

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di *Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari*

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Scienze Mediche, Cliniche e Sperimentali

INDIRIZZO: Scienze cardiovascolari

CICLO 28[^]

Meccanismi di immunosorveglianza nella carcinogenesi del rene affetto da end stage renal disease

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Supervisore :Ch.mo Prof. Marialuisa Valente

Dottorando: Cristina Silvestre

*“....success is not final and failure is not fatal, is the courage to
keep going that really counts.....”*

Wiston Churchill

INDICE

RIASSUNTO.....	1
INTRODUZIONE.....	8
• Incidenza dell'IRC.....	8
• Incidenza del tumore renale nella popolazione generale.....	8
- Associazione tra IRC e tumore renale.....	11
- Screening di routine per carcinoma renale nell'IRC terminale.....	16
- Screening pre-trapianto di rene.....	19
• Associazione tra trapianto di rene e tumore dei reni nativi.....	20
• Comparazione tra tumori renali in pazienti con IRC e tumori in trapiantati di rene	22
L'impatto della terapia immunosoppressiva.....	24
• Definizione di immunosorveglianza ed escape.....	26
• Attivazione dei linfociti e molecole di costimolazione.....	29
SCOPO DELLO STUDIO.....	30
MATERIALI E METODI.....	31
RISULTATI.....	44
DISCUSSIONE.....	55
CONCLUSIONI.....	68

RIASSUNTO

Introduzione- L'insufficienza renale cronica (IRC) e specialmente la terapia sostitutiva (dialisi e trapianto), aumentano il rischio di riscontrare tumori dei reni nativi. I fattori che possono essere implicati sono la malattia renale multicistica acquisita nei dializzati e la terapia immunosoppressiva nei pazienti trapiantati.

Nelle linee guida internazionali mancano tuttavia delle chiare indicazioni sulla tipologia di screening a cui sottoporre questi pazienti, benché in caso di diagnosi precoce la prognosi di queste neoplasie possa risultare ottima.

Scopo dello studio- nella fase retrospettiva dello studio è stata analizzata la casistica di neoplasie renali dei reni nativi in pazienti affetti da insufficienza renale cronica e in pazienti trapiantati di rene e sottoposti a nefrectomia presso l'U.O.C. Trapianti di Rene e Pancreas dell'Azienda Ospedale-Università di Padova.

L'istotipo del tumore, il grading, lo stadio alla diagnosi e la prognosi di questa tipologia di pazienti sono stati valutati e confrontati con i dati riportati in letteratura relativi a pazienti uremici e nella popolazione generale.

Nella fase prospettica: l'analisi istopatologica e citofluorimetrica dei reni sono state indirizzate allo studio dell'espressione delle molecole di costimolazione a livello delle cellule epiteliali renali, per determinare la loro funzione di antigen presenting cell non professionali. Sono state inoltre analizzate le sottopopolazioni linfocitarie T residenti ed il loro stato di attivazione.

Materiali e metodi: Da Aprile 2007 a Giugno 2013, 18 pazienti affetti da IRC e/o trapiantati di rene sono stati sottoposti a nefrectomia per riscontro di neoplasia renale presso la U.O.C. Trapianti Rene e Pancreas dell'Azienda Ospedale-Università di Padova. Sono stati analizzati: la causa dell'IRC, il tipo di terapia sostitutiva, il timing del trapianto di rene, la terapia immunosoppressiva, l'istotipo della neoplasia, il grado Fuhrman, e l'outcome dei pazienti.

Successivamente tra dicembre 2014 e dicembre 2015, sono stati arruolati nello studio 16 pazienti (5F/11M). Le indicazioni all'intervento di nefrectomia sono state malattia policistica dell'adulto (APKD) 13 pazienti, sospetta neoplasia del rene nativo 3 pazienti, 1 paziente è stata sottoposta ed espianto di autotrapianto di rene, effettuato per il riscontro di un'aneurisma dell'arteria renale primitiva. Sono state riscontrate le seguenti neoplasie renali 2 carcinomi a cellule chiare (Furhman 4 e Furhman 2 rispettivamente), 1 carcinoma papillare.

Risultati- L'età media dei pazienti al momento della nefrectomia era 53.4 ± 11.2 anni. Sei pazienti erano in trattamento dialitico (2 in emodialisi e 4 in dialisi peritoneale), mentre 11 pazienti erano trapiantati di rene e 1 era trapiantato di pancreas e rene. Un paziente ha presentato due neoplasie maligne bilaterali metacrone ed un tumore benigno. L'esame istologico ha evidenziato 17 casi di neoplasia maligna (9 carcinomi a cellule chiare e 8 carcinomi papillari) e 3 di tumore benigno (due adenomi papillari e un oncocitoma renale). Lo stadio alla diagnosi era: in 16 casi T₁ ed in un caso T₂. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a nefrectomia: 12 per via laparoscopica, 5 per via laparotomica e 2 per via lombotomica. Tutti i pazienti erano asintomatici alla diagnosi, che è avvenuta in corso di ecografia eseguita per altre ragioni e successivamente confermata

all'esame TAC con mezzo di contrasto e/o RM. Dopo un follow-up medio di 22±20 mesi, due pazienti sono deceduti per cause non collegate alla neoplasia renale e non si sono verificate recidive locali o a distanza della neoplasia, in assenza di trattamento adiuvante.

L'analisi puramente descrittiva della citofluorimetria sembra evidenziare una maggiore espressione di CD80, HLAABCm, HLAABCr; HLADRM e HLADRr; dove HLAABCm e HLADRM rappresentano l'intensità media della fluorescenza per cellula, mentre HLAABCr e HLADRr rappresentano la percentuale di cellule che superano il gate e sono quindi catalogate come positive. L'espressione di MCHC aumenta nei pazienti trapiantati rispetto ai non trapiantati in quanto il rene trapiantato sta esprimendo antigeni in modo non tollerigeno in quanto organo non self, la terapia immunosoppressiva determina un'inibizione del linfociti T a valle del CD80, impedendo il rigetto.

