

**Universitatea de Medicină și Farmacie
Craiova
Facultatea de Medicină**

TEZĂ DE DOCTORAT

**Rolul interrelației epitelio-mezenchimale în evaluarea bolii
cronice de rinichi
Studiu clinic, histologic și imunohistochimic**

REZUMAT

**Conducător științific
Prof. Univ. Dr. Laurențiu MOGOANTĂ**

**Doctorand
Ofelia Claudia JERCAN**

**CRAIOVA
2013**

CUPRINS

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU	3
I.1. Introducere	3
I.2. Epidemiologia bolii cronice de rinichi	4
I.3. Aspecte histopatologice în evoluția bolii cronice de rinichi	5
II. CONTRIBUȚII PROPRII	10
II.1. STUDIUL CLINICO-STATISTIC	10
II.1.2. Material și metodă	10
II.1.3. Rezultate	11
II.1.4. Discuții	13
II.2. STUDIUL HISTOLOGIC	14
II.2.1. Material și metodă	14
II.2.2. Rezultate	16
II.2.3. Discuții	17
II.3. STUDIUL IMUNOHISTOCHEMIC	19
II.3.1. Material și metodă	19
II.3.2. Rezultate	21
II.3.3. Discuții	23
IV. CONCLUZII	25
V. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	27

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU

I.1. Introducere

În multiple studii epidemiologice este subliniată importanța diagnosticării afectării renale în stadii incipiente astfel, în boala cronică de rinichi diagnosticul etiologiei este dificil numai pe baza criteriilor clinice [41-43].

Astfel, diverse studii susțin faptul că biopsia renală este esențială pentru a obține un diagnostic concludent în ceea ce privește etiologia afectării renale, suspiciunea clinică fiind confirmată de către biopsia renală în numai 51% din pacienți [44].

Cu toate acestea, este subliniat faptul că, la pacienții cu boală renală cronică în stadii avansate procedura de puncție biopsie renală are un risc mai mare de complicații, iar diagnosticul histopatologic nu determină modificarea terapiei de bază [45].

Multiple studii au demonstrat prezența mecanismelor de cicatrizare non reversibile ca factor patogenic esențial în dezvoltarea bolii cronice de rinichi indiferent de leziunea histologică inițială [92]. Astfel, injuria cronică la nivelul parenchimului, asemănător cu înlocuirea structurilor bine diferențiate cu țesut fibrozant în cadrul procesului de cicatrizare, reprezintă mecanisme patologice specifice în dezvoltarea insuficienței cronice în cadrul a diferitelor țesuturi parenchimale precum ficatul, rinichii și plămânii [93].

Astfel, scopul acestui studiu a fost de a demonstra relația existentă între expresia fenotipului epitelial și mezenchimal, în evoluția procesului de fibroză interstițială renală, fiind descriși astfel, noi markeri imunohistochimici de predicție în evoluției funcției renale, precum și interacțiunea între expresia acestor markeri și tratamentul cu vitamina D sau substituenți ai vitaminei D.

I.2. Epidemiologia bolii cronice de rinichi

Termenul de boală cronică de rinichi a fost introdus în 2002 de grupul de lucru ” The Kidney Disease Outcome Quality Initiative”(K/DOQI) și este definit ca fiind scăderea ratei de filtrare glomerulară (RFG) sub 60ml/min/1.73mp suprafață corporală, persistentă mai mult de 3 luni, cu/fără leziune renală sau ca fiind prezența unei afectări renale mai mult de 3 luni, demonstrată prin modificări morfopatologice sau prin prezența markerilor de leziune cum ar fi albuminurie/proteinurie, sediment urinar patologic sau modificări renale decelabile imagistic [6].

În ultimii ani termenul de insuficiență renală cronică a fost înlocuit cu cel de boală cronică de rinichi deoarece evidențiază existența afectării renale cronice la pacienții cu RFG normală (> 90 ml/min/1.73mp- stadiul I al BCR) sau ușor redusă între 60 și 90 ml/min/1.73mp respectiv în stadiul II de boală cronică de rinichi, precum și datorită faptului că include pacienții cu transplant renal [6].

BCR reprezintă o problemă majoră de sănătate publică pe plan mondial datorită prevalenței crescute de 18.3% în Australia (AUSDIAB) [7], respectiv 11% în SUA (NHANES III)[8]. În Europa Occidentală prevalența BCR în stadiile 3-5 este de aproximativ 10% din populația adultă [6].

În România se constată o creștere a numărului de pacienți dializați (5447 în 2003) și aproximativ dublu în 2009 precum și creșterea vârstei de inițiere a terapiei de substituție a funcțiilor renale. În SUA studiul NHANES III a relevat următoarea prevalență a BCR : 11.2 mil. în stadiile 1-2 și 8.3 mil. în stadiile 3-5 din care în stadiul 5 sunt 30000 de pacienți dializați sau transplantați renal [9].

Multiple studii susțin faptul că transplantul renal îmbunătățește speranța de viață cu aproximativ 3-15 ani comparativ cu terapia de substituție a funcției renale prin dializă în concordanță însă, cu prezența diferitelor caracteristici atât în cazul donatorilor cât și al primitorilor precum vârsta la transplantare [5].

Deși transplantul renal reprezintă cea mai bună alegere pentru pacienții cu boală cronică de rinichi datorită îmbunătățirii calității vieții dar și duratei, comparativ cu dializa, există o problemă identificată la nivel mondial, cererea pentru transplant renal depășește cu mult posibilitățile efective de realizare a acestuia [10].

În ceea ce privește rata de supraviețuire la 1 an pentru transplant de rinichi a fost următoarea: 93,7% probabilitate de a supraviețui la 1 an după transplant de la cadavru iar în cazul transplantului de la donator în viața rata de supraviețuire este de 97,6% (Raportul anual de date al USRDS 2003) . Rata de supraviețuire la 5 ani prezentată în același raport pentru transplant de rinichi a fost de : 80,6% probabilitate de a supraviețui la 5 ani după transplant de la cadavru și 90,4% probabilitate în cazul unui donator viu. În ceea ce privește rata de supraviețuire la 10 ani, pentru transplantul de rinichi a fost: 58,9% probabilitate de a supraviețui la 10 de ani de la transplant de la donator cadavru și 77,8% probabilitate în cazul transplantului de la donator viu.

În România din 1980 până în iunie 1997 s-au realizat 45 de transplantate renale, iar din iunie 1997 până în decembrie 2001 s-au realizat 255 de transplantate renale din care 39 cu greșă de la donator în moarte cerebrală.

În cadrul Raportului Anual pe 2011 al Registrului Renal Român a fost raportat, faptul că deși, ritmul de creștere al numărului bolnavilor cu grefe renale funcționale este mai mare decât media europeană, ponderea transplantului renal între metodele de tratament substitutiv renal este încă mică, astfel, hemodializă rămâne principala metodă de tratament substitutiv renal în România (88%) [11].

I.3. Aspecte histopatologice în evoluția bolii cronice de rinichi

La nivel renal, procesul de fibroză interstițială a fost considerată un mecanism comun de progresie a bolii cronice de rinichi, care la un anumit moment devine independent de cauza inițială a afectării renale și devine legată de un dezechilibru patogen între depunerea și degradarea componentelor matricei extracelulare [13]. Acest proces este stimulat de o varietate de citokine și factori de creștere descrise în imaginea de mai jos:

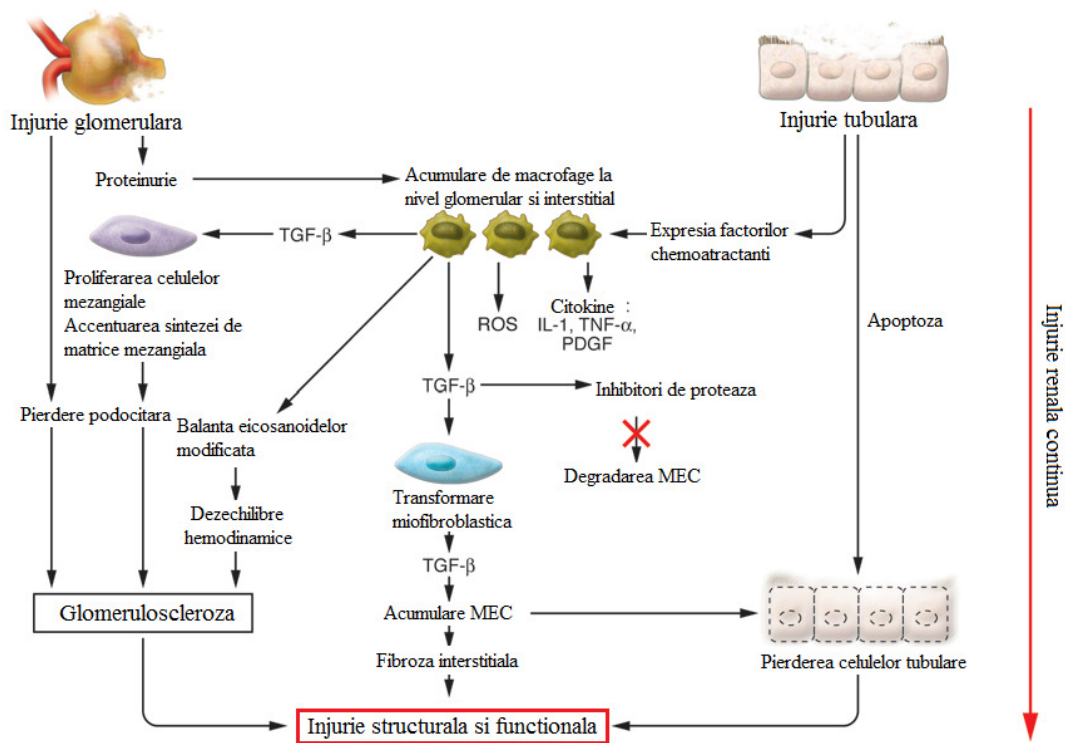


Figura1.

Principalii factori implicați în inițierea și evoluția injuriei cronice la nivel renal, adaptare după Ricardo SD. și colab. [14].

Membrii familiei factorilor de creștere TGF-β reprezintă cele mai intens studiate molecule derivate din macrofage care sunt legate de fibroza renală [14]. Macrofagele, celulele epiteliale tubulare, și miofibroblaștii reprezintă celule capabile de a sintetiza TGF-β în diferite etape de evoluție a leziunilor renale fibrotice. Astfel, observația că supresia expresiei macrofagelor la nivelul leziunilor cronice cu evoluție spre fibroză sugerează că aceste celule sunt printre principalii producători al factorului de creștere TGF-β [15]. Odată activat acest factor de creștere, TGF-β, transmite semnale prin receptori transmembranari care activează proteinele SMAD ce vor regla transcrierea unor gene importante precum cele care codifică sinteza colagenului. La nivel renal, TGF-β derivat din macrofage poate promova fibroza prin activarea paracrină a expresiei miofibroblaștilor capabili de sinteza matricei extracelulare și de asemenea promovarea transdiferențierii celulelor epiteliale tubulare în miofibroblaști [16].

