la membrana basale e porta alla formazione di aldeidi. L'incubazione in soluzione di Silver e il trattamento con cloruro d'oro fanno in modo che le membrane basali acquisiscano un colore nero. Per colorare il restante parenchima si procede come per la colorazione PAS.

Procedimento:

1. Deparaffinare e idratare le sezioni in acqua deionizzata
2. Immersione in acido periodico all'1% per 10 minuti
3. Lavare in acqua distillata
4. Colorazione in soluzione di Silver a 60 °C per circa 1 ora e mezza. (controllo al microscopio)
5. Lavaggio in acqua distillata
6. Passaggio in oro cloruro allo 0,1% per 30 secondi
7. Passaggio in tiosolfato di sodio al 3% per 2 minuti
8. Lavare in acqua distillata
9. Procedere come per la colorazione PAS

ROSSO CONGO

Viene utilizzata per valutare la presenza di amiloide. La positività, esaminata al microscopio ottico con luce polarizzata, si manifesta con una rifrangenza color verde mela. Il trattamento con permanganato di potassio permette di identificare la tipologia di amiloide: se di tipo AA (amiloidosi

reattiva o familiare) la positività scompare, se di tipo AL (mieloma multiplo nell'uomo) la positività permane.

Procedimento:

1. Deparaffinare e idratare le sezioni in acqua deionizzata
2. Colorazione con ematossilina di Mayer per 10 minuti
3. Lavare in acqua distillata per 5 minuti
4. Immersione in soluzione alcalina di sodio cloruro
5. Colorazione con soluzione Rosso Congo per 50 minuti
6. Disidratare rapidamente in soluzioni crescenti di alcool (50%, 70%, 90%, 100%) e xilene
7. Montare con Eukit

Il trattamento con permanganato di potassio viene effettuato solo su alcune sezioni prima della colorazione con ematossilina di Mayer: vengono lavate in acqua distillata e processate come le sezioni che non subiscono tale trattamento.

DIAGNOSI E CLASSIFICAZIONE DELLA FIBROSI

La diagnosi istologica è stata formulata secondo i parametri della classificazione delle patologie renali nell'uomo stabilita dalla WHO (Churg, 1982).

La valutazione del grado di fibrosi è stato effettuata alla colorazione AFOG. Per ogni sezione sono stati valutati 10 campi ad un ingrandimento di 200x, mentre il campione biotico è stato valutato in toto. La classificazione di tipo semi-quantitativo, è stata formulata a partire da precedenti studi per la valutazione del danno tubulointerstiziale e fibrosi renale (Aresu *et al.*, 2007) e prevede 4 categorie:

- **grado 0:** se tubulointerstizio normale e percentuale di fibrosi inferiore al 5% (normale)
- **grado 1:** se minima atrofia tubulare e fibrosi tra 5 e 20% (minimo)
- **grado 2:** se moderata atrofia tubulare e fibrosi tra il 20 e il 50% (moderato)
- **grado 3:** se grave atrofia tubulare e fibrosi maggiore del 50% (grave).

3.3 IMMUNOISTOCHEMICA (IHC)

Negli ultimi anni, l'immunoistochimica ha trovato impiego sempre maggiore sia come strumento di ricerca per la conoscenza dei processi patogenetici di una patologia, sia come strumento diagnostico. Tale tecnica permette l'identificazione e la localizzazione di antigeni e di costituenti cellulari e tissutali, su campioni istologici e citologici. (Ramos-Vara *et al.*, 2008)

Il principio della metodica si basa sulla ricerca del legame tra anticorpi specifici e l'antigene, successivamente l'avvenuto legame viene evidenziato tramite una reazione colorimetrica valutata alla microscopia ottica. (Ramos-Vara *et al.*, 2008)

Nel dettaglio la tecnica prevede diverse fasi:

- a. Sparaffinatura e idratazione delle sezioni
- b. Smascheramento dell'antigene
- c. Incubazione con anticorpo primario
- d. Sistema di rilevazione
- e. Controcolorazione

Nel nostro studio si sono ottenute fette seriali consecutive dei campioni renali dello spessore di 3 micron, montate su vetrini trattati in polilisina (Superfrost®Plus).

Il primo passaggio ha previsto l'incubazione a 37°C per 30 minuti.

I 20 campioni sono stati testati con quattro anticorpi diversi (Pancitocheratina, Vimentina, MMP 2 e MMP 9) utilizzando un immunocoloratore automatico (BenchMark, Ventana Medical System Inc.).

La macchina utilizza un sistema di rilevazione ultraViews™ Universal DAB, un sistema biotina-free basato sull'utilizzo di un multimeri complessato all'enzima perossidasi Horse-raddish, che permette di identificare in modo sensibile anticorpi primari di topo e coniglio. Il kit comprende 5 componenti.

I protocolli utilizzati sono stati i seguenti:

CITOCHERATINA (clone AE1/AE3 diluizione 1:100)

Sparaffinatura

Smascheramento: Cell Conditioning Ridotto (CRR) ridotto 30 minuti

Incubazione con anticorpo primario 16 minuti a 42°C

Ultrawash

Controcolorazione: incubazione con ematossilina 2 minuti

VIMENTINA (Clone V9 diluizione 1:150)

Sparaffinatura

Smascheramento: Cell Conditioning Ridotto (CRR) ridotto 30 minuti

Incubazione con anticorpo primario 18 minuti a 42°C

Controcolorazione: incubazione con ematossilina 2 minuti

METALLOPROTEASI 2 (RB 1537-P diluizione 1:100)

Sparaffinatura

Smascheramento: Cell Conditioning Standard (CRS) ridotto 60 minuti

Incubazione con anticorpo primario 30 minuti a 42°C

Ultrawash

Controcolorazione: incubazione con ematossilina 4 minuti

METALLOPROTEASI 9 (MAB 3309, diluizione 1:200)

Sparaffinatura

Smascheramento: Cell Conditioning Ridotto (CRR) ridotto 30 minuti

Incubazione con anticorpo primario 32 minuti a 42°C

Ultrawash

Controcolorazione: incubazione con ematossilina 2 minuti

Durante tutta la procedura i vetrini sono ricoperti di una soluzione oleosa che copre il tessuto e crea una camera umida, i reagenti sono distribuiti automaticamente, fatta eccezione per la titolazione con l'anticorpo primario che viene dispensato manualmente.

Al termine della corsa i vetrini vengono lavati in acqua e sapone per eliminare la soluzione oleosa, dopodiché si procede alla disidratazione in soluzioni crescenti di alcool (50%, 70%, 90%, 100%), passaggio in xilene (2 minuti per ogni passaggio) e montaggio con Eukit.

Sui vetrini testati per vimentina e per MMP 2 e 9, dopo il lavaggio in acqua e sapone è stata effettuata la colorazione PAS per permettere l'evidenziazione delle membrane basali durante la valutazione alla microscopia.

VALUTAZIONE IMMUNOISTOCHEMICA

La immunoreattività è stata valutata semi-quantitativamente.

Per **citocheratina** è stata valutata la perdita di positività delle CET e classificata come segue:

- +++ con perdita inferiore a 20%
- ++ con perdita tra 20% e 40%
- + con perdita superiore a 40%

Per **vimentina** è stata valutata positività delle CET e classificata come segue:

- + compresa tra 0 e 20%
- ++ compresa tra 20% e 50%
- +++ superiore a 50%.

Per **MMP 9** è stata valutata la localizzazione della positività e la perdita di positività delle CET classificata come segue:

- +++ con perdita inferiore a 20%
- ++ con perdita tra 20% e 40%
- + con perdita superiore a 40%

Per **MMP 2** è stata valutata la sola localizzazione della positività

Per citocheratina, l'epitelio tubulare normale presente nei casi controllo con assenza di lesioni è stato utilizzato come controllo positivo interno; mentre per vimentina, la positività dei miofibroblasti interstiziali è stata utilizzata come controllo positivo interno. Per MMP 9 la positività delle plasmacellule interstiziali è stata utilizzata come controllo positivo interno. Per MMP 2 in ciascuna corsa era presente un caso di osteosarcoma utilizzato come controllo positivo. In ciascuna corsa era presente un controllo negativo ottenuto sostituendo l'anticorpo primario con acqua deionizzata.

Le immagini sono state ottenute con Leica DMD 108

3.4 ANALISI STATISTICHE

I dati sono stati analizzati attraverso il programma Minitab 14 e i risultati sono stati espressi come media, deviazione standard e confrontati tra loro.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 DIAGNOSI MORFOLOGICA E GRADING FIBROSI

Sono stati presi in esame 20 campioni renali di cane. La tabella 2 riassume i dati relativi al segnalamento (razza, età, sesso) degli animali.

	Razza	Età	Sesso
22160/1 b	METICCIO	8a	M
54/07 x1	METICCIO	7aa	M
91/07 x	PASTORE TEDESCO	10aa	F
200/05 x	LEVRIERO	5aa	M
226/07 x2	METICCIO	13aa	M
239/05	CARLINO	9aa	M
244/06 x	BULLDOG INGLESE	6aa	F
305/06 a	BOXER	5aa	M
327/05 x	METICCIO	14aa	F
344/06 x	METICCIO	13aa	F
469/07 x1	CANE CORSO	9aa	F
478/06	LABRADOR	8aa	F
585/05 a	LABRADOR	7aa	M
587/06 x2	METICCIO	18aa	M
622/05 y	PASTORE TEDESCO	11aa	F
628/06 x3	BEAGLE	8aa	M
695/05 y	METICCIO	6aa	M
734/06 x1	METICCIO	5aa	F
20313	KURZHAAR	6a	F
21789	BOXER	4a	M

Tab 2 Segnalamento.

La valutazione microscopica è stata formulata secondo i criteri morfologici proposti dal WHO (Churg, 1982). Da un punto di vista morfologico i campioni renali sono stati così classificati:

- 6 casi controllo
- 5 casi di Glomerulonefrite membranoproliferativa
- 3 casi di Glomerulosclerosi focale segmentale (FSGS)
- 2 casi di End stage kidney
- 1 caso di Glomerulopatia crescentica
- 1 caso di Glomerulonefrite mesangioproliferativa
- 1 caso di Malattia a lesioni minime
- 1 caso di linfoma

Nella valutazione della fibrosi sono stati classificati:

- 6 casi di grado 3
- 4 casi di grado 2
- 3 casi di grado 1
- 7 casi di grado 0 (casi controllo)

Nei casi da noi esaminati non è stata evidenziata nessuna relazione tra il tipo di lesione descritta e il grado di fibrosi. Questo elemento può essere considerato un'ulteriore conferma del fatto che la progressione del danno tubulo interstiziale è indipendente dalla lesione glomerulare primaria (Aresu *et al.*, 2007; Brown *et al.*, 1997; Nath, 1998; Tanaka *et al.*, 2004).

La tabella 3 riassume la diagnosi morfologica formulata per ogni singolo caso associata al grado di fibrosi attribuito.

	Diagnosi morfologica	Fibrosi
22160/1 b	FSGS	3
54/07 x1	FSGS	3
91/07 x	GN membranoproliferativa	2
200/05 x	Controllo	0
226/07 x2	GN membranoproliferativa	3
239/05	Controllo	0
244/06 x	End stage kidney	3
305/06 a	Controllo	0
327/05 x	Controllo	0
344/06 x	GN membranoproliferativa	2
469/07 x1	FSGS	2
478/06	GN membranoproliferativa	1
585/05 a	Controllo	0
587/06 x2	Glomerulopatia crescentica	3
622/05 y	Controllo	0
628/06 x3	GN membranoproliferativa	1
695/05 y	Malattia a lesioni minime	0
734/06 x1	Metastasi renale di linfoma	1
20313	End stage kidney	3
21789	Glomerulopatia mesangioproliferativa	2

Tab 3 Diagnosi morfologica e grado di fibrosi.

La lesione renale più frequentemente osservata è stata la **glomerulonefrite membranoproliferativa** (Fig. 7). **Istologicamente** si osservavano alterazioni a carico del comparto glomerulare, con ipercellularità mesangiale e aumento della matrice mesangiale. Le membrane basali glomerulari, valutate alle colorazioni PAS e PASM, apparivano ispessite per la presenza di immunodepositi e l'interposizione delle stesse cellule mesangiali. A carico del comparto tubulointerstiziale si osservava materiale amorfo intratubulare, riferibile a proteinuria e si evidenziavano diversi gradi di degenerazione tubulare fino all'atrofia. Parallelamente erano presenti aumento della matrice extracellulare e fibrosi di vario grado (1-2-3). In tutti i casi era evidenziabile la presenza di infiltrato infiammatorio cronico di tipo linfoplasmacellulare di entità variabile, con distribuzione multifocale. In questi casi non sono state osservate alterazioni a carico del comparto vascolare.

Dal punto di vista **patogenetico**, l'aumento della matrice mesangiale è causa della costrizione dei capillari glomerulari, con progressiva riduzione del lume capillare fino all'occlusione totale. La ridotta portata ematica esita in sclerosi glomerulare globale, blocco della filtrazione e perdita della funzionalità del nefrone (Janette *et al.*, 2007). Al progredire della lesione glomerulare viene coinvolto il comparto tubulointerstiziale, sfociando in malattia renale cronica (Aresu *et al.*, 2007). Nel cane le glomerulonefriti membranoproliferative sono riconosciute avere diverse **eziologie**. Le cause più descritte sono le infezioni batteriche, virali (CAV 1) (Aresu *et al.*, 2008), protozoarie (*Leishmania spp.*) (Poli *et al.*, 1991; Zatelli *et al.*, 2003), infestazioni da *Dirofilaria spp* (Casey *et al.*, 1975; Maxie *et al.*, 2007) ed in alcuni casi è considerata idiopatica (Aresu *et al.*, 2007).

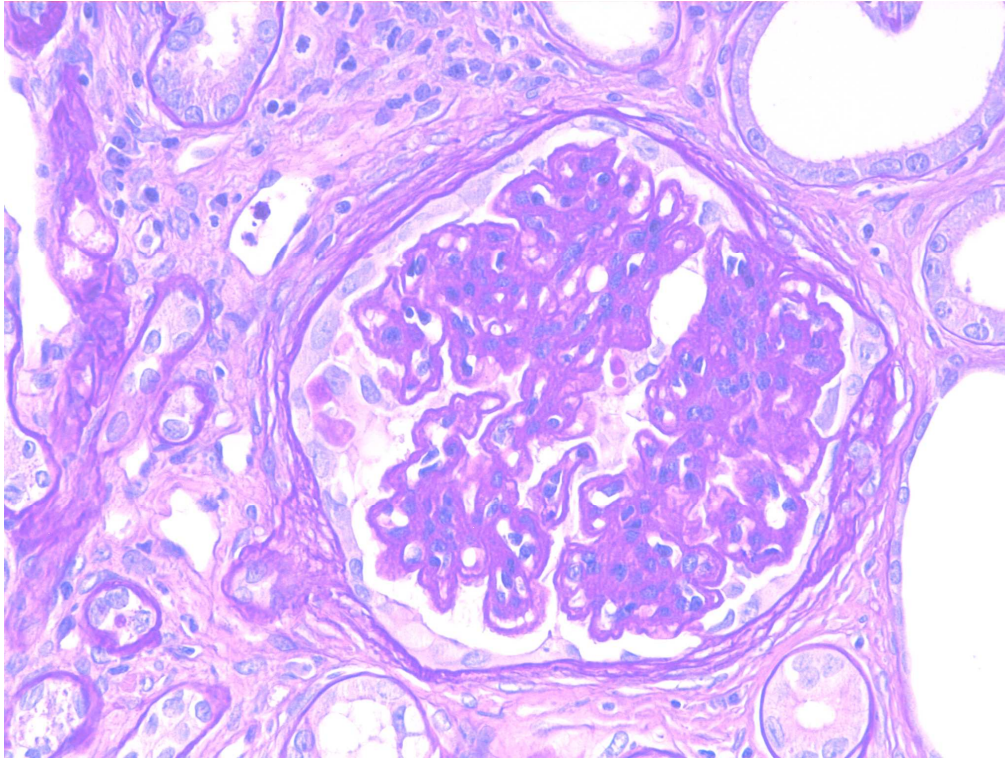


Fig. 6 Glomerulonefrite membranoproliferativa. (PAS 400x)

La seconda lesione più frequentemente osservata (3 casi) è stata la **glomerulosclerosi focale e segmentale** (FSGS) (Fig. 8). All'esame **istologico**, l'elemento morfologico caratteristico di FSGS è la presenza di aree di sclerosi glomerulare e collasso dei capillari glomerulari con distribuzione focale e segmentale. La diagnosi di FSGS viene effettuata al reperimento delle alterazioni tipiche in assenza di lesioni associabili a glomerulonefriti, patologie sistemiche che coinvolgono i glomeruli o patologie con deposizione di immunocomplessi (Janette *et al.*, 2007). Nei casi da noi esaminati, il comparto glomerulare era caratterizzato da elevata presenza di sclerosi glomerulare globale e atrofia glomerulare cistica. I glomeruli caratteristici per la diagnosi di FSGS presentavano aree di adesione alla capsula Bowman (sinechie), con aumento segmentale della matrice e depositi di scleroialinosi, che costringevano i capillari glomerulari. Si osservava danno tubulointerstiziale avanzato con degenerazione e atrofia tubulare, associati ad un elevato grado di fibrosi (grado 2-3) e infiltrato infiammatorio cronico di tipo linfoplasmacellulare. A carico del comparto vascolare non si evidenziavano alterazioni specifiche.