Conclusioni- La diagnosi delle neoplasie renali che viene effettuata nell'ambito di programma di follow-up nel paziente trapiantato di rene e di screening nel paziente uremico consente di individuare neoplasie in stadio precoce, migliorandone l'outcome e riducendo la necessità di terapie adiuvanti.

Sembra esserci un'attivazione nel processo di immunosorveglianza suggerito dall'elevata espressione della molecola di costimolazione CD80 nei pazienti affetti da neoplasie renali.

Rimane da chiarire il ruolo della terapia immunosoppressiva nell'immunosorveglianza.

ABSTRACT

Background- Chronic kidney disease (CKD) and replacement therapies (dialysis or transplantation) increase the risk of native kidneys cancer. Acquired multicystic kidney disease in dialysis patients and immunosuppressive therapy in transplant recipients might be relevant factors for the development of renal cancer.

International guidelines do not clearly recommend specific screening protocols for these categories of patients, although the early diagnosis could lead to an excellent prognosis.

Objectives- To retrospectively analyze the cases of renal neoplasms of the native kidneys in chronic renal failure patients and renal transplant recipients that underwent nephrectomy at the Kidney and Pancreas Transplant Center at Hospital-University of Padua.

The histological type of the tumor, grading, stage at diagnosis and prognosis of these patients were evaluated and compared with the data reported in the literature in uremic patients and in the general population.

In the prospective phase of the study: the histopathological analysis and the flow cytometry of the kidneys have been addressed to study the expression of costimulatory molecules at the level of renal epithelial cells, to determine their function as non-professional APC (Antigen Presenting Cell). The activation status of intraepithelial lymphocyte population have been evaluated.

Methods- From April 2007 to June 2013, 18 patients with chronic kidney disease (CKD) and/or kidney transplant recipients underwent nephrectomy because of renal tumor at the Kidney and Pancreas Transplant Center at Hospital-University of Padua. Were analyzed: the cause of the CKD, the type of replacement therapy, the timing of kidney transplantation, immunosuppressive therapy, the histological type of the tumor, the Fuhrman grade, and patient outcomes.

Thereafter, between December 2014 and December 2015, 16 patients (5F/11M) were enrolled in the study. Indications for nephrectomy were: polycystic disease (APKD) 13 patients, suspected malignancy of the native kidney 3 patients, 1 patient underwent trasnsplantectomy of his kidney, performed for the detection of an aneurysm of the renal artery. Histological examination showed: neoplasms 2 cell carcinomas (Furhman Furhman 4 and 2 respectively), 1 papillary carcinoma

Results- The average age of the patients at the time of nephrectomy was 53.4 ± 11.2 years. Six patients were receiving dialysis (hemodialysis in 2 and 4 on peritoneal dialysis), while 12 patients had a kidney transplant and 1 had previously pancreas and kidney transplantation. One patient developed 2 bilateral metacronous neoplasia and 1 benign tumor. Histological examination showed 17 cases of malignancy (9 clear cell carcinomas and 8 papillary carcinomas) and 3 benign tumors (2 papillary adenoma and a renal oncocyoma). The stage at diagnosis was: in 16 cases T1, and in 1 case T2. All patients underwent nephrectomy: 12 laparoscopically, 5 with laparotomy and 2 by lombotomic approach. All patients were asymptomatic at diagnosis, which took place during ultrasound performed for other reasons and subsequently confirmed at the CT-scan with contrast and / or MRI. After a mean follow-up of 22 ± 20 months,

two patients died of causes unrelated to renal cancer and there were no local or distant recurrence of the tumor, in the absence of adjuvant treatment.

The flow cytometry seems to show a greater expression of CD80, HLAABC_m, HLAABC_r; HLADR_m and HLADR_r; where HLAABC_m and HLADR_m represent the average intensity of fluorescence per cell, while HLAABC_r and HLADR_r represent the percentage of cells that exceed the gate and are therefore classified as positive. The expression of MCHC seems to increase in transplant recipient than in non-transplant patients; probably because immunosuppressive therapy, preventing rejection, leads an inhibition of T cell.

Conclusions- The diagnosis of kidney cancer which is carried out within the program of follow-up in kidney transplant patients and screening in uremic patients allows to detect cancer in its early stages, improving outcomes and reducing the need for adjuvant therapy.

The expression of costimulatory molecule CD80 in patients with renal carcinoma, might suggest an activation of immunosurveillance in the carcinogenesis of the kidney. Further studies are needed to clarify the role of immunosuppressive therapy in the immunosurveillance.

INTRODUZIONE

Incidenza dell'IRC.

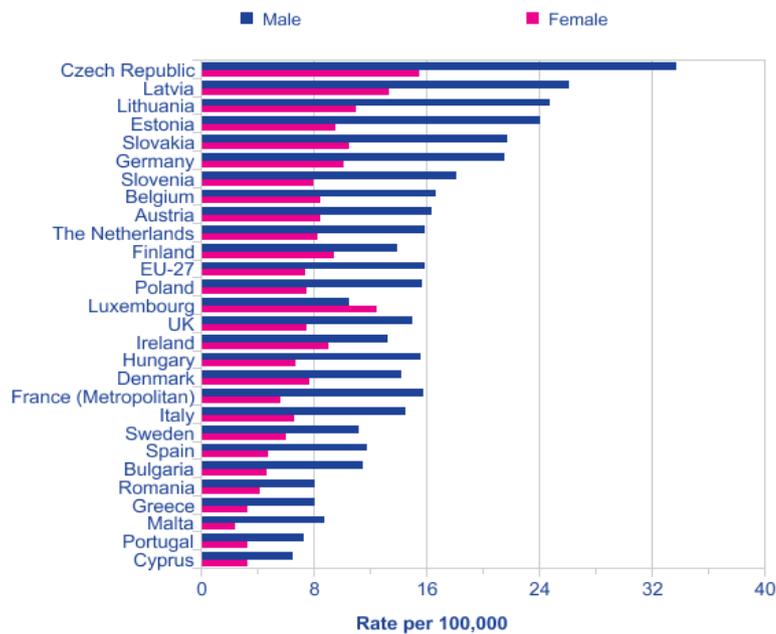
L'incidenza dello stadio terminale dell'IRC è in aumento, così come l'età media alla diagnosi.[1] Secondo i dati riportati dal United States Renal Data System negli Stati Uniti nel periodo 2005-2010 la prevalenza dei pazienti con IRC è stata del 9.4%, e per persone sopra i 60 anni del 18.4%. Nel 2011 in USA ci sono stati 109.006 pazienti che hanno iniziato la terapia dialitica (101.683 emodialisi e 7.323 dialisi peritoneale). [2][3]