Astfel inițierea procesului de transdiferențiere epitelio-mezenchimală reprezintă un proces destructiv cu evoluție spre declinul funcției renale și inițierea terapiei de substituție renală. De asemenea, macrofagele pot sintetiza și secreta colagen iar factorul de creștere TGF-β poate dezactiva, de asemenea, macrofagele și induce expresia unui fenotip antiinflamator la nivelul macrofagelor caracterizat prin producția de colagen tip VI [17].

Într-un studiu recent a fost observat faptul că o singură celulă hematopoietică a fost capabilă de a se diferenția în celulele mezangiale într-un model experimental de transplant de celule hematopoietice, astfel, aceste observații demonstrează faptul că aceste celule derivate din măduva osoasă pot reconstrui celule mezangiale și interstițiale [18].

Într-un studiu recent s-a observat faptul că celulele măduvei osoase GFP + migrează la nivelul glomerulilor și interstițiului astfel, contribuie la turnover-ul celular normal [19].

Deși majoritatea celulelor epiteliale tubulare regenerate sunt derivate dintr-o sursă intrarenală, de asemenea, celulele derivate din măduva osoasă pot contribui la înlocuirea celulelor epiteliale tubulare printr-un proces de fuziune celulară [17]. Astfel, celula hematopoietică responsabilă pentru acest proces de fuziune celulară nu este pe deplin cunoscută, deși există dovezi că macrofagele poate fi responsabilă de acest proces la nivel hepatic [18].

Astfel, în ciuda rezervelor adecvate de celule și mecanisme pentru repararea zonelor deteriorate, în cele mai multe cazuri, la nivel renal sau hepatic sunt utilizate fibroblastele în cadrul evoluției procesului de fibroză [16]. De exemplu, în cazul parenchimului renal, în afară de celulele epiteliale glomerulare, restul celulelor endoteliale, mezangiale sau tubulare reprezintă celule cu indice înalt de proliferare oferind elemente structurale adecvate pentru a vindeca în mod corespunzător. Cu toate acestea, din cauza unor deficiențe incomplet cunoscute, a mecanismelor de reparare tisulară în marea majoritate a cazurilor este folosit țesut conjunctiv și respectiv, componenta sa majoră, fibroblastele.

Un factor ce pare că acționează la nivelul celulelor epiteliale tubulare este reprezentat de angiotensina II, care acționează ca un factor de creștere locală stimulând astfel, hipertrofia celulară și producția de colagen de tip IV iar principalii factori de creștere implicați în acest proces este reprezentat de TGF β 1 [13]. Astfel, acest mecanism ar putea explica scăderea TGF β 1 în probele de urină după administrarea de corticosteroizi sau inhibitori ai enzimei de conversie a angiotensinei (IEC). Cu toate acestea, terapia combinată cu IEC și blocanți ai receptorilor de angiotensină II, intensifică în mod semnificativ acest fenomen.

Principalii factori care declanșează secreția TGF- β 1 sunt angiotensinei II și proteinuria. Astfel, în cazul pacienților cu nefropatie diabetică și proteinurie prezintă niveluri ridicate de TGF β 1 în urină comparativ pacienții fără proteinurie [20].

Astfel cele mai importante mecanisme implicate în injuria cronică la nivel tubulo-interstițial în cadrul nefropatiilor ce evoluează cu proteinurie sunt reprezentate de: leziunea directă la nivelul celulelor epiteliale tubulare care consumă cantități mari de proteine prin fagocitoză iar proteinele acumulate în exces vor distruge celulele tubulare, ischemia tubulară

constituie un fenomen declanșat de multiple chemokine și factori de creștere ce ajung la nivelul celulelor tubulare, de asemenea, expresia neoantigenelor și moleculelor de adeziune cu caracteristici proinflamatorii la nivelul celulelor tubulare după atașarea proteinelor pe suprafața celulară.

Proteinuria, precum și hipoxia reprezintă principalele mecanisme de stimulare a tranziției epitelio-mezenchimale (TEM) [22]. TGF β -1 prin calea SMAD este considerat ca fiind principalul mediator în reglarea mecanismelor de TEM, probabil în colaborare cu factorii inductori ai hipoxiei.

Fibroblaștii reprezintă celulele pivot, efectori ai fibrogenzei, inițial aceste celule au fost identificate prin microscopie optică și microscopie electronică pe baza caracteristicilor morfologice însă mult mai recent sunt identificate pe baza markerilor fibroblastici.

La nivel renal, Bowman a identificat două populații celulare distincte la nivelul corticalei și medularei interne care prezintă schimbări ale caracteristicilor morfologice și funcționale ulterioare în concordanță cu stadiul de boală [22]. Având în vedere complexitatea liniilor celulare, originea fibroblaștilor renali rămâne controversată, în prezent cea mai folosită teorie pune în prim plan apartenența la celule interstițiale locale însă alți autori susțin că fibroblaștii derivă din leucocitele migrate local [13].

În studii recente efectuate pe culturi de celule și modele experimentale de nefropatie s-a formulat ipoteza că celulele tubulare epiteliale, prin intermediul tranziției epitelio-mezenchimale pot deveni celule producătoare de colagen. Potrivit acestei ipoteze celulele epiteliale ar trebui să parcurgă mai multe stadii precum proliferarea și schimbări fenotipice, pentru a sintetiza în cele din urmă proteine ale matricei extracelulare.

Prezența tranziției epitelio-mezenchimale în fibroza renală a fost pentru prima dată demonstrat de Strutz și colab. într-un document publicat cu aproape un deceniu în urmă [23]. Utilizând proteina specifică pentru fibroblaste (Fsp1) ca marker, acești autori au arătat că celulele epiteliale tubulare ar putea exprima Fsp1, proteina de legare a calciului asociată citoscheletului, care este în mod normal exprimată la nivelul fibroblastelor, dar nu în epiteliu, într-un model experimental pe animale de nefropatie cu anticorpi anti-membrane bazale tubulare. A fost astfel, postulată prezența procesului de tranziție epitelio-mezenchimala, care ar putea servi drept o nouă cale de generare a fibroblastelor în cadrul proceselor fibrotice renale.

În nefropatia obstructivă, indusă prin obstrucția ureterală unilaterală, s-a demonstrat multiple celule au prezentat o co-exprimare atât a α -SMA cât și a markerilor tubulari, indicând faptul că acestea sunt într-o etapă de tranziție între epiteliu și mezenchim [25].

Aceste celule epiteliale tubulare au pierdut markerul specific e-cadherina și au dobândit caracteristici mezenchimale cum ar fi α -SMA și vimentina, producând astfel componente ale matricei interstițiale precum fibronectina și collagen tip I.

În conformitate cu studiile experimentale tranziția epitelio-mezenchimală este, de asemenea, observată la nivelul țesutului obținut prin biopsie renală [2]. Astfel, într-un studiu experimental, a fost observat faptul că celulele izolate sau grupurile mici, slab organizate de celule ce prezintă încă markeri epiteliale ar putea fi găsite la nivelul interstițiului în cazul probelor de biopsie renală la pacienții cu boală de rinichi în stadiu terminal, în acord cu noțiunea de tranziție epitelio-mezenchimală.

Studii recente privind probele de biopsie aduc argumente noi în sprijinul TEM ce pare a avea un rol progresiv în fibroza renală, pentru că celulele epiteliale tubulare suferă schimbări fenotipice, după cum o demonstrează exprimarea de novo a α -SMA și pierderea citokeratinelor [24]. Deoarece TEM apare adesea în zonele cu afectare structurală severă tubulară, o preocupare care a fost ridicată de-a lungul anilor este că aceste celule tubulare α -SMA pozitive pot reprezenta o infiltrare interstițială de miofibroblaste. Într-un studiu folosind sofisticate abordări genetice, Iwano și colab. au furnizat dovezi convingătoare care arată că fibroblaștii interstițiali ar putea fi derivați din epiteliul tubular după injuria renală de cauză obstructivă [25].

În concluzie, fibroza tubulo-interstițială renală caracterizată prin depunerea excesivă de țesut conjunctiv la nivelul parenchimului renal reprezintă un proces extensiv ce are drept rezultat final detriorarea progresivă a funcției renale independent de afecțiunea renală primară. Astfel, procesul de transdiferențiere epitelio-mezenchimală poate reprezenta principalul mecanism prin care celulele epiteliale tubulare sunt transformate în fibroblaști mezenchimali ce au capacitatea de a migra la nivelul injuriei interstițiale inițiind astfel, mecanismele de fibroză renală împreună cu factori locali circulatorii [20].

Factorul de creștere al hepatocitelor (HGF) precum și BMF-7 reprezintă molecule inhibitorii pentru procesul de TEM care ar putea preveni la nivel experimental și clinic procesul de fibroză interstițială. Studii recente indică faptul că administrarea acestor molecule previne fibroza peritoneală în modele experimentale [23].

II. CONTRIBUȚII PROPRII

II.1. STUDIUL CLINICO-STATISTIC

Obiectivele studiului clinico-statistic au fost reprezentate de: descrierea caracteristicilor demografice ale lotului de studiu și stabilirea distribuției populației pe sex, vârstă și factori de risc în bola cronică de rinichi; evaluarea modului de debut și a patologiilor intricate în debutul bolii cronice de rinichi, forma clinică a bolii; investigarea factorilor implicați în evoluția patologiei renale.

II.1.1. Material și metodă

Studiul clinic, desfășurat în Spitalul „Carol Davila” din București, a reprezentat un studiu retrospectiv efectuat pe un lot de 87 pacienți, ce au fost supuși unei proceduri de biopsie renală în perioada 2008 - 2011 și urmăriți pe o perioadă de 21 ± 11 luni sau până la declinul funcției renale și inițierea dializei sau deces.

Protocolul a fost aprobat de către Comitetul Etic al Spitalului “Carol Davila” și a fost realizat în conformitate cu principiile etice ale Convenției de la Helsinki.

Informațiile privind parametrii clinici și de laborator au fost extrase din bazele de date electronice și din dosarul medical al fiecărui pacient. Obținerea și raportarea acestor date au fost aprobate de către comisia etică a acestei instituții, iar consimțământul informat pentru folosirea datelor confidențiale a fost obținut de la fiecare pacient.