Dalla letteratura la **patogenesi** di FSGS è legata ad un danno alle cellule podocitarie. Un iniziale insulto ai podociti porta l'innescarsi di un processo infiammatorio che esita in sclerosi segmentale del glomerulo in direzione globale (Janette *et al.*, 2007, Zaho *et al.*, 2008).

L'evidenziazione di glomeruli sclerotici e glomeruli in atrofia glomerulare cistica, in corso di FSGS, è in accordo con quanto evidenziato da Kriz *et al.* (1998) secondo cui la progressione del danno glomerulare segue due diversi pattern:

- nel primo caso l'adesione del glomerulo alla capsula Bowman, l'aumento della matrice e la deposizione di materiale ialino provocano ostruzione dei capillari e progressione verso la sclerosi globale
- nel secondo si verifica ostruzione del polo urinario con mancato deflusso dell'ultrafiltrato: la porzione tubulare va incontro a degenerazione e il liquido si accumula nello spazio urinario, con successiva dilatazione del glomerulo (Kriz *et al.*, 1998).

Lo stadio terminale di FSGS è la sclerosi globale, elemento comune a più patologie e che non consente di formulare diagnosi di FSGS; diventa quindi essenziale indagare glomeruli in cui la lesione sia di tipo segmentale (Janette *et al.*, 2007).

Una problematica nella **diagnosi** di FSGS è che agli esordi della patologia, l'unica alterazione presente è una sclerosi focale e segmentale e la mancata evidenziazione di questa lesione rende impossibile differenziarla dalla Malattia a lesioni minime. In un campione bioptico in cui il numero di glomeruli è esiguo può accadere che non si rinvengano glomeruli alterati. Inoltre, la lesione di tipo segmentale può non essere evidenziata in un'unica sezione e risulta essenziale l'esame di sezioni seriali (Fogo *et al.*, 2005).

Nel cane questa patologia è scarsamente descritta, ma la frequenza nella nostra casistica ci porta a ritenere che la sua frequenza sia in realtà sottostimata.

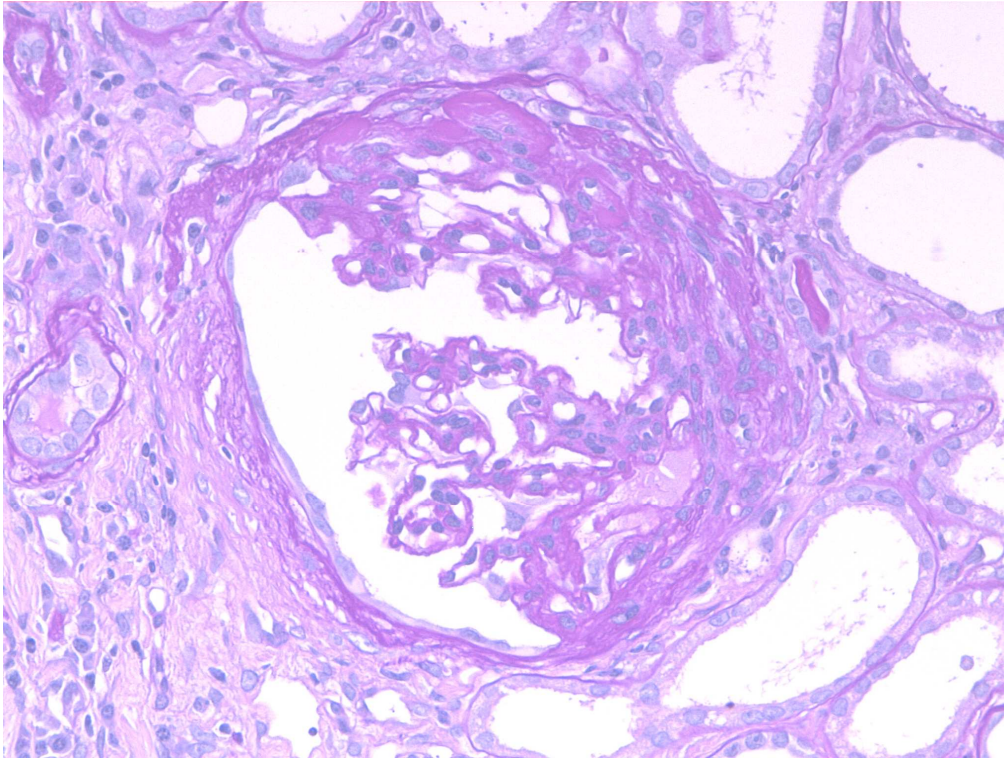


Fig. 7 FSGS. (PAS 400x)

La **malattie a lesioni minime** (MCD) è stata diagnosticata in un solo caso. Il quadro istologico era caratterizzato da lesioni glomerulari minime o assenti. In alcuni glomeruli era presente minimo aumento della matrice mesangiale. A carico del comparto tubulare si evidenziava la presenza di materiale amorfo eosinofilo intratubulare riferibile a proteinuria, mentre le cellule tubulari non presentavano alterazioni. A livello interstiziale si osservava grado di fibrosi inferiore al 5% (grado 0) e la presenza di rare cellule infiammatorie di tipo linfoplasmacellulare. Non sono state evidenziate lesioni a carico del comparto vascolare.

L'**eziopatogenesi** della MCD è tutt'ora sconosciuta. È stato ipotizzato che citochine anomale circolanti siano responsabili di un danno a livello del filtro glomerulare a cui seguono alterazione della filtrazione glomerulare e proteinuria (Janette *et al.*, 2007; Fogo *et al.*, 2005). Elemento caratteristico della MCD è la fusione dei pedicelli podocitari evidenziabile solo all'esame ultrastrutturale.

Due casi sono stati classificati come **End-stage kidney** (Fig. 9). A carico del comparto glomerulare si osservava sclerosi o ectasia della maggior parte dei glomeruli (>90%), associati ad ispessimento diffuso della capsula di Bowman e contenuto materiale proteico nello spazio urinario. Nei rimanenti glomeruli si osservava moderato aumento della matrice e della cellularità mesangiale, con

occasionali aggregati PAS-positivi, irregolarmente nodulari, segmentali, compatibili con scleroialinosi. A livello tubulointerstiziale si osservava materiale amorfo intratubulare (proteinuria) e depositi occasionali intratubulari di sali di calcio, indicativi di sofferenza cellulare. Erano presenti inoltre, gruppi di tubuli atrofici e fibrosi classificata di grado 3, con presenza di un moderato infiltrato linfoplasmacellulare a distribuzione multifocale.

Come precedentemente descritto la malattia renale cronica è una patologia progressiva ad **eziologia** eterogenea (infiammazioni, disordini immunitari, amiloidosi, neoplasie, infezioni) (Ilman *et al.*, 2006). Dal punto di vista **patogenetico**, si osserva una lesione primaria da cui s'innescano un meccanismo di autoperpetuazione del danno che porta al quadro istologico di end stage kidney. Indipendentemente dalla lesione primaria s'innescano alterazioni a livello tubulointerstiziale, che sono state viste come principali responsabili della progressione del danno (Brown *et al.*, 1997; Nath, 1998; Tanaka *et al.*, 2004).

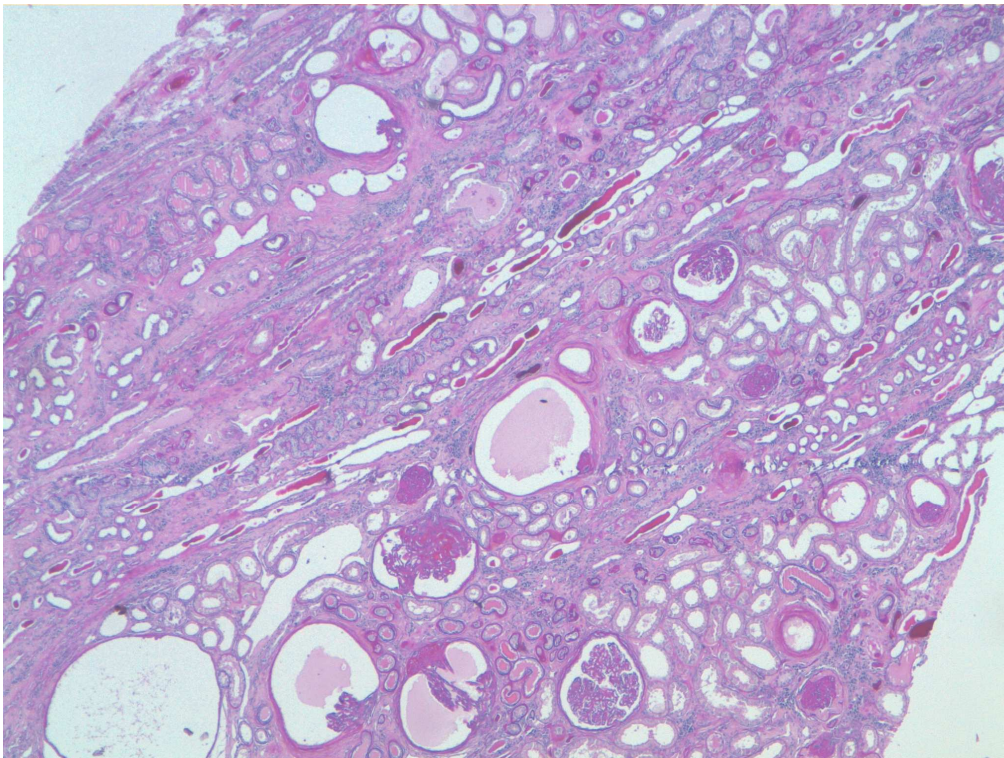


Fig. 8 End stage kidney. (PAS 50x)

La **glomerulonefrite crescentica** è caratterizzata dalla presenza di aree di aderenza delle cellule epiteliali viscerali all'epitelio parietale (sinechie), con reazione cellulare proliferativa (formazioni crescentiche) (Fig. 10). Nel campione esaminato si evidenziava glomerulosclerosi da segmentale a globale di 70% dei glomeruli. Nei rimanenti glomeruli si osserva ipercellularità mesangiale con

ispessimento delle membrane basali dei capillari glomerulare. Si osservava la presenza di formazioni crescentiche associate a rottura della capsula di Bowman. A carico del comparto tubulare si osservava atrofia tubulare, materiale amorfo all'interno del lume (proteinuria) e depositi di sali di calcio. È presente fibrosi grave (>75%) classificata di grado 3. Era evidenziabile la presenza di moderato infiltrato infiammatorio cronico, di tipo linfoplasmacellulare, con distribuzione multifocale. Non sono state osservate alterazioni a carico del comparto vascolare. Dal punto di vista **patogenetico**, lo sviluppo delle formazioni crescentiche è il risultato dell'interazione tra leucociti infiltrati, cellule epiteliali glomerulari, e modificazioni nella matrice extracellulare. La lesione glomerulare evolve poi in sclerosi da segmentale a globale per la deposizione di materiale fibrinoide e occlusione dei capillari glomerulari (Janette *et al.*, 2007 ; Sanders *et al.*, 2004).

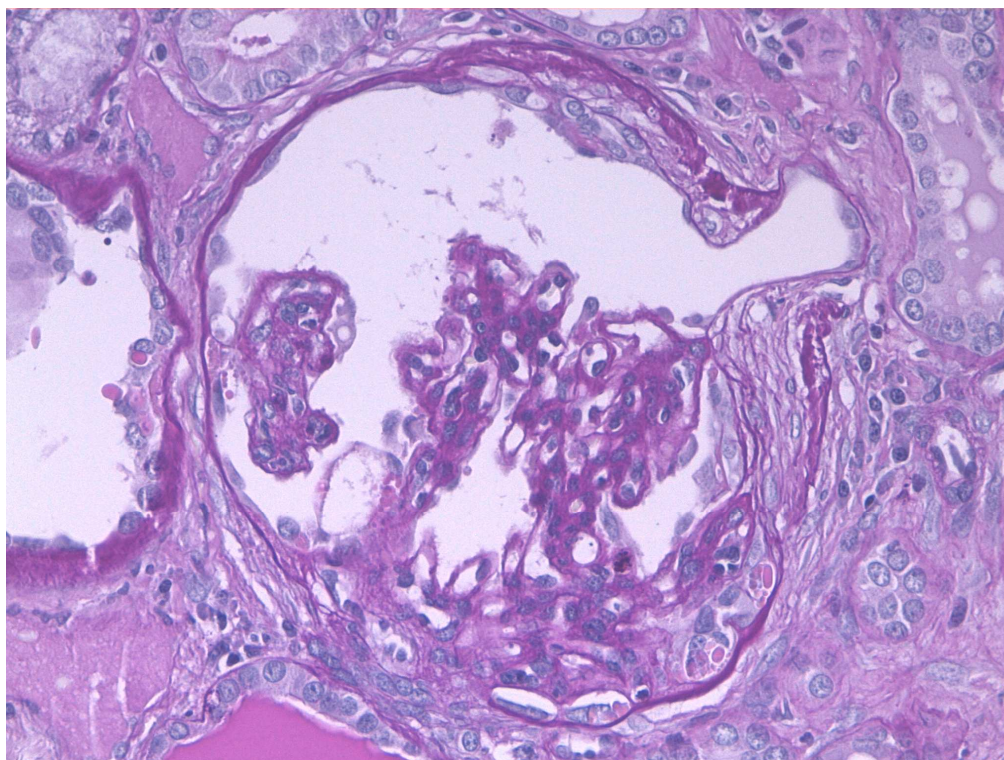


Fig. 9 Glomerulonefrite crescentica. (PAS 400x)

Il caso classificato come **glomerulopatia mesangioproliferativa** è l'unico campione biotico analizzato (Fig 11). Sono state valutate sezioni **istologiche** seriali di corticale e midollare renale. Alla colorazione PAS si contano 15 glomeruli di cui 5 in sclerosi globale e 2 in atrofia glomerulare cistica. I rimanenti glomeruli sono caratterizzati da aumento della cellularità mesangiale diffuso, senza ispessimento delle membrane basali. È presente sclerosi segmentale, associata a sinechie. La capsula di Bowman appare gravemente e diffusamente ispessita, con grave reattività delle cellule

epiteliali parietali e diffusa fibrosi periglomerulare. I tubuli appaiono multifocalmente ectasici e atrofici. A livello del lume dei tubuli si evidenziava la presenza di materiale riferibile a proteinuria. Si osservava fibrosi di grado 2, in associazione ad un moderato infiltrato infiammatorio multifocale costituito da linfociti, plasmacellule, occasionali macrofagi e rari granulociti neutrofilici. Non sono state osservate alterazioni a carico del comparto vascolare.