Anche in Italia l'incidenza dei pazienti che richiedono terapia sostitutiva è in aumento: nel 1999 era di 131 pazienti per milione di abitanti e nel 2009 è stata di 160 pazienti per milione di abitanti. Più di 50% di questi pazienti ha più di 50 anni mentre il 25% ha più di 78 anni. Nel 2009 in Italia la prevalenza di pazienti in terapia sostitutiva era 104.352 con incidenza di 7054 nuovi casi.[4]

Incidenza del tumore renale nella popolazione generale

Dai dati resi pubblici sul sito Cancer Statistic, nel 2010 negli Stati Uniti, ci sono stati 58.240 nuovi casi di tumore del rene e della pelvi renale e durante lo stesso anno si sono verificati 13.040 decessi dovuti a tale neoplasia. Il tumore renale e della pelvi costituisce il 3.8% dei nuovi casi di neoplasia negli Stati Uniti, con una incidenza più elevata nel sesso maschile (4.5%) che in quello femminile il (3%). [5][6][7]

Figura.2: Incidenza, standardizzata per età, del tumore renale nel 2008 in 27 paesi Europei.



Tra i paesi Europei l'Italia ha un'incidenza nella media con 14.6 casi per 100.000 abitanti per i maschi e 6.7 casi per la femmine. [8]

Nonostante l'aumento dell'incidenza si sta verificando un miglioramento della sopravvivenza che è attualmente del 62% a 5 anni. [9][10]

I tipi istologici più frequenti sono l'adenocarcinoma a cellule chiare 80%, papillare 15%, cromofobe 5%. [11][12]

Un studio in UK condotto dalla British Association of Urological Surgeons (BAUS) ha analizzato lo stadio alla diagnosi in una casistica di tutti i pazienti con tumore renale in UK nel 2009 [8]: essi si presentavano

- nel 39% dei casi in stadio 1

-nel 16% dei casi in stadio 2

-nel 26% dei casi in stadio 3

-nel 19% dei casi in stadio 4

Associazione tra IRC e tumore renale.

L'analisi di diverse casistiche indica che il rischio di sviluppare tumori, in pazienti con IRC, è aumentato in comparazione con la popolazione generale, e le neoplasie sono tra le cause principali di morte nei pazienti con IRC.[13][14] Anche gli stadi precoci di IRC sono caratterizzati da un aumentato rischio di neoplasie, tra cui anche di tumori renali.[15] L'esatto meccanismo fisiopatologico alla base di questo fenomeno è in gran parte ignoto, tuttavia sono stati adottati come possibili fattori causali nel paziente con insufficienza renale: [16][17]

- compromissione delle difese immunitarie;
- infezioni croniche;
- diminuzione della capacità antiossidante;
- accumulo di sostanze cancerogene;
- alterazione dei fattori che riparano il DNA;
- Aumenta anche il Sister Chromatid Exchange; [18]
- Aumenta il numero di anomalie strutturali dei cromosomi;

I reni dei pazienti con IRC vanno incontro ad alterazioni strutturali, tra cui anche lesioni cistiche, che potrebbero essere precursori di lesioni neoplastiche. Inoltre, il rischio di trasformazione in senso neoplastico è maggiore per i pazienti che passano più tempo in dialisi.[19] In caso di pazienti dializzati la percentuale dei tumori renali arriva all'11% di tutte le neoplasie. Il tempo medio che passa tra la diagnosi di IRC in stadio terminale e la diagnosi del tumore nello studio di J.E.Lee è di 142.7+/-68.2 mesi. Il rischio sembra essere maggiore per i pazienti in emodialisi rispetto alla dialisi peritoneale.[20]

L'incidenza di carcinoma renale in pazienti emodializzati aumenta di 41 volte rispetto alla popolazione generale.[21] L'età media della diagnosi del tumore renale è tra 60 e 65 anni. Solo il 5% si presenta prima dei 40 anni. Neuzillet Y. ha confrontato le caratteristiche di due popolazioni affette da tumore renale (1250): i pazienti con IRC (303) e quelli con tumore sporadico (947), e ha osservato: (Tabella I)

Tabella I: Confronto tra due popolazioni, in IRC terminale e popolazione generale, affette da tumore renale. [15]

	Pazienti con IRC terminale (303)	Pazienti della popolazione generale (947)
Età alla diagnosi	55±12 anni	62±12 anni
Dimensioni medie del tumore	3.7±2.6	7.3±3.8
Asintomatici	87%	44%
Di basso grado	68%	42%
Percentuale dei tumori papillari	37%	7%
Performance status basso	24%	37%
Stadio T ≥3	10%	42%
Invasione linfonodale	3%	12%
Metastasi a distanza	2%	15%
Morti a causa del tumore dopo una media di 33 mesi di follow-up	13 pazienti (4.3%)	261 (27.6%)

La prevalenza del carcinoma renale nella popolazione che ha malattia policistica dominante ed anche IRC è 2-3 volte maggiore che in pazienti solo con IRC.[22] In molti casi si tratta di neoplasie multifocali, spesso non visualizzate negli studi di imaging preoperatorio. Infatti i tumori nei reni policistici sono solitamente di piccole dimensioni e si sviluppano nel contesto di un parenchima caratterizzato

da distorsione architetturale, emorragie intracistiche, infezioni; inoltre in tali pazienti, a causa dell'IRC, spesso non viene somministrato mezzo di contrasto né durante esami TAC né RMN.