Criteriile de excludere au fost reprezentate de: lipsa datelor clinice și de laborator la momentul biopsiei și în perioada de urmărire, lipsa țesutului din cadrul fragmentelor de biopsie renală viabil pentru a efectua procedee de histologie clasică.

Funcția renală a fost evaluată prin nivelurile creatininei serice măsurate la intervale frecvente și prin estimarea ratei de filtrare glomerulară (RFG) prin formula MDRD [26].

Istoricul medical și parametrii clinici bazali au fost înregistrați la momentul efectuării biopsiei renale iar reevaluarea clinică și biochimică a fost efectuată la intervale de timp stabilite pentru fiecare pacient conform recomandărilor ”Kidney Disease Quality Outcomes Initiative” pentru evaluarea bolii cronice de rinichi [27].

Tratamentul imunosupresiv de inducție în cazul glomerulonefritelor primare a fost reprezentat de cortizon asociat cu ciclofosfamidă. Imunosupresia în cadrul anumitor glomerulonefrite primare a constat din asocierea de prednison și micofenolat mofetil.

Biopsiile renale au fost efectuate sub ghidaj ecografic prin puncție cu ac montat într-un dispozitiv automat cu arc, indicațiile principale de biopsie fiind: proteinuria izolată; scăderea funcției renale evaluată prin creșterea creatininei serice peste 25% față de valorile precedente; asocierea între scăderea funcției renale și proteinurie.

Probele biologice au fost obținute în Departamentul de Nefrologie de la fiecare pacient, în condiții de repaus alimentar timp de 12 ore și toate analizele biochimice au fost efectuate în același laborator.

Hipertensiunea arterială sistemică a fost definită ca valorile presiunii arteriale repetate consecutiv ce depășesc limita de 140/90mmHg sau folosirea cel puțin a unui medicament anti-hipertensiv.

În ceea ce privește analiza statistică, variabilele continue au fost exprimate ca valori medii \pm SD. Diferențele dintre grupuri au fost determinate de testul t Student, testul Mann-Whitney și ANOVA, în cazul în care este indicat. Diferențele între procente au fost determinate de testul χ^2 și testul exact Fisher. Regresia liniară și regresia logistică au fost folosite pentru a efectua analiza uni și multi-variata. În toate analizele semnificația statistică a fost stabilită pentru valorile $P < 0,05$. Analiza statistică a fost efectuată cu ajutorul software-ului SPSS versiunea 9 și SAS 9.2 (SAS Institute Inc, Cary, NC, SUA).

II.1.2. Rezultate

În cadrul studiului clinic au fost evaluați 87 pacienți, ce au fost supuși unei proceduri de biopsie renală în perioada aprilie 2008 – septembrie 2011 și urmăriți pe o perioadă de 21 ± 11 luni sau până la declinul funcției renale și inițierea dializei sau deces.

Pe parcursul perioadei de studiu un număr de 8 (9%) pacienți au înregistrat declinul funcției renale cu inițierea terapiei substitutive renale prin dializă.

În ceea ce privește stadiile bolii cronice de rinichi s-a observat un raport constant între incidența cazurilor cu rată de filtrare glomerulară între 70 și 90ml/min/1.73m² la momentul biopsiei, în ceea ce privește numărul cazurilor la care s-a înregistrat pierderea funcției renale s-a observat o incidență crescută a cazurilor cu o rată de filtrare glomerulară mai mică de 60 ml/min/1.73m² la momentul biopsiei renale.

Pentru grupul de pacienți la care s-a înregistrat declinul funcției renale, cu inițierea terapiei de substituție a funcției renale, durata medie de timp de la pierderea funcției renale și până la efectuarea biopsiei a fost de 15 ± 10 luni.

Studiul repartiției pe sexe, a populației studiate, a evidențiat predominanța sexului masculin în ambele grupuri, astfel există un procent de 61.3% de pacienți de sex masculin în grupul pacienților la care nu s-a înregistrat declinul funcției renale.

În ceea ce privește stratificarea pacienților pe vârstă nu s-a observat nici o diferență între cele două grupuri, media de vârstă a lotului de studiu fiind 44.7 ± 11 ani.

Urmărind repartiția pe grupe de vârstă s-a observat o incidență maximă a pacienților cu eRFG >90 ml/min/ 1.73 m² în grupul cu vârsta cuprinsă între 30-40 de ani, de asemenea, se poate observa scăderea constantă a incidenței cazurilor cu o rată de filtrare glomerulară în intervalul 60-90 ml/min/ 1.73 m², în care s-a luat decizia efectuării puncției biopsie renală, în cazul grupelor de vârstă peste pragul de 50 de ani.

În ceea ce privește incidența scăderii eRFG în cadrul grupelor de vârstă, s-a observat o tendință de creștere a frecvenței cazurilor în care s-a înregistrat scăderea funcției renale atât în grupa de vârstă între 40-49 de ani cât și în grupa de vârstă între 50-59 de ani.

Criteriile clinice și de laborator ce au constituit indicația de efectuare a puncției biopsie renală în cadrul grupului cu funcție glomerulară în limite normale, cu eRFG calculată prin formula MDRD >90 ml/min/ 1.73 m², co-existența proteinuriei/24 h >1 g a reprezentat în 87% din cazuri motivul principal de a efectua puncția biopsie renală în asociere cu prezența micro sau macrohematuriei, după excluderea unor cauze non-glomerulare pentru prezența hematuriei.

Proteinuria izolată cu o valoare mai mică de 1g/24h, nu a influențat decizia de a efectua puncția renală în condițiile unei funcții renale normale, chiar și în condițiile unor valori modificate ale proteinelor serice.

În ceea ce privește prezența factorilor de risc cardio-vasculari s-a constatat că în grupul la care s-a înregistrat declinul funcției renale prezența în 62.5% din cazuri a unor valori tensionale mari iar în 34% din cazuri au fost asociate mai mult de 3 medicamente anti-hipertensive.

S-a observat în cadrul acestui studiu prezența unui sindrom inflamator în 75% din cazurile în care s-a înregistrat declinul funcției renale iar nivelul seric al proteinei C reactive la momentul biopsiei renale a relaționat cu rata de filtrare glomerulară (eRFG) în perioada de urmărire ($r=-0.21$, $p=0.021$).

Pentru a determina impactul mai multor factori asupra declinului funcției renale și inițierii terapiei de substituție a funcției renale am aplicat modelul statistic de regresie logistică.

Cel mai puternic predictor al inițierii terapiei substitutive renale prin dializă, în acest model, este valoarea creatininei serice la momentul biopsiei renale.

Scăderea cu o unitate a ratei de filtrare glomerulară în perioada de urmărire crește de 1.46 ori riscul de începere a terapiei de substituție a funcției renale prin dializă.

Timpul scurt de urmărire este de asemenea un predictor al începerii dializei cu o rată a probabilităților de 1.16, acest lucru înseamnă ca fiecare lună de urmărire în plus, reduce riscul de 1.16 ori.

De asemenea, asocierea mai multor factori de risc cardio-vasculari a relaționat cu scăderea ratei de filtrare glomerulară, astfel, s-a observat că în 75% din cazurile în care s-a înregistrat declinul funcției renale s-a înregistrat un sindrom inflamator biologic accentuat în perioada de urmărire iar în 62.5% din cazurile care au inițiat terapia de substituție a funcției renale au avut în evoluție acidoză metabolică ce a fost corectată terapeutic.

II.1.3. Discuții

În cadrul acestui studiu într-un lot de studiu cu etiologie diferită a afectării renale s-a observat că efectuarea puncției biopsie renală la o rată de filtrare glomerulară cât mai mare a fost asociată cu o mai bună supraviețuire, respectiv, mai puține cazuri în care s-a inițiat terapia de substituție a funcției renale.

Funcția renală păstrată la momentul puncției biopsie renală a reprezentat un factor de predicție important în evoluția bolii cronice de rinichi. Astfel, terapia imunosupresivă sau modificarea acestei terapii după efectuarea puncției biopsie renală a determinat îmbunătățirea funcției renale în majoritatea cazurilor de glomerulonefrită. Acest răspuns la tratament este comparabil cu datele existente în cadrul altor studii în grupuri de subiecți cu diagnostic histopatologic de glomerulonefrite în diferite stadii [28-31].

Acest studiu nu a comparat terapia imunosupresivă individuală în cadrul grupurilor de pacienți cu etiologie diferită a afectării glomerulare, aceste subgrupuri fiind prea mici pentru o astfel de analiză.

În ceea ce privește distribuția populației pe sexe, s-a observat, în cadrul acestui studiu, o incidență crescută a sexului masculin, în anumite categorii de vârstă. Această observație fiind susținută de o serie de studii ce subliniază speranța de viață mai mare în cazul femeilor [48].

Astfel, Haas și colab. au raportat un număr aproape egal de femei și bărbați cu vârste peste 80 de ani ce au fost supuși unei proceduri de puncție biopsie renală pentru investigarea unei injurii renale acute (IRA) [49].

În cadrul studiului nostru, s-a observat o incidență asemănătoare a cazurilor diagnosticate cu nefropatie membranoasă și glomeruloscleroză focal segmentară primară în categoria de vârstă peste 50 de ani. În cadrul categoriilor de vârstă sub 50 de ani s-a observat o incidență mai crescută a cazurilor diagnosticate cu nefroscleroză diabetică și glomerulopatie cu leziuni minime.

Un aspect important descris în cadrul acestui studiu, este reprezentat de sublinierea importanței factorilor de risc cardiovasculari în declinul funcției renale.

Astfel, sindromul inflamator biologic prin nivelul crescut al proteinei C reactive și hipertensiunea arterială au reprezentat factori de risc ce s-au asociat cu declinul ratei de filtrare glomerulară ($p=0.001$, respectiv $p=0.032$).

În analiza factorilor implicați în evoluția patologiei renale un aspect important l-a reprezentat puterea predictivă a nivelului creatininei serice la momentul biopsiei renale ($p=0.48$), iar scăderea ratei de filtrare glomerulară în perioada de urmărire a reprezentat un element predictiv pentru inițierea terapiei de substituție renală.

II.2. STUDIUL HISTOLOGIC

Obiectivele studiului histologic au fost reprezentate de: descrierea principalelor caracteristici histopatologice în cadrul lotului de studiu, evidențierea caracteristicilor prezenței infiltratului inflamator la nivel interstițial, tubular și vascular, descrierea expresiei scorului de fibroză interstițială și periglomerulară și evoluția patologiei renale.