Il quadro istologico è associato ai casi di **nefropatia familiare**, descritte in più di 20 razze diverse (Maxie *et al.*, 2007). Il soggetto da cui è stato ottenuto il campione bioptico apparteneva alla razza Boxer. Chandler *et al.* (2007) hanno descritto da un punto di vista clinico e istopatologico 37 casi di nefropatia familiare in cani di razza boxer. Le lesioni istologiche da loro descritte sono sovrapponibili a quelle da noi riportate in questo caso. Nello studio di Chandler *et al.* (2007) si osserva anche displasia renale di diverso grado, reperto da noi non evidenziato. Riguardo all'origine della patologia, nei cani giovani le patologie renali sono considerate congenite o ereditarie; in alcune razze come Lhasa Apso è stata dimostrata una componente ereditaria, mentre in altre essa è solo presunta (Peeters *et al.*, 2000). Nel caso della razza Boxer, la descrizione della patologia è recente e non sono ancora presenti in letteratura studi che dimostrino la componente ereditaria. Negli ultimi anni è sempre maggiore il numero delle razze di cui è stata descritta l'esistenza di nefropatia familiare, probabilmente grazie ad un più frequente ricorso alla valutazione istologica delle lesioni renali in medicina veterinaria.

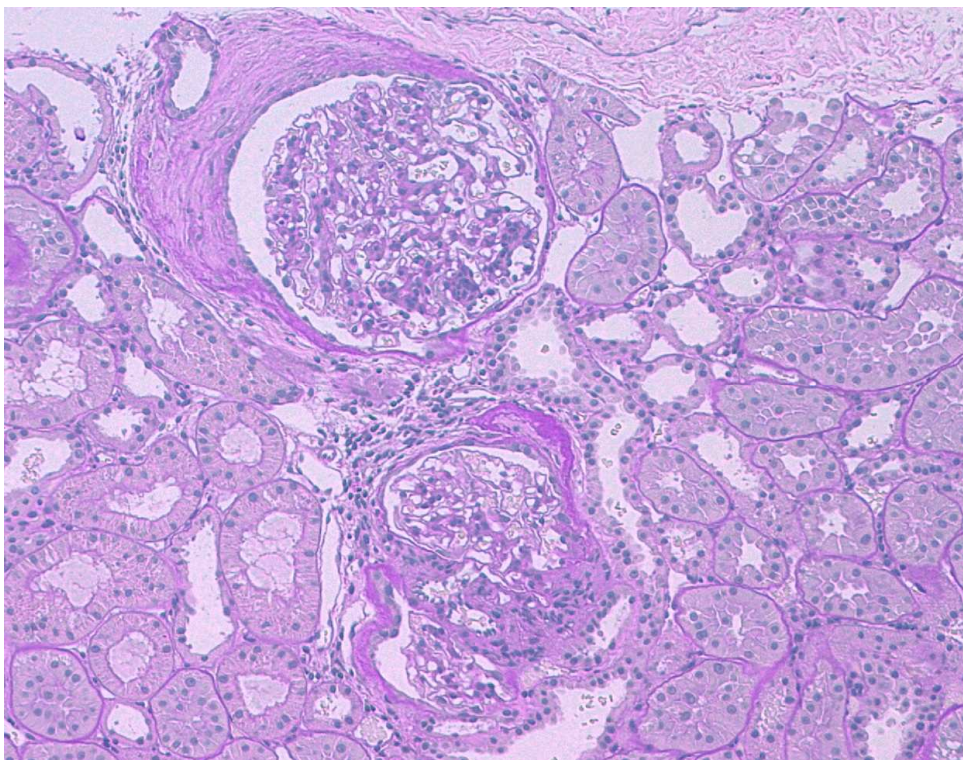


Fig. 10 Glomerulopatia mesangioproliferativa. (PAS 200x)

4.2 EMT E FIBROSI

4.2.1 CITOCHERATINA

L'esame immunohistochimico per la citocheratina ha mostrato positività intracitoplasmatica omogenea nei casi con danno tubulointerstiziale assente o minimo (grado 0-1) (Fig. 12).

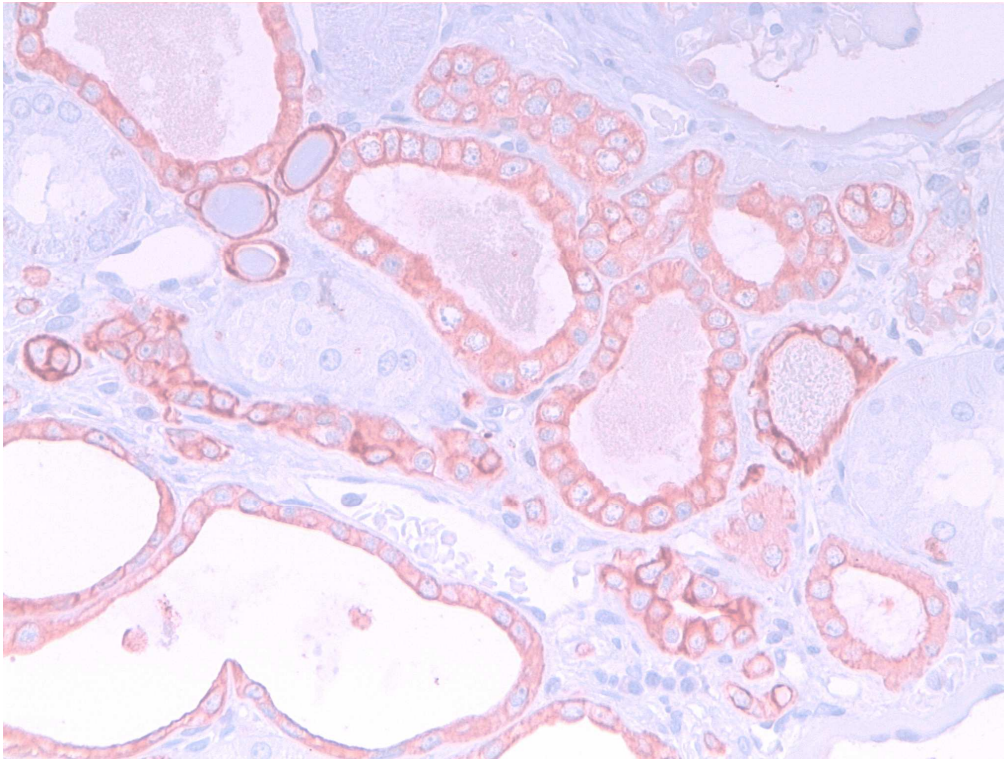


Fig. 11 Positiv  delle CET all'esame immunohistochimico per citocheratina (caso controllo). (400x)

In casi a vario grado di danno tubulo interstiziale (grado 2-3) si osservano:

- perdita di positivit  di alcune cellule epiteliali tubulari
- distribuzione non pi  omogenea della positivit 
- compresenza nello stesso tubulo di cellule positive e cellule negative al marker epiteliale (Fig. 13).

I casi sono stati valutati in base alla percentuale di perdita della positivit  per citocheratina e classificati come segue:

- 6 casi con positivit  pari a +
- 3 casi con positivit  pari a ++
- 11 con positivit  pari a +++.

La tabella 4 riassume il grado di positività delle CET osservata associata al grado di fibrosi attribuito ad ogni singolo caso.

	FIBROSI	CITOCHERATINA
22160/1 b	3	+
54/07 x1	3	+
91/07 x	2	++
200/05 x	0	+++
226/07 x2	3	+
239/05	0	+++
244/06 x	3	++
305/06 a	0	+++
327/05 x	0	+++
344/06 x	2	++
469/07 x1	2	+++
478/06	1	+++
585/05 a	0	+++
587/06 x2	3	+
622/05 y	0	+++
628/06 x3	1	+++
695/05 y	0	+++
734/06 x1	1	+++
20313	3	+
21789	2	+

Tab 4 Grado di fibrosi e positività per citocheratina

In relazione alle aree fibrotiche si osserva:

- perdita di positività da parziale a totale delle cellule epiteliali dei tubuli adiacenti alle aree di fibrosi
- perdita di positività di tutte le cellule del tubulo o solo di alcune
- perdita totale della positività nei tubuli atrofici (Fig. 13).

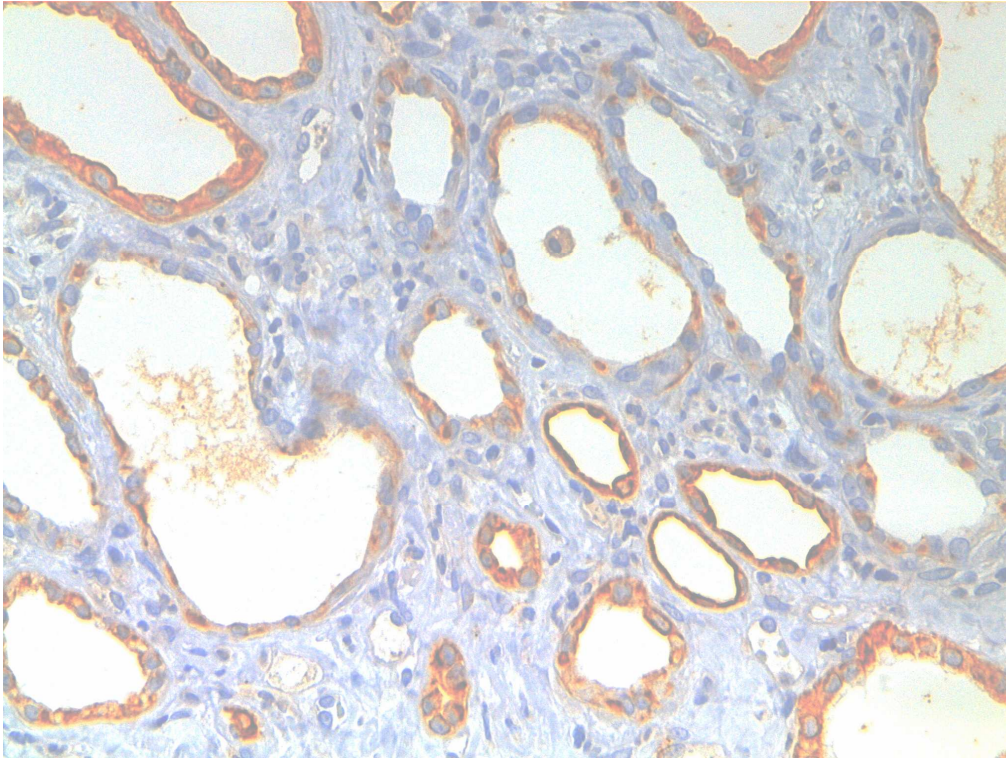


Fig. 13 Positiv   all'esame immunoistochimico per citocheratina. Si osserva perdita di positiv   a carico delle CET.
(400x)

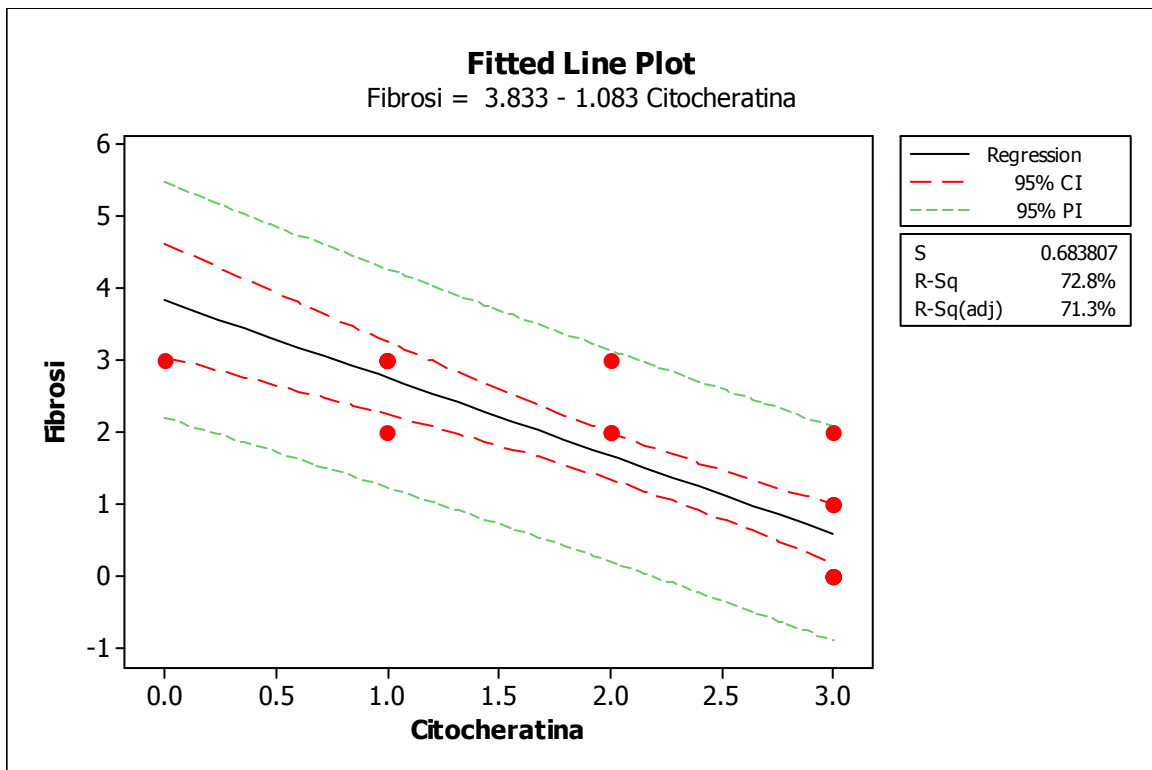


Grafico 1

Nel modello di regressione lineare riportato nel grafico 1, l'elemento citocheratina è utilizzato come variabile dipendente e la fibrosi come predittore. La correlazione attraverso il coefficiente di Pearson ha confermato l'esistenza di una relazione lineare. All'aumentare del grado di fibrosi il numero di cellule epiteliali citocheratina positive si riduce.

4.2.2 VIMENTINA

L'esame immunohistochimico per vimentina ha mostrato positività delle cellule interstiziali e assenza di positività delle CET nei casi con danno tubulointerstiziale assente o minimo (grado 0-1) (Fig. 14).

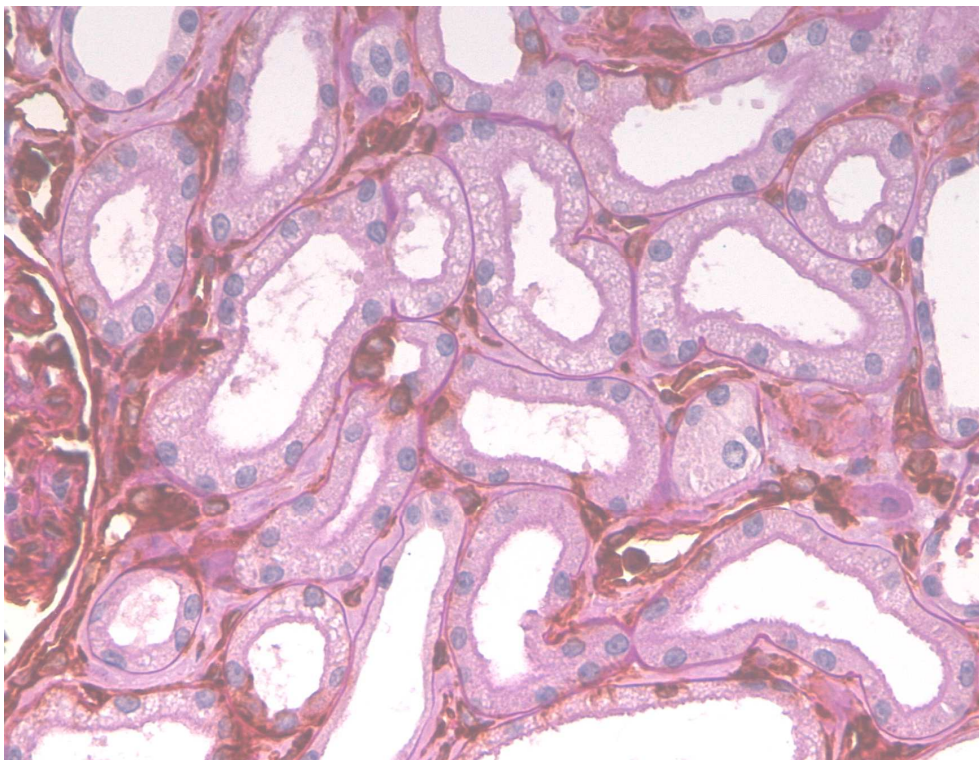


Fig. 14 Positività dei miofibroblasti all'esame immunohistochimico per vimentina (Caso controllo). (Controcolorazione con PAS 400x)

In casi a vario grado di danno tubulo interstiziale (grado 2-3) si osservano:

- positività *de novo* delle cellule epiteliali tubulari
- compresenza nello stesso tubulo di cellule positive e cellule negative al marker mesenchimali (Fig. 15).

