

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

**Cercetări exploratorii de anatomie structurală și
moleculară a aparatului urinar**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. RUSU MUGUREL CONSTANTIN**

**Student-doctorand:
dr.Dobra Mihai-Adrian**

2018

Cuprinsul tezei de doctorat

INTRODUCERE	5
PARTEA GENERALĂ A TEZEI DE DOCTORAT.....	8
1 MORFOGENEZA APARATULUI URINAR	9
2 ELEMENTE DE ANATOMIE A APARATULUI URINAR	22
3 ANATOMIA MICROSCOPICĂ A RINICHILUI	34
3.1 ELEMENTE DE HISTOLOGIE RENALĂ.....	34
3.2 ANATOMIA MICROSCOPICĂ A TUBILOR RENALI	35
3.2.1 <i>Tubul contort proximal</i>	35
3.2.2 <i>Tubul contort distal</i>	36
3.2.3 <i>Ansa Henle</i>	36
3.2.4 <i>Tubul colector</i>	37
4 ANATOMIA MICROSCOPICĂ A CĂILOR URINARE	38
4.1 ANATOMIA MICROSCOPICĂ A CĂILOR URINARE INTRASINUSALE RENALE	38
4.2 ANATOMIA MICROSCOPICĂ A URETERULUI	39
4.2.1 <i>Microstructura mușchiului neted</i>	40
4.3 ANATOMIA MICROSCOPICĂ A VEZICII URINARE	41
4.4 ANATOMIA MICROSCOPICĂ A URETREI	43
4.5 NIȘA STEM UROTELIALĂ	43
PARTEA PERSONALĂ A TEZEI DE DOCTORAT.....	47
5 CERCETĂRI EXPLORATORII ALE NIȘEI URETERALE	48
5.1 INTRODUCERE.....	48
5.1.1 <i>Telocitele ureterale</i>	48
5.1.2 <i>Teaca ureterală Waldeyer</i>	48
5.1.3 <i>Celule neuroendocrine ureterale</i>	49
5.2 MATERIAL ȘI METODE.....	49
5.2.1 <i>Material biologic</i>	49
5.2.2 <i>Imunohistochimie</i>	50
5.2.2.1 Pregătirea lamelor de microscopie	50
5.2.2.2 Anticorpii primari utilizați	50
5.2.2.3 Prepararea lamelor de imunohistochimie.....	51
5.2.2.4 Documentarea rezultatelor	52
5.2.3 <i>Microscopia electronică de transmisie</i>	53
5.3 REZULTATE.....	53
5.3.1 <i>Aprecierea histologică a structurii ureterale</i>	53
5.3.2 <i>Nișele stromală și urotelială ale ureterului – evaluarea imunohistochimică</i>	53
5.3.2.1 Imunomarcarea ureterului cu anticorpi anti-citokeratina 7	53
5.3.2.2 Imunoexpresia ureterală a receptorului c-kit	54
5.3.2.3 Imunomarcarea ureterului cu anticorpi anti-nestină.....	55
5.3.2.4 Expresia enolazei neuron-specifice (NSE) în ureter.....	57
5.3.2.5 Expresia markerilor mioizi în ureter	59
5.3.2.5.1 Alfa-actina mușchiului neted.....	59
5.3.2.5.2 Lanțul greu al miozinei mușchiului neted.....	60
5.3.2.5.3 Desmina	61

5.3.2.6	Expresia markerilor endoteliali în ureter	62
5.3.2.6.1	Endogлина (CD105)	62
5.3.2.6.2	CD34	63
5.3.2.6.3	Factorul von Willebrand	64
5.3.2.6.4	CD31	65
5.3.2.7	Expresia ureterală a vimentinei	66
5.3.2.8	Expresia ureterală a CD68	66
5.3.2.9	Expresia ureterală a CD45	66
5.3.2.10	Imunoexpresia c-erbB-B2 (HER2) în ureter	66
5.3.3	<i>Nișa tisulară ureterală – evaluarea în microscopia electronică de transmisie</i>	68
5.3.3.1.1	Evaluarea anatomică ultrastructurală a peretelui ureteral	68
5.4	DISCUȚII	73
5.4.1	<i>Telocitele ureterale</i>	73
5.4.1.1	Fenotipul molecular al telocitelor tunicii musculare a ureterului	76
5.4.1.2	Expresia ureterală a enolazei neuron-specifice (NSE), celulele neuroendocrine ureterale .	76
5.4.1.2.1	Expresia enolazei neuron-specifice în epiteliu	77
5.4.1.2.2	Expresia enolazei neuron-specifice în uroteliu	77
5.4.1.2.3	Expresia pericitară a enolazei neuron-specifice	79
5.4.1.2.4	Expresia enolazei neuron-specifice în celule stromale	79
5.4.1.2.4.1	Expresia NSE în celule stromale rotunde	79
5.4.1.2.4.2	Expresia NSE în celule stromale cu morfologie fibroblastoidă/telocitară	80
5.4.1.2.5	Expresia enolazei neuron-specifice în celulele endoteliale	80
5.4.1.2.6	Celulele neuroendocrine ureterale	82
5.4.1.3	Expresia ureterală a c-kit	82
5.4.1.3.1	Expresia intraepitelială a receptorului c-kit	82
5.4.1.3.2	Celule interstițiale Cajal-like în tractul urinar	85
5.4.1.4	Fenotipuri mioide ureterale	85
5.4.1.4.1	Fenotipul mioid urotelial	86
5.4.2	<i>Fenotipul mioid adventicial al ureterului – teaca Waldeyer</i>	86
6	ANATOMIA MOLECULARĂ ȘI ULTRASTRUCTURALĂ A NIȘELOR EPITELIALĂ ȘI STROMALĂ RENALE	88
6.1	INTRODUCERE	88
6.2	MATERIAL ȘI METODĂ	89
6.2.1	<i>Material biologic</i>	89
6.2.2	<i>Metoda imunohistochimică</i>	90
6.2.2.1	Pregătirea lamelor de microscopie	90
6.2.2.2	Anticorpii primari utilizați	90
6.2.2.3	Prepararea lamelor de imunohistochimie	91
6.2.2.4	Documentarea rezultatelor	92
6.2.3	<i>Microscopia electronică de transmisie</i>	92
6.3	REZULTATE	93
6.3.1	<i>Telocitele renale – studiul imunohistochimic</i>	93
6.3.2	<i>Anatomia ultrastructurală a componentei mioide renale</i>	100
6.3.2.1	Nișa epitelială tubulară	100
6.3.2.2	Componenta mioidă a epiteliului tubular – aparat sfincterian tubular	101
6.3.2.3	Celulele interstițiale mioide peritubulo-endoteliale	103
6.3.2.4	Celulele mioide juxtaglomerulare	107
6.3.2.5	Celulele mioide parietale ale capsulei Bowman	109
6.3.2.6	Celulele endoteliale glomerulare și podocitele cu fenotip mioid	109
6.3.2.7	Celulele mioide slab diferențiate ale corpusculilor renali	111
6.4	DISCUȚII	111
6.4.1	<i>Cercetări asupra anatomiei moleculare în nișa renală</i>	111

6.4.1.1	Anatomia moleculară a celulelor stromale/telocitelor renale	111
6.4.1.2	Markerii neuronali în nișa renală	116
6.4.1.3	Expresia renală a miozinei.....	118
6.4.1.4	Expresia CD31 în nișa renală	118
6.4.1.5	Expresia c-kit în nișa renală.....	121
6.4.2	<i>Particularități structurale la nivelul corpusculului renal</i>	<i>122</i>
6.4.3	<i>Cilii primari din epiteliul tubular.....</i>	<i>122</i>
6.4.4	<i>Componenta mioidă a tubilor proximal și distal</i>	<i>123</i>
6.4.5	<i>Celule interstițiale mioide ale rinchiului</i>	<i>125</i>
6.4.6	<i>Proteinele contractile ale celulelor mezangiale</i>	<i>126</i>
6.4.7	<i>Fenotipul celulelor polkissen</i>	<i>127</i>
6.4.8	<i>Elemente citoscheletale în celulele membranei de filtrare</i>	<i>128</i>
6.4.8.1	Fenotipul mioid endotelial	129
6.4.8.2	Componenta mioidă a epiteliului parietal al capsulei Bowman	130
6.4.8.3	Celulele secretorii juxtaglomerulare	131
6.4.9	<i>Celulele peripolare</i>	<i>131</i>
6.4.10	<i>Potențialul regenerativ renal.....</i>	<i>132</i>
6.4.10.1	Celule stem/progenitoare la nivel tubular	132
6.4.10.2	Celule stem/progenitoare la nivel glomerular	133
6.4.10.3	Progenitorii mezangiali	134
7	CONCLUZII.....	136
	BIBLIOGRAFIE	138
	ANEXA 1 – INDEX DE FIGURI ÎN TEXT	152
	ANEXA 2 – INDEX DE TABELE ÎN TEXT	158
	ANEXA 3 – DREPTURI DE REPRODUCERE	159

INTRODUCERE

Uroteliul reprezintă un epiteliu specializat al tractului urinar distal, fiind esențial pentru excreția în siguranță a urinei ¹. Uroteliul este important și din punct de vedere medical, deoarece, pe de o parte, infecțiile uropatogene sunt probabil cele mai frecvente și costisitoare boli infecțioase de pe glob și, pe de altă parte, carcinomul urotelial este asociat cu o morbiditate însemnată iar diagnosticul acestuia este unul din cele mai costisitoare diagnostice de cancer ¹. Atât uroteliul normal cât și cel modificat funcționează pe principii biologice similare ¹. Celulele stem uroteliale joacă un rol principal în menținerea homeostaziei normale a uroteliului ¹.

Tumorile neuroendocrine ureterale sunt rare iar etiologia acestora este incertă. Printre markerii imunohistochimici specifici tumorilor neuroendocrine este enolaza neuron-specifică. Am adus evidențe în microscopia electronică de transmisie a existenței celulelor neuroendocrine în ureterul uman adult, care susțin ipoteza originii locale a tumorilor neuroendocrine ureterale.

În perioada modernă cercetările din domeniul medical urmăresc să aprecieze valoarea celulelor stem adulte în medicina regenerativă. Din această perspectivă se caută, prin diverse metode, să se identifice celule stem renale endogene, astfel de caracterizări fiind destul de puține la om însă incluzând diferite tipuri celulare rezidente ale rinichiului, inclusiv podocitele ². Cu acest background, cercetările mele asupra nișelor stem renourinare au un caracter explorator neîndoielnic.

Sursa de celule stem endogene ale rinichiului ar putea fi epiteliiul tubular sau papila renală; celulele parietale ale capsulei Bowman funcționează precum celule stem în glomeruli și pot forma podocite și celule tubulare proximale ³. Celulele epiteliale devin celule stem mezenchimale prin procese de transformare epitelial-mezenchimală ³. Celulele stem derivate din urină (UDC) reprezintă o nișă de cercetare care a început destul de recent să fie explorată; se pot diferenția în celule ale liniilor endotelială, osteogenică, condrogenică, adipogenică, miogenică scheletică și neurogenică ⁴. Identificarea originii UDC ar putea facilita înțelegerea impactului acestei populații la nivelul tractului urinar. Evidențele acumulate indică faptul că aceste UDC ar proveni probabil din celule epiteliale parietale ale capsulei Bowman ³. Am adus evidențe ce indică faptul că mai degrabă UDC ar putea proveni din epiteliiile tubulare, și nu din epiteliiul parietal al capsulei Bowman.

Într-un studiu publicat în 1994 în jurnalul Societății Americane de Nefrologie ⁵ se discută consecința identificării expresiei consistente a filamentelor mioide în interstițiul renal, care sugerează că rinichiul ar putea funcționa precum un organ contractil, în condiții normale sau patologice. De asemenea se constată că în prezent această ipoteză este extrem de slab susținută de datele rezultate din cercetări și se comentează că în absența unor rețele mioide organizate, precum în pereții vasculari sau în organe cavitare, aceste structuri ar putea să nu performeze o activitate contractilă ⁵. Autorii respectivi comentează ⁵ despre necesitatea unor noi studii ultrastructurale, pe care eu le-am asumat ca scop al uneia dintre direcțiile mele de cercetare, studii care să clarifice aceste aspecte privind funcția contractilă renală. Este de asemenea adus în discuție ⁵ un studiu pe iepuri ⁶ care a identificat faptul că în nefropatia obstructivă crește cantitatea de celule interstițiale mușchi neted-like, condiție în care rinichiul și-ar putea mări capacitatea contractilă generală. Rezultatele mele, care indică o posibilă muscularizare a celulelor endoteliale

pot răspunde și necesității unor rețele mioide organizate, și posibilei derivări de celule interstițiale mioide prin transformare endotelial-mezenchimală.

Neonefrogeneza reprezintă capacitatea de a regenera țesut renal, caracteristică peștilor dar încă în stadiul incipient al cercetării la mamifere ⁷. Cercetarea aceasta specifică trebuie să răspundă la trei chestiuni, dacă celulele diferențiate terminal din rinichi au capacitate regenerativă, dacă în rinichi există progenitori multipotenți și dacă reparația renală este facilitată de celule cu origine extrarenală care populează postlezional rinichiul ⁷. Rezultatele mele indică prezența, fără îndoială, a unei populații rezidente a rinichiului cu fenotip slab diferențiat, deci având un posibil potențial regenerativ.

Atunci când funcțiile fiziologice ale rinichiului sunt pierdute, opțiunile terapeutice sunt de dializă sau transplant, dar acestea sunt limitate de numărul redus de donatori, de limitele dializei și de aceea se discută fezabilitatea implantării de celule stem/progenitoare care să asigure regenerarea parenchimului renal ⁸. Deși acest concept sună promițător sunt încă necesare cercetări care să permită depășirea unor obstacole biomedicale precum ineficiența implantării determinată de inflamația locală, matricea extracelulară degradată, metabolismii toxici, nutriția defectuoasă și hipoxia, care reduc prognoza de supraviețuire a celulelor stem ⁸.

Pentru realizarea cercetărilor mele de doctorat am pornit de la ipoteza existenței nișelor stem renourinare și, în cadrul acestora, a telocitelor. Am avut astfel ca scop documentarea adecvată pe referențial a morfogenezei și anatomiei aparatului urinar și realizarea de cercetări exploratorii, de anatomie moleculară și ultrastructurală, a ureterului și rinichiului, pentru caracterizarea nișelor stem ureterală și renală.

CERCETĂRI EXPLORATORII ALE NIȘEI URETERALE

1.1 INTRODUCERE

Telocitele (TC) au fost definite din anul 2010 de Popescu și Faussone-Pellegrini care au indicat o caracteristică particulară a acestora, telopodele ⁹. Aceste telopode sunt prelungiri celulare lungi, subțiri și moniliforme, cu dilatații numite podoame și segmente subțiri numite podomere ¹⁰⁻¹². Diverse studii au arătat că subseturi de TC cu diverse roluri funcționale populează diferite țesuturi ^{11, 13-20} și formează de regulă rețele stromale ^{11, 21, 22}. Lipsa de uniformitate în descrierea TC se datorează în bună parte faptului că aceste celule sunt definite pe baze morfologice, fenotipul lor molecular fiind extrem de versatil în publicații ²³. În țesuturile adulte TC ar putea fi privite precum celule mezenchimale stromale care au capacitatea de a da naștere la diverse tipuri celulare de celule stromale rezidente diferențiate ²⁴. Un marker de încredere care poate demonstra TC, deși specific și altor tipuri celulare ^{13, 25-29}, este CD34 ^{20, 30-34}. Fenotipul molecular al TC este însă țesut-specific ²⁰. Sunt puține studiile care au apreciat TC în nișa renală și în tractul urinar ³⁵⁻⁴². Unele dintre acestea au evaluat TC urinare prin imunohistochimie ^{40, 41, 43} însă expresia CD 34 în acestea este controversată, fie pozitivă ⁴⁰, fie negativă ⁴¹. Din referențial a rezultat ipoteza că subseturi de TC urinare sunt colocalizate în ureterul uman iar scopul cercetării a fost de a realiza un studiu imunohistochimic care să testeze această ipoteză ²³.

Waldeyer (1892) (cit. în ⁴⁴) a introdus termenul „*Ureterscheide*” pentru a identifica o teacă fibromusculară a ureterului distal, juxtavezical ⁴⁵. Această structură fusese

raportată anterior de Krause (1876) (cit. în ^{46,47}) precum o extensie a musculaturii vezicale în jurul porțiunii distale a ureterului ⁴⁵. Sunt diferite dispute privind originea ureterală sau vezicală a țesutului muscular din alcătuirea tecii lui Waldeyer. De aceea am urmărit să apreciez în anatomia microscopică învelișurile musculare ale ureterului proximal, pentru a verifica dacă include, sau nu, o astfel de teacă fibromusculară ⁴⁵. Faptul că ureterul proximal ar putea avea o astfel de teacă fibromusculară a fost sugerat de studiile mele prin disecție (**fig.2-2**).