II.2.1. Material și metodă

Studiul histologic a fost efectuat pe un număr de 87 piese de biopsie renală obținute de la pacienți ce au fost supuși unei proceduri de biopsie renală în perioada aprilie 2008 - septembrie 2011 și urmăriți pe o perioadă de 21 ± 11 luni sau până la inițierea dializei sau

deces. Au fost selectate numai cazurile analizate microscopic în Laboratorul de Nefropatologie din cadrul Spitalului de Nefrologie „Carol Davila”, București.

Au fost studiate microscopic aspectele ariei tubulo-interstițiale și glomerulare precum și gradul de inflamație și fibroză.

Au fost selecționate numai biopsiile renale care au avut țesut renal suficient pentru efectuarea tuturor celor trei tehnici de diagnostic: microscopie optică, microscopie electronică și imunofluorescență directă.

Pentru realizarea studiului histologic, au fost utilizate, pentru cuantificarea modificărilor histologice, cel puțin trei lame în colorații uzuale pentru fiecare biopsie, o lamă cu hematoxilină-eozină, două lame colorate cu tricromic Goldner-Szeckeli, toate secțiunile au avut mai mult de 5 glomeruli. În vederea stabilirii diagnosticului histopatologic toate biopsiile au fost revizuite de doi patologi independenți, înainte de includerea în studiu. Biopsiile au fost evaluate și clasificate în funcție de criteriile de diagnostic [69].

În ceea ce privește evaluarea ariei interstițiale s-a folosit un sistem de evaluare vizuală, efectuat de doi patologi independenți, printr-un sistem de scoruri de la 0 la 3, fiind evaluat procentul infiltratului inflamator interstițial precum și procentul fibrozei interstițiale din totalul ariei corticale fiind excluse ariile glomerulare și tubulare. Astfel, scor 0= absența infiltratelor inflamatorii sau fibrozei interstițiale, scor 1= prezența modificărilor în <25% din aria corticală evaluată, scor 2= prezența modificărilor în 25-50% din aria corticală evaluată, scor 3= prezența modificărilor în >50% din aria corticală evaluată.

Reproductivitatea interobservator a fost evaluată prin testul de corelație Spearman's ce a variat între 0.82 și 0.96 și testul t Student pentru perechi de date ce nu a relevat o diferență semnificativă între observatori.

Prin studiul morfometric s-a urmărit în cadrul studiului histologic măsurarea semicantitativă a densității fibrelor de colagen. Imaginile ariei tubulo-interstițiale în colorația tricromic Goldner- Szeckeli au fost procesate anterior efectuării studiului morfometric în Adobe Photoshop pentru a elimina aria tubulară și a nu supraestima scorul de fibroză interstițială prin excluderea membranei bazele tubulare.

În ceea ce privește analiza statistică, variabilele continue au fost exprimate ca valori medii \pm SD. Diferențele dintre grupuri au fost determinate de testul t Student, testul Mann-Whitney și ANOVA, în cazul în care este indicat. De asemenea, a fost utilizată analiza Kaplan-Meier pentru evaluarea supraviețuirii, semnificația statistică a fost stabilită pentru valorile $P < 0.05$. Analiza statistică a fost efectuată cu ajutorul software-ului SPSS versiunea 9 și SAS 9.2 (SAS Institute Inc, Cary, NC, SUA).

II.2.2. Rezultate

Cele mai frecvente diagnostice histopatologice întâlnite în cadrul lotului studiat au fost reprezentate de nefropatia membranoasă (17.2%), glomerulopatia cu leziuni minime (16%) și glomeruloscleroza focal segmentară (11.2%), iar în cadrul grupului în care s-a observat declinul funcției renale cele mai frecvente forme de diagnostic histopatologic au fost nefropatia tubulo-interstițială cronică, glomerulonefrita membranoproliferativă și amiloidoza renală.

În 13% din cazurile diagnosticate cu nefropatie membranoasă s-a observat aspectul de capilare glomerulare cu pereti mult îngroșați prin depozite epimembranare slab electronodense și frecvente zone de rezorbție, membranele bazale glomerulare au aspectul în microscopia electronică de „mâncat de moli”, caracteristic stadiului IV al nefropatiei membranoase.

Din cei 8 de pacienți la care s-a înregistrat declinul funcției renale, respectiv au inițiat terapia de substituție a funcției renale, 5 biopsii (62.5%) au înregistrat declinul funcției renale la mai mult de 12 luni de la efectuarea puncției biopsie renală. În cadrul acestor biopsii a fost observat un scor de inflamație total mai mare de 0 în 80% din cazuri și un scor de inflamație în aria de fibroză interstițială mai mare de 0 în 20% din cazuri.

În cadrul cazurilor ce au înregistrat un scor de inflamație total mai mare de 0 formele histopatologice predominante au fost reprezentate de nefropatiile cu leziuni active: glomerulonefrita membranoproliferativă, nefropatia vasculară.

În biopsiile renale în care s-a observat un scor de inflamație <1 a fost observat un procent mai mic de progresie spre inițierea terapiei de substituție a funcției renale în perioada de urmărire, astfel, doar într-un singur caz s-a inițiat terapia de substituție a funcției renale în perioada de urmărire din cele 28 de cazuri de biopsii la care s-a înregistrat un scor total de inflamație egal cu 0 și 2 cazuri din 50 de biopsii la care s-a înregistrat un scor de inflamație în aria de fibroză interstițială egal cu 0.

Scorul de inflamație în aria de fibroză interstițială a reușit să prezică declinul funcției renale, înregistrându-se un procent de 13.04% de cazuri în care s-a înregistrat pierderea funcției renale la un scor de inflamație în aria de fibroză interstițială >0 și 4% în cazul scorului de inflamație în aria de fibroză interstițială =0 ($r=0.41$, $p=0.001$).

În 64% din cazurile ce au prezentat congestie vasculară acest aspect s-a asociat cu prezența unui scor de inflamație total mai mare de 1 ($r=0.29$, $p=0.031$). A fost observat

aspectul caracteristic de congestie vasculară asociat cu prezența infiltratului inflamator limfo-plasmocitar la nivelul ariei interstițiale.

Un aspect caracteristic observat a fost reprezentat de asocierea fibrozei periglomerulare unei glomeruloscleroze incipiente în care se pot observa ansele capilare cu lumen încă permeabil, comparativ cu prezența unei fibroze periglomerulare cu aspect bine definit de depunere statificată de colagen ce înconjoară membrana bazală a capsulei Bowman în cazul unei glomeruloscleroze cu un scor sever.

De asemenea, s-a observat în grupul pacienților la care s-a înregistrat declinul funcției renale în perioada de urmărire, expresia unui scor de fibroză periglomerular mai mare comparativ cu grupul de pacienți în cazul cărora nu s-a înregistrat pierderea funcției renale ($r=0.28$, $p=0.02$).

Media scorului de fibroză la nivelul ariei tubulo-interstițiale a fost de $42.3 \pm 11.1\%$ în cazul biopsiilor renale cu fibroză interstițială confirmată prin evaluarea vizuală. În cazul biopsiilor renale cu scor 0 de fibroză interstițială media scorului de fibroză evaluat prin analiza computerizată a fost de $9.1 \pm 7.4\%$. A fost observată depunerea de benzi fibroase bine evidențiate la nivel interstițial și peritubular, iar în anumite cazuri acest aspect fiind asociat cu un bogat infiltrat inflamator limfo-plasmocitar.

Astfel, s-a constatat prezența unui scor de fibroză interstițială mai mare în cadrul grupului de pacienți la care s-a înregistrat declinul funcției renale în perioada de urmărire ($r=0.61$, $p=0.03$). De asemenea, scorul de fibroză interstițială s-a asociat cu expresia ariei de fibroză periglomerulară ($r=0.21$, $p=0.001$).

II.2.3. Discuții

S-a observat în cadrul lotului studiat, faptul că, cele mai frecvente forme histopatologice au fost reprezentate de nefropatia membranoasă, glomerulopatia cu leziuni minime și glomeruloscleroza focal segmentară. Aceste date sunt în concordanță cu datele din literatură, care subliniază frecvența crescută a glomerulonefritelor primare iar în cadrul formelor histopatologice prevalența crescută a glomerulonefritei membranoproliferative, glomerulosclerozei focal segmentale și a glomerulopatiei cu leziuni minime [74].

Date recente au indicat faptul că neogeneza limfoidă poate juca un rol important în menținerea răspunsurilor imune împotriva antigenelor persistente, și, astfel, având drept rezultat promovarea inflamației cronice [77]. Astfel, țesuturile care găzduiesc un proces

inflamator cronic prezintă o densitate mare de celulele efectorii precum limfocite T, macrofage, celule dendritice, limfocite B acestea fiind organizate ca structuri limfoide secundare cu foliculi limfatici și zone celulare cu celule limfocite T [78,79].

Impactul inflamației asupra funcției renale reflectă asocierea cu afecțiuni progresive, ce prezintă markeri histopatologici de inflamație exprimați atât în zonele cu fibroză interstițială cât și în zonele fără fibroză, susținând afirmația că disfuncția renală nu are drept cauză fiziopatologică principală procesul inflamator independent. Astfel, injuria severă la nivelul nefronilor determină o reacție inflamatorie permițând o remodelare la nivelul nefronilor și stromei ca o tentativă de vindecare tisulară.

S-a observat prezența fibrozei interstițiale severe și atrofiei tubulare, în cadrul grupului la care s-a înregistrat declinul ratei de filtrare glomerulară la o perioadă de timp mai mare de 1 an față de momentul biopsiei renale. Astfel, în cadrul acestor biopsii asocierea markerilor histopatologici ai inflamației, în zonele cu fibroză interstițială sau fără fibroză, este datorată reacției inflamatorii determinate de pierderea nefronilor, acest fapt explicând de ce markerii inflamației se corelează cu declinul funcției renale [88].

Studiul lui Remuzzi și colab. au evidențiat faptul că analiza histopatologică a secțiunilor unice a estimat corect glomeruloscleroza avansată dar a supraestimat cu aproximativ 30% procentul de glomeruli normali [89]. Astfel, în cadrul prezentului studiu există limitarea impusă de evaluare histopatologică a unui număr mic de secțiuni în clasificarea corectă a scorului individual de glomeruloscleroză pentru fiecare glomerul.

În ceea ce privește fibroza periglomerulară în cadrul studiului nostru a fost observată asocierea între expresia fibrozei periglomerulare și scorul de glomeruloscleroză. Aceste rezultate sunt în concordanță cu datele prezentate în diverse studii ce subliniază importanța evaluării fibrozei periglomerulare în analiza histopatologică de rutină a biopsiei renale [90].