In base alla positività delle CET per vimentina sono stati classificati:

- 3 casi con positività pari a 0
- 7 casi con positività pari a +
- 4 casi con positività pari a ++
- 6 casi con positività pari a +++.

La tabella 5 riassume il grado di positività delle CET osservata associata al grado di fibrosi attribuito ad ogni singolo caso.

	FIBROSI	VIMENTINA
22160/1 b	3	+++
54/07 x1	3	+++
91/07 x	2	+++
200/05 x	0	0
226/07 x2	3	+++
239/05	0	+
244/06 x	3	+++
305/06 a	0	++
327/05 x	0	+
344/06 x	2	++
469/07 x1	2	+
478/06	1	+
585/05 a	0	+
587/06 x2	3	+++
622/05 y	0	0
628/06 x3	1	0
695/05 y	0	+
734/06 x1	1	+
20313	3	++
21789	2	++

Tab 5 Grado di fibrosi e positività per vimentina

In relazione alle aree fibrotiche si osserva:

- positività *de novo* delle cellule epiteliali dei tubuli adiacenti alle aree di fibrosi
- positività a carico di tutte le cellule del tubulo o solo di alcune
- positività pressoché totale delle cellule epiteliali dei tubuli all'interno delle aree fibrotiche (Fig. 15).

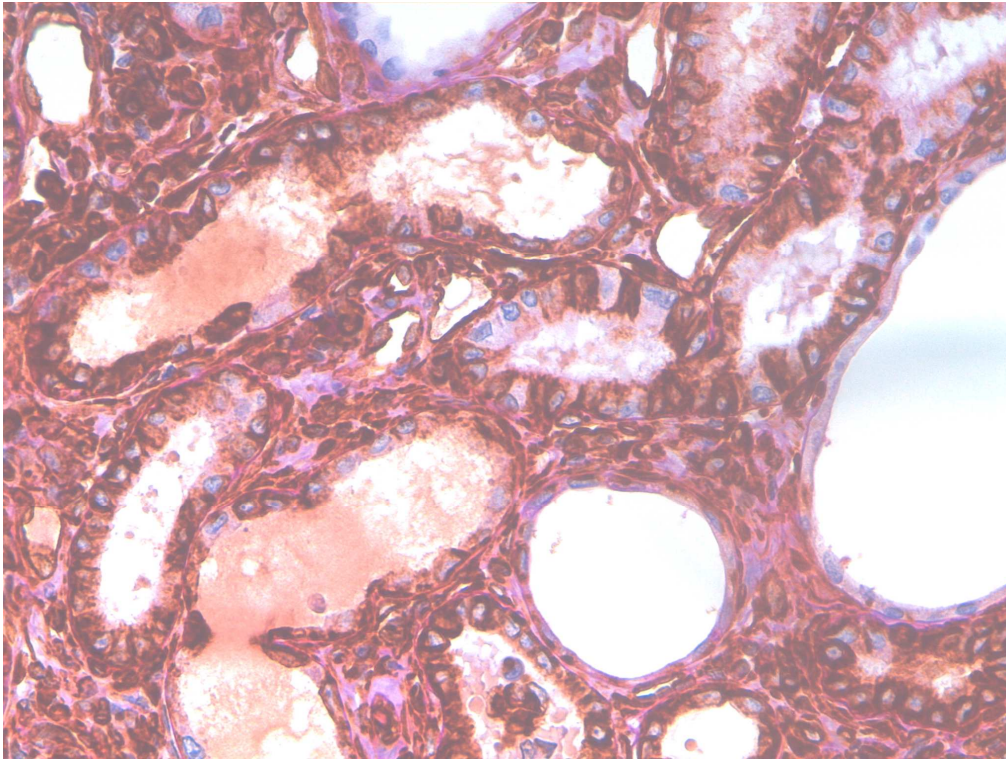


Fig. 15 Positiv  all'esame immunoistochimico per vimentina. Compresenza nello stesso tubulo di CET positive e negative. Altri tubuli appaiono totalmente positivi. (Controcolorazione con PAS 400x)

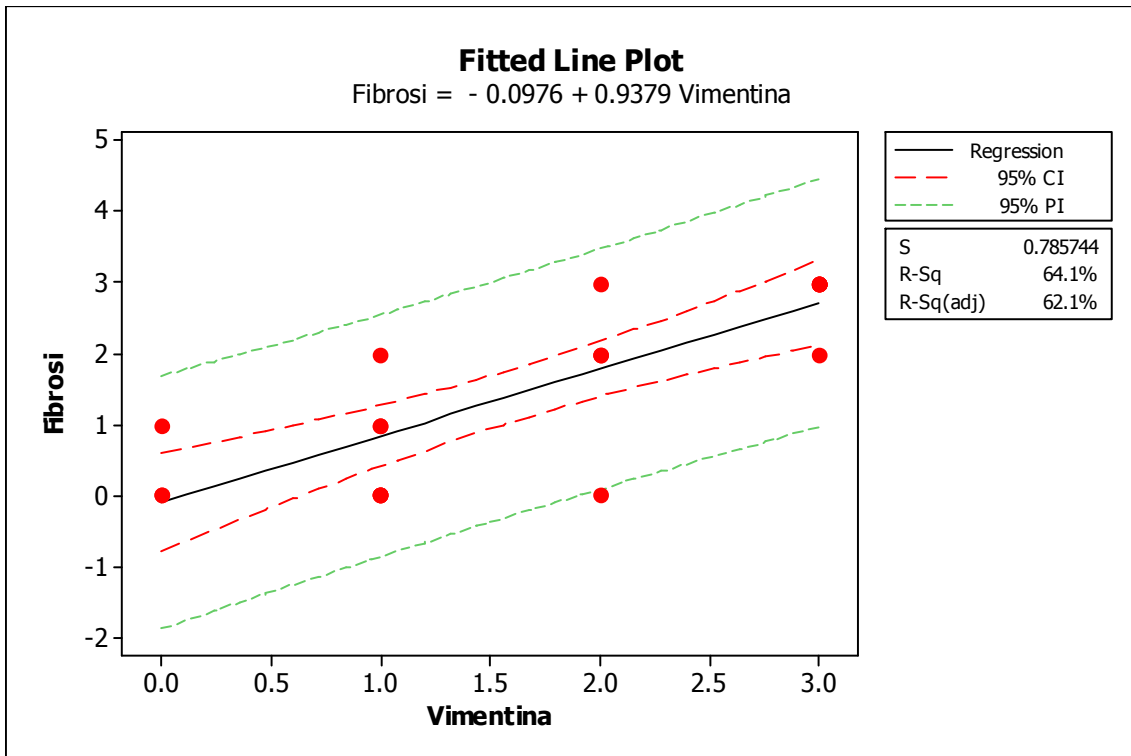


Grafico 2

Nel modello di regressione riportato nel grafico 2, contrariamente al grafico 1, l'andamento è correlato alla fibrosi. I due dati, citocheratina e vimentina, sono stati poi esaminati, utilizzando la citocheratina come variabile dipendente confermando l'andamento inverso e statisticamente significativo per i due anticorpi (vedi grafico 3).

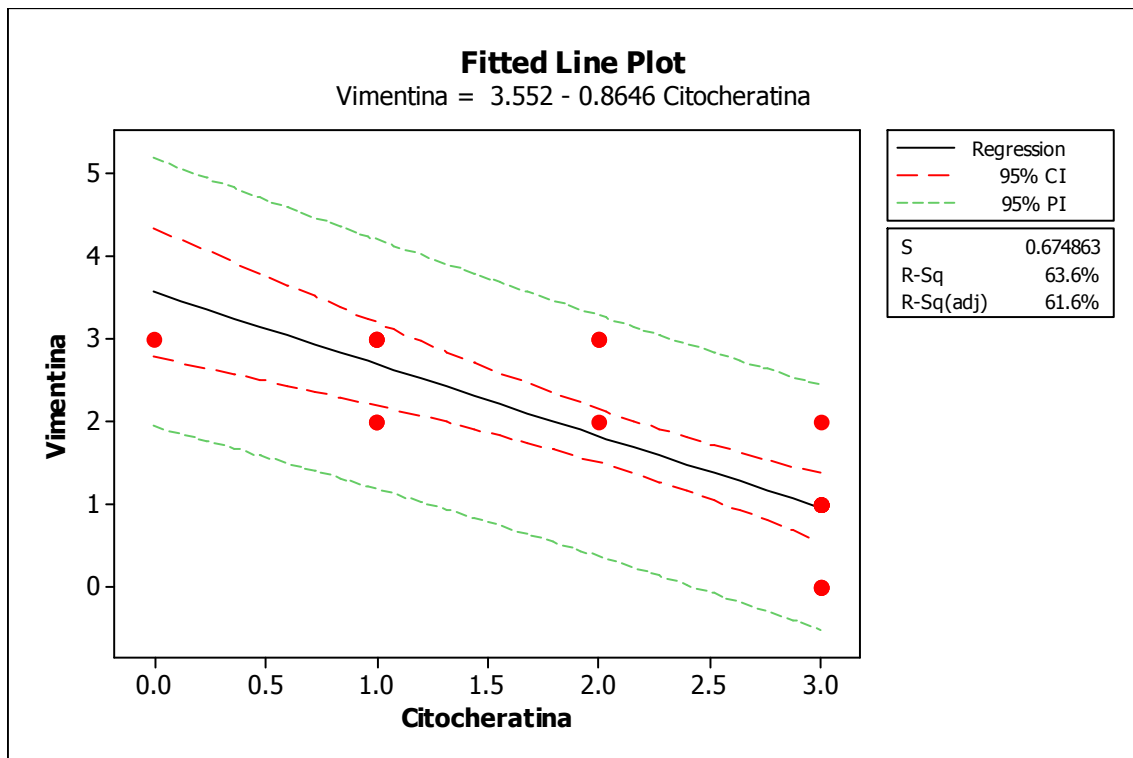


Grafico 3

Per valutare la positività immunoistochimica per citocheratina e vimentina sono state ottenute sezioni seriali consecutive. Questo ha permesso di osservare in presenza di fibrosi:

- contemporanea espressione dei due marker nelle stesse cellule
- perdita di positività per citocheratina e *de novo* espressione di vimentina in alcune cellule
- tubuli con compresenza di cellule positive per citocheratina e cellule positive per vimentina (Fig. 16 e 17).

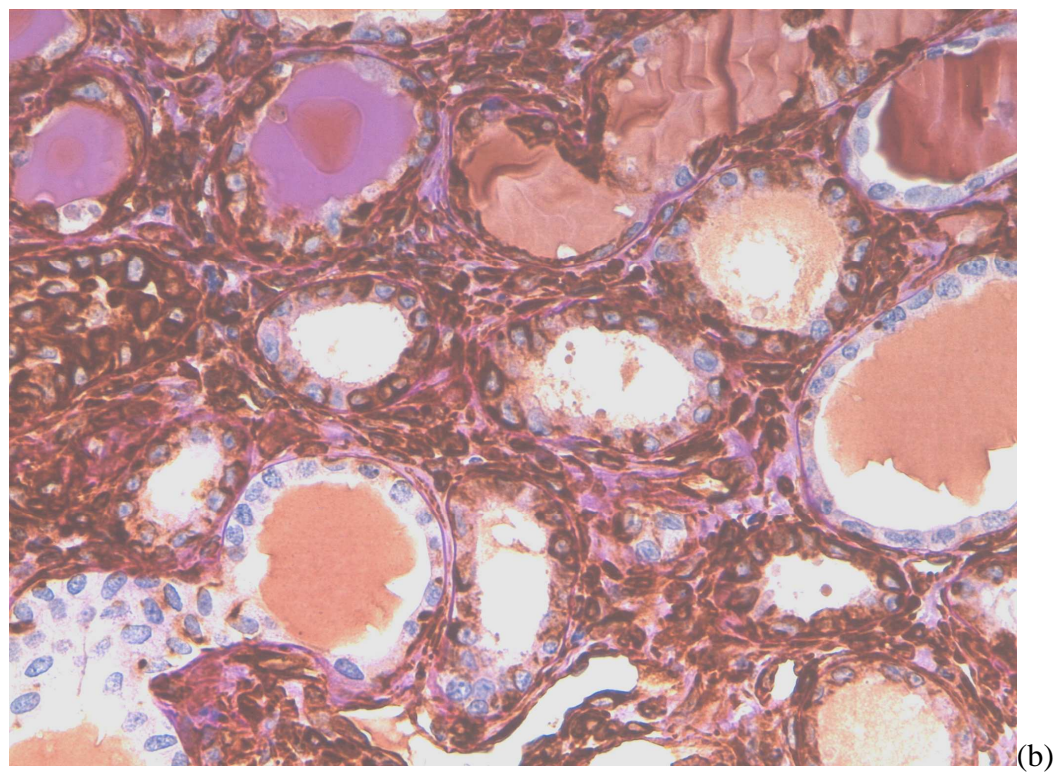
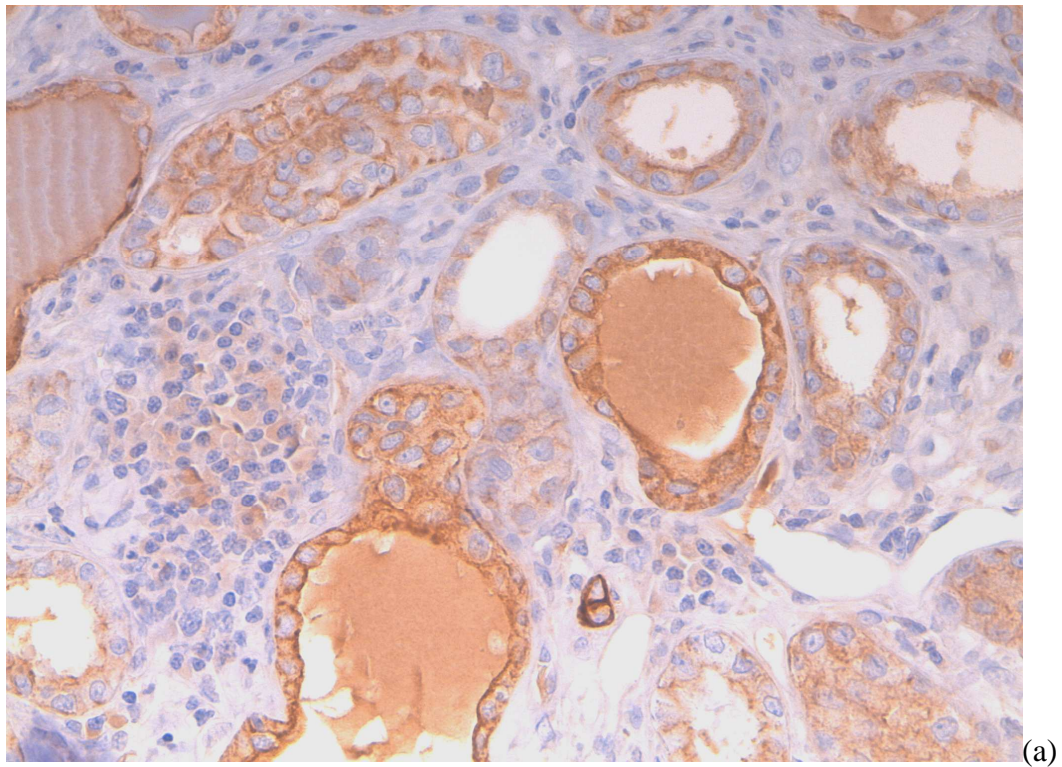