L'IRC è frequentemente associata con lo sviluppo di cisti renali di piccole dimensioni, multiple e bilaterali. In caso di coinvolgimento di entrambi i reni da parte di più di quattro cisti ci si riferisce alla diagnosi di malattia renale multicistica acquisita (MRMA). La diagnosi differenziale con la malattia policistica autosomica dell'adulto (APKD) si basa sull'assenza di storia familiare di patologia cistica renale e sulle dimensioni dei reni che appaiono di dimensioni ridotte o normali nella MRMA rispetto all'APKD.

Secondo Matson et al, la MRMA è presente nel 30-95% dei pazienti in emodialisi con una stratificazione della prevalenza in base all'età dialitica (Tabella.II) ed il 30-40% dei pazienti portatori di MRMA è destinato negli anni a sviluppare un carcinoma renale.

Tabella II: Prevalenza di malattia renale multicistica acquisita nei pazienti dializzati stratificata per età dialitica.[23]

Età dialitica (anni)	Prevalenza di MRMA
01-03	10-20%
03-05	40-60%
>5	>90%

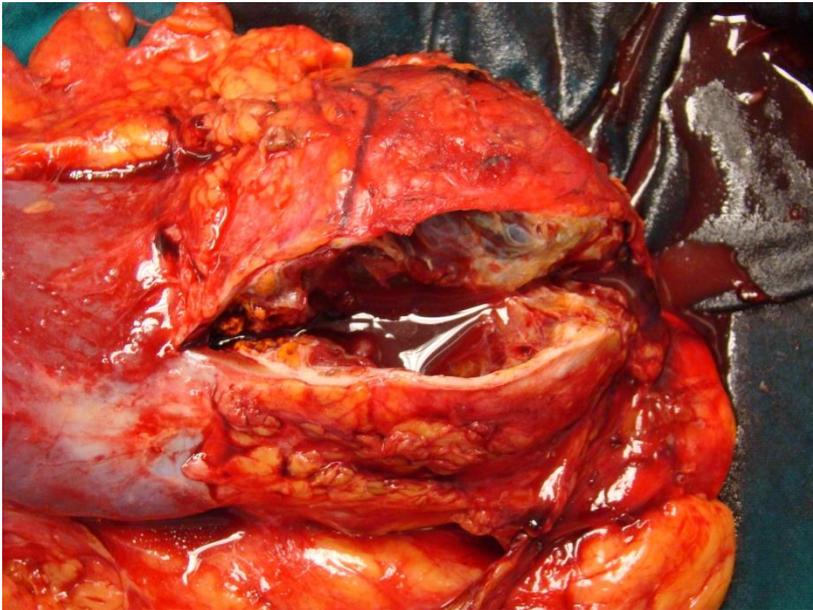
La malattia cistica acquisita è considerata pertanto uno stadio di pre-malignità, che necessita di follow-up continuo [23] .

L'ecografia rappresenta la diagnostica di prima linea. Nei pazienti con MRMA il riscontro ecografico di cisti con pareti irregolari (cisti complicate) deve essere ulteriormente approfondito mediante valutazione TAC o RMN. Nei casi in cui tali esami non fossero in grado di chiarire in maniera definitiva l'esatta natura delle cisti, in considerazione dell'elevato rischio di presenza di neoplasia o di sviluppo futuro di neoplasia, è consigliabile eseguire la nefrectomia. [24]

La progressiva distruzione del tessuto renale funzionante nei pazienti portatori di MRMA determinerebbe l'accumulo di diverse sostanze mitogene e citogenetiche non eliminabili dai nefroni superstiti e l'ipertrofia e l'iperplasia delle cellule epiteliali [25][26]; in particolare fattori di crescita delle cisti renali, quali l'Epidermal Growth Factor (EGF) ed il Platelet Derived Growth Factor (PDGF), nonché l'attivazione del proto-oncogene C-erb B, sarebbero responsabili dell'incremento della proliferazione cellulare e quindi, potenzialmente, della degenerazione neoplastica.

Sebbene le neoplasie renali dei pazienti con MRMA possano originare da strutture cistiche (Figura 3), secondo alcuni Autori esse si sviluppano più facilmente da un epitelio tubulare anomalo [24]. Cisti atipiche con estesa iperplasia papillare si manifestano con un'incidenza del 30.3% [27] e sono spesso i precursori di adenomi renali papilliferi e di adenocarcinomi renali [28]. L'istotipo più frequentemente rappresentato nell'ambito delle neoplasie renali insorte in pazienti con MRMA è il carcinoma di tipo papillare, con un'incidenza che varia tra il 42 e l'86%; tale dato differisce da quello relativo alla popolazione generale, in cui il rapporto tra carcinoma renale non papillare e papillare è di 8 a 1 [23].

Figura 3: Tumore cistico in un paziente con IRC



1. Screening di routine per carcinoma renale nell'IRC in stadio terminale.

L'ecografia è l'esame più usato nella diagnostica del tumore renale. Su un studio di 1603 pazienti in emodialisi sono stati diagnosticati 41 tumori renali utilizzando soltanto l'ecografia.[29]

Tuttavia vi sono alcune difficoltà diagnostiche del tumore in pazienti con malattia cistica acquisita.

In questi casi anche con la TC può essere difficoltoso riuscire a distinguere il tumore dalle cisti. È stato definito un protocollo basato sul Bosniak Renal Cyst Classification System, al fine di indirizzare a una corretta gestione clinica la presenza di cisti renali in base al loro aspetto alle indagini di imaging. Sono definite complesse le cisti che hanno irregolarità nello spessore della membrana,

che sono iperdense o che hanno calcificazioni interne. Si raccomanda la nefrectomia in caso di progressione delle cisti anche se non sono ancora in stadio III o IV.