Multiple studii au demonstrat prezența mecanismelor de cicatrizare non reversibile ca factor patogenetic esențial în dezvoltarea bolii cronice de rinichi indiferent de leziunea histologică inițială [92]. Astfel, injuria cronică la nivelul parenchimului, asemănător cu înlocuirea structurilor bine diferențiate cu țesut fibrozant în cadrul procesului de cicatrizare, reprezintă mecanisme patogenice specifice în dezvoltarea insuficienței cronice în cadrul a diferitelor țesuturi parenchimale precum ficatul, rinichii și plămânii [93].

II.3.STUDIUL IMUNOHISTOCHIMIC

Obiectivele studiului imunohistochimic au fost reprezentate de: observarea caracteristicilor fenotipului epitelial în cadrul formelor histopatologice de leziuni cronice la nivelul biopsiei renale, descrierea caracteristicilor expresiei imunohistochimice a markerilor epiteliali și mezenchimali la nivel tubulo-interstițial, evaluarea importanței expresiei markerilor epitelio-mezenchimali tubulo-interstițiali în evaluarea bolii cronice de rinichi

II.3.1. Material și metodă

Studiul imunohistochimic s-a desfășurat pe un număr de 36 de biopsii renale selecționate în urma criteriilor de excludere, din lotul inițial de 87 de piese de biopsie renală obținute de la pacienți ce au fost supuși unei proceduri de biopsie renală în perioada aprilie 2008 - septembrie 2011 și urmăriți pe o perioadă de 17 ± 11 luni sau până la inițierea dializei sau deces.

Un criteriu de excludere important în realizarea studiului imunohistochimic a fost absența materialului biptic, acesta fiind utilizat în multe din cazuri aproape în întregime pentru diagnostic histopatologic. Un alt criteriu de excludere a fost reprezentat de formele histopatologice de injurie renală acută sau leziuni proliferative acute precum: nefropatii proliferative, nefrita interstițială acută, necroză tubulară acută, microangiopatia trombotică sau vasculită.

Pentru evidențierea imunohistochimică a antigenelor tisulare metoda utilizată este bistadială, bazată pe un sistem de vizualizare cu rețea polimerică (DAKO EnVision).

Asemănător cu studiul histologic lamele colorate imunohistochimic au fost apoi investigate cu ajutorul unui microscop Nikon Eclipse (Nikon, Apidrag, România) echipat cu obiective plan apocromate, un senzor CCD de 5Mp precum și cu o videocameră digitală AxioCam MRc5. Analiza cantitativă a fost realizată cu ajutorul unui soft dedicat de analiză imagistică morfometrică Image Pro Plus (MediaCybernetics) [68]. Zonele de interes au fost fotografiate cu aceleași setări pentru iluminare și contrast iar imaginile au fost arhivate în format TIF într-o bază de date. Studiul imunohistochimic s-a desfășurat pe o bază de date de mai mult de 200 de imagini microscopice surprinse cu obiective de 20x și 40x.

Anticorpul utilizat în cadrul studiului imunohistochimic sunt redați mai jos:

Tabel 1. Anticorpii utilizați în studiul imunohistochimic

Anticorp	Epitop/marker	Diluție	Recuperare antigenică	Sursă
α - SMA	Actina de mușchi neted, miofibroblaști	1:50	Citrat, pH6	Dako
CD68	Macrofage/monocite	1:50	Citrat, pH6	Dako
Citokeratina (MNF116)	Citokeratine cu masă moleculară intermediară/mică	1:50	Citrat, pH6	Dako
E-caderina	Marker epitelial de adeziune	1:500	Citrat, pH 6	Epitomics
Vimentina	Marker mezenchimal	1:150	Citrat, pH6	Invitrogen
Ki-67	Factor de proliferare	1:50	EDTA, pH 9	Dako

Studiul morfometric a urmărit măsurarea intensității și procentului de arie ocupat de semnal, a numărului de elemente de interes identificate precum și a distanței dintre elementele de interes.

Au fost studiate numai aspectele ariei tubulo-interstițiale fiind excluse din analiza morfometrică ariile glomerulare sau structurile din vecinătatea unor vase mari.

Expresia markerilor imunohistochimici a fost exprimată ca procent din aria corticală tubulo-intestițială, ocupată de semnal, excepție a făcut expresia CD-68 ce a fost reprezentată prin numărul de celule pozitive/arie interstițială analizată.

Asemănător cu studiul histologic, a fost utilizat un sistem semicantitativ de scoruri pentru cuantificarea leziunilor la nivelul ariei tubulo-interstițiale reprezentat de scoruri de diagnostic ce variază între 0 și 3, pentru leziunile cronice de la nivel glomerular, vascular, tubular sau interstițial [90].

În ceea ce privește analiza statistică, variabilele continue au fost exprimate ca valori medii \pm SD. Diferențele dintre grupuri au fost determinate de testul t Student, testul Mann-Whitney și ANOVA, în cazul în care este indicat. De asemenea, a fost utilizată analiza Kaplan-Meier pentru evaluarea supraviețuirii în cadrul lotului studiat, endpointul primar fiind reprezentat de creșterea cretininei serice cu mai mult de 25% față de valoarea de bază de la momentul biopsiei renale (T0), observată în perioada de urmărire. Analiza statistică a fost efectuată cu ajutorul software-ului SPSS 9 și SAS 9.2 (SAS Institute Inc, Cary, NC, SUA).

II.3.2. Rezultate

S-a observat astfel, predominanța sexului masculin în cadrul lotului de pacienți incluși în studiul imunohistochimic, asemănător lotului inițial. În cadrul prezentului lot nu a fost observat nici un caz la care s-a înregistrat declinul ratei de filtrare glomerulară cu inițierea tratamentului de substituție renală prin dializă, în perioada de urmărire.

De asemenea, în perioada de urmărire s-a observat în 63.8% din cazuri creșterea creatininei serice în perioada de urmărire cu mai mult de 25% comparativ cu valoarea înregistrată la momentul biopsiei renale. Astfel, s-a observat în cadrul clasificării lotului de studiu în funcție de stadiul bolii cronice de rinichi, prezența a 25% din cazuri în stadiul III de boală cronică de rinichi, 38.8% din cazuri în stadiul II de boală cronică de rinichi și 41.6% în stadiul I de boală cronică de rinichi, la momentul biopsiei renale.

Principalele forme de diagnostic histopatologic au fost reprezentate de glomeruloscleroza focal segmentară în 27.7% din cazuri, urmată de nefropatia membranoasă în 22.2% din cazuri și nefropatia diabetică în 16.6% din cazuri.

În cadrul principalelor caracteristici histopatologice, în cadrul lotului pentru studiul imunohistochimic, s-a observat expresia unui procent de glomeruloscleroză de $14 \pm 4.2\%$, în cadrul acestui lot de studiu nu a fost observată relația între expresia scorului de glomeruloscleroză și evoluția parametrilor funcției renale.

De asemenea, s-a observat expresia unui scor de fibroză interstițială cu o medie de $31.2 \pm 16.1\%$. Un alt aspect observat a fost reprezentat de expresia unei fibroze interstițiale de $11.1 \pm 3.5\%$ în cadrul expresiei infiltratului inflamator cu un scor >1 , comparativ cu expresia unei fibroze interstițiale de $23.1 \pm 8.2\%$ în cadrul absenței infiltratului inflamator ($p=0.03$).

Expresia morfometrică a fibrozei la nivel interstițial s-a asociat cu evoluția parametrilor funcției renale. Astfel, în cazurile în cadrul cărora s-a înregistrat creșterea nivelului creatininei serice, în perioada de urmărire, au prezentat expresia unei fibroze interstițiale cu o medie de $54 \pm 11.7\%$ mai mare comparativ cu grupul în care nu a fost observată creșterea creatininei serice în perioada de urmărire ($p=0.01$).

În cadrul acestui studiu, expresia citokeratinei a fost evaluată ca procentul expresiei la nivelul secțiunilor tubulare observate pentru fiecare biopsie, expresia citokeratinei și e-caderinei nefiind observată la nivel interstițial. De asemenea, a fost observată absența expresiei markerilor epiteliali la nivel glomerular.

Un aspect important observat în cadrul acestui studiu a fost reprezentat de scăderea expresiei tubulare de citokeratină în cadrul biopsiilor cu un scor semicantitativ de fibroză interstițială mai mare de 1.

Astfel, s-a observat expresia citokeratinei cu o medie de $31.8 \pm 5.9\%$ din secțiunile tubulare. De asemenea, a fost observată în cadrul acestui studiu o scădere a expresiei citokeratinei în cadrul a 34% din biopsiile renale la care s-a înregistrat un scor de fibroză interstițială mai mare de 1 ($r = -0.61$, $p = 0.03$).

În cadrul lotului de studiu s-a observat asocierea unei expresii scăzute a citokeratinei la nivelul epiteliului tubular cu expresia predominantă a miofibroblaștilor ($r = -0.32$, $p = 0.02$) la nivel interstițial și vimentinei ($r = -0.25$, $p = 0.002$) la nivel tubulo-interstițial.

Asemănător cu expresia filametelor intermediare de citokeratină, a fost evaluată și expresia e-caderinei ce reprezintă o moleculă de adeziune transmembranară importantă în cadrul definirii caracteristicilor fenotipului epitelial la nivel tubular, nefiind observată imunoexpresia acestui marker la nivel interstițial sau glomerular.

A fost observată expresia e-caderinei la nivelul epiteliului tubular cu o medie de $37.1 \pm 11\%$ din secțiunile tubulare. De asemenea, s-a observat în cadrul grupului la care s-a înregistrat creșterea creatininei serice în perioada de urmărire, expresia e-caderinei cu o medie de $24.5 \pm 11.5\%$, mai mică decât expresia e-caderinei în cadrul grupului ce nu a prezentat creșterea creatininei serice în perioada de urmărire ($p = 0.02$).

Expresia vimentinei la nivelul ariei tubulo-interstițiale renale a fost asociată cu expresia fibrozei interstițiale, de asemenea, s-a observat asocierea prezenței imunohistochemice a vimentinei la nivelul celulelor epiteliale tubulare.

În cadrul evoluției parametrilor funcției renale, s-a observat în cadrul grupului ce nu a prezentat expresia epitelială tubulară a vimentinei asocierea cu o rată de filtrare glomerulară calculată prin formula MDRD cu o medie de 43.8 ± 14.5 ml/min/1.73m² mai mare comparativ cu grupul ce prezintă expresia vimentinei la nivel epitelial tubular ($p = 0.002$).