Enolaza neuron-specifică (NSE, Neuron-Specific Enolase) este un marker folosit de regulă pentru a identifica neuroni și celule neuroendocrine ⁴⁸⁻⁵¹. Antigenul însă exprimat în diverse țesuturi normale și patologice ^{19, 49, 52}, ceea ce face discutabilă specificitatea strict neuronală a markerului⁵². Uroteliul, prezent în tractul urinar și în ductele glandulare ale prostatei, conține un strat bazal de celule indicate precum celule stem uroteliale ¹. Un subset de celule uroteliale bazale sunt marcate specific cu CD44 și a fost demonstrat faptul că celulele epiteliale bazale de la nivelul prostatei care exprimă CD44 sunt celule neuroendocrin-like ⁵³. Acest lucru favorizează teoria precursorilor epiteliali neuroendocrini locali, la nivelul uroteliului, împotriva ipotezei originii celulelor neuroendocrine ale tractului urinar din creasta neurală ⁵³. Conceptul comun actual este că ureterul nu are celule neuroendocrine, ceea ce creează polemici privind patogeniza tumorilor neuroendocrine ureterale ⁵⁴. Am căutat ca prin cercetările mele, atât de imunohistochimie, cât și prin microscopie electronică de transmisie, să apreciez dacă, sau nu, ureterul conține celule neuroendocrine rezidente.

1.2 MATERIAL ȘI METODE

Am folosit (studiu retrospectiv, material biologic arhivat) probe tisulare de ureter proximal, obținute de la 20 pacienți umani adulți (sex ratio 3:2) după nefrectomii. Consimțământul informat pentru utilizarea probelor tisulare a fost obținut de la pacienți preoperator. Toate experimentele au fost realizate în acord cu Declarația de la Helsinki, revizia Rio de Janeiro <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index>.

Imunohistochimia

Am folosit anticorpi primari pentru CD117/c-kit, factorul von Willebrand, CD 105, CD31, CD34, CD45, CD68, c-erbB2, citokeratina 7, nestină, vimentină, α -actina mușchiului neted, desmină, enolaza neuron-specifică, și lanțul greu de miozină din mușchiul neted.

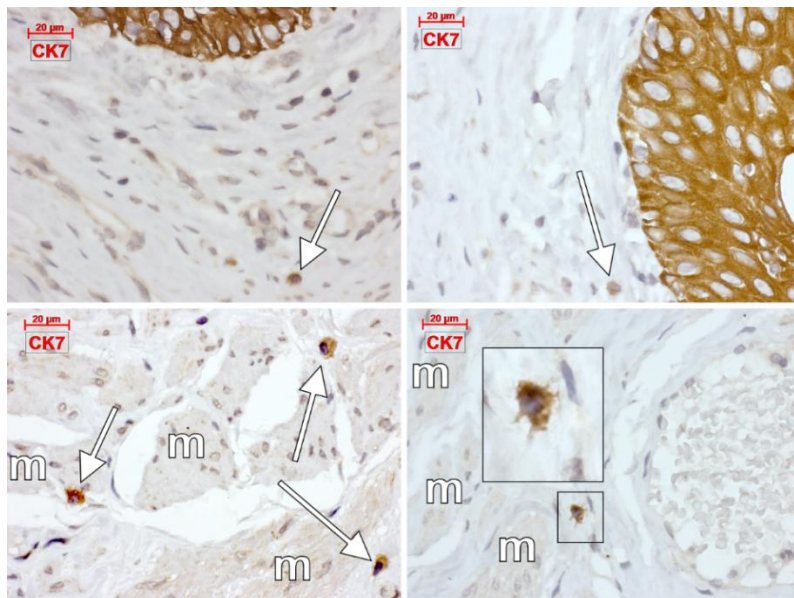
Microscopia electronică de transmisie

Pentru explorare în TEM fragmentele tisulare de circa 1-2 mm³ au fost prefixate specific și examinate într-un microscop electronic Philips EM 208S operat la un voltaj de accelerare de 80 kV. A fost utilizat un sistem de achiziție a imaginilor compus dintr-o cameră video Veleta și un software, iTEM Olympus Soft Imaging System.

1.3 REZULTATE

Pe preparatele histologice colorate cu hematoxină-eozină am identificat componentele structurale ureterale. Mucoasa ureterală este formată dintr-un epiteliu tranzițional sau uroteliu și din lamina propria subiacentă. Tunica musculară a ureterului a prezentat straturi longitudinale extern și intern, separate printr-un strat muscular neted circular. La exterior am identificat adventicea ureterului care a părut a îngloba un strat

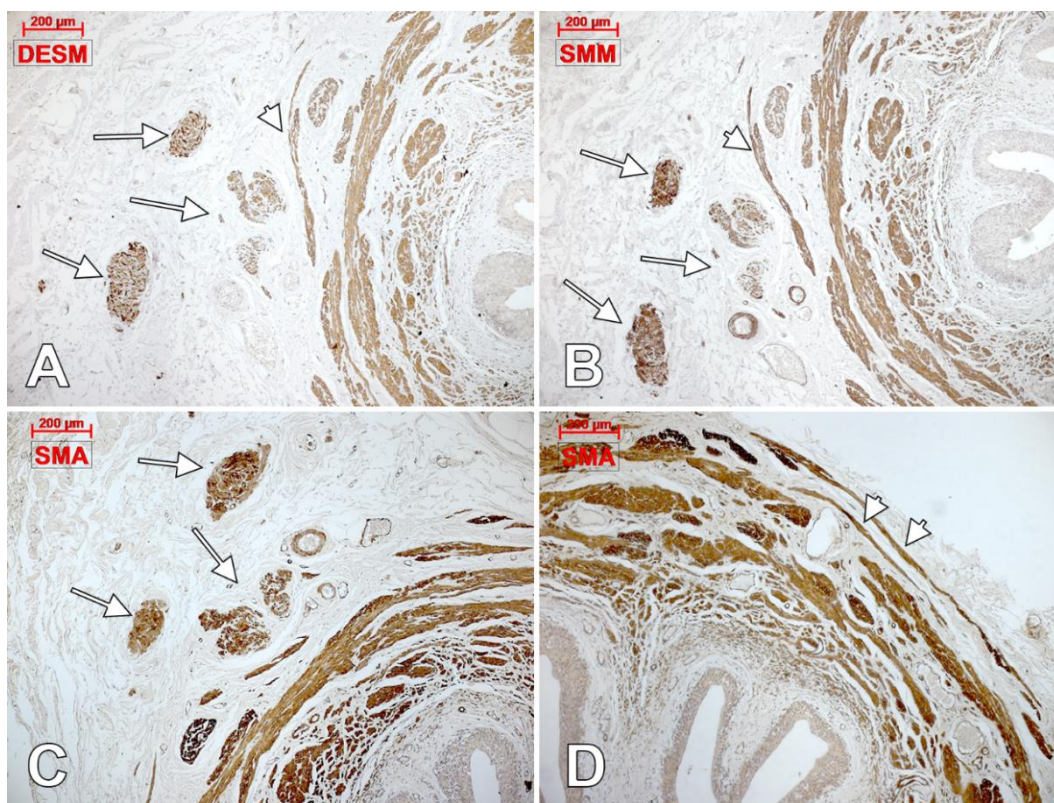
muscular suplimentar, cu dispoziția circulară a fibrelor netede. Pe secțiunile ureterale imunomarcate cu citokeratina 7 (CK7), antigenul respectiv a fost localizat în uroteliu. Expresia CK7 nu a fost exclusiv urotelială; am identificat celule CK7-pozitive stromale, unele localizate în lamina propria iar altele în interstițiile tunicii musculare a ureterului.



Ureter uman adult. Expresia pozitivă a citokeratinei 7 este identificată (săgeți) în celule stromale ale laminei propria (panelul superior) și în tunica musculară (panelul inferior) unde aceste celule par a avea morfologie multipolară (chenar, mărire digitală). m: mușchi neted ureteral.

Am identificat expresia pozitivă a CD117/c-kit în celule intraepiteliale izolate, unele fiind celule de talie mică, cu nucleii hiperchromatici, localizate imediat deasupra membranei bazale epiteliale iar altele fiind localizate în regiunile intermediară și superficială ale epiteliului ureteral, apărând precum celule de talie medie și mare, cu citoplasmă mai bine, sau consistent reprezentată, eventual trimițând prelungiri către lamina bazală a uroteliului, și având orientare verticală. De asemenea, am identificat expresia pozitivă endotelială a CD117/c-kit. Mastocitele au exprimat de asemenea c-kit. Am identificat expresia endotelială pozitivă a nestinei, în toate tunicile ureterului uman adult. Am identificat expresia pozitivă a nestinei în celule stromale intrinseci tunicii musculare. Aceste celule au apărut grupate sau izolate, prezentând nucleii mari, eucromatici, cu o cantitate redusă de citoplasmă; de asemenea, celulele respective proiectau prelungiri fine, numeroase și scurte. De asemenea, celule epiteliale bazale au fost rar marcate pozitiv cu nestină. Enolaza neuron-specifică a fost rar exprimată pozitiv în celule bazale ale uroteliului ureteral. De asemenea, expresia NSE a fost pozitivă în celule fibroblastoide aparent dispuse în lungul traiectelor microvasculare și în celule fibroblastoide periendoteliale. Și pericitele din structura ureterului au exprimat NSE. Am identificat de asemenea celule stromale izolate, cu nucleii hiperchromi, sugestivi pentru fenotipul proliferativ, rotunde sau ovalare, cu un raport nucleocitoplasmatic variabil, care au exprimat pozitiv NSE. Am pus de asemenea în evidență celule stromale izolate de talie medie spre mare cu nucleii excentrici, eucromatici. Prin imunomarcare cu alfa-actina mușchului neted (α -SMA) am obiectivat anatomia structurală mioidă a specimenelor de ureter uman. Tunica musculară ureterală a conținut substraturi intern longitudinal, circular și extern longitudinal. Adventicea ureterului a prezentat straturi mioide suplimentare, fie circulare subțiri, fie cordoane longitudinale localizate doar pe un flanc

al ureterului, acestea exprimând deopotrivă alfa-actina mușchiului neted, desmina și lanțul greu al miozinei mușchiului neted. Celule microvasculare murale și celule stromale fusiforme au exprimat de asemenea α -SMA.



Ureter uman adult, imunomarcare cu anticorpi anti-desmină (A), anti-lanț greu al miozinei mușchiului neted (B) și anti-alfa-actina mușchiului neted (C, D). Fascicule musculare netede adventiciiale, circulare (vârfuri de săgeți) și longitudinale (săgeți, câmpuri microscopice corespondente).

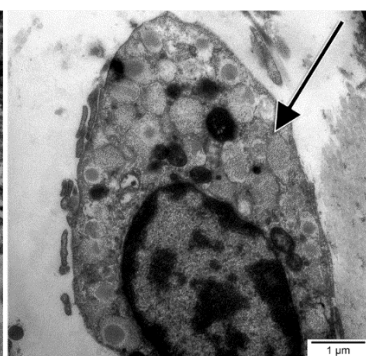
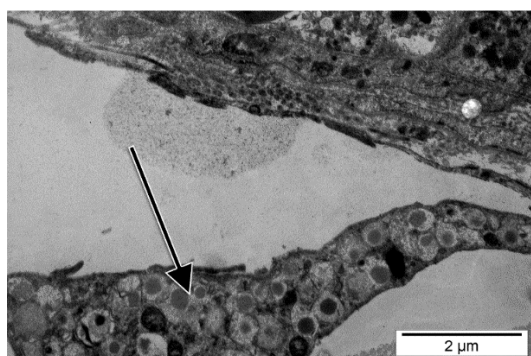
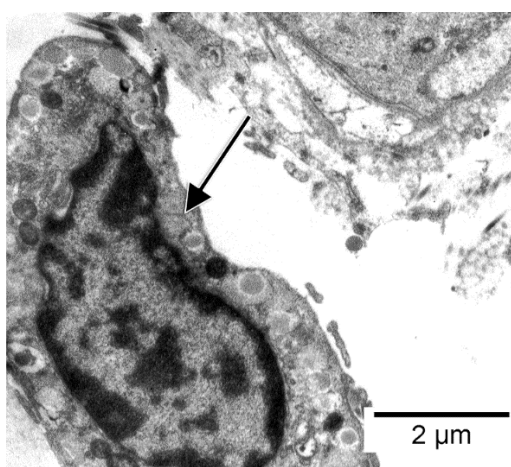
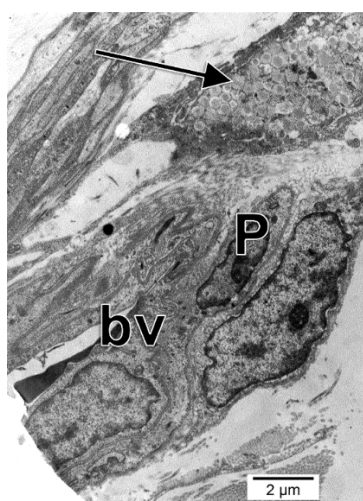
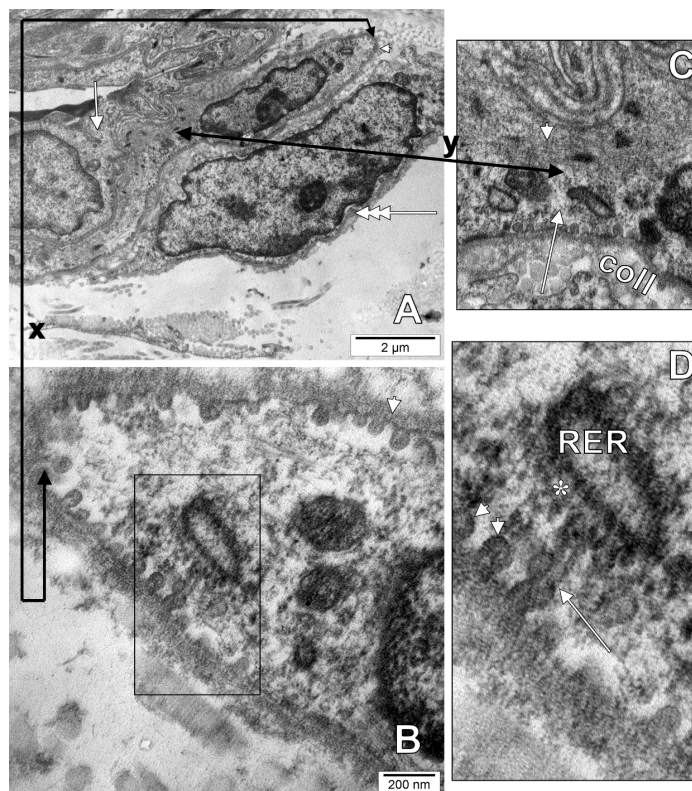
Expresia lanțului greu de miozină de mușchi neted a fost pozitivă în partea profundă a laminei propria a mucoasei ureterale, unde o serie de celule stromale de aspect telocitar au fost marcate pozitiv. De asemenea, mușchiul neted ureteral a exprimat acest marker. La toate speciemenle, mai puțin unul, epiteliul nu a exprimat miozina mușchiului neted. La nivelul ureterului cu fenotip mioid epitelial am identificat de asemenea celule cu fenotip miozin-pozitiv, localizate atât imediat subepitelial, cât și în porțiunile intermediară și bazală/profundă ale laminei propria. Am identificat prin marcarea cu desmină faptul că acest marker este exprimat în celule izolate ale laminei propria a mucoasei, în stratul subepitelial, precum și într-un substrat localizat la în partea profundă a laminei propria; în această din urmă localizare au fost prezente și celule desmină-pozitive fusiforme, cu procese lungi, de aspect telopodial. Desmina a fost de asemenea exprimată pozitiv în mușchiul neted ureteral. Mai mult, am identificat rara expresie a desminei și în celule localizate în lamina propria, care histologic au fost identificate ca celule endoteliale. Expresia endoglinei (CD105) a fost pozitivă în endoteliile microvasculare și capilarele născânde intramurale (acestea au indicat procese de vasculogeneză adultă) dar și în lamina propria ureterală, în celule fusiforme de aspect telocitar, cu procese celulare extrem de lungi. Endoglina nu a fost exprimată în celulele interstițiale ale tunicii musculare ureterale și nici în stratul supramuscular cu celule interstițiale mioide. Am identificat expresia pozitivă a CD34 în endoteliile din peretele ureteral. În lamina propria ureterală au fost prezente rar celule izolate CD34-pozitive. De

asemenea, am identificat rețele stromale întinse, asociate tunicii musculare, însă nu și laminei propria, de celule CD34-pozitive, care morfologic au putut fi considerate precum telocite ureterale. Factorul von Willebrand a fost exprimat exclusiv de celulele endoteliale microvasculare. Expresia CD31 în ureter a fost pozitivă atât în stroma conjunctivă, cât și în uroteliu, la nivelul ureterului uman adult. La nivel stromal CD31 a marcat atât endoteliile microvasculare rezidente, cât și celule stromale izolate identificate de mine precum progenitori endoteliali probabil implicați în procese de vasculogeneză adultă. Celule uroteliale de aspect dendritic au apărut de asemenea CD31-pozitive. Vimentina a fost exprimată la nivelul stromei ureterale atât în endoteliile microvasculare, cât și în celule stromale izolate, fie cu morfologie fibroblastoidă, fie rotunde/ovalare. De asemenea, celule uroteliale au exprimat vimentina, fenotip ce sugerează procese intense de transformare epitelial-mezenchimală. În ureterul uman adult markerul monocitar-macrofagic CD68 a fost exprimat pozitiv atât în celule epiteliale, cât și stromal, în endoteliile și celule izolate. Am identificat expresia epitelială pozitivă a CD45, comparabilă cu fenotipul epitelial pentru CD31. Markerul epitelial c-erbB-2 (Her-2 *neu*) a prezentat expresie pozitivă în celule epiteliale prezente în toate straturile epiteliului, în celule endoteliale și în celule stromale izolate cu morfologie diferită de a telocitelor (lipsite de prelungiri, non-fibroblastoide). Ocazional acest marker a fost exprimat și în celule perivascularare cu morfologie telocitară.