Tabella III: Classificazione di Bosniak delle cisti renali

Categoria	Criteri diagnostici e gestione clinica
I	Cisti semplice benigna, provvista di parete sottile, senza sepimenti, calcificazioni o componenti solide. Essa presenta valori densitometrici dell'acqua alla TC, risulta perfettamente anecogena agli ultrasuoni. Nessuna impregnazione dopo iniezione di mezzo di contrasto. Non è necessario alcun intervento terapeutico.
II	Lesione cistica di aspetto benigno che risulta provvista di qualche sottile sepimento che presenta alla TC una impregnazione di contrasto apprezzabile visivamente ma non misurabile. Può essere presente qualche calcificazione parietale o interna. La lesione presenta valori densitometrici vicini a quella dell'acqua. Non risulta necessario alcun intervento.
IIF	Formazione cistica che presenta più sepimenti sottili, che dimostrano una non misurabile impregnazione dopo mezzo di contrasto. Anche la parte sottile sembra impregnarsi, ma si confonde con il parenchima circostante. Si osservano ispessimenti parietali e/o dei setti minimi e focali, dove si possono documentare delle calcificazioni più grossolane micronodulari. Non si apprezza alcun contrast

	enhancement misurabile. A volte le lesioni presentano alla TC senza contrasto elevati valori densitometrici per la presenza di sangue o altro materiale a densità elevata. Queste lesioni vengono ritenute benigne, ma devono essere seguite nel tempo per poter confermare la loro benignità.
III	Masse cistiche che presentano parete ispessita ed irregolare localmente. Anche i setti interni sono più numerosi e spessi e presentano una impregnazione dopo contrasto, ben misurabile alla TC. Queste lesioni richiedono nella maggioranza dei casi un intervento chirurgico, perché potenzialmente maligne. Questa categoria comprende le cisti emorragiche complicate o infette, il nefroma cistico multiloculare ed i tumori cistici. La diagnosi certa è possibile solo all'esame istologico, poiché l'aspetto macroscopico non consente un giudizio sufficiente.
IV	Lesioni cistiche che presentano aspetti TC o US molto simili a quelli delle lesioni di categoria III, ma evidenti segni di malignità con impregnazione plurifocale della parte e/o dei setti. Queste lesioni richiedono sempre una asportazione chirurgica.

La diagnosi precoce eseguita tramite un programma di screening consentirebbe di evidenziare neoplasie in stadio meno avanzata, migliorando pertanto la sopravvivenza dei pazienti. Ishikawa I. et al., ha condotto uno studio su due coorti di pazienti dializzati con neoplasia renale: in un gruppo la diagnosi era stata posta durante screening, nell'altro la diagnosi era stata effettuata dopo la comparsa

di sintomatologia, e ha dimostrato che la mortalità era diminuita del 35% nel primo gruppo, con un tasso di sopravvivenza del 50% a 119 mesi per il primo gruppo e di 80 mesi nel secondo gruppo.[30]

2. Screening pre-trapianto di rene.

In corso di valutazione pre-trapianto una neoplasia renale viene occasionalmente riscontrata nel 3.8% dei pazienti [31][32], pertanto è sempre necessaria un'attenta valutazione pre-trapianto rivolta all'identificazione di eventuali neoplasie renali preesistenti nel potenziale ricevente.

In presenza di tumori renali diagnosticati occasionalmente in corso di screening pre-trapianto, in assenza di metastasi dimostrabili e/o di fattori prognostici sfavorevoli, dopo la “bonifica neoplastica” non è necessario procrastinare i tempi del trapianto, che può quindi essere eseguito in successione ragionevolmente rapida. Differente è invece il caso di pazienti nefrectomizzati o binefrectomizzati precedentemente all'immissione in lista d'attesa per neoplasie sintomatiche; per essi è infatti opportuno documentare un periodo di tempo “libero da malattia” di almeno tre anni prima di avviare le procedure per l'immissione in lista d'attesa. Dopo il trapianto l'incidenza di recidiva neoplastica è minore nei pazienti in cui la neoplasia renale è stata occasionalmente diagnosticata e trattata in sede di valutazione pre-trapianto rispetto ai pazienti operati per carcinoma renale sintomatico (1% vs 27%) [33]. Tuttavia per entrambi i gruppi la sopravvivenza a 5 anni di organo e paziente dopo il trapianto risulta essere sovrapponibile a quella dei pazienti trapiantati non affetti da neoplasia (rispettivamente del 62.6% e del

65.0%) [34]. È quindi possibile affermare che oggi il trapianto renale rappresenta un'valida opzione terapeutica anche per i pazienti affetti da neoplasie renali, sia quelle asintomatiche trattate precedentemente all'immissione in lista d'attesa che quelle occasionalmente riscontrate in corso di screening pre-trapianto.

Associazione tra trapianto di rene e tumore dei reni nativi.

Il trapianto rimane la soluzione migliore per i pazienti con IRC in stadio terminale, sia in termini di sopravvivenza sia di qualità di vita.

Tra le complicanze a lungo termine della terapia immunosoppressiva, tuttavia, vi è un significativo aumento del rischio di sviluppare neoplasie, più comunemente a carico della cute e del sistema linfatico. Infatti, l'incidenza di cancro in pazienti che usano farmaci immunosoppressori è da 2 a 5 volte superiore rispetto alla popolazione generale [35].