În cadrul acestui studiu, nu a fost observată prezența miofibroblaștilor la nivelul celulelor epiteliale tubulare ci, preponderent, la nivel interstițial, fiind observată de asemenea expresia miofibroblaștilor la nivel glomerular. Expresia interstițială a miofibroblaștilor fiind preponderent la nivelul ariilor de fibroză interstițială sau la nivelul ariilor adiacente expresiei vimentinei.

De asemenea, în cadrul acestui studiu a fost observată relația între expresia miofibroblaștilor și creșterea creatininei serice în perioada de urmărire. Astfel, existând o asociere negativă

între expresia imunohistochimică a α -SMA și variația creatininei serice în perioada de urmărire ($r = -0.23$, $p = 0.01$).

Expresia imunohistochimică a macrofagelor nu a fost observată la nivelul capilarelor glomerulare sau la nivelul celulelor epiteliale tubulare. Intervalul imunoexpresiei CD-68 la nivel interstițial s-a situat între 0.4 și 11.2 celule pozitive/câmp.

În cadrul grupului de pacienți ce au prezentat creșterea creatininei serice, în perioada de urmărire, s-a observat expresia unui număr mai mare de celule CD-68 pozitive cu o medie de 5.5 ± 3.2 celule pozitive comparativ cu grupul ce nu a înregistrat creșterea creatininei în perioada de urmărire ($p = 0.04$).

Un aspect important, observat în cadrul acestui studiu, a fost reprezentat de asocierea unei imunoexpresii a celulelor CD-68 pozitive mai mari în cadrul pacienților ce nu au fost tratați cu analogi sau substituenți de vitamina D cu o medie de 6.4 ± 2.1 celule/câmp comparativ cu lotul ce a primit tratament cu vitamina D ($p = 0.02$).

Nu a fost observată prezența markerilor de proliferare la nivelul celulelor epiteliale tubulare sau la nivel interstițial.

În cadrul analizei multivariate nu a fost găsită o relație între expresia miofibroblaștilor și vimentinei și parametrii clinici evaluați precum: vârsta, sexul masculin sau prezența mai multor factori de risc cardiovasculari.

Analizând însă, eficacitatea diagnostică a expresiei vimentinei în predictivitatea evoluției funcției renale, numai acest marker imunohistochimic a demonstrat o specificitate și sensibilitate diagnostică, semnificativă statistic, chiar și la un nivel scăzut al expresiei, pentru creșterea creatininei serice $> 25\%$ T0, în perioada de urmărire (AUC 0.680, $p = 0.0026$).

II.3.3. Discuții

Expresia tubulară a vimentinei s-a observat a fi importantă pentru prognosticul progresiei funcției renale atunci când expresia sa este asociată cu infiltrarea interstițială de miofibroblaste.

În cadrul acestui studiu, expresia vimentinei s-a asociat atât cu gradul disfuncției renale de la momentul biopsiei, dar, de asemenea, reprezintă și un puternic factor predictiv al evoluției parametrilor funcției renale în perioada de urmărire.

În plus, prezența vimentinei tubulare a prezentat o asociere cu expresia infiltratului inflamator, indicând faptul că atât evenimentele inflamatorii cât și cele relaționate cu TEM

sunt strâns legate între ele și, eventual, reprezintă etape diferite în aceeași secvență patogenică, rezultatul final fiind deteriorarea progresivă a funcției renale [95].

În conformitate cu aceste rezultate, un studiu anterior a raportat o asociere între modificările fenotipului tubular, numărul de leucocite interstițiale, gradul de fibroză interstițială și expresia parametrilor funcției renale, respectiv, nivelul creatininei serice [96].

Cu toate acestea, trebuie subliniat faptul că, deși a fost observată, în cadrul diverselor studii, asocierea între TEM, fibroza tubulo-interstițială cronică și deteriorarea cronică a funcției renale, nu au fost găsite încă dovezi pentru a susține rolul de cauzalitate al TEM în declinul ratei de filtrare glomerulară, deoarece, nu au fost găsite, până în prezent, terapii care să modifice evoluția TEM.

De asemenea, expresia interstițială a miofibroblastelor este demonstrată ca factor predictiv al evoluției funcției renale, în cadrul biopsiilor renale de protocol, efectuate la mai puțin de 12 luni post-transplant [94].

Este important de remarcat faptul că asocierea între expresia miofibroblaștilor și vimentina pe de o parte, și evoluția funcției renale pe de altă parte, a fost independentă de nivelul creatininei serice sau proteinurei/24h la momentul biopsiei renale. Pe baza acestor rezultate, este clar că o utilizare mai largă a acestor markeri poate reprezenta un element important în prognosticul evoluției funcției renale.

Un alt aspect important descris în cadrul studiului imunohistochimic, a fost reprezentat de evaluarea imunoexpresiei macrofagelor la nivel interstițial, această expresie fiind asociată cu progresia leziunilor cronice la nivelul biopsiei renale.

Multiple studii au descris nefropatiile glomerulare sau interstițiale ca fiind caracterizate prin acumularea macrofagelor la nivel interstițial, acest proces poate deveni cronic și poate determina stimularea producției continue de factori de creștere similar procesului de cicatrizare [99,100].

Asocierea între expresia tubulară a vimentinei și infiltrarea miofibroblastelor, în cadrul studiului imunohistochimic nu a fost demonstrată a fi un proces de tranziție epiteliomezenchimală (TEM), respectiv, în cadrul analizei histopatologice a secțiunilor nu a fost observată întreruperea membranei bazale tubulare.

Deși în cadrul prezentului studiu nu a fost investigată originea miofibroblastelor la nivel interstițial, asocierea infiltrării miofibroblaștilor și macrofagelor la nivelul ariilor cu fibroză incipientă pledează pentru posibila origine duală a acestor celule fie de la nivelul fibroblastelor locale fie origine sistemică din cadrul celulelor derivate din măduva osoasă. Aceste observații sunt în concordanță cu studiul lui Yu și colab. care neagă prezența unui

proces de transdiferențiere epitelio-mezenchimală la nivel tubulo-interstițial în cadrul evoluției procesului de fibroză renală [102].

IV.CONCLUZII

1. În ceea ce privește distribuția populației pe sexe, s-a observat, atât în cadrul studiului clinico-statistic cât și în cazul studiului imunohistochimic, o incidență crescută a sexului masculin, în anumite categorii de vârstă. După vârsta de 60 de ani s-a observat predominanța sexului feminin în cadrul pacienților cu indicație de efectuare a puncției biopsie renală.

2. În cadrul studiului clinico-statistic efectuat într-un lot de pacienți cu etiologie diferită a afectării renale s-a observat că efectuarea puncției biopsie renală la o rată de filtrare glomerulară cât mai mare a fost asociată cu o mai bună supraviețuire respectiv mai puține cazuri în care s-a inițiat terapia de substituție a funcției renale.

3. În cazul pacienților cu diabet și proteinurie/24h > 3g s-a constatat un număr mai mic de cazuri cu indicație de efectuare a puncției biopsie renală incluse în studiu comparativ cu cazurile cu funcție renală modificată, eRFG calculată prin formula $MDRD < 90 \text{ml/min/1.73m}^2$ și proteinurie de rang nefrotic.

4. În analiza factorilor implicați în evoluția patologiei renale un aspect important l-a reprezentat puterea predictivă a nivelului creatininei serice la momentul biospiei renale, iar scăderea ratei de filtrare glomerulară în perioada de urmărire a reprezentat un element predictiv pentru inițierea terapiei de substituție a funcției renale.

5. În cadrul studiului clinico-statistic a fost descrisă de asemenea importanța tratamentului cu suplimente sau analogi ai vitaminei D, atât la momentul biospiei cât și în perioada de urmărire. A fost observată asocierea negativă între sindromul inflamator biologic și tratamentul cu vitamina D, însă nu a fost observată nici o îmbunătățire în evoluția bolii cronice de rinichi în cadrul tratamentului cu vitamina D.

6. Impactul inflamației asupra funcției renale reflectă asocierea cu afecțiuni progresive, ce prezintă markeri histo-patologici de inflamație exprimați atât în zonele cu fibroză interstițială cât și în zonele fără fibroză, susținând afirmația că declinul funcției renale nu are drept cauză fiziopatologică principală procesul inflamator independent.

7. Coeficientul de fibroză interstițială determinat prin studiul morfometric reprezintă un factor predictiv pentru declinul funcției renale.

8. În ceea ce privește fibroza periglomerulară, a fost observată asocierea între expresia fibrozei periglomerulare și glomeruloscleroză.

9. De asemenea, în cadrul studiului imunohistochimic a fost confirmată importanța evaluării infiltrării inflamatorii interstițiale în fazele precoce ale dezvoltării procesului de fibroză interstițială.

10. Un alt aspect important descris în cadrul studiului imunohistochimic, a fost reprezentat de evaluarea imunoexpresiei macrofagelor la nivel interstițial, această expresie fiind asociată cu progresia leziunilor cronice la nivelul biopsiei renale.

11. Expresia tubulară a vimentinei s-a observat a fi importantă pentru prognosticul progresiei funcției renale atunci când expresia sa este asociată cu infiltrarea interstițială de miofibroblaste.

12. În cadrul acestui studiu, expresia vimentinei s-a corelat atât cu gradul disfuncției renale de la momentul biopsiei, dar, de asemenea, reprezintă și un puternic factor predictiv al evoluției funcției renale în perioada de urmărire.

13. În cadrul studiului imunohistochimic, expresia α -SMA nu a fost găsită la nivelul celulelor epiteliale tubulare, ci numai în compartimentul interstițial în zonele cu un grad mai mare de fibroză tubulo-interstițială, depuneri de colagen, precum și în apropiere de celulele epiteliale tubulare ce exprimă vimentina.

14. Este important de remarcat faptul că asocierea între expresia miofibroblaștilor și vimentină pe de o parte, și evoluția funcției renale pe de altă parte, a fost independentă de nivelul creatininei serice sau proteinuria/24h.

15. Un aspect important observat în cadrul studiului imunohistochimic a fost reprezentat de asocierea între infiltrarea interstițială macrofagică și tratamentul cu vitamina D sau analogi ai vitaminei D.

16. Un aspect original descris în cadrul acestui studiu, îl reprezintă asocierea între expresia morfometrică a markerilor histologici ce descriu relația epitelio-mezenchimală de la nivelul ariei tubulo-interstițiale renale și evoluția funcției renale.

17. Expresia imunohistochimică a markerilor epiteliali și mezenchimali la nivelul ariei tubulo-interstițiale, reprezintă factori importanți de prognostic al evoluției funcției renale.