În microscopia electronică celulele musculare, cu nucleii unici, au apărut grupate în fascicule separate și învelite prin fibre de collagen. Prelungiri ale celulelor musculare netede au realizat legăturile dintre fascicule, ceea ce a realizat continuitatea structurilor mioide. Orientarea celulelor musculare netede precum și electronodensitatea au fost variabile intrafascicular. Din punct de vedere al electronodensității am definit celule musculare netede (leiomiocite) clare și întunecate. În citoplasme am identificat rar mitocondrii, reticul endoplasmic, ribozomi, aparate Golgi, precum și un citoschelet abundent realizat de filamente intermediare, groase (miozină) și microfilamente (actină). Plasmalemele au prezentat caveole, grupate de regulă în domenii caveolare plasmalemale. Intracelular am identificat relativ constant corpi denși mioizi iar la nivelul plasmalemelor au fost prezente plăci dense plasmalemale. În matricea colagenică adiacentă fasciculelor mioide am pus în evidență prelungiri celulare telopodiale. Leiomiocitele clare au prezentat o componentă citoscheletală mult redusă, organitele intracitoplasmatice fiind evident mai numeroase ca în leiomiocitele întunecate.

Am identificat de asemenea în microscopia electronică de transmisie vase intramurale ureterale. Acestea au prezentat lumene mărginite de celule endoteliale, peste care au fost dispuse miopericite prezentând, caracteristic, o componentă mioidă, cu corpi denși mioizi, adendotelială, și una non-mioidă abendotelială. La nivelul componentei mioide am pus în evidență prezența unui tubul transversal conectând plasmalema cu reticulul endoplasmic rugos, structură asociată cu fibrele musculare striate și nu cu pericitele. O particularitate a miopericitului respectiv a fost distribuția strictă a caveolelor în plasmalema abendotelială, acestea lipsind adendotelial. Acest miopericit a prezentat în citoplasma abendotelială corpi Weibel-Palade-like. Am identificat prin microscopie electronică de transmisie celule neuroendocrine ureterale cu un conținut abundent de granule secretorii. Granulele au apărut fie rotunde, fie ovalare, intricate cu rare mitocondrii. Granulele respective au fost compuse dintr-o matrice densă, uniformă, separată printr-un halou clar de membrana limitantă. Astfel de celule neuroendocrine ureterale au fost prezente de regulă în matricea colagenică perivasculară.

Ureter uman adult, microscopie electronică de transmisie. În structura unui microvas ureteral (A) se identifică endoteliul (săgeata albă) și un miopercit detaliat (conectori x și Y în (B) și (C) și o celulă de asemenea intramurală, localizată sub lamina bazală endotelială (săgeata cu vârf dublu). Miopercitul are un versant adluminal mioid (C, vârf de săgeată), cu corpi denși specifici fibrelor musculare netede, și un versant abluminal non-mioid (C, săgeata). coll:colagen. Plasmalema miopercitară prezintă (chenar, mărit digital în D) caveole (D, vârfuri de săgeți) și un tubul transversal (D, săgeata) conectat cu reticulul endoplasmic rugos (RER) prin material granular joncțional electronodens (*).



Ureter uman adult, microscopie electronică de transmisie. Sunt indicate prin săgeți celule neuroendocrine ureterale cu abundente granule secretorii. bv: vas sangvin; P: pericit.

1.4 DISCUȚII

Am identificat în cercetările imunohistochimice fenotipuri distincte ale telocitelor, specifice substraturilor laminei proprii ureterale: lamina propria superficială (suburotelială), lamina propria profundă, sintetizate în tabelul următor.

	LPS	LPP
CD34	-	+
CD105	+	-
α -SMA	-	+
desmină	-	+
SMM	-	+
nestină	-	-
CD68	-	-
CD31	-	-
factor von Willebrand	-	-
HER-2	-	-
enolaza neuron-specifică	-	-
CD117/c-kit	-	-

Fenotipul molecular al telocitelor din lamina propria ureterală. LPS: lamina propria superficială; LPP: lamina propria profundă.

Sunt puține studii care au apreciat (celulele interstițiale) telocitele de la nivelul căilor urinare. Reiese din referențial un studiu care a apreciat fenotipul molecular al celulelor interstițiale suburoteliale: în peretele vezicii urinare, la om, suburoteliul a conținut celule interstițiale care au exprimat α -SMA, vimentina, CD34, dar nu și CD117/c-kit⁴⁰. Un al doilea studiu a evaluat expresia podoplaninei (D2-40) în miofibroblaști (telocite), care este diferită în peretele vezical, pelvisul renal și în peretele ureteral⁴¹. Astfel, pe probe bioptice stratul suburotelial vezical a conținut celule fusiforme corespunzătoare unor miofibroblaști actin-pozitivi, celule care de asemenea au exprimat podoplanină, a cărei expresie nu a fost decelată în celulele musculare ale detrusorului vezical⁴¹. Celulele interstițiale respective nu au exprimat CD31, CD34, desmină, CD117/c-kit și nici proteina S100⁴¹. În probele de pelvis renal expresia podoplaninei a fost pozitivă segmentar/zonal⁴¹. Expresia pozitivă a podoplaninei în ureter a fost decelată doar într-unul din șase cazuri⁴¹. Nu sunt prezentate date despre submucoasa vezicală, care ar putea corespunde stratului profund al laminei proprii ureterale din preparatele mele. Corespundența celor două studii este parțială, ambele identifică fenotip CD117/c-kit- și α -SMA+ al acestor celule mioide suburoteliale, expresia CD34 fiind prezentată diferit în aceste două studii, fie pozitivă, fie negativă. În cel de-al doilea studiu⁴¹ se discută comentariul făcut de Gevaert și colaboratorii (2012) privind telocitele din diferite segmente ale căii urinare care au trăsături ultrastructurale similare însă nu sunt identice cu miofibroblaștii vezicali, prin aceea că au prelungiri celulare mai subțiri și nu au substructuri mioide (corpi denși, microtubuli, filamente de actină). Gevaert și colaboratorii (2012) apreciază de asemenea fenotipurile moleculare ale telocitelor din căile urinare⁴³, însă nu fac distincția dintre stratul superficial și cel profund ale laminei proprii, neasumând deci că fenotipurile moleculare ar putea diferi intrinsec laminei proprii, conform rezultatelor mele. Consier însă că un studiu imunohistochimic al podoplaninei, utilizată de regulă ca marker al liniei celulare endoteliale limfatice⁵⁵⁻⁵⁹, ar

fi putut fi dublat și de unul electronomicroscopic, aceasta deoarece în microscopia electronică de transmisie telocitele și celulele endoteliale limfatice ar putea prezenta un model similar și nu doar asemănător. Zheng și colaboratorii (2012) publică un studiu de microscopie electronică și prin culturi celulare al telocitelor de la nivelul aparatului urinar (șobolani), pe care le localizează în principal în spațiul subcapsular al rinichiului și între fasciculele musculare netede ³⁵. Documentarea rezultatelor din microscopia electronică constă din imagini la rezoluție mică, ale căror detalii ultrastructurale nu pot fi studiate adecvat. Sunt convingătoare dovezile prezenței telocitelor subcapsulare renale. În lamina propria ureterală autorii analizează telocitele ³⁵: acestea au fenotip mioid și sunt plasate profund, în raport imediat cu tunica musculară. Astfel, aceste telocite ureterale mioide corespund subsetului identificat de mine în partea profundă a laminei propria ureterale, în anatomia moleculară. Identificarea telocitelor s-a făcut doar pe criterii morfologice, existența telopodelor ³⁵. Gevaert și colaboratorii (2012) identifică prin microscopie electronică de transmisie prezența telocitelor în lamina propria suburotelială la nivelul pelvisului renal, ureterului, vezicii urinare și uretrei, la om, diferența principală între aceste căi urinare fiind lungimea telopodelor și numărul de straturi cu telocite identificate ⁴³. În acest studiu nu au fost apreciate telocitele din alte straturi/tunici ureterale. Și Gevaert și colab. (2012) apreciază fenotipul ultrastructural al celulelor interstițiale din lamina propria a căilor urinare. Atât în pelvisul renal cât și în peretele ureteral, acestea au prezentat următoarele caracteristici: prelungiri celulare lungi, prezentând rar îngroșări asemănătoare sinapselor, corp celular mic, cantitate redusă de organite intracitoplasmice (reticul endoplasmic rugos și mitocondrii), care poate însă să sugereze și un fenotip fie nediferențiat, fie dediferențiat, fie parțial diferențiat, lipsa filamentelor de actină și a corpiilor denși mioizi, eventuali microtubuli și vezicule cu miez dens, iar la nivelul plasmalemei au fost observate caveole dar nu și plăci dense și fibronexusuri ⁴³. Histologia laminei propria ureterale prezentată de Gevaert și colab. (2012) în imagini la rezoluție mică a microscopului electronic corespunde histologiei porțiunii superficiale a laminei propria observată de mine în microscopia optică. Imaginile de microscopie optică prezentate de Gevaert și colab. (2012) sunt de asemenea la rezoluție mică și nu pot fi apreciate pentru prezența telocitelor. Un review recent asupra celulelor interstițiale Cajal și telocitelor de la nivelul aparatului urinar sintetizează datele existente, prezentate și de mine aici, fără însă a le aprecia critic sau prin referire la rezultatele personale ale autorilor acestui review ³⁶. În tunica musculară a ureterului am identificat telocite care au exprimat pozitiv CD34. Aici trebuie discutat punctul de vedere al grupului de cercetare al lui Diaz-Flores, care au revăzut diferite studii asupra celulelor stromale fibroblastoide CD34-pozitive și ajung la concluzia unei heterogenități a termenilor utilizați pentru același tip celular. Acești autori indică astfel de celule precum „celule stromale/fibroblaști/fibrocite/telocite CD34+” și le consideră precum principala rezervă tisulară de celule stem mezenchimale ⁶⁰. Barth și Westhoff (2007) sintetizează (**tab.5-3**) caracteristicile morfologice tisular-dependente ale fibrocitelor CD34+ ⁶¹.

Enolaza neuron-specifică este considerată o proteină specifică neuronală; sunt studii care arată că aceasta nu există doar în neuroni ci și în celule neuroendocrine, trombocite și limfocite. NSE a fost identificată la pacienți cu neuroblastoame, carcinoame pulmonare cu celule mici și gliome maligne ⁶². Enolaza neuron-specifică este izoenzima unei enzime glicolitice – enolaza, considerată inițial ca fiind prezentă doar în neuroni, însă ulterior a fost raportată și în celulele neuroendocrine ale sistemului APUD ⁶³. Sistemul neuroendocrin este considerat precum a treia componentă a sistemului nervos, componentă ce integrează funcțiile sistemelor autonom și endocrin ⁶⁴. O serie de

neuropeptide, inclusiv NSE, au fost identificate în epiteliul ductal la nivelul glandelor salivare, în țesut fetal, considerându-se că ar putea juca un rol în dezvoltarea glandulară ⁶⁵. Un alt studiu a apreciat faptul că celulele neuroendocrine la nivel endometrial sunt insuficient evaluate; au fost studiate specimene bioptice și au fost identificate celule endometriale exprimând NSE, cu o distribuție rară în epiteliul glandular, considerându-se că ar putea juca un rol în cursul endometriozelor ⁶⁶. NSE (sau gama-enolaza, ENO2) este un biomarker util pentru identificarea diferențierii neuroendocrine în tumori și ar putea reprezenta un marker pentru expunerea la cadmiu și arsen ⁶⁷. A fost realizat un studiu pe o linie celulară urotelială și modele expuse la cadmiu și la arsen, observându-se că expunerea a condus la creșterea semnificativă a expresiei NSE, atât nucleară cât și citoplasmatică ⁶⁷. A fost astfel sugerată o legătură între expunerea la cadmiu și la arsen și diferențierea celulară neuroendocrină, NSE fiind indicată precum un biomarker al acestei expunerii ⁶⁷. Celulele neuroendocrine ale prostatei, care își începe dezvoltarea din sinusul urogenital ⁶⁸, sunt celule intraglandulare hibride, epitelial-neuroendocrine, care exprimă și secretă neuropeptide și hormoni ce reglează probabil creșterea, diferențierea și activitatea secretorie a epiteliului prostatei ⁶⁹. Am în vedere aici faptul că am decelat expresia pozitivă a NSE în celule bazale ale uroteliului ureteral; de asemenea am identificat expresia c-kit în uroteliile apreciate imunohistochimic. Din acest punct de vedere, și luând în calcul și faptul, bine cunoscut, că celulele bazale ale uroteliului, care tapetează și ductele glandulare ale prostatei ¹, exprimă CD44 și citokeratine (CK5, CK14) ⁷⁰ voi discuta aici un studiu realizat *in vitro* care a avut ca fundamentare faptul că celulele neuroendocrine prostatice dispersate au rol în reglarea creșterii prostatei și intervin în patogeneza carcinomului de prostată, considerându-se că aceste celule derivă fie din creasta neurală în cursul embriogenezei, fie prin diferențierea directă din precursori locali existenți ⁵³. Pentru evaluarea originii acestor celule s-a pus la punct un model experimental de culturi celulare, în care au fost crescute celule explantate din prostatectomii radicale – majoritatea celulelor care au crescut pe culturi au fost celule bazale ce exprimau CK5/14 și CD44 (de observat corespondența fenotipică cu celulele uroteliale bazale), o fracție mai mică fiind reprezentată de celule care au exprimat c-kit, marker considerat ca indicând precursori pluripotenți ⁵³. Din celulele bazale au rezultat după diferențiere *in vitro* celule cu morfologie neuroendocrină, care au fost denumite celule neuroendocrine-like (NELC, *neuroendocrine-like cells*), care pe culturi au apărut grupate, fiind caracterizate printr-un corp celular mic, alungit, și numeroase prelungiri citoplasmatiche de aspect neuronal-like, ce veneau în contact între ele formând o rețea celulară ⁵³. Diferențierea neuroendocrină *in vitro* a celulelor prostatice adulte favorizează ipoteza conform căreia celulele neuroendocrine ar deriva din precursori locali iar accelerarea acestei căi de diferențiere ar putea fi motivul pentru prezența celulelor neuroendocrine în ariile de hiperplazie epitelială ⁵³. Observ de asemenea că precursorii exprimând c-kit nu au apărut implicați în formarea de NELC. În susținerea acestei diferențieri epitelial-neuroepiteliale vine un alt studiu care a apreciat ca pozitivă influența interferonului asupra diferențierii celulelor epiteliale bazale ale prostatei umane ⁶⁹. Celulele neuroendocrine ale prostatei derivă dintr-un precursor bazal comun care formează de asemenea și epiteliul secretor – interferonul γ care este produs în prostată de către celule bazale, precum și limfocitele infiltrante în condiții inflamatorii, pot susține diferențierea celulelor neuroendocrine și pot juca un rol în procesele de diferențiere neuroendocrină a celulelor tumorale în cancerul de prostată refractar la hormoni ⁶⁹. În ceea ce privește densitatea populației de celule neuroendocrine la nivelul tractului genitourinar a fost demonstrat că cea mai mare concentrație de astfel de celule este la

nivel vulvar și în uretra distală, reducându-se spre tractul genitourinar proximal, în vezica urinară celulele neuroendocrine fiind identificate doar ocazional și în ureter nefiind identificate astfel de celule [71, cit. în 54]. Astfel, au fost formulate patru ipoteze privind originea celulelor neuroendocrine ureterale (tumori neuroendocrine primare): (1) leziunea originală este un carcinom urotelial care suferă o metaplazie neuroendocrină; (2) celulele neuroendocrine tumorale derivă din celule neuroendocrine rezidente în ureter, fapt încă nedemonstrat, însă susținut de rezultatele mele; (3) celulele neuroendocrine tumorale derivă din celule ale creste neurale capturate anormal în decursul migrării embrionare; (4) prin analogie cu alte țesuturi lipsite de celule neuroendocrine în mod normal, se propune teoria celulelor stem canceroase 54. Din referințele pe care le-am studiat rezultă că celulele bazale uroteliale sunt celule stem/progenitoare 72 care exprimă CD44, similar celulelor stem/progenitoare derivate din urină 73. Astfel de subseturi de celule stem/progenitoare derivate din urină exprimă de asemenea CD117/c-kit și SSEA4 73. A fost sugerat faptul că celule bazale uroteliale care exprimă CD44 și c-kit ar putea fi precursori ai celulelor neuroendocrine în uroteliul de la nivelul prostatei, fapt ce plasează la adult diferențierea celulelor neuroendocrine 53. Evidențele pe care le-am adus, de subseturi de celule uroteliale care exprimă, în fracție minoră, c-kit, și în fracție majoră enolaza neuron-specifică, cunoscută precum marker neuroendocrin, ar putea indica rezonabil faptul că de bună seamă celulele uroteliale alimentează local nișa stromală ureterală cu celule neuroendocrine, la adult. Tumori neuroendocrine ureterale sunt extrem de rare iar etiologia acestora este disputată, fiind emise patru ipoteze pe care le-am prezentat anterior în lucrarea mea de doctorat. Markerii imunohistochimici specifici tumorilor neuroendocrine sunt enolaza neuron-specifică, sinaptofizina, cromogranina A și CD56 54. Am adus evidențe certe, în microscopia electronică de transmisie, a existenței celulelor neuroendocrine în ureterul uman adult, ceea ce favorizează ipoteza originii locale a tumorilor neuroendocrine ureterale.