Il carcinoma renale costituisce il 5% di tutti i tumori riscontrati nei pazienti trapiantati. [36] Il rischio di sviluppare il carcinoma a cellule renali dei reni nativi è 15 volte maggiore che nella popolazione generale.[37]

Secondo l'esperienza di Doublet JD, su 129 pazienti trapiantati, il carcinoma del rene può insorgere "de novo", dopo il trapianto, nell'ambito dei reni nativi, mediamente a distanza di circa 7 anni dal trapianto e di circa 10 anni dall'ingresso in dialisi. [38] .Ad oggi, ad eccezione della MRMA, non è ancora stato individuato un chiaro fattore predisponente in grado di giustificare tale aumentata incidenza. La terapia immunosoppressiva avrebbe, infatti, un ruolo limitato nel promuovere l'insorgenza di queste neoplasie, poiché l'incidenza di tumori renali

in pazienti immunodepressi dopo trapianto cardiaco (3.3%) è quasi sovrapponibile a quella della popolazione generale (3%).[39] Hoshida ha tuttavia dimostrato che il tipo di trattamento immunosoppressivo correla con il tempo di insorgenza delle neoplasie nell'ambito dei reni nativi dopo il trapianto, risultando più precoce nei pazienti trattati con Ciclosporina rispetto a quelli trattati con Azatioprina e Corticosteroidi (24 vs 143 mesi).[40] La terapia immunosoppressiva sembrerebbe, inoltre, accelerare l'evoluzione della malattia neoplastica; è stato infatti riscontrato che nei pazienti con MRMA sottoposti a trapianto renale la neoplasia si manifesta in forma metastatica nel 53% dei casi, mentre nei pazienti con MRMA in trattamento emodialitico, e quindi non sottoposti ad immunosoppressione, l'incidenza di malattia metastatica è solamente dell'8%, senza alcun decesso ad essa correlabile.[41] Oltre alla MRMA, l'unico accertato fattore di rischio per l'insorgenza di neoplasie nell'ambito dei reni nativi dopo il trapianto è rappresentato dalla nefropatia cronica da analgesici. L'analisi dei dati del registro di Cincinnati [39], infatti, ha evidenziato che il 10% dei pazienti che avevano sviluppato una neoplasia dei reni nativi successivamente al trapianto erano stati precedentemente affetti da nefropatia cronica da analgesici. Da un punto di vista anatomopatologico sono generalmente carcinomi di piccole dimensioni, con un'elevata incidenza di forme papillari, spesso sono multifocali e frequentemente associate a MRMA. Raramente sono presenti mutazioni del gene P53, un gene soppressore della proliferazione tumorale allocato sul braccio corto del cromosoma 17, in grado di inibire la proliferazione tumorale arrestando le cellule con DNA danneggiato in fase G1.

Comparazione tra tumori renali in pazienti con IRC e tumori renali in trapiantati di rene

Ci sono delle differenze tra i tumori diagnosticati in pazienti trapiantati e in dialisi. Un'analisi su 43 pazienti sottoposti a nefrectomia per cancro, trapiantati o dializzati ha evidenziato che l'età della diagnosi è più tardiva nel trapiantato, mentre non vi sono differenze statisticamente significative tra i 2 gruppi per quanto riguarda il tipo di tumore, il grado di Fuhrman, e lo stadio TNM.

(Tabella IV)

Tabella IV: Dati clinici e patologici di pazienti in terapia sostitutiva che hanno riscontrato neoplasia renale.

	Pazienti trapiantati (21)	Pazienti in dialisi (22)	p
Età alla nefrectomia	55±10 anni	47±11 anni	0.78
Istologia del tumore			0.85
Tumore a cellule chiare	57%	64%	
Tumore papillare	29%	27%	
Altri tumori	14%	9%	
Grado Fuhrman			0.91
Grado Fuhrman 1	33%	32%	
Grado Fuhrman 2	48%	41%	
Grado Fuhrman 3	14%	23%	
Grado Fuhrman 4	5%	4%	
Stadio T			0.27
Stadio T₁	73%	95%	
Stadio T₂	14%	5%	
Stadio T₃	5%	0%	
Stadio T₄	0%	0%	
Stadio N			0.36
N₀	90%	100%	
Metastasi linfonodali N₁	5%	0%	
Stadio M			0.36
M₀	90%	100%	
Metastasi a distanza	5%	0%	

Questo studio ha anche osservato che l'incidenza di malattia cistica acquisita era significativamente maggiore nei pazienti dializzati rispetto ai pazienti trapiantati, confermando che il tempo trascorso in emodialisi è il più importante fattore di rischio per il tumore renale.[42][43]. (Tabella V)

Tabella V: Malattia renale multicistica acquisita nei dializzati e trapiantati.

	MRMA (+)	MRMA (-)	P
Trapiantati	1	20	
Dializzati	18	4	
Totale	19	24	<0.01

Dato che i pazienti trapiantati il più delle volte sono stati trattati con terapia dialitica prima del trapianto, essendo bassa la percentuale di trapianti eseguiti in modalità pre-emptive, è difficile stabilire quanto influisca la terapia immunosoppressiva nello sviluppo di neoplasia renale.[42]

- **L'impatto della terapia immunosoppressiva.**

La terapia immunosoppressiva, rappresenta una delle principali cause di morbilità e mortalità del paziente trapiantato. La malattia cardiovascolare, le infezioni e la patologia neoplastica, che risultano le principali cause di mortalità del paziente trapiantato, sono infatti in gran parte dovute ai farmaci immunosoppressori ed allo stato di alterata sorveglianza immunologica che da essi deriva.

La relazione tra la natura, l'intensità, la durata della terapia immunosoppressiva e l'insorgenza della neoplasia è stata ampiamente studiata [44], anche se l'uso di terapie combinate rende difficile valutare l'impatto dei singoli agenti immunosoppressivi sul rischio neoplastico.[45][46][44][47]

Jacques D ha condotto un studio su 231 pazienti trapiantati di rene per comparare l'incidenza di nuovi tumori in due coorti(116, 115) di pazienti trattati con dosi diverse di ciclosporina (75–125 ng/ml, 150–250 ng/mL). Dopo 6 anni, 60 pazienti erano affetti da tumore, 37 facevano parte del gruppo trattati con la dose standard e 23 del gruppo trattati con la dose ridotta. La differenza era significativa ($p < 0.034$). Il numero dei tumori diagnosticati era inoltre più alto nei pazienti che ricevevano dosi maggiori di azatioprina ($p < 0.03$). [48]