Fig. 16 Confronto tra la positività all'esame immunohistochimico per citocheratina (a) e vimentina (b). Si evidenzia come cellule negative o con diminuita positività per citocheratina presentino espressione *de novo* per vimentina. (Controcolorazione con PAS 400x)

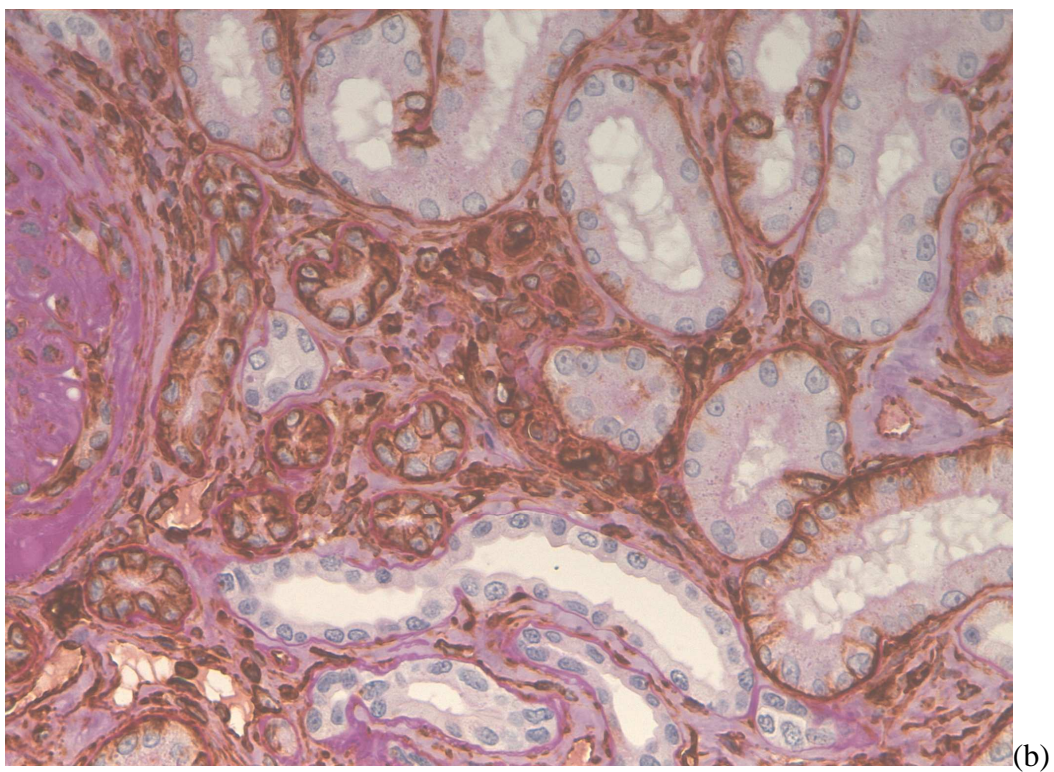
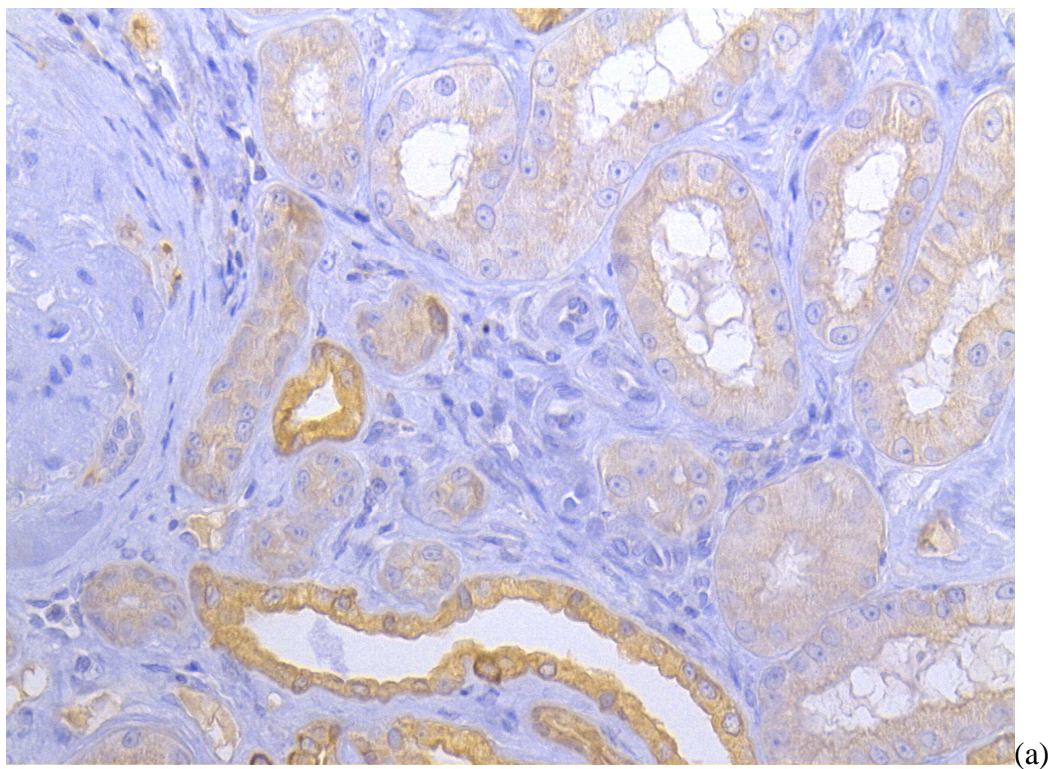


Fig. 17 Confronto tra la positività all'esame immunohistochimico per citocheratina (a) e vimentina (b). Si evidenzia come cellule negative o con diminuita positività per citocheratina presentino espressione *de novo* per vimentina. (Controcolorazione con PAS 400x)

La **fibrosi tubulointerstiziale** è un processo patologico, in cui si assiste alla sostituzione del parenchima renale con tessuto cicatriziale caratterizzato da aumento di matrice extracellulare (Iwano *et al.*, 2004). In corso di **danno tubulo-interstiziale**, con l'attivazione dei fibroblasti, s'innescano un meccanismo di riparazione che mira a ristabilire l'integrità e la funzionalità del parenchima. È riportato in alcuni lavori che in corso di nefropatie croniche il numero di fibroblasti è strettamente correlato alla fibrosi interstiziale (El-Nahas, 2003).

Quattro diversi meccanismi possono essere responsabili di tale attivazione:

- la produzione di fattori di crescita autocrini e paracrini (TGF β 1, CTGF, FGF 2, PTGF)
- contatto cellula-cellula con cellule di natura infiammatoria (macrofagi e leucociti)
- interazione con molecole della MEC (integrine α 1 e β 1)
- l'esposizione a stimoli quali l'ipossia, l'alta concentrazione di glucosio, le proteine del complemento e l'albumina (Qi *et al.*, 2006).

Oltre che per fenomeni di proliferazione e attivazione locale, i fibroblasti che si rilevano nel tessuto renale in corso di danno tubulo interstiziale, possono derivare per migrazione dalle regioni perivascolari e da precursori delle cellule del sangue (Qi *et al.*, 2006).

L'**epithelial mesenchymal transition** (EMT) è un processo in cui le cellule epiteliali tubulari perdono il loro fenotipo epiteliale ed acquisiscono le caratteristiche delle cellule mesenchimali (Lan *et al.*, 2003). Uno studio del 2002 riporta che una larga parte (36%) dei fibroblasti interstiziali nel tessuto renale fibrotico deriva da EMT delle CET (Forino *et al.*, 2006).

La citocheratina è una proteina citoscheletrica utilizzata come marker immunocistochemico per l'evidenziazione delle cellule epiteliali. In condizioni di normalità la sua positività si esprime in modo omogeneo a livello intracitoplasmatico, tuttavia nelle CET non è mai totale, anche nei casi controllo. Questo dato può essere giustificato ricordando che il rene riconosce una particolarità rispetto ad altri organi epiteliali: sia la componente epiteliale che quella stromale derivano dallo stesso blastema (Kaissling *et al.*, 2008). Il tessuto renale epiteliale si sviluppa da tessuto mesenchimale (nefroblastema metanefrico), per cui è possibile considerare che non tutte le CET sviluppino l'espressione di citocheratina (Chaffer *et al.*, 2007).

La vimentina è una proteina citoscheletrica espressa nelle cellule mesenchimali. In condizioni normali la sua positività a livello renale si rinviene a livello interstiziale a carico di fibroblasti e miofibroblasti. In questo studio si è indagata la positività alla vimentina delle CET in corso di patologia renale cronica.

Nello studio, l'espressione della citocheratina e della vimentina sono state valutate singolarmente e in relazione al grado di fibrosi in corso di danno renale cronico con l'obiettivo di evidenziare il

processo di EMT e successivamente correlare l'EMT e il grado di fibrosi tubulointerstiziale. La perdita di espressione della citocheratina e la contemporanea comparsa di positività alla vimentina nelle stesse cellule sono state interpretate come evidenza di EMT. La presenza di una fase transizionale del processo è stata dedotta dall'evidenziazione di compresente positività alla citocheratina (in alcune cellule intensità diminuita oppure solo alcune cellule del tubulo) e alla vimentina.

I risultati osservati mostrano la presenza di una relazione tra EMT e grado di fibrosi tubulointerstiziale in quanto:

- nei casi di fibrosi grado 0 e 1 si ha normale espressione di citocheratina e assente espressione di vimentina a livello delle CET.
- nei casi di fibrosi grado 2 si ha perdita di espressione di citocheratina e si evidenzia espressione di vimentina superiore al 20% a livello delle CET.
- nei casi di fibrosi grado 3 si verifica perdita di espressione di citocheratina superiore al 40% ed espressione di vimentina superiore al 20% a livello delle CET.

Abbiamo osservato che il processo di EMT si verifica nelle CET adiacenti alle aree di fibrosi.

Riteniamo che:

- da un lato le cellule transitate producano matrice e aggravino il grado di fibrosi
- dall'altro il danno tubulo interstiziale (stato infiammatorio, progressione della fibrosi) sia responsabile di EMT delle CET.

Pensiamo quindi, che si venga ad innescare un circolo vizioso in cui:

- l'EMT sia responsabile dell'aumento della matrice extracellulare e della progressione della fibrosi interstiziale
- la fibrosi stimoli il processo di EMT delle cellule sane ad essa adiacenti portando l'estensione del danno.

Nello specifico i dati sono stati rappresentati attraverso Matrix Plot per quanto riguarda i diagrammi di dispersione (scanner plot) per ogni coppia di variabili (citocheratina, vimentina e fibrosi) (vedi grafico 4). È un'analisi grafica dei loro comportamenti, molto utile al fine di evidenziare la presenza o l'assenza di relazioni causa-effetto di tipo casuale. In questo caso risulta evidente che tra Fibrosi e Vimentina esiste una relazione lineare, la cui intensità è valutata con l'analisi della correlazione (in questo caso positiva); anche tra Fibrosi e Citocheratina si evidenzia l'esistenza di una relazione lineare con una correlazione negativa. Lo stesso dicasi per l'altra coppia di variabili, Citocheratina e Vimentina. Infatti, andando a stimare l'entità della correlazione, si trova che le tre correlazioni sono tutte significative ($p\text{-value} < 0.001$).

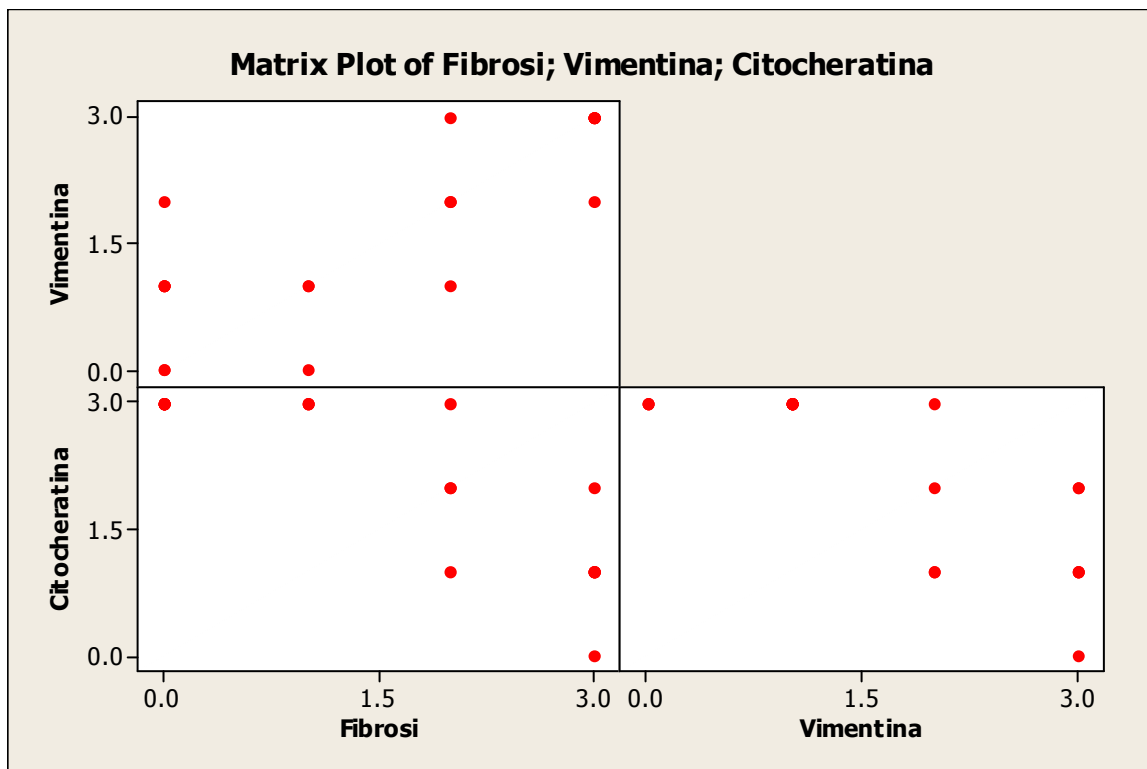


Grafico 4

Si riconoscono diversi fattori in grado di promuovere l'EMT tra cui l'ipossia (Iwano *et al.*, 2004). L'**ipossia** svolge un ruolo importante nello sviluppo della fibrosi tubulo interstiziale, in quanto la carenza di ossigeno innesca una risposta compensatoria nelle cellule aumentando il loro metabolismo con un consumo maggiore di ossigeno e aggravamento dell'ipossia tissutale (Iwano *et al.*, 2004). Iwano *et al.* (2004) riportano studi *in vitro* in cui lo stato d'ipossia porta sofferenza cellulare delle CET, con progressione verso il processo di EMT e la deposizione di matrice delle cellule transitate comporta l'aggravamento della fibrosi. Il tessuto interstiziale, costringendo le arteriole, aggraverebbe lo stato di ipossia e un maggior numero di cellule andrebbero incontro ad EMT (Tanaka *et al.*, 2004).

Così come l'ipossia, altri fattori (TGF β 1) sono coinvolti sia nel processo che porta alla fibrosi tubulointerstiziale sia nei meccanismi che inducono l'EMT (Cheng *et al.*, 2006; D'Amico, 1998).