Am identificat expresia pozitivă intraepitelială a receptorului c-kit în speciile de ureter uman adult. Aceasta a mai fost identificată anterior în celule verticale intraepiteliale la diferite specii, inclusiv la om, de către Mezger și colaboratorii, în studiile cărora accentul a fost pus pe identificarea cu acuratețe a celulelor interstițiale Cajal, sau Cajal-like, la nivelul căilor urinare și spermatice 74-77. Aceștia au identificat celule intraepiteliale (și nu interepiteliale cum, eronat, se indică în studiile respective 74, 75, 77) dispuse vertical în epiteliul respectiv, la nivelul stratului intermediar sau în stratul epitelial superficial 74-77. Autorii discută faptul că acest subset de celule epiteliale ce exprimă receptorul c-kit, subset celular pe care l-am identificat și eu la speciile tisulare pe care le-am investigat, ar putea reprezenta o populație celulară trecută cu vederea care ar putea avea anumite funcții mecanoreceptoare dacă se are în vedere faptul că contracțiile spontane sunt inițiate de distensie sau de perfuzie, sau ar putea reprezenta o subpopulație de celule stem epiteliale, având rol în regenerarea epitelială 75. Grupul respectiv de cercetători nu ia însă în calcul și posibilitatea eliminării în urină a acestor celule, cărora expresia receptorului c-kit le indică un fenotip progenitor, sau stem. Se cunoaște faptul că diureticele determină eliminarea celulelor epiteliale renale viabile în urină, aceste celule având un bun potențial proliferativ și fiind considerate celule progenitoare 78.

Plecând de la faptul că CD117/c-kit este un marker indiscutabil al celulelor interstițiale Cajal, Metzger și colab. (2004) au apreciat topografia celulelor interstițiale Cajal-like (ICLC) la om, în ureter 77. Receptorul c-kit a fost decelat în trei tipuri celulare: (1) celule fusiforme, pe toată lungimea ureterului, localizate de-a lungul septurilor

păturilor musculare internă și externă; (2) celule izolate din uroteliu, orientate vertical, dispuse de regulă în stratul epitelial intermediar; (3) celule rotunde identificate precum mastocite, cu observația că aceste mastocite au marcat și cu CD34 ⁷⁷.

Importanța leziunilor cronice tubulointerstițiale în insuficiența renală este cunoscută dar, deși leziunile specifice pot fi identificate la biopsie, sunt puține date care să ofere cunoaștere asupra celulelor interstițiale, asupra fenotipului acestora și privind mecanismele prin care acestea sunt dirijate către o anumită histopatologie ⁵. Nefiind exact, și în detaliu, cunoscut substratul morfologic, patologia histopatologică se poate prezenta cu situații rare. De exemplu, tumorile ureterale sunt similare celor de la nivelul pelvisului renal și vezicii urinare și se împart în tumori epiteliale și tumori non-epiteliale, acestea din urmă fiind destul de rare (polipi fibroși, hemangioame, fibromioame, glomangioame și sarcoame) ⁷⁹. Un raport de caz prezintă o tumoră musculară netedă ureterală, indicată precum „bizară”, cu un pleiomorfism remarcabil (miom pleiomorf) ⁷⁹. Acest lucru atrage atenția asupra structurii mioide al ureterului, însă trebuie avut în vedere faptul că diagnosticul histopatologic respectiv a fost făcut doar pe baza colorațiilor histologice, fără a se aplica anticorpi specifici.

Am identificat la unul dintre speciemenle ureterale evaluate imunohistochimic existența unui fenotip mioid epitelial, identificat prin expresia pozitivă a lanțului greu al miozinei mușchiului neted. Documentând pe referențial această expresie aparent atipică, am întâlnit două studii care susțin și demonstrează prezența celulelor mioide în celule epiteliale ^{80,81}. Este discutat ⁸⁰ faptul că tradiția clasifică filamentele din celulele epiteliale precum tonofilamente însă aceste filamente din celulele epiteliale nu au fost apreciate histochimic; miozine se localizează în celulele epiteliale ale diferitelor organe.

În embriogeneza ductul Wolff se deschide în cloacă iar mugurele ureteral pornește de pe aspectul dorsal al acestuia, deasupra joncțiunii cu cloaca ⁸². Ulterior, mugurele ureteral va realiza o deschidere independentă în cloacă, dorsolateral de deschiderea ductului Wolff ⁸². Mugurele ureteral va migra rostral și lateral iar ductul Wolff – caudal și medial, cele două structuri devenind separate prin țesut mezodermal din care va deriva trigonul vezical ⁸². Astfel, cu excepția vezicii urinare care este endodermală în natură, celelalte structuri sunt mezodermale, inclusiv tunică musculară a ureterului. Este astfel firesc ca din mezoderm să rezulte și cordoanele longitudinale care muscularizează teaca Waldeyer ⁴⁵. Am identificat muscularizarea adventiceei ureterale, atât cu fascicule circulare, cât și prin formarea de cordoane groase longitudinale – muscularizarea adventicială a ureterului. Acestea au exprimat panelul de markeri mioizi, desmina, α -SMA și miozina mușchiului neted. Proximal, adventicea ureterală este continuă cu fascia pelvină, însă distal adventicea devine mai groasă și proeminentă deoarece apar fascicule musculare bine conformate care transformă adventicea dintr-un înveliș fibros într-unul fibromuscular numit teaca lui Waldeyer care este deosebit de importantă pentru funcțiile ureterului terminal și joncțiunii ureterovezicale ⁸³. Waldeyer a denumit această teacă „Ureterscheide” ⁸⁴ și a descris-o ca având originea (fasciculele musculare longitudinale) în musculara vezicală ⁴⁴. Alți autori au raportat faptul că doar câteva fascicule musculare longitudinale trec în adventicea porțiunii inferioare a ureterului, longitudinale sau circulare ⁴⁴. Discuțiile sunt legate de originea vezicală sau ureterală a fasciculelor musculare adventiciale ⁴⁴ iar rezultatele mele care demonstrează prezența muscularizării adventiciale la nivelul ureterului superior susțin și o componentă ureterală care realizează la acest nivel o teacă fibromusculară similară tecii lui Waldeyer care, astfel, nu mai poate

fi considerată o structură specifică a joncțiunii ureterovezicale. Disse a fost primul care a ridicat îndoiele asupra originii vezicale a tecii lui Waldeyer și, pe de altă parte, sunt autori care confundă această teacă cu fascicule musculare periureterale care realizează o teacă ureterală diferită de teaca lui Waldeyer ⁴⁷. Prezintă importanță faptul că eu am identificat cordoane longitudinale de mușchi neted în adventicea porțiunii superioare a ureterului, pe un singur flanc al ureterului, și nu la joncțiunea ureterovezicală. Acestea nu au mai fost descrise la acest nivel și corespund identic descrierii tecii lui Waldeyer: „... *țesut fibros specializat care are un grup de fibre musculare longitudinale localizate pe un flanc* ...” ⁸⁵.

ANATOMIA MOLECULARĂ ȘI ULTRASTRUCTURALĂ A NIȘELOR EPITELIALĂ ȘI STROMALĂ RENALE

1.5 INTRODUCERE

Prezintă interes pentru structura aparatului urinar faptul că la nivel renal au fost identificate fibrile mioide în celule tubulare și celule glomerulare; cele de la nivelul celulelor epiteliale tubulare erau în mod normal delicate însă în condiții patologice deveneau proeminente ¹¹⁷. De asemenea, în anumite condiții, fibrile mioide au fost prezente în epiteliul capsular și în celulele mezangiale ale glomerulilor; în anumite cazuri podocitele au conținut de asemenea fibrile mioide ¹¹⁷. A fost decelat un sistem continuu de fibrile mioide din media arteriolei aferente până în mezangiu și din epiteliul capsular până în epiteliul tubular ¹¹⁷.

Telocitele (TC) au fost propuse ca fiind un nou tip celular ⁹ după ce anterior fuseseră investigate precum celule interstițiale Cajal-like (ICLC). Astfel de ICLC au fost documentate și în țesuturi lipsite de mușchi neted propriu, precum glanda mamară și cordul ⁸⁶⁻⁹⁰. În prezent TC sunt identificate prin morfologia lor particulară, ele fiind celule stromale ce proiectează prelungiri lungi, subțiri și moniliforme numite telopode – telopodele prezintă dilatații numite podoame, care sunt unite prin segmente subțiri numite podomere ^{10, 11, 15-19, 24, 40}. Diferite studii au demonstrat că, fie și în același organ, există mai multe tipuri de TC ^{16, 19, 24} la nivelul nișelor stem respective ³⁵. Totuși TC au fost destul de puțin investigate la nivelul aparatului urinar ^{23, 35-37, 40, 43, 77}. La nivelul rinichiului au fost identificate TC doar în spațiul subcapsular ³⁵ sau au fost identificate în interstițiul corticalei renale ³⁷. TC renale au exprimat pozitiv CD34, c-kit și vimentina, însă în grade diferite ³⁷. De asemenea a fost comunicat faptul că TC, identificate exclusiv morfologic, ar putea proteja celulele epiteliale tubulare împotriva leziunilor de ischemie-reperfuzie prin mecanisme în care intervin diferiți factori de creștere ³⁸.

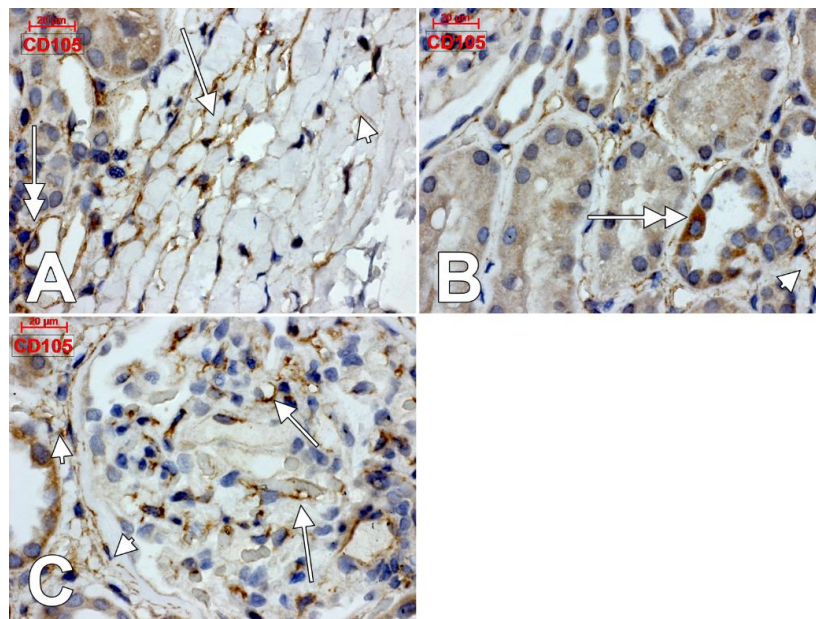
Deoarece sunt puține studiile privind TC renale, și nu oferă un tablou general al topografiei și fenotipurilor acestora, am realizat un studiu imunohistochimic cu un panel mare de markeri, pentru a localiza TC renale și pentru a evalua fenotipul lor specific. De asemenea, am urmărit identificarea în microscopia electronică de transmisie a caracterelor mioide specifice la diferite tipuri de celule, epiteliale și stromale, ale țesutului renal.

1.6 MATERIAL ȘI METODĂ

Am folosit (studiu retrospectiv, material biologic arhivat) probe tisulare de rinichi uman adult, obținute de la 20 pacienți umani adulți (sex ratio 3:2) după nefrectomii. Consimțământul informat pentru utilizarea probelor tisulare a fost obținut de la pacienți preoperator. Toate experimentele au fost realizate în acord cu Declarația de la Helsinki, revizia Rio de Janeiro <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index>. Au fost utilizați și cinci șobolani adulți rasa Wistar, cântărind 350-400 g. Animalele au fost ținute separat în cuști metabolice individuale, cu controlul metabolismului și alimentației, în condiții de iluminare standard. După preanestezie cu eter, animalele au fost eutanasiate prin injectarea intracardiacă a unui drog veterinar pentru eutanasiere (0,2 ml. T-61, INTERVET, Kirkland, Quebec, Canada). Toate procedurile au fost în conformitate cu reglementările etice în vigoare, și Declarația de la Helsinki.

Am folosit anticorpi primari pentru CD117/c-kit, CD 105, CD31, CD34, nestină, α -actina mușchiului neted, desmină, enolaza neuron-specifică, lanțul greu de miozină din mușchiul neted.

1.7 REZULTATE

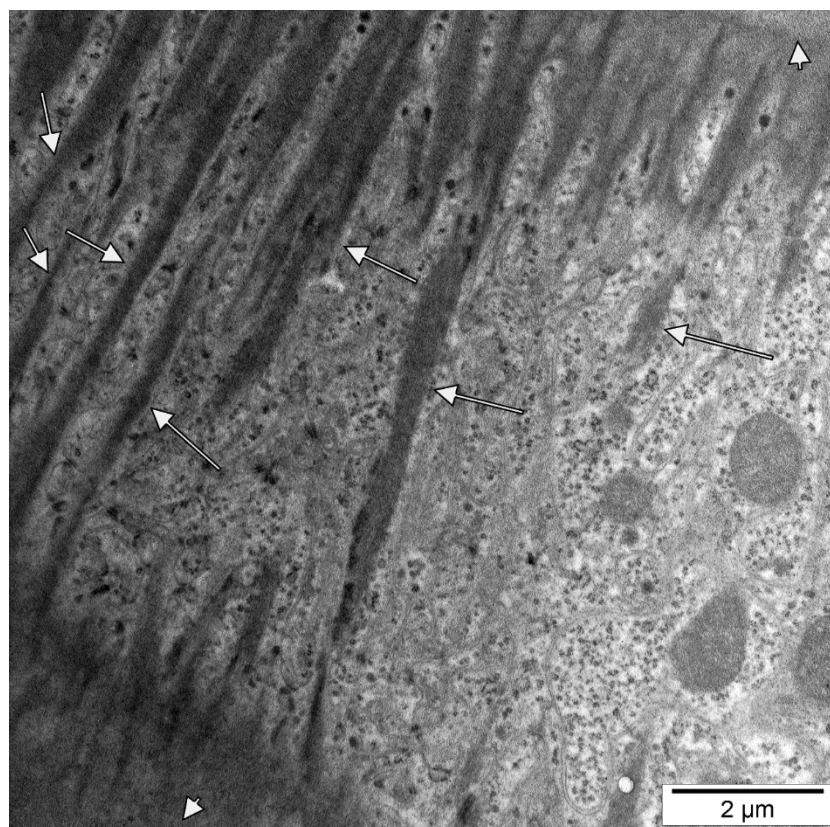


Expresia endoglinei (CD105) în corticala renală este pozitivă în telocite subcapsulare (A, săgeata) dar ocazională în telocite capsulare (A, vârf de săgeată). Endoglina este exprimată de asemenea în rețele interstițiale (B, C, vârfuri de săgeți), în celulele epiteliale tubulare (B, săgeata cu vârf dublu), și în endoteliilor interstițiale (A, săgeata cu vârf dublu) și glomerulare (C, săgeți).

1.7.1 Telocitele renale – studiul imunohistochimic

Fenotipurile moleculare ale capsulei renale și stromei subcapsulare au prezentat diferențe discrete. Capsula renală a apărut precum o structură vascularizată cu celule stromale/telocite (SC/TC) înglobate în collagen, iar stroma subcapsulară a apărut precum un strat bogat în celule – SC/TC subcapsulare. La nivelul capsulei renale SC/TC nu au exprimat CD31, c-kit, desmină sau SMM. Acestea au exprimat rar nestina și CD105 și au fost pozitive pentru CD34 și α -SMA. SC/TC subcapsulare nu au exprimat CD31 și nici c-kit sau desmină însă au fost pozitive pentru expresia celorlalți markeri: CD34, nestina, α -SMA, SMM și CD105. La nivelul interstițiilor SC/TC au fost negative pentru CD31, c-kit și desmină. Expresia SMM a fost rară. Aceste celule au exprimat CD34, nestina, α -SMA și CD105. Celulele endoteliale ale corticalei renale au exprimat CD31, și CD105. Rar a fost exprimată nestina precum și SMM. Celulele endoteliale nu au prezentat

expresia c-kit sau a α -SMA. În medulara renală SC/TC nu au exprimat CD31, CD34, nestina și c-kit. Totuși markerii mioizi, α -SMA și SMM, au fost exprimați focal în rețele stromale. Celulele endoteliale au prezentat expresia CD31, CD34, a nestinei dar și expresia markerilor mioizi, α -SMA și SMM. Celule stromale izolate care însă nu prezentau morfologii telocitare au exprimat CD34. Tubii endoteliali secționați tangențial longitudinal au apărut precum false telocite. Celulele murale periendoteliale au exprimat atât α -SMA cât și SMM. În celulele epiteliale parietale ale capsulei Bowman și podocite am pus în evidență expresia ocazională a nestinei. Rar a fost exprimată și desmina, ceilalți markeri fiind negativi. În țesuturile investigate am găsit expresii epiteliale ocazionale ale CD31, c-kit, desminei, CD34, SMM și CD105. Ceilalți markeri nu au fost exprimați în epiteliiile tubulare.