Martin P et al, ha condotto uno studio su 489 pazienti trapiantati trattati con diversi farmaci immunosoppressivi. Il tempo di follow-up è stato di 20.6 anni. I risultati di questo studio suggeriscono che i regimi immunosoppressivi con azatioprina e ciclosporina sono associati a rischi simili di riscontrare il cancro a lungo termine.[49]

Clayton PA et al., in uno studio di 133 pazienti trapiantati di rene in Australia (45 trattati con azatioprina, 44 trattati con micofenolato mofetile 2g/die e 44 trattati con micofenolato mofetile 3g/die), non ha descritto differenze significative nell'incidenza di tumori nei pazienti trattati con micofenolato mofetile rispetto a quelli trattati con azatioprina in un follow-up di 13.8 anni.[50]

Gli inibitori del segnale di proliferazione (mTOR-inibitori), Sirolimus ed Everolimus, sembrano invece avere una certa efficacia nel prevenire lo sviluppo

di neoplasie nei pazienti trapiantati [47], e, in alcuni casi, nel facilitare la regressione di tumori dopo che si sono sviluppati. In uno studio di Campistol et al i pazienti in terapia con Sirolimus sviluppavano meno tumori di quelli in terapia con inibitori della calcineurina.[51] Come pure è stata documentata una completa guarigione del sarcoma di Kaposi dopo conversione da inibitori della calcineurina a terapia con Sirolimus.[52] Lo switch è solitamente ben tollerato con funzione renale preservata ed assenza di rigetto nella maggior parte dei pazienti. Gli inibitori di mTOR sembrano pertanto indicati per i pazienti che hanno presentato una neoplasia dopo il trapianto renale.[53]

In considerazione del ruolo espresso dalla terapia immunosoppressiva nel causare o aggravare diversi tipi di neoplasia, l'orientamento generale è quello di ridurre il carico complessivo dei farmaci. Tuttavia, poiché la riduzione del trattamento immunosoppressivo può aumentare il rischio di rigetto acuto e con esso una maggior probabilità di perdita del graft, può avere un forte impatto sulla qualità di vita del paziente.

Definizione di immunsorveglianza ed escape

Il concetto di immunsorveglianza prevede che una delle funzioni del sistema immunitario sia quella di individuare ed eliminare cloni di cellule trasformate prima che esse possano dare il via alla formazione di neoplasie. I tumori infatti pur derivando da cellule del medesimo individuo sono in grado di dare il via da una risposta immunitaria presentando, anche se pochi antigeni riconoscibili come non self.

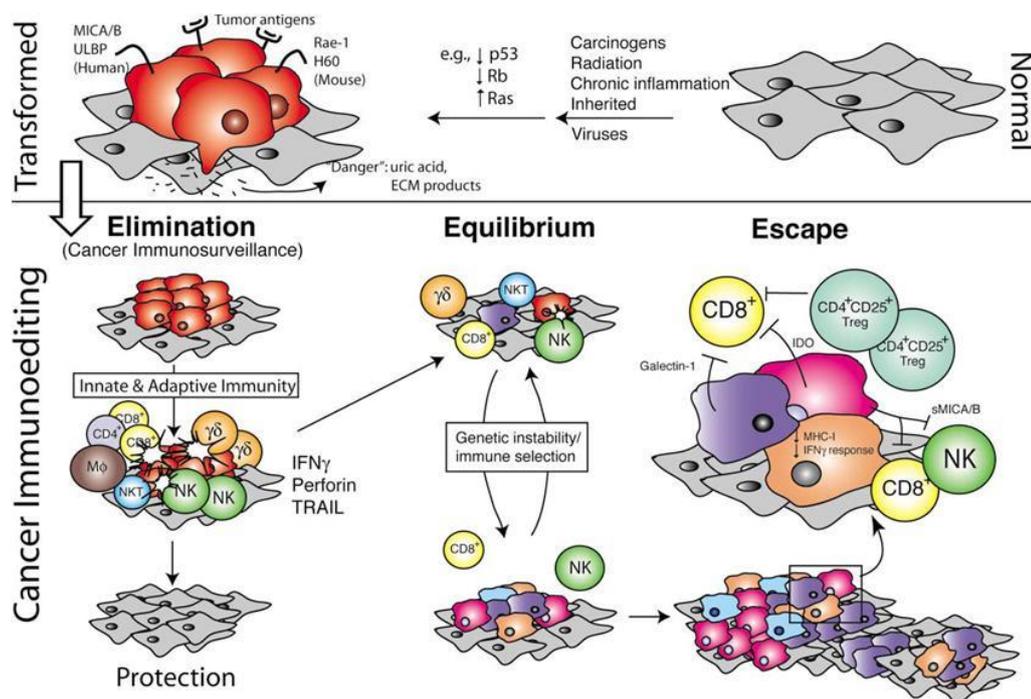


Figura 4. Fonte: Dunn, G.P., Koebel, C. M. & Schreiber, R. D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology*, 6(11), 836-848.

Esistono diversi meccanismi di evoluzione a cancro delle lesioni precancerose e uno di questi meccanismi è proprio l'escape dell'immunosorveglianza, che normalmente interviene agli stadi precoci del processo carcinogenetico bloccandone la progressione (Dunn, Koebel & Schreiber, 2006). Il tumore eludendo il sistema immunitario giunge ad una proliferazione incontrollata e alla diffusione metastatica. Recenti studi hanno individuato due principali tipologie di *escape* basate sulle caratteristiche cellulari e molecolari del microambiente immunitario.

Il primo gruppo (a) mostra un consistente infiltrato infiammatorio costituito prevalentemente da linfociti T, un largo spettro di chemochine e la presenza di

interferon di tipo I. segno dell'attivazione dell'immunità innata. Questo gruppo sembra resistere all'attacco del sistema immunitario tramite effetto inibitorio dominante. Recentissime ricerche hanno dimostrato che il tumore stesso può produrre specifici mRNA capaci di modulare la risposta infiammatoria e immune nel tessuto peritumorale influenzando la progressione della neoplasia (Schmitt, Margue, Behrmann, & Kreis, 2013).