Risulta tutt'ora poco chiaro quali siano gli elementi e le caratteristiche che permettono alle CET di convertire il loro fenotipo e diventare cellule con caratteristiche mesenchimali. Anche in questo caso riteniamo che delle risposte possano essere cercate nello studio dell'organogenesi renale. Il rene nei mammiferi si sviluppa a partire dallo strato intermedio dell'embrione, il mesoderma, da cui si sviluppano tre sistemi escretori: il pronefro, il mesonefro e il metanefro. I primi due sono in realtà

organi transitori, ma essenziali per lo sviluppo del rene definitivo a partire dal metanefro, distinto in due parti: il mesenchima metanefrico, da cui origina il parenchima renale, e la gemma ureterale, da cui si sviluppano i dotti collettori, i calici, la pelvi renale e l'uretere (Janette *et al.*, 2007). Come già accennato, diversamente da quanto si verifica negli altri organi di origine epiteliale, l'embriogenesi renale è caratterizzata da una struttura mesenchimale da cui originano sia la componente epiteliale sia quella stromale (Kaissling *et al.*, 2008). È bene sottolineare che l'EMT, così come il procedimento inverso, ovvero la transizione mesenchimale epiteliale (MET), si verifica fisiologicamente durante l'organogenesi (a livello della cresta neuronale di derivazione ectodermica) (Chaffer *et al.*, 2007; Lan, 2003). Questi processi, EMT e MET, tuttavia non si rinvengono solo durante l'organogenesi, ma sono stati documentati anche nell'adulto in corso di guarigione delle ferite, nello sviluppo della cataratta e in corso di patologie tumorali (Chaffer *et al.*, 2007).

Si ritiene che le cellule di origine tubulare andate incontro ad EMT, siano responsabili della progressione della fibrosi interstiziale in quanto produttori dei componenti della MEC. È inoltre riportata la possibilità che tali cellule si convertano in cellule epiteliali e quindi possano essere promotori di un processo di tipo rigenerativo (Chaffer *et al.*, 2007; El-Nahas, 2003).

Quest'ultimo aspetto potrebbe essere indagato ulteriormente, così da poter permettere sviluppi terapeutici che permettano il recupero della funzionalità renale in corso di patologia renale cronica.

4.3 METALLOPROTEASI 2 E 9

4.3.1 METALLOPROTEASI 9

Nei casi con danno tubulo interstiziale assente o minimo (grado 0-1), è stata osservata positività intracitoplasmatica a livello delle CET; la positività appare omogeneamente diffusa con la presenza di granuli di positività più intensa (Fig. 18).

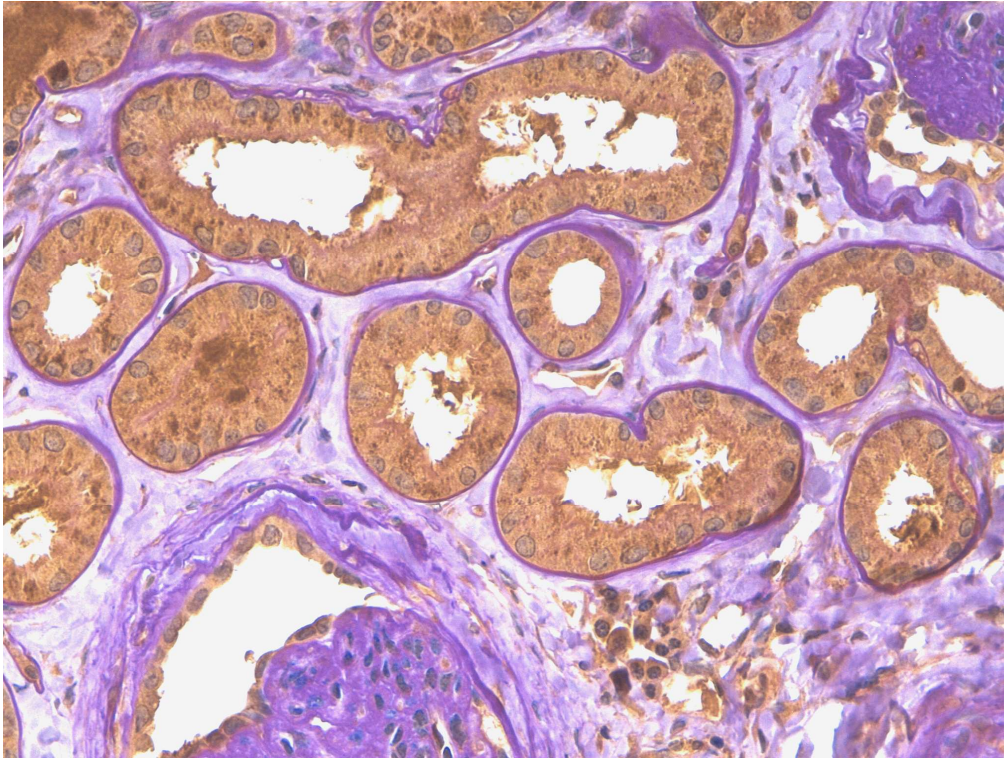


Fig. 18 Positività all'esame immunohistochimico per MMP 9 in cellule epiteliali tubulari normali (Controcromazione con PAS 400x)

In casi a vario grado di danno tubulo interstiziale (grado 2-3) si osservano:

- diminuzione della positività nelle CET e la scomparsa del “pattern granulare”
- perdita di positività delle CET nei tubuli atrofici (Fig. 19).

I casi sono stati valutati in base alla percentuale di perdita della positività per MMP 9 e classificati come segue:

- 6 casi con positività pari a +
- 4 casi con positività pari a ++
- 8 casi con positività pari a +++
- 2 casi non significativi

La tabella 6 riassume il grado di positività osservata associata al grado di fibrosi attribuito ad ogni singolo caso.

	FIBROSI	MMP 9
22160/1 b	3	+
54/07 x1	3	+
91/07 x	2	+
200/05 x	0	+++
226/07 x2	3	+
239/05	0	+++
244/06 x	3	++
305/06 a	0	Non significativo
327/05 x	0	Non significativo
344/06 x	2	++
469/07 x1	2	++
478/06	1	+++
585/05 a	0	+++
587/06 x2	3	++
622/05 y	0	+++
628/06 x3	1	+++
695/05 y	0	+++
734/06 x1	1	+++
20313	3	+
21789	2	+

Tab 6 Grado di fibrosi e positività per MMP 9

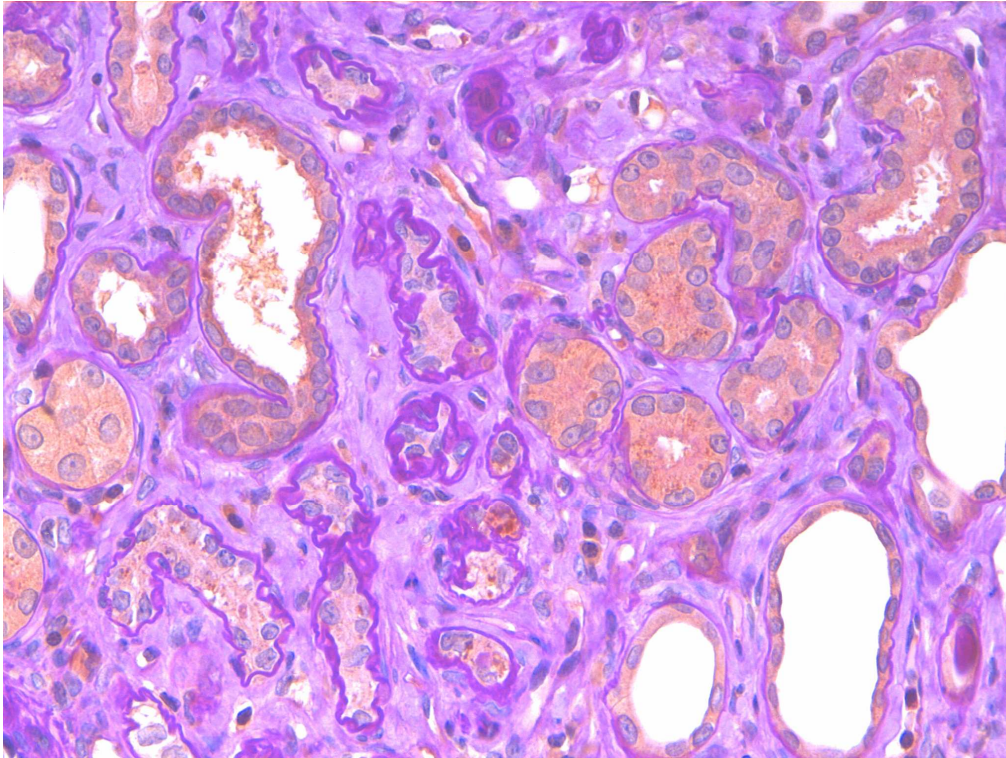


Fig. 19 Positività all'esame immunohistochimico per MMP 9. Si osserva perdita di positività a carico delle CET nell'atrofia tubulare. (400x)

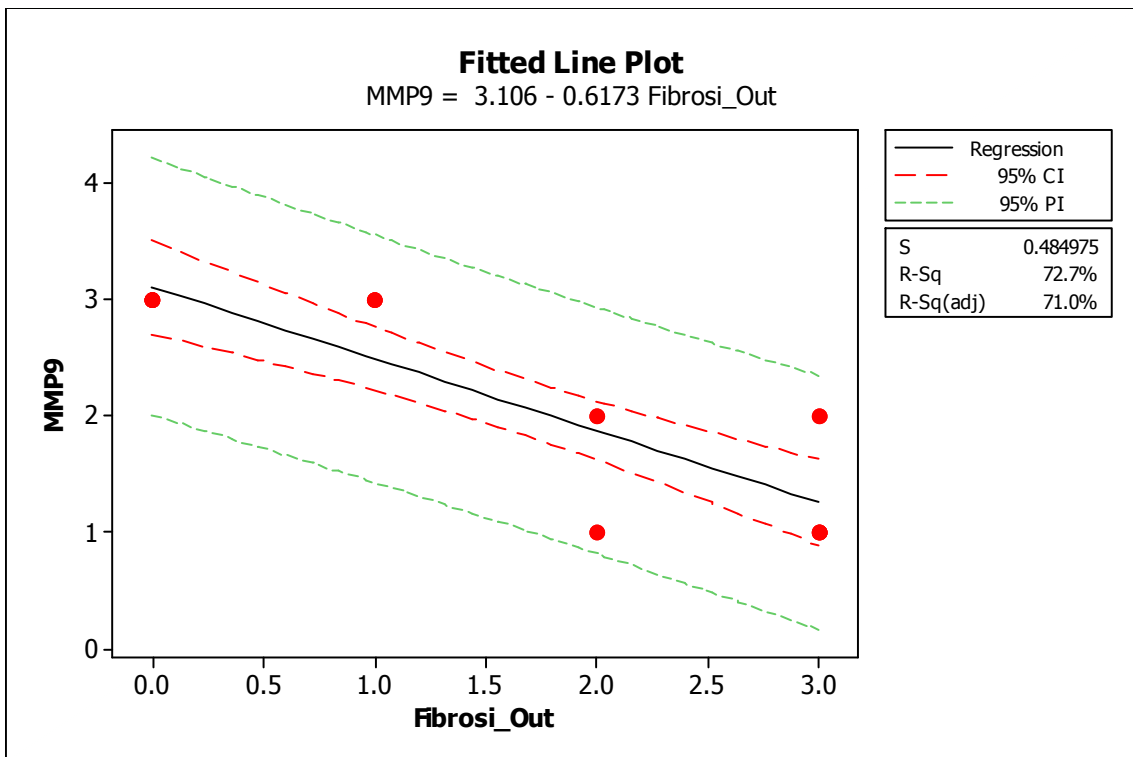


Grafico 5

Nel grafico 5 si osserva la correlazione lineare tra la perdita di espressione di MMP 9 e l'aumentare del grado di fibrosi.

MMP 9 o gelatinasi B, è una metalloproteasi che riconosce il collagene di tipo IV come principale substrato ma la sua azione proteolitica si esplica a carico di molte molecole (Lelongt *et al.*, 2002). In medicina umana l'espressione di MMP 9, valutata tramite diverse tecniche, è riportata in tutte le parti del nefrone (glomeruli, tubuli, dotti collettori), nelle cellule infiammatorie (neutrofili e macrofagi e plasmacellule) e nelle cellule tumorali nel carcinoma renale (Awakura *et al.*, 2006; Catania *et al.*, 2007; Inkinen *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2002; Laplante *et al.*, 2003; McCawley *et al.*, 2001). In accordo con quanto riportato per l'uomo, è stata osservata una **positività intracitoplasmatica** delle CET nel tessuto renale di cane (Ahmed *et al.*, 2007).

In relazione al danno tubulointersiziale:

- nei casi di grado 0 e 1 si osserva normale espressione di MMP 9 a livello delle CET
- nei casi di grado 2 e 3 si osserva perdita di espressione di MMP 9 superiore al 20%

La diminuzione della positività è stata evidenziata a carico dei tubuli adiacenti alle aree di **fibrosi**; mentre a carico delle cellule epiteliali dei tubuli atrofici si osserva perdita totale della positività. Questo è giustificabile ammettendo che durante il processo infiammatorio la sintesi di MMP 9 a livello cellulare sia diminuita fino alla sua completa scomparsa, in seguito alla transizione epitelio-mesenchimale delle CET nella fibrosi renale.

Per MMP 9, oltre all'azione proteolitica della matrice extracellulare, sono riportate altre funzioni:

- nell'angiogenesi: la sua espressione è stata associata alla liberazione del Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (McCawley *et al.*, 2001)
- nei processi infiammatori: azione chemiotattica (Inkinen *et al.*, 2005)
- nello sviluppo renale: viene espressa nei primi stadi di sviluppo dell'organo (Arnould *et al.*, 2009; Lelongt *et al.*, 2001; Lelongt *et al.*, 2002)
- nei fenomeni apoptotici: azione indiretta dovuta alla liberazione di Soluble stem cell factor (SCF), un potente fattore antiapoptotico (Lelongt *et al.*, 2001; Lelongt *et al.*, 2002).

La metalloproteasi 9 viene sintetizzata e stoccata nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato di Golgi, ma la tecnica di immunistochemica non permette di evidenziare l'accumulo di MMP 9 all'interno degli organuli cellulari (Ahmed *et al.*, 2007). Ahmed *et al.* (2007) riportano una distribuzione citoplasmatica diffusa della positività e l'assenza di un aspetto granuloso o striato che, accoppiato all'assenza di positività extracellulare, lascia spazio all'ipotesi che le MMP svolgano un ruolo intracitoplasmatico e non solo nel turnover della matrice extracellulare. Al contrario abbiamo

osservato, nelle CET dei casi controllo, una positività omogeneamente diffusa con la presenza di granuli più intensi, che abbiamo associato ad uno stoccaggio della proteina nella sua forma inattiva a livello intracellulare. Nei tubuli in prossimità delle aree di fibrosi la distribuzione appare meno intensa e non si evidenziano più granuli. Abbiamo ipotizzato quindi che in corso di danno le cellule rilascino MMP 9, la quale andrebbe a svolgere un ruolo sia nello spazio extracellulare, sia all'interno della cellula.

In accordo con quanto riportato in letteratura, il rilascio di MMP 9 in corso di danno cellulare potrebbe essere un meccanismo difensivo per impedire l'apoptosi delle CET (Lelongt *et al.*, 2001; Lelongt *et al.*, 2002). Visto inoltre il suo ruolo nello sviluppo del tessuto renale durante l'organogenesi non è da escludere che quest'enzima possa svolgere anche un ruolo nel favorire la rigenerazione cellulare.

4.3.2 METALLOPROTEASI 2

Per MMP 2, i risultati sono stati non uniformi e statisticamente non significativi. Non è stato possibile formulare un grading per quantificare la positività osservata e questo ha impedito di correlare i risultati ottenuti al grado di fibrosi tramite analisi statistiche. Per questo motivo, l'analisi della positività per MMP 2 è stata esclusivamente di tipo qualitativo.

È stata osservata occasionale positività intracitoplasmatica delle CET, ad aspetto granulare che coinvolge i tubuli con distribuzione multifocale, indipendentemente dal danno tubulointerstiziale. Dall'altra parte il nostro lavoro ha evidenziato, positività per MMP 2 a carico della membrana basale tubulare caratterizzata dalla presenza di aree di maggior intensità riferibili a grossi vacuoli che dividono la membrana (splitting) (Fig. 20, 21, 22).