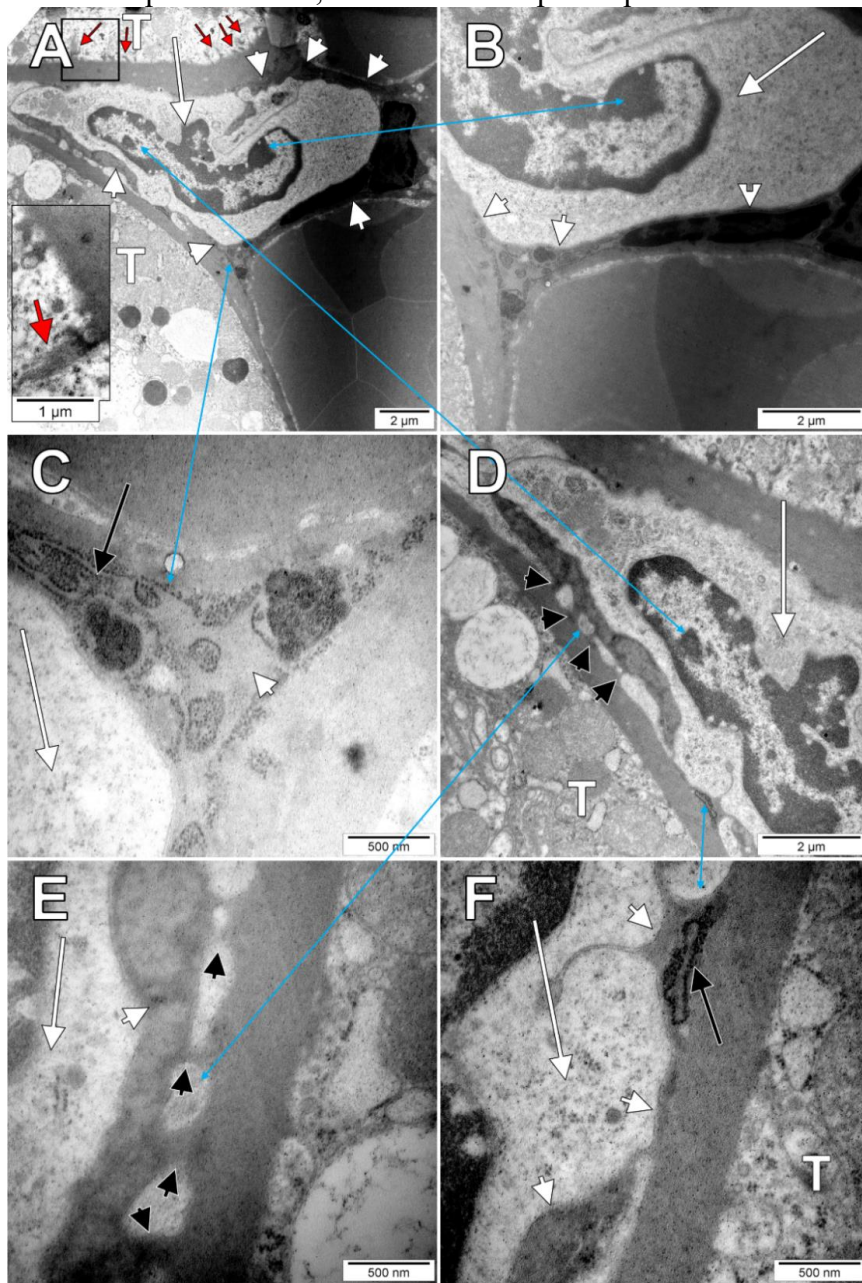


Rinichi de șobolan, microscopie electronică de transmisie. Pe secțiunea oblică a unui tub proximal se identifică benzi mioide (săgeți) perpendiculare pe axul tubular, cu dispoziție periodică, atașate în membrana bazală (vârfuri de săgeți). Este astfel constituit un aparat ultrastructural sfincterian.

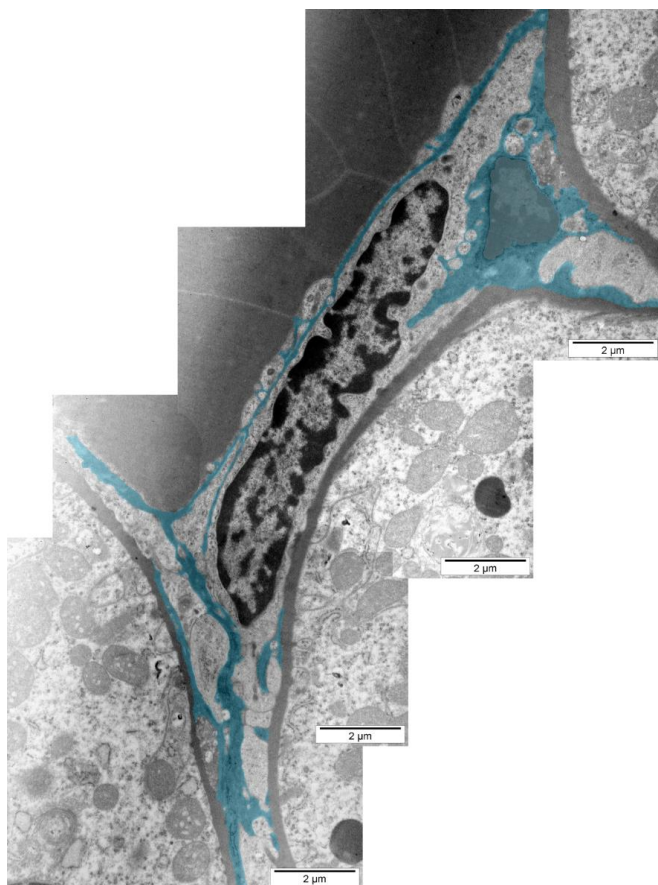
1.7.2 Anatomia ultrastructurală a componentei mioide renale

Am identificat prin microscopie electronică prezența de cili primari în celulele epiteliale tubulare. De asemenea, epiteliile tubulare au conținut celule nediferențiate, sau dediferențiate, de aspect primitiv, poligonale, cu plasament bazal, lipsite de microvili și de falduri bazolaterale. Am identificat sfinctere tubulare mioide, atât la nivelul tubilor proximali cât și la nivelul tubilor distali. Pe secțiuni razante componenta mioidă bazală tubulară a apărut precum benzi circulare succesive, asociind corpi denși mioizi, care au realizat un aspect sfincterian. Pe secțiuni tubulare perpendiculare această componentă mioidă bazală a celulelor epiteliale tubulare a realizat aspectul de „dinți de pieptene”. În interstițiile renale, peritubular, am identificat un tip particular de celule cu conținut mioid aplicate peste celulele endoteliale și realizând contact strânse cu membranele bazale ale epiteliiilor tubulare. Morfologia ultrastructurală a acestor celule mioide a sugerat

caracterul lor progenitor prin talia mică a nucleilor cu heterocromatină marginală și în grămezi centrale și prin conținutul citoplasmatic format aproape exclusiv de ribozomi liberi și reticul endoplasmic rugos, mitocondriile fiind rare iar alte organite intracitoplasmice, asociate aparatului de sinteză, nefiind identificate. O particularitate a acestor celule a fost reprezentată de dilatațiile polare ale spațiilor perinucleare localizate sub anvelopele nucleare, acestea luând aspectul polar de saci nucleari.

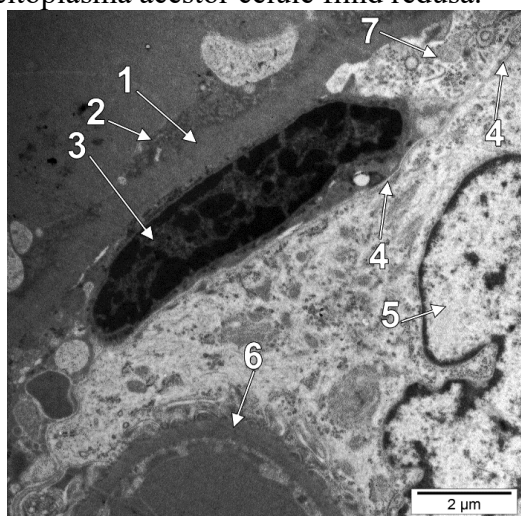


Rinichi normal, șobolan, microscopie electronică de transmisie. Aspectul general este prezentat în (A) și detaliat în (B-F), regiunile corespondente sunt indicate prin conectori albastru-deschis. În interstițiul dintre doi tubi renali adiacenți (T) se identifică un microvas cu hematii în lumen. Față de acest lumen se identifică o celulă endotelială cu citoplasmă clară electronomicroscopic (săgeți albe) și o celulă electronodensă slab diferențiată (vârfuri de săgeți albe) aplicată peste celula endotelială respectivă. Aceasta din urmă are fenotip mioid, cu corpi denși mioizi, și, ca organite, conține exclusiv reticul endoplasmic rugos și ribozomi liberi și polizomi (săgeți negre) și se acolează la membranele bazale tubulare sau se ancorează la acestea prin punți/pripoane mioide (vârfuri de săgeți negre). Detaliul (A, chenar prezentat la rezoluție mărită a microscopului) prezintă ancoraje mioide intrinseci membranei bazale tubulare (săgeți roșii).



Rinichi normal, șobolan, microscopie electronică de transmisie. Rețea mioidă interstițială aplicată peste endoteliu.

În regiunile periglomerulare am identificat de asemenea celule nediferențiate sau slab diferențiate, cu nucleu heterocromatinic și conținut citoplasmatic reprezentat exclusiv de reticul endoplasmic rugos și ribozomi. Astfel de celule juxtaglomerulare au prezentat și acestea saci nucleari. Am urmărit pe grile caracteristicile ultrastructurale la nivelul glomerulilor renali. La nivelul capsulei Bowman am identificat celule epiteliale parietale mioide de aspect nediferențiat, comparabile morfologic cu cele de la nivelul interstițiilor și cele juxtaglomerulare. Raportul nucleocitoplasmatic a fost mare, citoplasma acestor celule fiind redusă.



Rinichi normal, șobolan, microscopie electronică de transmisie. 1.membrana bazală epitelială a capsulei Bowman; 2.celulă mioidă slab diferențiată interstițială; 3.celulă mioidă slab diferențiată integrată în epiteliul parietal al capsulei Bowman; 4.spațiul urinar; 5.nucleul unui podocit; 6.membrana bazală endotelială a unui capilar glomerular; 7.celulă epitelială parietală a capsulei Bowman.

La nivelul glomerulilor renali am identificat componentă mioidă atât în celulele endoteliale glomerulare cât și în podocite. Am identificat rar celule cu fenotip ultrastructural identic celor interstițiale mioide slab diferențiate și la nivelul corpusculilor

renali. Acestea au prezentat nucleu heterocromatic, reticul endoplasmic rugos și ribozomi liberi și polizomi grupați caracteristic, însă nu exclusiv, în jurul cisternelor reticulului rugos și adiacent anvelopei nucleare.

1.8 DISCUȚII

Qi și colab. (2012) identifică telocite în cortexul rinichiului la om folosind culturi celulare primare, imunohistochimie și microscopie electronică de transmisie ³⁷. Acești autori identifică astfel de celule în interstiții, peritubular și periendotelial ³⁷. Identificarea este strict morfologică, de celule cu telopode, acestea din urmă fiind prelungirile celulare lungi, subțiri și moniliforme ale telocitelor ³⁷. Observând imaginile de microscopie electronică prezentate în acest articol, am constatat că autorii descriu precum telocite celulele interstițiale slab diferențiate pe care le-am identificat și eu în localizare peritubulară și periendotelială. Consider că în interpretarea imaginilor de microscopie electronică autorii fac o serie de erori de diagnostic morfologic (**fig.6-34**) ³⁷, deoarece ceea ce indică precum caveolă este de fapt spațiul extracelular iar ceea ce indică precum veziculă de exocitoză este de fapt o mitocondrie conținută într-o celulă învecinată. Așadar, telocitele renale prezintă „saci nucleari” și conțin exclusiv reticul endoplasmic rugos și ribozomi.

Telocitele (TC) au fost propuse de Popescu și Faussone-Pellegrini (2010) precum un tip celular distinct, însă anterior fuseseră documentate morfologic precum celule interstițiale Cajal-like (ICLC). ICLC au fost redenumite TC. Un astfel de studiu al ICLC ⁹¹ a prezentat un rezultat de imunoelectron microscopie al unei ICLC/TC, care este probabil singura dovadă a expresiei unui marker în astfel de celule cu telopode, deși TC au fost studiate consistent în microscopia electronică ^{11, 15, 92-95}. Din acest punct de vedere, celulele stromale fusiforme cu telopode CD34+ ar putea fi indicate precum TC, deși telopodele se disting cu dificultate în microscopia optică. De aceea, lipsa imunoelectron microscopiei ar putea fi o limitare a studiilor privind TC iar această lipsă poate fi o limitare în definirea TC. Țesutul conjunctiv al tuturor Țesuturilor conține celule CD34+, indicate prin diferiți termeni, probabil datorită faptului că autorii „*nu erau avizați de faptul că populațiile celulare investigate și descrise erau identice*” ⁶¹.

Celulele stromale/telocitele (SC/TC) CD34+ au roluri importante în menținerea și modularea homeostaziei celulare și în morfogeneza și reparația tisulară ⁹⁶. Astfel de SC/TC CD34+ se comportă precum progenitori dormanți în nișele stem stromale și au capacitatea de a dobândi un fenotip α -SMA + ^{23, 96-98}. Activarea *in vivo* a SC/TC CD34+ include separarea acestora de structurile de vecinătate (în principal de pereții vasculari), formarea de organite de sinteză, proliferarea celulară și diferențierea ⁹⁸.

Pease (1968) a identificat în microscopia electronică de transmisie celule renale interstițiale mioide care în general nu prezentau decât ribozomi și proiectau ceea ce autorul a indicat precum „*pseudopode lungi*” ⁹⁹. Aceste celule pot fi privite precum celule slab diferențiate, stem/progenitoare. Prelungirile acestor celule mioide interstițiale nu au fost atât de clar prezentate în studiul respectiv ⁹⁹ pentru a putea fi validate precum telopode. Însă, rezultatele mele în microscopia optică permit să indic celulele mioide interstițiale care mărginesc tubulii și corpusculii renali precum SC/TC mioide.

Johnson și colab. (1991) au identificat în imunoelectron microscopie faptul că celulele α -SMA+ ale rinichiului sunt celule mezangiale proliferative active ¹⁰⁰. Alte studii ^{5, 101} au identificat, însă în condiții patologice, expresia accentuată a filamentelor mioide, precum α -SMA, în interstițiul renal, ceea ce a sugerat faptul că întreg rinichiul ar putea funcționa precum un organ contractil ⁵. Acest lucru ar putea avea consecințe asupra ratei

de fibrare glomerulară și presiunii sangvine⁵. S-a discutat faptul că upreglarea α -SMA ar putea să aibă legătură cu un grad de fibroză interstițială¹⁰² și o funcție renală alterată¹⁰³.

Din aceste perspective, SC/TC periendoteliale ar putea fi privite fie precum pericite, fie ca miofibroblaști derivați din pericite, sau ca celule progenitoare mezangial-like ce populează interstițiul renal. Aceste diferențe trebuie însă să fie clarificate prin microscopia electronică de transmisie. Deși a fost asumat faptul că astfel de SC/TC α -SMA+ ar rezulta prin transformare epitelial-mezenchimală a celulelor epiteliale¹⁰⁴⁻¹⁰⁶, ceea ce s-ar corela cu evidența mea de celule mioepiteliale, studii ulterioare au demonstrat originea stromală, și nu epitelială, a acestora¹⁰⁷, ceea ce corespunde cu lipsa expresiei epiteliale a α -SMA în preparatele mele. Nu trebuie însă ignorat faptul că există controverse privind originea SC/TC și a miofibroblaștilor. Aceasta deoarece pot rezulta nu doar prin transformare epitelial-mezenchimală ci și din alte surse precum celule derivate din măduva osoasă sau transformarea endotelial-mezenchimală¹⁰⁸.

Zheng și colab. (2017) au realizat un studiu atât prin microscopie electronică de transmisie cât și prin culturi celulare, în care au sortat TC doar pe criterii morfologice și au identificat astfel de TC în spațiul subcapsular renal³⁵, capsula renală nefiind cercetată ca și o nișă de TC, așa cum am documentat eu prin cercetările mele. Acești autori au diagnosticat TC doar prin prezența telopodelor. Este interesant faptul că au documentat și macrofage cu telopode, ceea ce susține comentariul că telopodele ar putea să nu fie indicatori de siguranță pentru diagnosticul TC, acestea trebuie să fie indicate deci precum SC/TC. Pe de altă parte s-a demonstrat adecvat faptul că la nivelul rinichiului capsula acestuia funcționează precum nișă stem, deoarece conține celule stem mezenchimale capabile să contribuie în procesele reparatorii renale¹⁰⁹.

Deci, ca și în alte țesuturi, un subset de TC pare a fi mai degrabă o populație de celule stem/progenitoare^{16, 18, 19}. În rinichiul de nou-născut a fost identificat prin microscopie electronică faptul că nișa renală stem/progenitoare este în contact cu un sistem tisular de canale care se plasează printre celule musculare netede atipice de pe aspectul intern al capsulei renale⁸.