V.BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Spach KM, Pedersen LB, Nashold FE, Kayo T, Yandell BS, Prolla TA, and Hayes CE. Gene expression analysis suggests that 1,25- dihydroxyvitamin D3 reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by stimulating inflammatory cell apoptosis. *Physiol Genomics* , 2004, 18:141–151.
2. Hullett DA, Cantorna MT, Redaelli C, Humpal-Winter J, Hayes CE, Sollinger HW, and Deluca HF. Prolongation of allograft survival by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Transplantation* , 1998, 66: 824–828.
3. Aschenbrenner JK, Sollinger HW, Becker BN, and Hullett DA. 1,25-(OH)2D3 alters the transforming growth factor beta signaling pathway in renal tissue. *J Surg Res* , 2001, 100: 171–175.
4. Yanagisawa J, Yanagi Y, Masuhiro Y, Suzawa M, Watanabe M, Kashiwagi K, Toriyabe T, Kawabata M, Miyazono K, and Kato S. Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators. *Science*, 1999, 283: 1317–1321.
5. U S Renal Data System, *USRDS 2011 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States*, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2011
6. National Kidney Foudation. *K/DOQI Clinical practice guideleines for chronic kidney disease evaluation, classification and stratification*. *Am J Kidney Dis*. 2002, 39(2): S1-S266.
7. Covic A, Schiller A, Constantinescu O, Bredețean V, Mihăescu A, Olariu N, Seica A, Cepoi V, Gusbeth-Tatomir P. Stage 3-5 chronic kidney disease--what is the real prevalence in Romania? *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2008 , 112(4):922-31.
8. Coresh J, Astor BC, Greene T, Eknoyan G, Levey AS. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis*. 2003, 41(1):1-12.
9. Coresh J, Byrd-Holt D, Astor BC, Briggs JP, Eggers PW, Lacher DA, Hostetter TH. Chronic kidney disease awareness, prevalence, and trends among U.S. adults, 1999 to 2000. *J Am Soc Nephrol*. 2005, 16(1):180-8.
10. Renal Disease Subcommittee of the American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Systemic Lupus Erythematosus Response Criteria: The American college of rheumatology response criteria for proliferative and membranous renal disease in systemic lupus erythematosus clinical trials. *Arthritis Rheum* 2006, 54:421–432.
11. Raportul Anual al Registrului Renal Român 2011. Ministerul Sănătății - Spitalul Clinic de Nefrologie „Dr Carol Davila”, București, România, 2012.
12. Racusen LC. Protocol transplant biopsies in kidney allografts: why and when are they indicated? *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006 Jan;1(1):144-7.
13. Bohle A, Strutz F , Muller GA: The role of tubulointerstitial injury in chronic renal failure. *Exp Nephrol*, 1994, 2 : 205-210.
14. Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest*. 2008 ;118(11):3522-30.

15. Duffield JS, Tipping PG, Kipari T, Cailhier JF, Clay S, Lang R, Bonventre JV, Hughes J. Conditional ablation of macrophages halts progression of crescentic glomerulonephritis. *Am J Pathol.* 2005;167(5):1207-19.
16. Eddy AA. Progression in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2005 Oct;12(4):353-65.
17. Schnoor M, Cullen P, Lorkowski J, Stolle K, Robenek H, Troyer D, Rauterberg J, Lorkowski S. Production of type VI collagen by human macrophages: a new dimension in macrophage functional heterogeneity. *J Immunol.* 2008; 180(8):5707-19.
18. Anders HJ, Frink M, Linde Y, Banas B, Wörnle M, Cohen CD, Vielhauer V, Nelson PJ, Gröne HJ, Schlöndorff D. CC chemokine ligand 5/RANTES chemokine antagonists aggravate glomerulonephritis despite reduction of glomerular leukocyte infiltration. *J Immunol.* 2003;170(11):5658-66.
19. Yang J, Reutzel-Selke A, Steier C, Jurisch A, Tullius SG, Sawitzki B, Kolls J, Volk HD, Ritter T. Targeting of macrophage activity by adenovirus-mediated intragraft overexpression of TNFRp55-Ig, IL-12p40, and vIL-10 ameliorates adenovirus-mediated chronic graft injury, whereas stimulation of macrophages by overexpression of IFN-gamma accelerates chronic graft injury in a rat renal allograft model. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Jan;14(1):214-25.
20. Bagnasco S, Racusen L. Proteinuria and Epithelial-to-Mesenchymal Transition: The Role of Complement. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20: 459-460.
21. Higgins D, Kimura K, Iwano M, Haase VH. Hypoxia-inducible factor signaling in the development of tissue fibrosis. *Cell Cycle.* 2008; 7: 1128-1132.
22. Horster MF, Braun GS, Huber SM: Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation. *Physiol Rev* , 1999, 79: 1157–1191.
23. Strutz F, Muller GA, Neilson EG: Transdifferentiation: A new angle on renal fibrosis. *Exp Nephrol*, 1996, 4: 267–270.
24. Lan HY: Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation mechanisms in proximal tubule cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens* , 2003, 12: 25–29.
25. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG: Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest*, 2002,110: 341–350.
26. A.S. Levey, J.P. Bosch, J.B. Lewis, T. Greene, N. Rogers and D. Roth. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group *Ann Intern Med* 1999, 130 (6): 461-70.
27. Kidney Disease Quality Outcomes Initiative: Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39(Suppl 1): S1: S266.
28. Waldman M, Crew RJ, Valeri A, Busch J, Stokes B, Markowitz G, D'Agati V, Appel G: Adult minimal-change disease: clinical characteristics, treatment, and outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007, 2:445–453.
29. Shiiki H, Dohi K: Primary focal segmental glomerulosclerosis: clinical course, predictors of renal outcome and treatment. *Intern Med* 2000, 39:606–611.
30. Tumlin JA, Madaio MP, Hennigar R: Idiopathic IgA nephropathy: pathogenesis, histopathology, and therapeutic options. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007, 2:1054–1061.
31. Salama AD, Levy JB, Lightstone L, Pusey CD: Goodpasture's disease. *Lancet* 2001, 358:917–920.

32. Alchi B, Jayne D: Membranoproliferative glomerulonephritis. *Pediatr Nephrol* 2010, 25:1409–1418.
33. Rose BD. Indications for and complications of renal biopsy, in Rose BD (ed): *UpToDate*. Wellesley, MA, UpTo-Date, Inc, 1998, pag. 147-205.
34. Covic A, Schiller A, Volovat C, Gluhovschi G, Gusbeth-Tatomir P, Petrica L, Caruntu ID, Bozdog G, Velciov S, Trandafirescu V, Bob F, Gluhovschi C: Epidemiology of renal disease in Romania: A 10-year review of two regional renal biopsy databases. *Nephrol Dial Transplant* , 2006, 21: 419–424.
35. Kobrin S, Madaio MP. Renal biopsy, in Jacobson HR, Striker GE, Klahr S (eds): *The Principles and Practice of Nephrology*. St Louis, MO, Mosby, 1996, pag. 65-71.
36. Yamagata K, Yamagata Y, Kobayashi M, Koyama A: A long-term follow-up study of asymptomatic hematuria and/or proteinuria in adults. *Clin Nephrol*, 1996, 45:281-288.
37. Tisher CG: Clinical indications for kidney biopsy, in Tisher CG, Brenner BM (eds): *Renal Pathology:With Clinical and Functional Correlations* (ed 2). Philadelphia, PA, Lippincott, 1994, pag. 75-84.
38. Andreucci VE, Fuiano G, Stanziale P, Andreucci M: Role of renal biopsy in the diagnosis and prognosis of acute renal failure. *Kidney Int* 1998 , 53 (suppl 66):S91-S95.
39. Mandache E, Gherghiceanu M, Serafinceanu C, Penescu M, Mircescu G, Myofibroblast involvement in tubular basement membrane remodeling in type II diabetic nephropathy, *Rom J Morphol Embryol*, 2011, 52(1):75–79.
40. Mandache E, Penescu M, Renal subcapsular tertiary lymphoid aggregates in chronic kidney diseases, *Rom J Morphol Embryol*, 2011, 52(4):1219–1225.
41. Bagnasco S, Racusen L. Proteinuria and Epithelial-to-Mesenchymal Transition: The Role of Complement. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20: 459-460.
42. Abbate M, Zoja C, Remuzzi G. How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 2974-2984.
43. Ruggenti P, Perna A, Remuzzi G, GISEN Group Investigators. Retarding progression of chronic renal disease: The neglected issue of residual proteinuria. *Kidney Int*. 2003; 63: 2254-2261.
44. Kobrin S, Madaio MP. Renal biopsy, in Jacobson HR, Striker GE, Klahr S (eds): *The Principles and Practice of Nephrology*. St Louis, MO, Mosby, 1996, pag. 65-71.
45. Morwah DS, Korbet SM: Timing of complications in percutaneous renal biopsy: What is the optimal period of observation? *Am J Kidney Dis*, 1996, 28:47-52.
46. Ponticelli C, Mihatsch MJ, Imbasciati E: Renal biopsy: Performance and interpretation, in Cameron JS, Davison AM (eds): *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*. Oxford University Press, 1992, pag. 141-175.
47. Glassock RJ, Massry SG: Renal biopsy, in Massry SG, Glassock RJ (eds): *Textbook of Nephrology* (ed 3). Baltimore, MD, Williams & Wilkins, 1995, pag. 1739-1743.
48. Nair R, Bell JM, Walker PD: Renal biopsy in patients aged 80 years and older. *Am J Kidney Dis*, 2004, 44: 618–626.
49. Haas M, Spargo BH, Wit EJ, Meehan SM: Etiologies and outcome of acute renal insufficiency in older adults: A renal biopsy study of 259 cases. *Am J Kidney Dis* , 2000, 35: 433– 447.
50. Rivera F, Lopez-Gomez JM, Perez-Garcia R: Clinicopathologic correlations of renal pathology in Spain. *Kidney Int* , 2004, 66: 898–904.