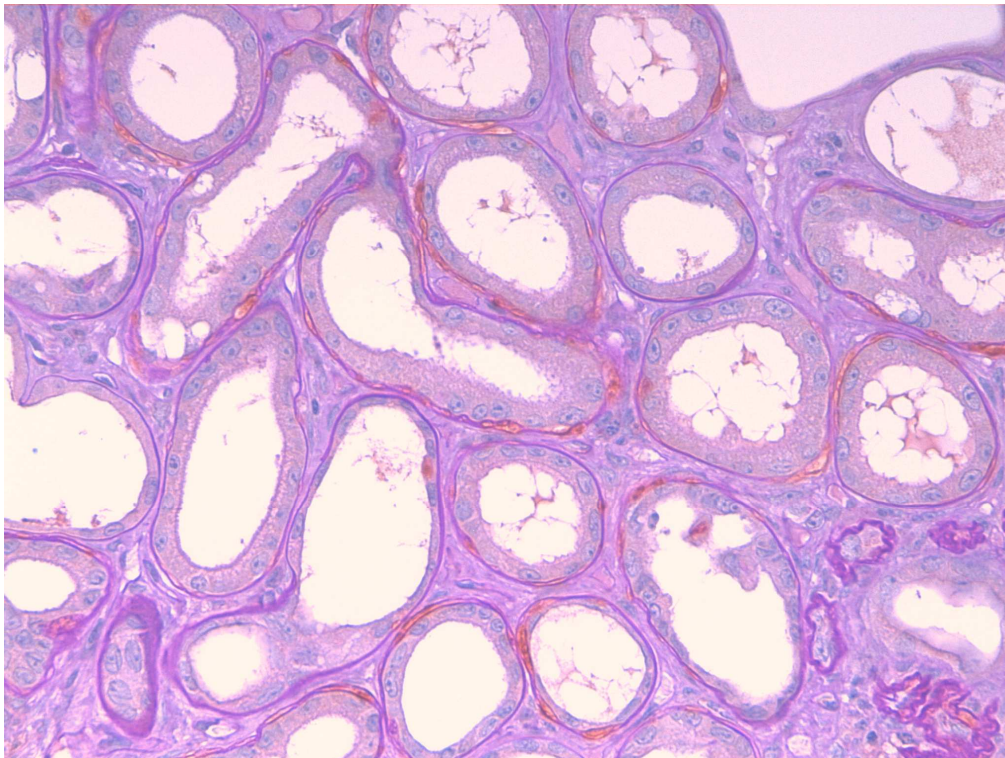


Fig. 20 Positività all'esame immunohistochimico per MMP 2 a livello di membrana basale tubulare (Controcolorazione con PAS 400x)

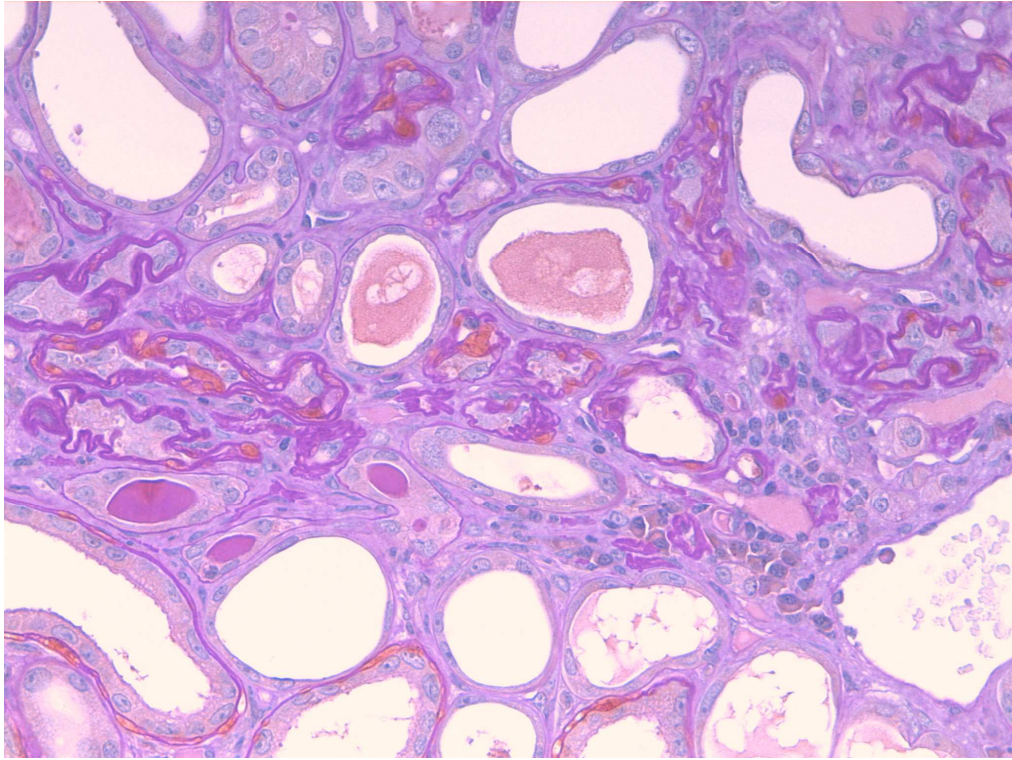


Fig. 21 Positività all'esame immunohistochimico per MMP 2 a livello di membrana basale tubulare (Controcolorazione con PAS 400x)

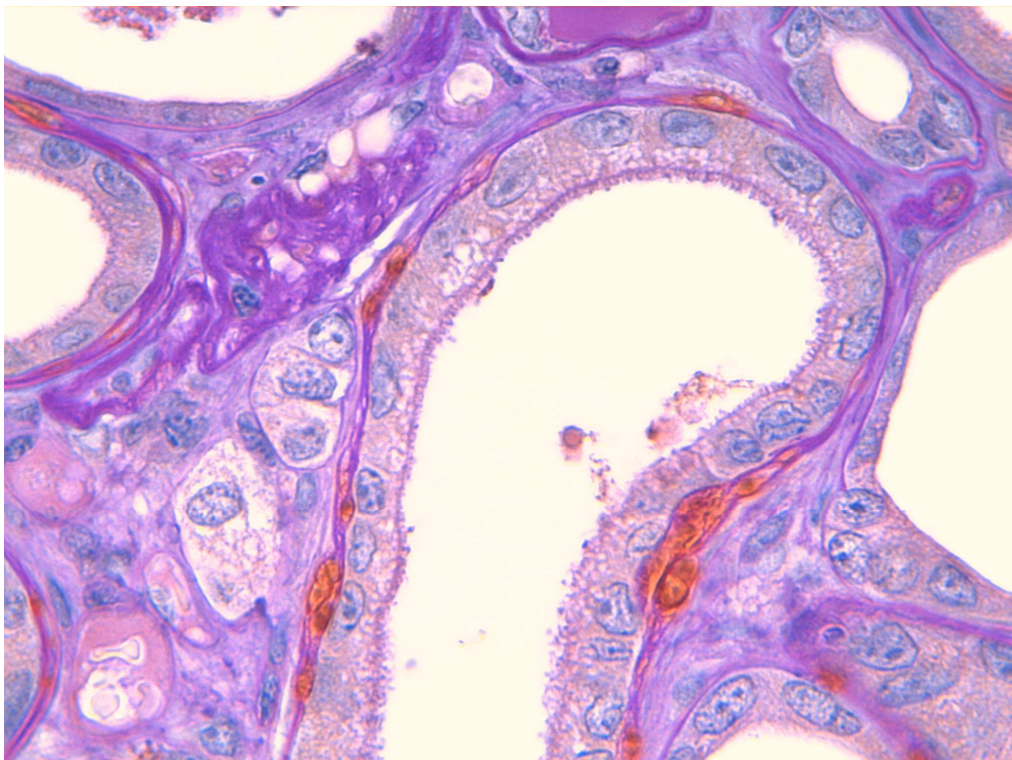


Fig. 22 Positività all'esame immunohistochimico di MMP 2 a livello di membrana basale tubulare. (Controcolazione con PAS 600x)

Allo scopo di avere dati maggiormente sensibili per lo studio di **MMP 2**, sono stati sottoposti diversi **protocolli immunoistochimici**, sia manuali sia automatizzati, sulla base di dati bibliografici (Ahmed *et al.*, 2007; Aupperle *et al.*, 2009; Beceriklisoy *et al.*, 2007; Endo *et al.*, 2006). Si è poi scelto di utilizzare il protocollo che ha dato migliori risultati in termini di chiarezza della positività e riduzione dell'aspecificità.

Dal momento che non esistono dati bibliografici in medicina veterinaria che abbiano applicato la tecnica immunoistochimica per valutare l'espressione di MMP 2 su campioni renali di cane, abbiamo preso in considerazione come fonti, studi svolti in medicina umana. In questi lavori, è riportata l'espressione di MMP 2 a carico delle strutture glomerulari (cellule e matrice mesangiali) (Ahmed *et al.*, 2007; Endo *et al.*, 2006); mentre per la positività delle CET sono presenti risultati diversificati (Ahmed *et al.*, 2007; Endo *et al.*, 2006).

La variabile positività evidenziata è attribuibile all'età dei campioni analizzati e potrebbe essere indicativa di una particolare sensibilità di MMP 2. Per chiarire questo punto sarebbe opportuno effettuare ulteriori indagini su campioni più recenti.

Nel nostro lavoro la positività osservata a livello **intracitoplasmatico** assume aspetto granulare ed è stata da noi interpretata come la capacità da parte delle CET di stoccare MMP 2 nella forma inattiva; mentre a livello della membrana basale si localizzerebbe l'enzima nella forma attiva. MMP 2 o gelatinasi A, viene **sintetizzata** a livello cellulare in forma di zimogeno (ProMMP2). L'attivazione avviene nello spazio extracellulare, in prossimità della membrana cellulare, in seguito all'interazione con MT1 MMP e TIMP 2 (Visse *et al.*, 2003). Rao *et al.* (2003) hanno evidenziato l'espressione di MT1 MMP a livello basolaterale delle CET. La presenza di MMP 2 è quindi giustificabile nella membrana basale:

- sintesi cellulare di proMMP 2
- esocitosi nel comparto extracellulare a livello basolaterale
- attivazione mediata da MT1 MMP e TIMP 2
- azione proteolitica a livello della membrana basale

La presenza di MMP 2 a livello della membrana basale è stata fino ad ora riportata in unico lavoro svolto tramite immunofluorescenza su campioni renali di cane con sindrome di Alport (Rao *et al.*, 2003). Riteniamo che questo dato permetta di associare l'espressione di MMP 2 e la sua azione a carico della membrana basale al processo di **EMT**. Il ruolo della **membrana basale** in corso di EMT rimane tutt'ora controverso:

- da un lato le viene attribuito un ruolo essenziale nel mantenimento delle caratteristiche epiteliali delle CET e in corso di danno tubulo interstiziale, la sua alterazione sarebbe responsabile dell'innescarsi del processo di EMT (Cheng *et al.*, 2006)
- dall'altro lato è riportato come la transizione epitelio mesenchimale delle CET si verifichi indipendentemente dal danno alla membrana basale e solo successivamente la membrana venga degradata ad opera di enzimi prodotti dalle cellule in transizione (El-Nahas, 2003).

La positività da noi evidenziata è associata ad **integrità** della membrana basale tubulare. Riteniamo che pur non comportandone la lisi, MMP 2 esplichi la sua azione proteolitica a livello delle molecole componenti la membrana basale stessa e comporti delle alterazioni in grado di innescare l'EMT delle CET, secondo il pattern **intratubulare** precedentemente descritto. In questo modello le CET appaiono a vari gradi di differenziazione mesenchimale con compresenza di positività ai marker epiteliali e mesenchimali. La membrana basale appare integra e la deposizione di collagene è peritubulare. Secondo Cheng *et al.* (2003), alcuni studi *in vitro* hanno dimostrato che MMP 2 è necessaria e sufficiente ad indurre il processo di EMT nelle CET. In un lavoro del 2006, in ratti transgenici in cui MMP 2 è costitutivamente espressa dalle CET, si evidenzia come in assenza di lesioni primarie, si manifesti EMT (Cheng *et al.*, 2006). Se ne può desumere che MMP 2 svolga un **ruolo promotore** nel processo di transizione, non riducibile all'azione proteolitica sulla membrana basale. Un altro elemento da sottolineare è che tutti i fattori descritti come promotori di EMT, portano un'aumentata sintesi di MMP 2 (Cheng *et al.*, 2006). Cheng *et al.* (2003) hanno formulato delle ipotesi per chiarire il ruolo di MMP 2 nel processo di EMT:

- *interazione con le molecole di adesione cellulare*: l'EMT è conseguente ad un'alterazione delle giunzioni cellulari delle CET. L'azione proteolitica di MMP 2 a carico delle molecole di adesione cellulare potrebbe indurre l'EMT delle CET. La molecola giunzionale E-caderina, in condizioni di normalità, sopprime l'espressione di MT1-MMP, impedendo l'attivazione di MMP2 e favorendo il mantenimento delle caratteristiche epiteliali delle CET.
- *interazione con molecole inducenti l'EMT*: oltre ad essere indotta da fattori promotori dell'EMT, come TGF 1 β , MMP 2 può essere essa stessa responsabile della liberazione e attivazione di tali fattori.

Con le informazioni in nostro possesso non è ad oggi possibile escludere o preferire una delle ipotesi formulate. Riteniamo che MMP 2 sia essenziale nel processo di EMT e debba essere ulteriormente indagata per chiarire i meccanismi diretti ed indiretti attraverso cui agisce.

5. CONCLUSIONI

Lo studio è stato svolto su 20 campioni di tessuto renale di cane analizzati dal punto di vista istologico attraverso colorazioni istochimiche e la tecnica immunohistochimica.

Istologicamente è stato possibile identificare e descrivere lesioni glomerulari differenti, associate a danno tubulointerstiziale di vario grado, senza osservare una relazione tra il tipo di lesione osservato e il grado di fibrosi attribuito al campione.

Attraverso i marker immunohistochimici **citocheratina** e **vimentina** è stato possibile:

- evidenziare una correlazione, tra il grado di espressione dei due marker a livello delle cellule epiteliali tubulari e il grado di danno tubulointerstiziale presente nel campione
- osservare il processo di **epithelial mesenchymal transition** a carico delle cellule epiteliali tubulari in relazione alla presenza di aree fibrotiche

Le **metalloproteasi** sono proteine enzimatiche coinvolte in processi fisiologici e patologici a carico di molti apparati. Nel tessuto renale di cane pochi lavori hanno indagato l'espressione e il ruolo di questi enzimi (Rao *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2003). Per la prima volta, il presente lavoro si è posto l'obiettivo di indagare l'espressione e la localizzazione di MMP 9 e MMP 2 nel tessuto renale di cane attraverso la tecnica immunohistochimica. Tale mezzo diagnostico presenta il limite di non permettere la discriminazione tra la forma attiva e la forma non attiva delle MMP. Questo potrebbe essere indagato tramite zimografia su gel, con l'obiettivo di meglio chiarire il ruolo di questi enzimi nella progressione del danno renale.

Per **MMP 9** è stato possibile:

- evidenziare la perdita di positività delle CET in relazione alle aree di fibrosi interstiziale
- ipotizzare un ruolo anti-apoptotico per tale enzima in corso di danno tubulointerstiziale cronico

Per **MMP 2**, la positività riscontrata a livello della membrana basale tubulare si ricollega al potenziale ruolo di questa molecola nel processo di EMT, anche se ulteriori indagini sono necessarie al fine di poter completamente comprendere la sua azione. Studi recenti hanno

evidenziato come l'EMT sia uno dei meccanismi più importanti coinvolti nella fibrosi renale nell'uomo e negli animali. Riteniamo che la comprensione dei meccanismi e dei fattori coinvolti in tale processo fornisca importanti informazioni sulla progressione del danno renale in corso di malattia renale cronica. I meccanismi alla base del danno tubulo interstiziale nella malattia renale cronica sono importanti sia per comprendere la patogenesi della patologia, sia come potenziali target per interventi terapeutici. In veterinaria, attualmente non si conosce una terapia medica mirata in grado di impedire la progressione del danno renale fino allo stadio terminale di end stage kidney. L'identificazione di fattori coinvolti (con ruolo inibente o promotore) potrebbe favorire lo sviluppo di nuovi protocolli efficaci. Con finalità terapeutica, le metalloproteasi sono già oggetto d'interesse in medicina umana (Hu, 2007): in corso di patologia polmonare è stato dimostrato che l'inibizione della MMP 12 esita in una riduzione del processo infiammatorio (Lagente *et al.*, 2009).