Eu am pus în evidență diferite expresii moleculare la nivelul capsulei renale și la nivelul spațiului subcapsular. TC capsulare exprimă variabil nestina și CD105, exprimă CD34, însă sunt negative pentru alți markeri. TC subcapsulare exprimă nestina, CD105 însă și doi markeri mioizi, α -SMA și SMM, fiind negative pentru alți markeri. Acest lucru indică faptul că SC/TC mioide subcapsulare sunt probabil acele celule musculare atipice indentificate pe aspectul intern al capsulei renale⁸. Expresiile pozitive ale nestinei, CD34 și CD105 susțin un potențial stem/progenitor al SC/TC, atât capsulare, cât și subcapsulare.

Faptul că TC interstițiale mioide au un fenotip similar cu cele subcapsulare sugerează o continuitate a acestor nișe. Acest lucru este în acord cu Alpers și colab. (1994) care au demonstrat existența în rinichiul normal a unei populații de celule interstițiale mioide care pot prolifera și/sau migra în situsuri de injurie tubulo-interstițială⁵. Qi și colab. (2012) au raportat expresia pozitivă a CD34, c-kit și vimentinei în TC interstițiale renale³⁷. Eu nu am găsit expresia c-kit pozitivă iar pe de altă parte, expresia markerului mezenchimal și endotelial vimentină ar putea indica deopotrivă TC și celule endoteliale în dovezile prezentate de autorii respectivi³⁷. CD117/c-kit este un marker stem/progenitor, astfel încât valoarea sa pentru diagnosticul TC, chiar și în tandem cu CD34³⁸, ar trebui reformulată ca indicator al rolului TC în reparația tisulară.

Prezintă importanță comentariul lui Anglani și colab. (2004) referitor la faptul că „în rinichi, ca și în alte țesuturi mezenchimale, nevoia unui compartiment celular stem

real ar putea fi mai puțin importantă decât flexibilitatea fenotipică a celulelor tubulare”¹¹⁰.

În studiul meu am identificat expresia epitelială pozitivă a CD31, completă în ansele Henle și tubii legați la acestea, însă sporadică în ductele colectoare. Acest rezultat a identificat o nișă de cercetare puțin explorată, după cum reiese din discuția următoare.

	UDC (VU)	UDC (TUS)	epiteliul tubular
markeri uroteliali	uroplakina Ia CK	+	ND ND
markeri stem mezenchimali	CD73 CD90 CD105 CD133	+	ND ND +
markeri stem/progenitor	CD44 CD117/c-kit SSEA4	+	ND +
markeri de mușchi neted	α -SMA vimentina calponina desmina miozina	ND +	ND ND +
markeri endoteliali	CD31 vWF	+	+
alți markeri	CD45: – CD34: –	–	ND +

Expresia epitelială tubulară a markerilor din studiul personal, raportată la fenotipul molecular al celulelor stem derivate din urină (UDC, Urine Derived Cells), prelevate de la nivelul vezicii urinare⁷³ și la fenotipul UDC obținute din tractul urinar superior¹¹¹. ND: markerul nu a fost determinat. vWF: factor von Willebrand; VU: vezica urinară; TUS: tractul urinar superior; CK- citokeratine.

Țesutul renal normal exprimă CD31 în celulele endoteliale glomerulare și celulele endoteliale interstițiale iar în epiteliul tubular apar expresia VEGF și timidin fosforilazei¹¹². În nefropatia membranară idiopatică, care este o alterare la nivel glomerular, se pierde expresia glomerulară a CD31 dar acest antigen devine exprimat pozitiv în celulele epiteliale tubulare¹¹². A fost discutată posibilitatea ca expresia tubulară a CD31 să semnifice preluarea de fragmente celulare de suprafață CD31+ pornite de la nivelul celulelor glomerulare în celule epiteliale tubulare; pe de altă parte se pierde expresia VEGF și timidin fosforilazei în celulele tubulare, ceea ce conduce la degradarea mecanismelor angiogenice care pot promova angiogeneza glomerulară¹¹². Autorii respectivi însă ignoră posibilitatea ca expresia tubulară a CD31 să fie un proces independent care să conducă la eliminarea acestor celule în urină, cum de altfel nici nu comentează posibilitatea unor procese de transformare epitelial-mezenchimală, sau epitelial-endotelială, la nivelul epiteliului tubular.

A fost testată expresia angiogeninei în nefrogeneză, rinichi non tumoral și tumori Wilms; studiul respectiv a identificat o corelație statistică semnificativă între angiogenină și CD31, rezultatele fiind indicative pentru procesele de angiogeneza¹¹³. Expresia pozitivă a angiogeninei a fost depistată în glomeruli, vase și în tubii proximali¹¹³.

Prezintă importanță faptul că am identificat expresia epitelială tubulară a unor markeri specifici liniilor mezenchimală și endotelială, inclusiv ai celulelor stem/progenitoare. Există o corespondență clară cu elemente de fenotip molecular identificate *in vitro* pentru celulele stem derivate din urină și prelevate de la nivelul vezicii urinare⁷³ (**tab.6-1**). Corelația există și pentru celule stem derivate din urină dar prelevate la nivelul tractului urinar superior¹¹¹.

Sursa de celule stem endogene ale rinichiului ar putea fi epiteliul tubular sau papila renală; celulele parietale ale capsulei Bowman funcționează precum celule stem în glomeruli – se pot reînnoi și pot da naștere la podocite și celule tubulare proximale³. Aici trebuie însă avut în vedere faptul că au fost demonstrate convingător celule stem/progenitoare la nivelul epiteliilor renale, mai ales în tubii proximali și în epiteliul parietal al capsulei Bowman, cu fenotip CD24+/CD133+¹¹⁴. A fost demonstrat însă faptul că celulele CD24+/CD133- nu exprimă CD31¹¹⁵. Celulele epiteliale devin celule stem mezenchimale prin procese de transformare epitelial-mezenchimală³. Celulele stem derivate din urină (UDC) reprezintă o nișă de cercetare care a început destul de recent să fie explorată^{4, 73, 116}. Identificarea originii UDC ar putea facilita înțelegerea impactului acestei populații de celule stem mezenchimale multipotente la nivelul tractului urinar³. Evidențele acumulate indică faptul că aceste UDC ar proveni probabil din celule epiteliale parietale ale capsulei Bowman³. Expresia pozitivă a CD31 pe care am identificat-o în epiteliul tubular, corelată cu expresia acestui marker în UDC, indică faptul că mai degrabă UDC ar putea proveni din epiteliile tubulare, și nu din epiteliul parietal al capsulei Bowman. Prezintă importanță în acest context faptul că UDC se pot diferenția în celule ale liniilor endotelială, osteogenică, condrogenică, adipogenică, miogenică scheletică și neurogenică⁴. Aprecierea fenotipului molecular *in vitro* al UDC a identificat expresia pozitivă a CD31^{73, 111}, sau negativă^{4, 116, 117}. Se poate conchide fie că expresia CD31 este versatilă, fie, și susțin prin rezultatele mele, că eliminarea în urină a celulelor epiteliale tubulare este un proces versatil prin care pot fi eliminate fie celule CD31+, fie CD31-. S-a demonstrat faptul că gena CD31 este upreglată pe parcursul diferențierii USC în celule endoteliale¹¹⁸. În mod repetat însă s-a demonstrat că UDC nu exprimă CD34¹¹⁷; eu am identificat însă în cercetările mele expresia CD34 în epiteliul tubular renal, acest lucru putând fi privit ca un marker de transformare epitelial-mezenchimală în primul rând, și nu ca un identificator de UDC. Neîndoielnic sunt necesare studii viitoare cu dublă imunomarcare, care să localizeze sau să co-localizeze CD31 și CD34 în epiteliile tubulare. Este importantă observația că populația de UDC conține atât celule uroteliale cât și celule stem¹¹⁹, iar în acest context faptul că eu am găsit celule CD31+ atât în epiteliile tubulare cât și în uroteliu nu ajută la decelarea originii exacte a UDC ci doar adaugă epiteliul tubular la uroteliu ca furnizor de UDC.

Rezultatele mele indică faptul că expresia markerilor mioizi în epiteliile renale este marker-specifică. În timp ce α -SMA nu a fost exprimată în celulele epiteliale, expresia SMM a fost ocazională în tubulii corticali și ductele colectoare, însă uzuală în ansele Henle. Desmina a fost exprimată în tubulii corticali și ansele Henle însă a apărut rar în ductele colectoare. Când au fost exprimați, markerii mioizi au fost localizați bazal. În corpusculii renali desmina a fost exprimată ocazional în celulele epiteliale parietale iar SMM a apărut ocazional în endoteliile glomerulare. Aceste rezultate susțin ipoteza rinichiului contractil care, în prezent, este extrem de puțin documentată⁵.

Ross și Reith (1970) au studiat prin microscopie electronică tubul contort proximal comentând faptul că rezultatele lor sunt în acord cu cele ale lui Pease (1968) și că, probabil, componenta mioidă tubulară și glomerulară are rol în transportul fluidelor și electroliților¹²⁰. Cei doi autori observă faptul că opacitatea citoplasmei bazale a compartimentelor/proceselor celulelor epiteliale tubulare nu este o regulă, se corelează mai degrabă cu procesele citoplasmice groase și nu întotdeauna se decelează în cele subțiri¹²⁰. Mai degrabă procesele mai subțiri prezintă caracteristici microvilare decât densități bazale¹²⁰. Aceste densități bazale sunt produse de filamente fine, cu grosimi de 50-70 Å¹²⁰. Procesele groase conțin ribozomi, de regulă organizați ca și polizomi, reticul

endoplasmic neted și, ocazional, microtubuli ¹²⁰. Cele microvilare sunt lipsite de aceste organite ¹²⁰.

Am prezentat în secțiunea de Rezultate dovada existenței unui veritabil aparat sfincterian tubular, rezultată din aprecierea în microscopia electronică. Acest aparat sfincterian a fost indicat și de Ross și Reith (1970) care discutau că „*atunci când sunt observate în secțiuni razante benzile mioide bazale tubulare sunt aranjate într-un model circular în jurul tubilor în care există la periferie benzi mioide*” iar acest aspect este comparabil cu dispoziția mușchiului neted arteriolar ¹²⁰. Aceste elemente cu dispoziție sfincteriană au fost documentate precum filamente subțiri de actină și de Maunsbach (1972), citat în ¹²¹. Am în vedere aici și faptul că benzile mioide ale acestor sfinctere tubulare reprezintă, pe de altă parte, bariere structurale pentru procesele de secreție și reabsorbție tubulară.

După Pease (1968) situația nu este identică la nivelul tubului distal unde doar rar se găsesc compartimente celulare bazale cu filamente, conform unui model vestigial sau slab diferențiat ⁹⁹.

Ross și Reith (1970) au apreciat și ultrastructura tubilor distali și capsulei Bowman, unde au observat de asemenea elemente filamentare identice cu cele din tubii proximali ¹²⁰. În regiunile mioide ale citoplasmei au notat absența ribozomilor, mitocondriilor și a organitelor cu membrane ¹²⁰.

Tanaka și colab. (1977) au identificat filamente de actină și miozină, de asemenea în celulele epiteliale ale capsulei Bowman și în celulele epiteliale ale tubilor proximali ¹²².

Trenchev și colab. (1976) au lucrat rinichi de șobolan și au găsit în imunolectron microscopie că actina se localizează în procesele podocitelor, procesele bazale ale celulelor epiteliale tubulare și în celulele musculare netede, în timp ce miozina era localizată numai în celulele musculare netede vasculare ¹²³. Aici ar putea fi vorba de un pattern dependent de specie. Mai mult, Saleem și colab. (2008) au demonstrat că podocitele mature, *in vitro*, au un fenotip mioid neted contractil funcțional, însă cu niveluri reduse de α -SMA ¹²⁴.

Pease (1968) identifică faptul că celulele interstițiale intertubulare ale rinichiului conțin un sistem de filamente aparent identic cu cel mioid ⁹⁹. Numeroase zone ale citoplasmei acestor celule au aceeași densitate omogenă precum cea a celulelor musculare netede și în general sunt lipsite de organite, cu excepția ribozomilor; în aceste zone se localizează filamente aspre ⁹⁹. Aceste celule au formă neregulată și pseudopode lungi ⁹⁹. Ross și Reith (1970) nu se referă la componenta mioidă a celulelor interstițiale renale.

Celulele interstițiale mioide ale rinichiului au fost apreciate de Alpers și colab. (1994), prin imunohistochimie și microscopie electronică ⁵. În toate cazurile apreciate, peste jumătate din ariile interstițiale corticale au prezentat populații de celule peritubulare fusiforme care au exprimat α -SMA și actina panmusculară ⁵. Acestea însă nu au exprimat desmina ⁵. Distribuția acestor celule a fost superpozabilă peste distribuția rețelei capilare peritubulare, aceste celule fiind plasate între rețeaua de capilare și membrana bazală tubulară ⁵. În zone cu fibroză interstițială numărul celulelor exprimând actina a fost crescut ⁵. În ariile de fibroză periglomerulară de asemenea au prezentat o acumulare concentrică de celule interstițiale actin-pozitive ⁵. Rar a fost detectat un aspect care sugera că celulele interstițiale actin-pozitive derivă din populația celulară periglomerulară și migrează prin spațiul glomerular ⁵. În microscopia electronică imună, cu aceiași anticorpi, populația fibroblastoidă interstițială a fost marcată și a prezentat o serie de caracteristici:

procesele celulare lungi, prezența consistentă a reticulului endoplasmic rugos și absența structurilor de atașament celulare⁵. Nu au fost marcate pozitiv nici celule endoteliale, nici celulele epiteliale tubulare⁵. Corelând rezultatele studiului acesta, observ că autorii nu indică distinct formarea de rețele interstițiale mioide de celulele pe care eu le-am indicat precum interstițiale slab diferențiate, deși rezultatele lor susțin evidențele mele. Faptul că actina nu a fost identificată în epitelii poate sugera faptul că structurile mioide epiteliale sunt realizate de miozină și nu de actină.

Se consideră că celulele mezangiale sunt celule contractile, similare celulelor musculare netede¹²⁵. Ultrastructura celulelor mezangiale a fost descrisă în anii '60: celulele conțin reticul endoplasmic, mitocondrii, complexe Golgi, mici vezicule, citozomi și un nucleu indentat¹²⁶. Deși au fost aduse argumente privind contractilitatea celulelor mezangiale, acestea au rezultat după studii *in vitro*; unele studii ultrastructurale au arătat că aceste celule conțin, *in situ*, fascicule de microfilamente care se inseră pe corpi denși mioizi, similare celulelor musculare netede vasculare¹²⁵. Aceste microfilamente sunt mai dense în procesele celulare¹²⁵. Drenckhahn și colab. (1990) au apreciat ultrastructura celulelor mezangiale după cum urmează. Aceste celule sunt celule foarte ramificate, cu procese întinse în toate direcțiile¹²⁵. De la nivelul corpului celular sau de la nivelul proceselor principale pornesc procese groase, ce pot fi diferențiate de microprocesse asemănătoare microvililor¹²⁵. Acestea din urmă se îndreaptă către porțiunea perimezangială a membranei bazale glomerulare¹²⁵. Toate procesele celulelor mezangiale conțin microfilamente abundente, de regulă grupate în fascicule, paralele cu axul longitudinal al proceselor sau având o dispoziție oblică¹²⁵. Au fost decelate intersecții ale microfilamentelor iar acestea nu au ocupat regiunea perinucleară¹²⁵. Au mai fost identificate de asemenea filamente intermediare și microtubuli¹²⁵.

Pease (1968), în ceea ce reprezintă singurul studiu ultrastructural documentat exhaustiv al structurilor mioide intrarenale, discută⁹⁹ despre celulele polkissen agranulare, comparabile cu cele identificate de mine pe preparate. Autorul respectiv discută faptul că descoperirea unui sistem de miofilamente în celulele epiteliale ale rinichiului (aici trece cu vederea celulele interstițiale mioide pe care eu le-am pus în evidență fără îndoială) nu trebuie să surprindă dacă se are în vedere originea embriologică comună a epiteliiilor acestea cu celulele musculare netede vasculare; se poate considera astfel un sistem contractil continuu, ce include celulele musculare netede vasculare, celulele juxtaglomerulare și celulele epiteliale ale capsulei Bowman și tubulilor intrarenali (aici sunt incluse și celulele interstițiale), sistem miofilamentar care diminuează la nivelul celulelor polkissen agranulare, în mezangiu și în podocite⁹⁹.

Sunt puține datele despre prezența celulelor stem în rinichiul adult însă a fost documentat faptul că în anumite condiții rinichiul se poate regenera prin creșterea proliferării unor celule rezidente¹²⁷. Originea acestor celule nu este clară încă, considerându-se frecvent că derivă din celule stem sau progenitori rezidenți renali¹²⁷. Încă se apreciază dacă aceste celule imature (eu am adus evidențe certe ale unor celule slab diferențiate, localizate deopotrivă interstițial și intraepitelial) sunt o subpopulație conservată din stadii primitive ale nefrogenezei¹²⁷. A fost de asemenea sugerată contribuția extrarenală cu celule stem din măduva osoasă¹²⁷. Un studiu a identificat faptul că celulele stem care au repopulat postischemic tubulii renali ar putea avea origine extrarenală și pot ajunge în parenchimul renal prin vasele sangvine¹²⁸. Celulele imature migrează în tubii renali cu leziuni și se diferențiază în celule epiteliale mature care pot înlocui peste 80% din celulele lezate¹²⁸.