51. Schena FP: Survey of the Italian Registry of Renal Biopsies. Frequency of the renal diseases for 7 consecutive years. The Italian Group of Renal Immunopathology. *Nephrol Dial Transplant* , 1997, 12: 418–426.
52. ERA-EDTA Registry. Annual Report 2010. <http://www.era-edta-reg.org/files/annualreports/pdf/AnnRep2010.pdf> accesat în 20.Mai.2012.
53. Vendemia F, Gesualdo L, Schena FP, D'Amico G: Epidemiology of primary glomerulonephritis in the elderly. Report from the Italian Registry of Renal Biopsy. *J Nephrol*, 2001, 14: 340–352.
54. Glassock RJ: Glomerular disease in the elderly population. *Geriatr Nephrol Urol*, 1998, 8: 149–154.
55. Rychlik I, Jancova E, Tesar V, Kolsky A, Lacha J, Stejskal J, Stejskalova A, Dusek J, Herout V: The Czech registry of renal biopsies. Occurrence of renal diseases in the years 1994–2000. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19: 3040–3049.
56. Komatsuda A, Nakamoto Y, Imai H, Yasuda T, Yanagisawa MM, Wakui H, Ishino T, Satoh K, Miura AB: Kidney diseases among the elderly—A clinicopathological analysis of 247 elderly patients. *Intern Med*, 1993, 32: 377–381.
57. Moreso F, Ibernon M, Goma M, Carrera M, Fulladosa X, Hueso M, et al. Subclinical rejection associated with chronic allograft nephropathy in protocol biopsies as a risk factor for late graft loss. *Am J Transplant* 2006; 6: 747-752.
58. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000; 342: 605-612.
59. Artz MA, Hilbrands LB, Borm G, Assmann KJ, Wetzels JF. Blockade of the renin-angiotensin system increases graft survival in patients with chronic allograft nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 2852-2857.
60. Moreso F, Ibernon M, Goma M, Carrera M, Fulladosa X, Hueso M, et al. Subclinical rejection associated with chronic allograft nephropathy in protocol biopsies as a risk factor for late graft loss. *Am J Transplant* 2006; 6: 747-752.
61. Remuzzi A, Gagliardini E, Donadoni C, Fassi A, Sangalli F, Lepre MS, et al. Effect of angiotensin II antagonism on the regression of kidney disease in the rat. *Kidney Int* 2002; 62:885-894.
62. Jones C A, Mcquillan G M, Kusek JW. Serum creatinine levels in the US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis*, 1998, 32:992–999.
63. Hillege HL, Fidler V, Diercks GF, van Gilst WH, de Zeeuw D, van Veldhuisen DJ, Gans RO, Janssen WM, Grobbee DE, de Jong PE; Prevention of Renal and Vascular End Stage Disease (PREVEND) Study Group. Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and noncardiovascular mortality in general population. *Circulation* ,2002, 106:9037–9038.
64. Verhave JC, Gansevoort RT, Hillege HL, Bakker SJ, De Zeeuw D, de Jong PE; PREVEND Study Group. An elevated urinary albumin excretion predicts de novo development of renal function impairment in the general population. *Kidney Int Suppl*. 2004, (92):S18-21.
65. Spach KM, Pedersen LB, Nashold FE, Kayo T, Yandell BS, Prolla TA, and Hayes CE. Gene expression analysis suggests that 1,25-dihydroxyvitamin D3 reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by stimulating inflammatory cell apoptosis. *Physiol Genomics* , 2004, 18:141–151.

66. Hullett DA, Cantorna MT, Redaelli C, Humpal-Winter J, Hayes CE, Sollinger HW, and Deluca HF. Prolongation of allograft survival by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Transplantation*, 1998, 66: 824–828.
67. Mogoanta L, Popescu CF, Georgescu CV. Ghid de tehnici de histologie, citologie și imunohistochimie, Ed Med Univ 2007, IV:67-73, XV:233-299.
68. Image Pro Plus Reference Guide. MediaCybernetics, 2006, <http://web.uvic.ca/ail/techniques/IPReference.pdf>, accesat în Oct.2011.
69. Jennette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG (eds): *Heptinstall's Pathology of the Kidney*, Volumele 1 și 2, 6th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007, pag. 1271-1412.
70. Ellingsen AR, Nyengaard JR, Osterby R, Jorgensen KA, Petersen SE, Marcussen N: Measurements of cortical interstitium in biopsies from human kidney grafts: How representative and how reproducible? *Nephrol Dial Transplant*, 2002, 17: 788–792.
71. Weibel ER, Gomez DM: A principle for counting tissue structures on random sections. *J Appl Physiol*, 1962, 17:343-348.
72. Bertram JF: Analyzing renal glomeruli with the new stereology. *Int Rev Cytol*, 1995, 161:111-172.
73. Heptinstall RH. End-stage renal disease. In: Heptinstall RH, ed. *Pathology of the Kidney*. 4th ed. Boston, MA: Little, Brown & Co; 1992, pag: 713–777.
74. Covic A, Schiller A, Volovat C, Gluhovschi G, Gusbeth-Tatomir P, Petrica L, Caruntu ID, Bozdog G, Velciov S, Trandafirescu V, Bob F, Gluhovschi C. Epidemiology of renal disease in Romania: a 10 year review of two regional renal biopsy databases *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(2):419-24.
75. Gesualdo L, Di Palma AM, Morrone LF, Strippoli GF, Schena FP; Italian Immunopathology Group, Italian Society of Nephrology. The Italian experience of the national registry of renal biopsies. *Kidney Int*. 2004;66(3):890-4.
76. Rychlík I, Jancová E, Tesar V, Kolsky A, Lácha J, Stejskal J, Stejskalová A, Dusek J, Herout V. The Czech registry of renal biopsies. Occurrence of renal diseases in the years 1994-2000. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(12):3040-9.
77. Aloisi F, Pujol-Borrell R, Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases, *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(3):205–217.
78. Ruddle NH, Lymphoid neo-organogenesis: lymphotoxin's role in inflammation and development, *Immunol Res*, 1999, 19(2–3):119–125.
79. Hjelmström P, Lymphoid neogenesis: de novo formation of lymphoid tissue in chronic inflammation through expression of homing chemokines, *J Leukoc Biol*, 2001, 69(3):331–339.
80. Velázquez P, Dustin ML, Nelson PJ, Renal dendritic cells: an update, *Nephron Exp Nephrol*, 2009, 111(3):e67–e71.
81. Geissmann F, Auffray C, Palframan R, Wirrig C, Ciocca A, Campisi L, Narni-Mancinelli E, Lauvau G, Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses, *Immunol Cell Biol*, 2008, 86(5):398–408.
82. John R, Nelson PJ, Dendritic cells in the kidney, *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(10):2628–2635.
83. Edgton KL, Kausman JY, Li M, O'Sullivan K, Lo C, Hutchinson P, Yagita H, Holdsworth SR, Kitching AR, Intrarenal antigens activate CD4+ cells via co-stimulatory signals from dendritic cells, *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(3):515–526.
84. Fiore N, Castellano G, Blasi A, Capobianco C, Loverre A, Montinaro V, Netti S, Torres D, Manno C, Grandaliano G, Ranieri E, Schena FP, Gesualdo L, Immature

- myeloid and plasmacytoid dendritic cells infiltrate renal tubulointerstitium in patients with lupus nephritis, *Mol Immunol*, 2008, 45(1):259–265.
85. Segerer S, Heller F, Lindenmeyer MT, Schmid H, Cohen CD, Draganovici D, Mandelbaum J, Nelson PJ, Gröne HJ, Gröne EF, Figel AM, Nössner E, Schlöndorff D, Compartment specific expression of dendritic cell markers in human glomerulonephritis, *Kidney Int*, 2008, 74(1):37–46.
 86. Gluhovschi G, Gluhovschi C, Bob F, Velciov S, Trandafirescu V, Petrică L, Bozdog G, Immune compartments of the nephron in relation to the immune system, *Rom J Intern Med*, 2010, 48(1):17–31.
 87. Carragher DM, Rangel-Moreno J, Randall TD, Ectopic lymphoid tissues and local immunity, *Semin Immunol*, 2008, 20(1):26–42.
 88. Heller F, Lindenmeyer MT, Cohen CD, Brandt U, Draganovici D, Fischereeder M, Kretzler M, Anders HJ, Sitter T, Mosberger I, Kerjaschki D, Regele H, Schlöndorff D, Segerer S, The contribution of B cells to renal interstitial inflammation, *Am J Pathol*, 2007, 170(2):457–468.
 89. Dumoulin A, Hill GS, Montseny JJ, Meyrier A. Clinical and morphological prognostic factors in membranous nephropathy: Significance of focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 2003;41:38-48.
 90. Okoń K, Sułowicz W, Smoleński O, Sydor A, Chruściel B, Kirker-Nowak A, Rosiek Z, Sysło K, Stachura J. Predicting kidney function from renal biopsy. Semi quantitative versus quantitative approach. *Pol J Pathol*. 2007;58(2):65-71.
 91. Shimizu A, Yamada K, Sachs DH, Colvin RB: Persistent rejection of peritubular capillaries and tubules is associated with progressive interstitial fibrosis. *Kidney Int*, 2002, 61: 1867–1879.
 92. Willis BC, Boroc Z. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 293: L525-L534.
 93. Liu Y. Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Fibrogenesis: Pathologic Significance, Molecular Mechanism, and Therapeutic Intervention. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15: 1-12.
 94. Badid C, Desmouliere A, Babici D, Hadj-Aissa A, McGregor B, Lefrancois N, Touraine JL, Laville M. Interstitial expression of alpha-SMA: an early marker of chronic renal allograft dysfunction. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(11):1993-8.
 95. Gago M, Cornell LD, Kremers WK, Stegall MD, Cosio FG. Kidney allograft inflammation and fibrosis, causes and consequences. *Am J Transplant*. 2012;12(5):1199-207.
 96. Rastaldi MP, Ferrario F, Giardino L, Dell'Antonio G, Grillo C, Grillo P, Strutz F, Müller GA, Colasanti G, D'Amico G. Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney Int*. 2002;62(1):137-146.
 97. Mandache E, Gherghiceanu M, Serafinceanu C, Penescu M, Mircescu G, Myofibroblast involvement in tubular basement membrane remodeling in type II diabetic nephropathy, *Rom J Morphol Embryol*, 2011, 52(1):75–79.
 98. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Chapman JR, Allen RD. Delta analysis of posttransplantation tubulointerstitial damage. *Transplantation*, 2004, 78(3):434-41.
 99. Weitkamp B, Cullen P, Plenz G, Robenek H, Rauterberg J. Human macrophages synthesize type VIII collagen in vitro and in the atherosclerotic plaque. *FASEB J.*, 1999, 13(11):1445-1457.
 100. Wyburn K, Wu H, Yin J, Jose M, Eris J, Chadban S. Macrophage-derived

interleukin-18 in experimental renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant.*, 2005, 20(4):699-706.

101. Rigby WFC, Waugh M, Graziano RF: Regulation of monocyte HLA-DR and CD4 expression and antigen presentation by 1.25-dihydroxyvitamin D3, *Blood* , 1990, 76:189-194.
102. Ru Y, Eyden B, Curry A, McWilliam LJ, Coyne JD, Actin filaments in human renal tubulo-interstitial fibrosis: significance for the concept of epithelial-myofibroblast transformation, *J Submicrosc Cytol Pathol*, 2003, 35(3):221–233.