Riteniamo quindi che le metalloproteasi possano rivestire un ruolo terapeutico anche in corso di patologia renale, ma è necessario indagare ulteriormente la loro espressione ed attività.

6. BIBLIOGRAFIA

Ahmed AK, Haylor JL, El Nahas AM, Johnson TS, 2007. Localization of matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental progressive kidney scarring. *Kidney Int.* 71(8):755-63.

Aresu L, Pregel P, Cavicchioli L, Zanatta R, Valenza F, Castagnaro M, 2008. Valore diagnostico dell'esame di immunofluorescenza nelle biopsie renali nel cane. *M. Veterinaria*, anno 22, n. 4, agosto 1.

Aresu L, Rastaldi MP, Pregel P, Valenza F, Radaelli E, Scanziani E, Castagnaro M, 2008. Dog as model for down-expression of E-cadherin and beta-catenin in tubular epithelial cells in renal fibrosis. *Virchows Arch.* 453(6):617-25.

Aresu L, Rastaldi MP, Scanziani E, Baily J, Radaelli E, Pregel P, Valenza F, 2007. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) of renal tubular cells in canine glomerulonephritis. *Virchows Arch.* 451(5):937-42.

Arnould C, Lelièvre-Pégorier M, Ronco P, Lelongt B, 2009. MMP9 limits apoptosis and stimulates branching morphogenesis during kidney development. *J Am Soc Nephrol.* 20(10):2171-80.

Aupperle H, März I, Thielebein J, Dinges G, Schoon HA, 2008. Histomorphological findings and expression of matrix metalloproteinases and their tissue specific inhibitors (TIMPs) in normal tricuspid valves and in chronic tricuspid valvular disease in dogs. *Vet J.* Oct 24.

Aupperle H, März I, Thielebein J, Kiefer B, Kappe A, Schoon HA, 2009. Immunohistochemical characterization of the extracellular matrix in normal mitral valves and in chronic valve disease (endocardiosis) in dogs. *Res Vet Sci.* 87(2):277-83.

Aupperle H, Thielebein J, Kiefer B, März I, Dinges G, Schoon HA, Schubert A, 2009. Expression of genes encoding matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in normal and diseased canine mitral valves. *J Comp Pathol.* 140(4):271-7.

- Awakura Y, Ito N, Nakamura E, Takahashi T, Kotani H, Mikami Y, Manabe T, Kamoto T, Habuchi T, Ogawa O, 2006. Matrix metalloproteinase-9 polymorphisms and renal cell carcinoma in a Japanese population. *Cancer Lett.* 8;241(1):59-63.
- Beceriklisoy HB, Walter I, Schäfer-Somi S, Miller I, Kanca H, Izgür H, Aslan S, 2007. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity in the canine uterus before and during placentation. *Reprod Domest Anim.* 42(6):654-9.
- Brenner BM, Meyer TW, Hostetter TH, 1982. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. *N Engl J Med.* 307(11):652-9.
- Brown SA, Crowell WA, Brown CA, Barsanti JA, Finco DR, 1997. Pathophysiology and management of progressive renal disease. *Vet J.* 154(2):93-109.
- Casey HW, Splitter GA, 1975. Membranous glomerulonephritis in dogs infected with *Dirofilaria immitis*. *Vet Pathol.* 12(2):111-7.
- Catania JM, Chen G, Parrish AR, 2007. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiologies. *Am J Physiol Renal Physiol.* 292(3):F 905-11.
- Chaffer CL, Thompson EW, Williams ED, 2007. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs* 185(1-3):7-19.
- Chandler ML, Elwood C, Murphy KF, Gajanayake I, Syme HM, 2007. Juvenile nephropathy in 37 boxer dogs. *J Small Anim Pract.* 48(12):690-4.
- Cheng S, Lovett DH, 2003. Gelatinase A (MMP-2) is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Pathol.* 162(6):1937-49.
- Cheng S, Pollock AS, Mahimkar R, Olson JL, Lovett DH, 2006. Matrix metalloproteinase 2 and basement membrane integrity: a unifying mechanism for progressive renal injury. *FASEB J.* 20(11):1898-900.
- Churg J, 1982. *Renal diseases: Classification and atlas of glomerular diseases*, Igaku-Shoin, Tokio-New York.

Clement MG, 1997. Il rene. In: Aguggini G, Beghelli V, Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia, (2° edizione), UTET, Torino, 589-653.

Codner EC, Caceci T, Saunders GK, Smith CA, Robertson JL, Martin RA, Troy GC, 1992. Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced Ehrlichia canis infection. Am J Vet Res. 53(12):2286-91.

Dambach DM, Smith CA, Lewis RM, Van Winkle TJ, 1997. Morphologic, immunohistochemical, and ultrastructural characterization of a distinctive renal lesion in dogs putatively associated with Borrelia burgdorferi infection: 49 cases (1987-1992). Vet Pathol 34: 85-96.

D'Amico G, 1998. Tubulo-interstitial damage in glomerular diseases: its role in the progression of the renal damage. Nephrol Dial Transplant. 13 Suppl 1:80-5.

El-Nahas AM, 2003. Plasticity of kidney cells: role in kidney remodeling and scarring. Kidney Int. 64(5):1553-63.

Endo T, Nakabayashi K, Sekiuchi M, Kuroda T, Soejima A, Yamada A, 2006. Matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the peripheral blood of patients with various glomerular diseases and their implication in pathogenetic lesions: study based on an enzyme-linked assay and immunohistochemical staining. Clin Exp Nephrol. 10(4):253-61.

Fogo AB, Kashgarian M. Glomerular diseases, 2005. In: Fogo AB, Kashgarian M. Diagnostic atlas of renal pathology, 7th edition, Elsevier Saunders, Philadelphia, PA, 2-276.

Forino M, Torregrossa R, Ceol M, Murer L, Della Vella M, Del Prete D, D'Angelo A, Anglani F, 2006. TGFbeta1 induces epithelial-mesenchymal transition, but not myofibroblast transdifferentiation of human kidney tubular epithelial cells in primary culture. Int J Exp Pathol. 87(3):197-208.

Harten SK, Shukla D, Barod R, Hergovich A, Balda MS, Matter K, Esteban MA, Maxwell PH, 2009. Regulation of renal epithelial tight junctions by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene involves occludin and claudin 1 and is independent of E-cadherin. Mol Biol Cell. 20(3):1089-101.

Henrikson C. Apparato urinario, 2000. In: Dellmann HD, Eurell JA, Istologia e anatomia microscopica veterinaria, 2° edizione, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 275-302.

Hewitson TD, 2009. Renal tubulointerstitial fibrosis: common but never simple. *Am J Physiol Renal Physiol.* 296(6):1239-44.

Hu J, Van den Steen PE, Sang QX, Opdenakker G, 2007. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 6(6):480-98.

Illman SA, Lehti K, Keski-Oja J, Lohi J, 2006. Epilysin (MMP-28) induces TGF-beta mediated epithelial to mesenchymal transition in lung carcinoma cells. *J Cell Sci.* 15;119(Pt 18):3856-65.

Inkinen KA, Soots AP, Krogerus LA, Lautenschlager IT, Ahonen JP, 2005. Fibrosis and matrix metalloproteinases in rat renal allografts. *Transpl Int.* 18(5):506-12.

Iwano M, Neilson EG, 2004. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 13(3):279-84.

Janette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG, 2007. Pathology of the kidney, 6th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

Johnson TS, Haylor JL, Thomas GL, Fisher M, El Nahas AM, 2002. Matrix metalloproteinases and their inhibitions in experimental renal scarring. *Exp Nephrol.* 10(3):182-95.

Kaissling B, Le Hir M, 2008. The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects. *Histochem Cell Biol.* 130(2):247-62.

Kawai K, Uetsuka K, Doi K, Nakayama H, 2006. The activity of matrix metalloproteinases (MMPS) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in mammary tumors of dogs and rats. *J Vet Med Sci.* 68(2):105-11.

Kriz W, Hosser H, Hähnel B, Gretz N, Provoost AP, 1998. From segmental glomerulosclerosis to total nephron degeneration and interstitial fibrosis: a histopathological study in rat models and human glomerulopathies. *Nephrol Dial Transplant.* 13(11):2781-98.

- Lagente V, Le Quement C, Boichot E, 2009. Macrophage metalloelastase (MMP-12) as a target for inflammatory respiratory diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 13(3):287-95.
- Lai SC, Chen KM, 2007. Changes to plasminogen activators and matrix metalloproteinase-9 in dogs with toxocarosis. *Vet Parasitol*. 30;150(1-2):122-7.
- Lan HY, 2003. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation mechanisms in proximal tubule cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 12(1):25-9.
- Laplante A, Liu D, Demeule M, Annabi B, Murphy GF, Daloz P, Chen H, Béliveau R, 2003. Modulation of matrix gelatinases and metalloproteinase-activating process in acute kidney rejection. *Transpl Int*. 16(4):262-9.
- Lelongt B, Bengatta S, Delauche M, Lund LR, Werb Z, Ronco PM, 2001. Matrix metalloproteinase 9 protects mice from anti-glomerular basement membrane nephritis through its fibrinolytic activity. *J Exp Med*. 193(7):793-802.
- Lelongt B, Ronco P, 2002. Role of matrix metalloproteinases in kidney development and glomerulopathy: lessons from transgenic mice. *Nephrol Dial Transplant*. 17 Suppl 9:28-31.
- Loukopoulos P, Mungall BA, Straw RC, Thornton JR, Robinson WF, 2003. Matrix metalloproteinase-2 and -9 involvement in canine tumors. *Vet Pathol*. 40(4):382-94.
- Maxie MG, Newman SJ, Urinary system, 2007. In: Maxie MG, Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals, 5th edition, vol. 2, Philadelphia, PA, 425-522.
- McCawley LJ, Matrisian LM, 2001. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol*. 13(5):534-40.
- Mott JD, Werb Z, 2004. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol*. 16(5):558-64.
- Murakami M, Sakai H, Kodama A, Yanai T, Mori T, Maruo K, Masegi T, 2009. Activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 by membrane type 1-MMP and abnormal immunolocalization of the basement membrane components laminin and type IV collagen in canine spontaneous hemangiosarcomas. *Histol Histopathol*. 24(4):437-46.
- Nakaichi M, Yunuki T, Okuda M, Une S, Taura Y, 2007. Activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in canine oronasal tumors. *Res Vet Sci*. 82(2):271-9.

- Nath KA, 1998. The tubulointerstitium in progressive renal disease. *Kidney Int.* 54(3):992-4.
- Newman RG, Kitchell BE, Wallig MA, Paria B, 2008. The cloning and expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 2 in normal canine lymph nodes and in canine lymphoma. *Res Vet Sci.* 84(2):206-14.
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E, 1979. Apparato urinario. In: *Trattato di anatomia degli animali domestici II*, (1° edizione italiana), Nickel R, Schummer A, Seiferle E, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 292-314.
- Nowak M, Madej JA, Podhorska-Okolow M, Dziegiel P, 2008. Expression of extracellular matrix metalloproteinase (MMP-9), E-cadherin and proliferation-associated antigen Ki-67 and their reciprocal correlation in canine mammary adenocarcinomas. *In Vivo.* 22(4):463-9.
- Peeters D, Clercx C, Michiels L, Desmecht D, Snaps F, Henroteaux M, Day MJ, 2000. Juvenile nephropathy in a boxer, a rottweiler, a collie and an Irish wolfhound. *Aust Vet J.* 78(3):162-5.
- Poli A, Abramo F, Mancianti F, Nigro M, Pieri S, Bionda, 1991. A Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. *Nephron.* 57(4):444-52.
- Qi W, Chen X, Poronnik P, Pollock CA, 2006. The renal cortical fibroblast in renal tubulointerstitial fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 38(1):1-5.
- Ramos-Vara JA, Kiupel M, Baszler T, Bliven L, Brodersen B, Chelack B, Czub S, Del Piero F, Dial S, Ehrhart EJ, Graham T, Manning L, Paulsen D, Valli VE, West K, 2008. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Subcommittee on Standardization of Immunohistochemistry. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest.* 20(4):393-413.
- Rao VH, Lees GE, Kashtan CE, Delimont DC, Singh R, Meehan DT, Bhattacharya G, Berridge BR, Cosgrove D, 2005. Dysregulation of renal MMP-3 and MMP-7 in canine X-linked Alport syndrome. *Pediatr Nephrol.* 20(6):732-9.
- Rao VH, Lees GE, Kashtan CE, Nemori R, Singh RK, Meehan DT, Rodgers K, Berridge BR, Bhattacharya G, Cosgrove D, 2003. Increased expression of MMP-2, MMP-9 (type IV

collagenases/gelatinases), and MT1-MMP in canine X-linked Alport syndrome (XLAS). *Kidney Int.* 63(5):1736-48.

Rosati P, Colombo R, 1997. Tessuti di origine mesenchimale. In: Rosati P, Colombo R, I tessuti, Edi-Ermes, Milano, 95-135.

Sanders JS, van Goor H, Hanemaaijer R, Kallenberg CG, Stegeman CA, 2004. Renal expression of matrix metalloproteinases in human ANCA-associated glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 19(6):1412-9.

Schlondorff DO, 2008. Overview of factors contributing to the pathophysiology of progressive renal disease. *Kidney Int.* 74(7):860-6.

Strutz F, Neilson EG, 2003. New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. *Springer Semin Immunopathol.* 24(4):459-76.

Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang CQ, Kalluri R, Müller GA, Neilson EG, 2002. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int.* 61(5):1714-28.

Sun S, Ning X, Zhang Y, Lu Y, Nie Y, Han S, Liu L, Du R, Xia L, He L, Fan D, 2009. Hypoxia-inducible factor-1 α induces Twist expression in tubular epithelial cells subjected to hypoxia, leading to epithelial-to-mesenchymal transition. *Kidney Int.* 75(12):1278-87.

Tanaka T, Miyata T, Inagi R, Fujita T, Nangaku M, 2004. Hypoxia in renal disease with proteinuria and/or glomerular hypertension. *Am J Pathol.* 165(6):1979-92.

Vilafranca M, Wohlsein P, Trautwein G, Leopold-Temmler B, Nolte I, 1994. Histological and immunohistological classification of canine glomerular disease. *Zentralbl Veterinarmed A.* 41(8):599-610.

Visse R, Nagase H, 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2;92(8):827-39.

Wyatt L, Wadham C, Crocker LA, Lardelli M, Khew-Goodall Y, 2007. The protein tyrosine phosphatase Pez regulates TGF β , epithelial-mesenchymal transition, and organ development. *J Cell Biol.* 24;178(7):1223-35.

Yabuki A, Mitani S, Fujiki M, Misumi K, Endo Y, Miyoshi N, Yamato O, 2009. Comparative study of chronic kidney disease in dogs and cats: Induction of myofibroblasts. *Res Vet Sci.* Oct 10.

Yhee JY, Yu CH, Kim JH, Sur JH, 2008. Effects of T lymphocytes, interleukin-1, and interleukin-6 on renal fibrosis in canine end-stage renal disease. *J Vet Diagn Invest.* 20(5):585-92.

Zatelli A, Borgarelli M, Santilli R, Bonfanti U, Nigrisoli E, Zanatta R, Tarducci A, Guarraci A, 2003. Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. *Am J Vet Res.* 64(5):558-61.

Zhao W, Chen SS, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y, 2008. Kidney fibrosis in hypertensive rats: role of oxidative stress. *Am J Nephrol.* 28(4):548-54.