Sunt necesare studii complexe privind potențialul regenerativ renal uman care să ofere tabloul moleculelor țintite asupra genelor relevante pentru fiziopatologia regenerării, ceea ce va putea înlocui dializa renală sau transplantul renal ⁷.

Un studiu recent a indicat faptul că celule stem/progenitoare derivate din măduva osoasă nu au o contribuție semnificativă la reparația tubulară epitelială după un eveniment ischemic și că redresarea morfofuncțională a epiteliului tubular este realizată prin proliferarea intrinsecă a celulelor epiteliale tubulare ¹²⁹.

Identificarea expresiei markerilor de celule stem în rinichi a inclus CD133 și CD24, al doilea marker fiind specific și mezenchimului metanefric ⁷. Din epiteliul tubular au fost izolate celule cu potențial de diferențiere epitelial și endotelial ⁷. De asemenea, din capsule Bowman adulte au fost izolate celule progenitoare multipotente CD133+/CD24+ ⁷. Eu am adus evidențe ale expresiei nestinei în podocite și în rețele interstițiale. Se pare că podocitele derivă din precursori care exprimă nestina, de la nivelul epiteliului parietal al capsulei Bowman ⁷. Nișele perivascularare cunoscute ca nișe stem ⁷; consider că la nivel renal histologia specifică permite suprapunerea la nivel interstițial a nișelor perivasculară și peritubulară, în care se localizează, după cum am obiectivat clar prin microscopia electronică de transmisie, celule stem/progenitoare nediferențiate. Observații recente susțin într-adevăr faptul că interstițiul renal poate fi o nișă pentru o populație de celule stem încă neidentificate și/sau poate găzdui celule stem derivate din măduva osoasă, aduse prin sânge ¹²⁸.

Dacă am în vedere faptul că am identificat în microscopia electronică de transmisie celule epiteliale tubulare lipsite de particularitățile morfologice specifice tipurilor diferențiate, trebuie să aduc în discuție un studiu care apreciază aceste populații celulare epiteliale tubulare și în care acestea au fost comparate în imuno-electron microscopie cu celulele epiteliale convenționale, identificându-se că au mai puțină citoplasmă, mai puține mitocondrii și sunt lipsite de microvili și de invaginări bazolaterale ¹¹⁴, ceea ce este similar evidențelor mele. Aceste celule exprimă CD24 care colocalizează cu alți opt markeri ce includ CD133 ¹¹⁴; CD24 și CD133 colocalizează și în celulele parietale ale capsulei Bowman ¹¹⁴, ceea ce sprijină diagnosticul meu de celule stem/progenitoare localizate în epiteliul capsular parietal, pe care le-am decelat în microscopia electronică. Colocalizarea CD24 cu aquaporina-1 (marker exprimat în tubii proximali și brațul gros descendent al anselor Henle) a precizat ¹¹⁴ că astfel de celule stem/progenitoare se găsesc de regulă în tubii proximali. Nu au fost identificate prin dublă imunomarcare în tubii distali însă colocalizarea cu aquaporina-2 a identificat un subset în tubii colectorii ¹¹⁴. Celulele CD24+/CD133+ din tubii proximali au exprimat și vimentină, integrină αV și annexina 3 ¹¹⁴; vimentina a fost exprimată și în podocite, integrina αV în celulele parietale capsulare iar anexina 3 a fost exprimată și în tubii distali ¹¹⁴. Alte studii, citate în ¹¹⁴ au demonstrat co-expresia proteinei anti-apoptotice Bcl-2 și a citokeratinelor 7 și 19 în celulele CD24+/CD133+. În evaluarea fenotipică a celulelor tubulare epiteliale stem/progenitoare nu au fost aplicați markeri precum CD31, CD34, c-kit, CD105, NSE, desmină și miozină, markeri a căror expresie pozitivă am identificat-o în epiteliul tubular.

Rinichiul posedă o mare capacitate de regenerare ². Nu se poate însă indica o anumită populație master care să guverneze procesul de regenerare la nivelul rinichiului; studii de nefrologie experimentală trebuie realizate în continuare pentru identificarea posibilităților de utilizare a potențialului regenerativ endogen al rinichiului în practica medicală ².

CONCLUZIILE TEZEI DE DOCTORAT

1. La nivelul stromei ureterale am identificat heterogenitatea fenotipică moleculară a telocitelor care nu exclude potențialul subseturilor identificate în cadrul nișei stem ureterale.
2. Am demonstrat faptul că teaca fibromusculară a lui Waldeyer nu este o structură specifică joncțiunii ureterovezicale. O astfel de adventice muscularizată se localizează și la nivelul ureterului proximal. Lipsa specificității topografice a acesteia impune aprecierea funcțională și nu anatomică a patologiei de reflux vezicoureteral.
3. Am obținut evidențe indiscutabile ale localizării celulelor neuroendocrine în ureter, ceea ce nu se cunoștea anterior. Celulele neuroendocrine ureterale se localizează în compartimentul stromal, precum celule rezidente ale ureterului, ceea ce combate ipoteze precum originea acestor celule din creasta neurală sau metaplazia neuroendocrină la nivel ureteral. Se explică astfel morfologic posibilitatea formării de tumori neuroendocrine ureterale.
4. Am demonstrat fenotipul mioid renal, molecular și ultrastructural, asociat sau nu unei funcții contractile, atât în compartimentul epitelial renal, cât și la nivelul celui interstițial. Acesta poate avea rol în funcția renală individuală. Însă, sunt necesare studii ulterioare care să stabilească dacă celulele stromale/telocitele renale sunt miofibroblaștii asociați cu diferite modificări patologice renale.
5. Componenta mioidă bazală a epitelilor tubulare realizează veritabile sfîinctere anatomice care ajută funcția de eliminare a urinei însă nu pot decât să reducă procesele de adaptare dinamică a compoziției acesteia.
6. Am demonstrat prin imunohistochimie prezența miozinei în celule endoteliale renale umane. Fenotipul mioid endotelial l-am obiectivat prin microscopie electronică la șobolan. Aceste evidențe susțin rolul activ al microvaselor renale în funcția renală.
7. În nișa interstițială renală se localizează celule progenitoare mioide. Caracteristicile acestora sunt comparabile cu cele ale celulelor mezangiale, ceea ce indică acest tip celular precum pan-interstițial renal. Structura rinichiului permite suprapunerea nișei interstițiale peste nișa perivasculară recunoscută în prezent precum nișa stem universală a adultului.
8. Telocitele renale posedă de asemenea heterogenitate fenotipică moleculară însă existența acestora trebuie întărită prin evidențe certe cu reconstrucții tridimensionale în microscopia electronică.
9. Rinichiul și căile urinare posedă o mare capacitate de mentenanță structurală și regenerare, demonstrate prin fenotipuri moleculare și ultrastructurale în compartimentele epitelial și interstițial. Nu se poate însă indica o anumită populație stem master din care să derive subseturi specifice diferitelor linii celulare regenerate.
10. Fenotipurile endotelial și hematopoietic ale celulelor epiteliale tubulare pot indica tubulii renali ca punct de plecare a celulelor stem urinare. Uroteliul ureteral care prezintă un tablou molecular similar indică și căile urinare precum surse de celule stem urinare.

Bibliografie (selectivă)

1. Hatina J, Schulz WA. Stem cells in the biology of normal urothelium and urothelial carcinoma. *Neoplasma* 2012; **59**(6): 728-36.
2. Little MH, Bertram JF. Is there such a thing as a renal stem cell? *J Am Soc Nephrol* 2009; **20**(10): 2112-7.
3. Zhang D, Wei G, Li P, Zhou X, Zhang Y. Urine-derived stem cells: A novel and versatile progenitor source for cell-based therapy and regenerative medicine. *Genes Dis* 2014; **1**(1): 8-17.
4. Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, Wu R, Yang B, He T, Fan Y, Lu X, Zhou X, Liu H, Atala A, Rohozinski J, Zhang Y. Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: potential for therapeutic applications in urology. *Stem Cells* 2013; **31**(9): 1840-56.
5. Alpers CE, Hudkins KL, Floege J, Johnson RJ. Human renal cortical interstitial cells with some features of smooth muscle cells participate in tubulointerstitial and crescentic glomerular injury. *J Am Soc Nephrol* 1994; **5**(2): 201-9.
6. Nagle RB, Kneiser MR, Bulger RE, Benditt EP. Induction of smooth muscle characteristics in renal interstitial fibroblasts during obstructive nephropathy. *Lab Invest* 1973; **29**(4): 422-7.
7. Benigni A, Morigi M, Remuzzi G. Kidney regeneration. *Lancet* 2010; **375**(9722): 1310-7.
8. Minuth WW, Denk L. Structural links between the renal stem/progenitor cell niche and the organ capsule. *Histochem Cell Biol* 2014; **141**(5): 459-71.
9. Popescu LM, Faussone-Pellegrini MS. TELOCYTES - a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. *J Cell Mol Med* 2010; **14**(4): 729-40.
10. Rusu MC, Mirancea N, Manoiu VS, Valcu M, Nicolescu MI, Paduraru D. Skin telocytes. *Ann Anat* 2012; **194**(4): 359-67.
11. Rusu MC, Loreto C, Manoiu VS. Network of telocytes in the temporomandibular joint disc of rats. *Acta Histochem* 2014; **116**(4): 663-8.
12. Rusu MC. Skin telopodes. *Rom J Morphol Embryol* 2014; **55**(2 Suppl): 723-4.
13. Vrapciu AD, Rusu MC, Leonardi R, Corbu CG. Stem potentialities of the human iris - An in situ immunohistochemical study. *Acta Histochem* 2014; **116**(8): 1509-13.
14. Rusu MC, Pop F, Hostiuc S, Curca GC, Jianu AM, Paduraru D. Telocytes form networks in normal cardiac tissues. *Histol Histopathol* 2012; **27**(6): 807-16.
15. Rusu MC, Nicolescu MI, Jianu AM, Lighezan R, Manoiu VS, Paduraru D. Esophageal telocytes and hybrid morphologies. *Cell Biol Int* 2012; **36**(12): 1079-88.
16. Rusu MC, Hostiuc S, Vrapciu AD, Mogoanta L, Manoiu VS, Grigoriu F. Subsets of telocytes: Myocardial telocytes. *Ann Anat* 2017; **209**: 37-44.
17. Rusu MC, Cretoiu D, Vrapciu AD, Hostiuc S, Dermengiu D, Manoiu VS, Cretoiu SM, Mirancea N. Telocytes of the human adult trigeminal ganglion. *Cell Biol Toxicol* 2016; **32**(3): 199-207.
18. Petre N, Rusu MC, Pop F, Jianu AM. Telocytes of the mammary gland stroma. *Folia Morphol (Warsz)* 2016; **75**(2): 224-31.
19. Grigoriu F, Hostiuc S, Vrapciu AD, Rusu MC. Subsets of telocytes: the progenitor cells in the human endocardial niche. *Rom J Morphol Embryol* 2016; **57**(2 Suppl): 767-74.
20. Vannucchi MG, Faussone-Pellegrini MS. The Telocyte Subtypes. *Adv Exp Med Biol* 2016; **913**: 115-26.
21. Sanches BD, Corradi LS, Vilamaior PS, Taboga SR. Paracrine Signaling in the Prostatic Stroma: A Novel Role for the Telocytes Revealed in Rodents' Ventral Prostate. *Adv Exp Med Biol* 2016; **913**: 193-206.
22. Cretoiu SM, Popescu LM. Telocytes revisited. *Biomol Concepts* 2014; **5**(5): 353-69.
23. Dobra MA, Vrapciu AD, Pop F, Petre N, Rusu MC. The molecular phenotypes of ureteral telocytes are layer-specific. *Acta Histochem* 2017; 10.1016/j.acthis.2017.11.003.
24. Vannucchi MG, Bani D, Faussone-Pellegrini MS. Telocytes Contribute as Cell Progenitors and Differentiation Inductors in Tissue Regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther* 2016; **11**(5): 383-9.
25. Ilie CA, Rusu MC, Didilescu AC, Motoc AG, Mogoanta L. Embryonic hematopoietic stem cells and interstitial Cajal cells in the hindgut of late stage human embryos: evidence and hypotheses. *Ann Anat* 2015; **200**: 24-9.
26. Rusu MC, Didilescu AC, Stanescu R, Pop F, Manoiu VM, Jianu AM, Valcu M. The mandibular ridge oral mucosa model of stromal influences on the endothelial tip cells: an immunohistochemical and TEM study. *Anat Rec (Hoboken)* 2013; **296**(2): 350-63.
27. Rusu MC, Motoc AG, Pop F, Folescu R. Sprouting angiogenesis in human midterm uterus and fallopian tube is guided by endothelial tip cells. *Anat Sci Int* 2013; **88**(1): 25-30.
28. Rusu MC, Poalelungi CV, Vrapciu AD, Nicolescu MI, Hostiuc S, Mogoanta L, Taranu T. Endocardial tip cells in the human embryo - facts and hypotheses. *PLoS One* 2015; **10**(1): e0115853.
29. Stanescu R, Didilescu AC, Jianu AM, Rusu MC. Angiogenesis in the reparatory mucosa of the mandibular edentulous ridge is driven by endothelial tip cells. *Rom J Morphol Embryol* 2012; **53**(2): 375-8.

30. Zheng Y, Wang X. Roles of Telocytes in the Development of Angiogenesis. *Adv Exp Med Biol* 2016; **913**: 253-61.
31. Zhaofu L, Dongqing C. Cardiac Telocytes in Regeneration of Myocardium After Myocardial Infarction. *Adv Exp Med Biol* 2016; **913**: 229-39.
32. Zhao Y, Chen X, Wang F, Yang C. Hepatic Telocytes. *Adv Exp Med Biol* 2016; **913**: 425-32.
33. Zhang H, Zhong S, Yu P, Ge T, Peng S, Guo X, Zhou Z. Telocytes in gastric lamina propria of the Chinese giant salamander, *Andrias davidianus*. *Sci Rep* 2016; **6**: 33554.
34. Urban L, Miko M, Kajanova M, Bozikova S, Mrazova H, Varga I. Telocytes (interstitial Cajal-like cells) in human Fallopian tubes. *Bratisl Lek Listy* 2016; **117**(5): 263-7.
35. Zheng Y, Zhu T, Lin M, Wu D, Wang X. Telocytes in the urinary system. *J Transl Med* 2012; **10**: 188.
36. Wolnicki M, Aleksandrovych V, Gil K. Interstitial cells of Cajal and telocytes in the urinary system: facts and distribution. *Folia Med Cracov* 2016; **56**(4): 81-9.
37. Qi G, Lin M, Xu M, Manole CG, Wang X, Zhu T. Telocytes in the human kidney cortex. *J Cell Mol Med* 2012; **16**(12): 3116-22.
38. Li L, Lin M, Li L, Wang R, Zhang C, Qi G, Xu M, Rong R, Zhu T. Renal telocytes contribute to the repair of ischemically injured renal tubules. *J Cell Mol Med* 2014; **18**(6): 1144-56.
39. Vannucchi MG, Traini C, Guasti D, Del Popolo G, Faussone-Pellegrini MS. Telocytes subtypes in human urinary bladder. *J Cell Mol Med* 2014; **18**(10): 2000-8.
40. Rusu MC, Folescu R, Manoiu VS, Didilescu AC. Suburothelial interstitial cells. *Cells Tissues Organs* 2014; **199**(1): 59-72.
41. Povysil C, Kana M, Zamecnik L, Valova Z, Hanus T. Podoplanin (D2-40) is a reliable marker of urinary bladder myofibroblasts (telocytes). *Folia Biol (Praha)* 2014; **60**(6): 286-9.
42. Balicki O, Turunc T, Bal N, Celik H, Ozkardes H. Comparison of Cajal-like cells in pelvis and proximal ureter of kidney with and without hydronephrosis. *Int Braz J Urol* 2015; **41**(6): 1178-84.
43. Gevaert T, De Vos R, Van Der Aa F, Joniau S, van den Oord J, Roskams T, De Ridder D. Identification of telocytes in the upper lamina propria of the human urinary tract. *J Cell Mol Med* 2012; **16**(9): 2085-93.
44. Noordzij JW, Dabhoiwala NF. A view on the anatomy of the ureterovesical junction. *Scand J Urol Nephrol* 1993; **27**(3): 371-80.
45. Rusu MC, Pop F, Petre N, Dobra MA. The sheath of Waldeyer is not a specific anatomical trait of the ureterovesical junction. *Morphologie* 2017; 10.1016/j.morpho.2017.11.001.
46. Roshani H, Dabhoiwala NF, Verbeek FJ, Lamers WH. Functional anatomy of the human ureterovesical junction. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 1996; **245**(4): 645-51.
47. Elbadawi A. Anatomy and function of the ureteral sheath. *J Urol* 1972; **107**(2): 224-9.
48. Selaru M, Hostiuc S, Rusu MC. Intrinsic neuroendocrine cells in the outer wall of the human pyriform recess. *Anat Sci Int* 2015; **90**(4): 251-5.
49. Taomoto K, Kokunai T, Okuda T, Tamaki N, Matsumoto S, Hashimoto N. The value of neuron specific enolase (NSE) in patients with brain tumors. *No to shinkei= Brain and nerve* 1987; **39**(2): 169-73.
50. Wharton J, Polak J, Cole G, Marangos P, Pearse A. Neuron-specific enolase as an immunocytochemical marker for the diffuse neuroendocrine system in human fetal lung. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1981; **29**(12): 1359-64.
51. Marangos PJ, Schmechel DE. Neuron specific enolase, a clinically useful marker for neurons and neuroendocrine cells. *Annu Rev Neurosci* 1987; **10**: 269-95.
52. Carter RL, al-Sams SZ, Corbett RP, Clinton S. A comparative study of immunohistochemical staining for neuron-specific enolase, protein gene product 9.5 and S-100 protein in neuroblastoma, Ewing's sarcoma and other round cell tumours in children. *Histopathology* 1990; **16**(5): 461-7.
53. Rumpold H, Heinrich E, Untergasser G, Hermann M, Pfister G, Plas E, Berger P. Neuroendocrine differentiation of human prostatic primary epithelial cells in vitro. *Prostate* 2002; **53**(2): 101-8.
54. Acosta AM, Kajdacsy-Balla A. Primary Neuroendocrine Tumors of the Ureter: A Short Review. *Arch Pathol Lab Med* 2016; **140**(7): 714-7.
55. Zhikun G, Liping M, Kang G, Yaofeng W. Structural relationship between microlymphatic and microvascular blood vessels in the rabbit ventricular myocardium. *Lymphology* 2013; **46**(4): 193-201.
56. Yaghmaei M, Mashhadiabbas F, Shahabi S, Zafarbakhsh A, Yaghmaei S, Khojasteh A. Histologic evaluation of inferior alveolar lymphatics: an anatomic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011; **112**(5): 564-7.
57. Teijeira A, Rouzaut A, Melero I. Initial afferent lymphatic vessels controlling outbound leukocyte traffic from skin to lymph nodes. *Front Immunol* 2013; **4**: 433.
58. Sleeman JP, Krishnan J, Kirkin V, Baumann P. Markers for the lymphatic endothelium: in search of the holy grail? *Microsc Res Tech* 2001; **55**(2): 61-9.
59. Schroedl F, Brehmer A, Neuhuber WL, Kruse FE, May CA, Cursiefen C. The normal human choroid is endowed with a significant number of lymphatic vessel endothelial hyaluronate receptor 1 (LYVE-1)-positive macrophages. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; **49**(12): 5222-9.

60. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Garcia MP, Saez FJ, Diaz-Flores L, Jr., Valladares F, Madrid JF. CD34+ stromal cells/fibroblasts/fibrocytes/telocytes as a tissue reserve and a principal source of mesenchymal cells. Location, morphology, function and role in pathology. *Histol Histopathol* 2014; **29**(7): 831-70.
61. Barth PJ, Westhoff CC. CD34+ fibrocytes: morphology, histogenesis and function. *Curr Stem Cell Res Ther* 2007; **2**(3): 221-7.
62. Taomoto K, Kokunai T, Okuda T, Tamaki N, Matsumoto S, Hashimoto N. [The value of neuron specific enolase (NSE) in patients with brain tumors]. *No To Shinkei* 1987; **39**(2): 169-73.
63. Wharton J, Polak JM, Cole GA, Marangos PJ, Pearse AG. Neuron-specific enolase as an immunocytochemical marker for the diffuse neuroendocrine system in human fetal lung. *J Histochem Cytochem* 1981; **29**(12): 1359-64.
64. Delcore R, Friesen SR. Embryologic concepts in the APUD system. *Semin Surg Oncol* 1993; **9**(5): 349-61.
65. Hayashi Y, Takemura T, Hirokawa K. Expression of neuron-specific enolase, Leu-7, and neuropeptides in human fetal salivary gland epithelium. *J Histochem Cytochem* 1989; **37**(7): 1147-52.
66. Wang G, Tokushige N, Russell P, Dubinovsky S, Markham R, Fraser IS. Neuroendocrine cells in eutopic endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod* 2010; **25**(2): 387-91.
67. Soh M, Dunlevy JR, Garrett SH, Allen C, Sens DA, Zhou XD, Sens MA, Somji S. Increased neuron specific enolase expression by urothelial cells exposed to or malignantly transformed by exposure to Cd(2)(+) or As(3)(+). *Toxicol Lett* 2012; **212**(1): 66-74.
68. Hayward SW, Cunha GR. The prostate: development and physiology. *Radiol Clin North Am* 2000; **38**(1): 1-14.
69. Untergasser G, Plas E, Pfister G, Heinrich E, Berger P. Interferon-gamma induces neuroendocrine-like differentiation of human prostate basal-epithelial cells. *Prostate* 2005; **64**(4): 419-29.
70. Ho PL, Kurtova A, Chan KS. Normal and neoplastic urothelial stem cells: getting to the root of the problem. *Nat Rev Urol* 2012; **9**(10): 583-94.
71. Czaja K, Sienkiewicz W, Vittoria A, Costagliola A, Cecio A. Neuroendocrine cells in the female urogenital tract of the pig, and their immunohistochemical characterization. *Acta Anat (Basel)* 1996; **157**(1): 11-9.
72. Sun W, Wilhelmina Aalders T, Oosterwijk E. Identification of potential bladder progenitor cells in the trigone. *Dev Biol* 2014; **393**(1): 84-92.
73. Zhang Y, McNeill E, Tian H, Soker S, Andersson KE, Yoo JJ, Atala A. Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction. *J Urol* 2008; **180**(5): 2226-33.
74. Metzger R, Rolle U, Fiegel HC, Franke FE, Muenstedt K, Till H. C-kit receptor in the human vas deferens: distinction of mast cells, interstitial cells and interepithelial cells. *Reproduction* 2008; **135**(3): 377-84.
75. Metzger R, Neugebauer A, Rolle U, Bohlig L, Till H. C-Kit receptor (CD117) in the porcine urinary tract. *Pediatr Surg Int* 2008; **24**(1): 67-76.
76. Metzger R, Schuster T, Till H, Franke FE, Dietz HG. Cajal-like cells in the upper urinary tract: comparative study in various species. *Pediatr Surg Int* 2005; **21**(3): 169-74.
77. Metzger R, Schuster T, Till H, Stehr M, Franke FE, Dietz HG. Cajal-like cells in the human upper urinary tract. *J Urol* 2004; **172**(2): 769-72.
78. Ellem KA, Gardiner RA. Diuretic potentiation of shedding of renal progenitor cells. *Lancet* 1985; **2**(8461): 946-7.
79. Dejager H. Bizarre Smooth-Muscle Tumour of the Ureter. *J Pathol Bacteriol* 1964; **87**: 424-5.
80. Puchtler H, Waldrop FS, Meloan SN, Branch BW. Myoid fibrils in epithelial cells: studies of intestine, biliary and pancreatic pathways, trachea, bronchi, and testis. *Histochemistry* 1975; **44**(2): 105-18.
81. Harper JT, Puchtler H, Meloan SN, Terry MS. Light-microscopic demonstration of myoid fibrils in renal epithelial, mesangial and interstitial cells. *J Microsc* 1970; **91**(2): 71-85.
82. Hutch JA. The mesodermal component: its embryology, anatomy, physiology and role in prevention of vesicoureteral reflux. *J Urol* 1972; **108**(3): 406-10.
83. Tanagho EA. Ureteral embryology, developmental anatomy and myology. *Urodynamics, Hydrodynamics of the Ureter and Renal Pelvis* 1971: 1-27.
84. Waldeyer W. Ueber die sogenannte Ureter-scheide. *Anat Anz* 1892; **6**: 259-60.
85. Velardo JT. Histology of the ureter. *The ureter*: Springer; 1981: 13-54.
86. Gherghiceanu M, Popescu LM. Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in human resting mammary gland stroma. Transmission electron microscope (TEM) identification. *J Cell Mol Med* 2005; **9**(4): 893-910.
87. Kostin S. Myocardial telocytes: a specific new cellular entity. *J Cell Mol Med* 2010; **14**(7): 1917-21.
88. Mandache E, Popescu LM, Gherghiceanu M. Myocardial interstitial Cajal-like cells (ICLC) and their nanostructural relationships with intercalated discs: shed vesicles as intermediates. *J Cell Mol Med* 2007; **11**(5): 1175-84.
89. Popescu LM, Gherghiceanu M, Hinescu ME, Cretoiu D, Ceafalan L, Regalia T, Popescu AC, Ardeleanu C, Mandache E. Insights into the interstitium of ventricular myocardium: interstitial Cajal-like cells (ICLC). *J Cell Mol Med* 2006; **10**(2): 429-58.

90. Hinescu ME, Gherghiceanu M, Mandache E, Ciontea SM, Popescu LM. Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in atrial myocardium: ultrastructural and immunohistochemical characterization. *J Cell Mol Med* 2006; **10**(1): 243-57.
91. Pieri L, Vannucchi MG, Faussone-Pellegrini MS. Histochemical and ultrastructural characteristics of an interstitial cell type different from ICC and resident in the muscle coat of human gut. *J Cell Mol Med* 2008; **12**(5B): 1944-55.
92. Cantarero Carmona I, Luesma Bartolome MJ, Junquera Escribano C. Identification of telocytes in the lamina propria of rat duodenum: transmission electron microscopy. *J Cell Mol Med* 2011; **15**(1): 26-30.
93. Cantarero I, Luesma MJ, Alvarez-Dotu JM, Munoz E, Junquera C. Transmission Electron Microscopy as Key Technique for the Characterization of Telocytes. *Curr Stem Cell Res Ther* 2016; **11**(5): 410-4.
94. Manetti M, Guiducci S, Ruffo M, Rosa I, Faussone-Pellegrini MS, Matucci-Cerinic M, Ibba-Manneschi L. Evidence for progressive reduction and loss of telocytes in the dermal cellular network of systemic sclerosis. *J Cell Mol Med* 2013; **17**(4): 482-96.
95. Nicolescu MI, Popescu LM. Telocytes in the interstitium of human exocrine pancreas: ultrastructural evidence. *Pancreas* 2012; **41**(6): 949-56.
96. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Diaz-Flores L, Jr., Gomez MG, Saez FJ, Madrid JF. Behaviour of telocytes during physiopathological activation. *Semin Cell Dev Biol* 2016; **55**: 50-61.
97. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Garcia MP, Gonzalez M, Saez FJ, Aparicio F, Diaz-Flores L, Jr., Madrid JF. Human resident CD34+ stromal cells/telocytes have progenitor capacity and are a source of alphaSMA+ cells during repair. *Histol Histopathol* 2015; **30**(5): 615-27.
98. Díaz-Flores L, Gutiérrez R, González-Gómez M, Díaz-Flores Jr L, Valladares F, Rancel N, Sáez F, Madrid J. Telocyte Behaviour During Inflammation, Repair and Tumour Stroma Formation. *Telocytes*: Springer; 2016: 177-91.
99. Pease DC. Myoid features of renal corpuscles and tubules. *Journal of Ultrastructure Research* 1968; **23**(3-4): 304-20.
100. Johnson RJ, Iida H, Alpers CE, Majesky MW, Schwartz SM, Pritz P, Gordon K, Gown AM. Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. Alpha-smooth muscle actin is a marker of mesangial cell proliferation. *J Clin Invest* 1991; **87**(3): 847-58.
101. Nagle RB, Evans LW, Reynolds DG. Contractility of renal cortex following complete ureteral obstruction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975; **148**(3): 611-4.
102. Boukhalfa G, Desmouliere A, Rondeau E, Gabbiani G, Sraer JD. Relationship between alpha-smooth muscle actin expression and fibrotic changes in human kidney. *Exp Nephrol* 1996; **4**(4): 241-7.
103. Saratlija Novakovic Z, Glavina Durdov M, Puljak L, Saraga M, Ljutic D, Filipovic T, Pastar Z, Bendic A, Vukojevic K. The interstitial expression of alpha-smooth muscle actin in glomerulonephritis is associated with renal function. *Med Sci Monit* 2012; **18**(4): CR235-40.
104. Ng YY, Huang TP, Yang WC, Chen ZP, Yang AH, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Lan HY. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int* 1998; **54**(3): 864-76.
105. Loeffler I, Wolf G. Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Diabetic Nephropathy: Fact or Fiction? *Cells* 2015; **4**(4): 631-52.
106. Masszi A, Di Ciano C, Sirokmany G, Arthur WT, Rotstein OD, Wang J, McCulloch CA, Rosivall L, Mucsi I, Kapus A. Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; **284**(5): F911-24.
107. Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP, Duffield JS. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol* 2010; **176**(1): 85-97.
108. Sun YB, Qu X, Caruana G, Li J. The origin of renal fibroblasts/myofibroblasts and the signals that trigger fibrosis. *Differentiation* 2016; **92**(3): 102-7.
109. Park HC, Yasuda K, Kuo MC, Ni J, Ratliff B, Chander P, Goligorsky MS. Renal capsule as a stem cell niche. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; **298**(5): F1254-62.
110. Anglani F, Forino M, Del Prete D, Toso E, Torregrossa R, D'Angelo A. In search of adult renal stem cells. *J Cell Mol Med* 2004; **8**(4): 474-87.
111. Chun SY, Kim HT, Lee JS, Kim MJ, Kim BS, Kim BW, Kwon TG. Characterization of urine-derived cells from upper urinary tract in patients with bladder cancer. *Urology* 2012; **79**(5): 1186 e1-7.
112. Sivridis E, Giatromanolaki A, Touloupidis S, Pasadakis P, Vargemezis V. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and angiogenic factor expression in idiopathic membranous nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2003; **41**(2): 360-5.
113. Ramani P, Headford A, Sowa-Avugrah E, Hunt LP. Angiogenin expression in human kidneys and Wilms' tumours: relationship with hypoxia and angiogenic factors. *Int J Exp Pathol* 2013; **94**(2): 115-25.
114. Smeets B, Boor P, Dijkman H, Sharma SV, Jirak P, Mooren F, Berger K, Bornemann J, Gelman IH, Floege J, van der Vlag J, Wetzels JF, Moeller MJ. Proximal tubular cells contain a phenotypically distinct, scattered cell population involved in tubular regeneration. *J Pathol* 2013; **229**(5): 645-59.

115. Ronconi E, Sagrinati C, Angelotti ML, Lazzeri E, Mazzinghi B, Ballerini L, Parente E, Becherucci F, Gacci M, Carini M, Maggi E, Serio M, Vannelli GB, Lasagni L, Romagnani S, Romagnani P. Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors. *J Am Soc Nephrol* 2009; **20**(2): 322-32.
116. Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, Markert C, Andersson KE, Atala A, Zhang Y. Characterization of urine-derived stem cells obtained from upper urinary tract for use in cell-based urological tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2011; **17**(15-16): 2123-32.
117. Guan JJ, Niu X, Gong FX, Hu B, Guo SC, Lou YL, Zhang CQ, Deng ZF, Wang Y. Biological characteristics of human-urine-derived stem cells: potential for cell-based therapy in neurology. *Tissue Eng Part A* 2014; **20**(13-14): 1794-806.
118. Kang HS, Choi SH, Kim BS, Choi JY, Park GB, Kwon TG, Chun SY. Advanced Properties of Urine Derived Stem Cells Compared to Adipose Tissue Derived Stem Cells in Terms of Cell Proliferation, Immune Modulation and Multi Differentiation. *J Korean Med Sci* 2015; **30**(12): 1764-76.
119. Tayhan SE, Keles GT, Topcu I, Mir E, Gurhan SID. Isolation and in vitro cultivation of human urine-derived cells: an alternative stem cell source. *Turk J Urol* 2017; **43**(3): 345-9.
120. Ross MH, Reith EJ. Myoid elements in the mammalian nephron and their relationship to other specializations in the basal part of kidney tubule cells. *Am J Anat* 1970; **129**(4): 399-415.
121. Maunsbach AB, Boulpaep EL. Quantitative ultrastructure and functional correlates in proximal tubule of Ambystoma and Necturus. *Am J Physiol* 1984; **246**(5 Pt 2): F710-24.
122. Tanaka K, Shibata N, Tatsumi N. Electron microscopic studies on the myofibrils in the epithelial cells of the Bowman's capsule and of proximal tubules in rat renal cortex (first report). *Jpn Circ J* 1977; **41**(12): 1329-36.
123. Trenchev P, Dorling J, Webb J, Holborow EJ. Localization of smooth muscle-like contractile proteins in kidney by immunoelectron microscopy. *J Anat* 1976; **121**(Pt 1): 85-95.
124. Saleem MA, Zavadil J, Bailly M, McGee K, Witherden IR, Pavenstadt H, Hsu H, Sanday J, Satchell SC, Lennon R, Ni L, Bottinger EP, Mundel P, Mathieson PW. The molecular and functional phenotype of glomerular podocytes reveals key features of contractile smooth muscle cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; **295**(4): F959-70.
125. Drenckhahn D, Schnittler H, Nobiling R, Kriz W. Ultrastructural organization of contractile proteins in rat glomerular mesangial cells. *Am J Pathol* 1990; **137**(6): 1343-51.
126. Zimny ML, Levy ED, Jr. Ultrastructure of mesangial and juxtaglomerular cells in the kidney of a hibernator. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1971; **118**(3): 326-32.
127. Morigi M, Benigni A, Remuzzi G, Imberti B. The regenerative potential of stem cells in acute renal failure. *Cell Transplant* 2006; **15 Suppl 1**: S111-7.
128. Vanstherthem D, Caron N, Declèves AE, Cludts S, Gossiaux A, Nonclercq D, Flamion B, Legrand A, Toubeau G. Label-retaining cells and tubular regeneration in postischemic kidney. *Nephrol Dial Transplant* 2008; **23**(12): 3786-97.
129. Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, Kelley VR, Scadden DT, Ichimura T, Bonventre JV. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest* 2005; **115**(7): 1743-55.