Il secondo gruppo (b) invece si caratterizza per la scarsità di infiltrato infiammatorio a cellule T e sembra che resista all'attacco del sistema immunitario tramite elusione (Gajewski, Schreiber, & Fu, 2013).

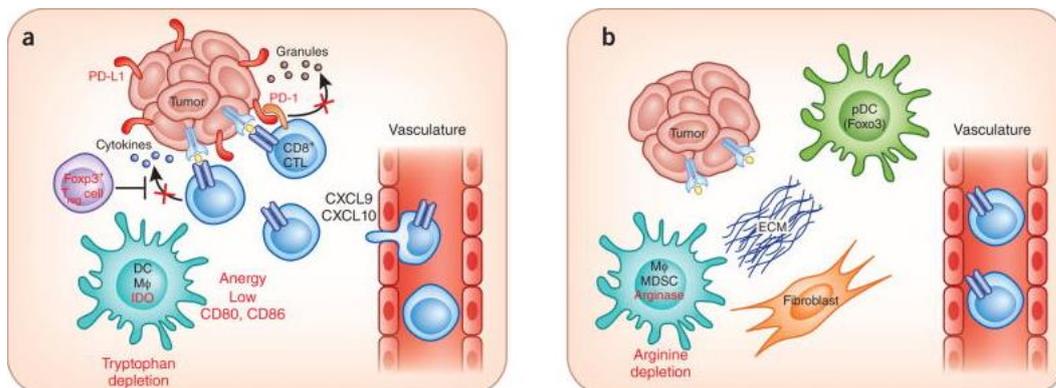


Figura 5. Tipologie di escape tumorale. Fonte: Gajewski, T.F., Schreiber, H., & Fu, Y-X (2013). Innate and adaptive immune cells in the microenvironment. *Nature Immunology*, 14(10), 1014-1022.

Attivazione dei linfociti e molecole di costimolazione

I linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ sono i principali protagonisti dell'immunità antitumorale (Hung et al., 1998). Nel caso di antigeni tumorali la presentazione è effettuata su complessi MHC (Major Histocompatibility Complex) di classe I da parte delle stesse cellule neoplastiche, che quindi assumono il ruolo di APC non professionali. I linfociti CD8⁺ che infiltrano la neoplasia hanno un ruolo molto importante nella difesa dell'ospite contro la progressione neoplastica. Un'attivazione efficace dei linfociti T naive richiede il legame del TCR (T cell receptor) con il complesso MHC-antigen in presenza di molecole di costimolazione che leghino la cellula presentante l'antigene (APC) con la cellula T. La presentazione del complesso MHC-antigene in assenza di segnale di costimolazione induce l'anergia della cellula T. Tali segnali sono forniti dall'interazione delle molecole CD80 e CD86 sulla superficie delle APC con il loro recettore espressi dai linfociti T (CD28) (June, Bluestone, Nadler & Thompson 1994). Il CD80 e il CD86 legandosi al CD28 inducono la fosforilazione della tirosina di diversi substrati potenziando l'attivazione linfocitaria indotta dall'interazione MHC-TCR. I linfociti attivati acquisiscono così la loro capacità citotossica (nel caso dei linfociti CTL CD8⁺) e attivano la produzione delle citochine quali IL-2. Uno dei possibili meccanismi è l'immunosorveglianza basata sull'interazione tra APC e linfociti T. La presentazione dell'antigene associato alla neoplasia in associazione con l'espressione di molecole di costimolazione permette l'attivazione delle cellule T e il riconoscimento di tale antigene come non self.

SCOPO DELLO STUDIO

Lo studio è suddiviso in due fasi: una prima fase retrospettiva in cui viene analizzata la casistica di neoplasie renali dei reni nativi in pazienti affetti da insufficienza renale cronica e in pazienti trapiantati di rene e sottoposti a nefrectomia presso l' U.O.C. Trapianti di Rene e Pancreas dell' Azienda Ospedale-Università di Padova.

Le problematiche aperte in questa tipologia di pazienti includono il rischio aumentato di neoplasie renali e la necessità di un programma di screening al fine di raggiungere precocemente la diagnosi, oltre al ruolo della terapia immunosoppressiva per i pazienti trapiantati. L'istotipo del tumore, il grading, lo stadio alla diagnosi e la prognosi nella popolazione uremica e trapiantata di rene sono stati valutati e confrontati con i dati riportati in letteratura relativi a pazienti uremici e nella popolazione generale.

Inoltre, nella fase prospettica dello studio, abbiamo voluto valutare se nel percorso carcinogenetico di queste neoplasie vi sia un ruolo nell'alterata immunosorveglianza che può essere dovuto in questi soggetti ad una alterata risposta immunitaria legata all'insufficienza renale cronica, o ad un microambiente stimolato dalla patologia sottostante al trattamento dialitico stesso.

L'analisi istopatologica e citofluorimetrica dei reni sono state pertanto indirizzate allo studio dell'espressione delle molecole di costimolazione a livello delle cellule epiteliali renali, per determinare la loro funzione di antigen presenting cell non

professionali. Sono state inoltre analizzate le sottopopolazioni linfocitarie T residenti ed il loro stato di attivazione.

MATERIALI E METODI

Nella fase retrospettiva dello studio sono stati inclusi pazienti sottoposti a nefrectomia dal 2007 a Giugno 2013. A questo scopo è stata formulata una richiesta al Controllo di Gestione dell'AO di Padova per ricevere la lista dei pazienti con tutti i seguenti requisiti:

- Nefrectomia eseguita presso la U.O.C Trapianti Rene e Pancreas dal 2007 a Giugno 2013 (cod.55.51)
- Codifica di IRC allo stadio terminale (cod.585.6) o stato di trapiantato di rene (V42.0) o rene-pancreas (V42.83)
- Codifica di tumore maligno del rene (cod.189.0) o tumore benigno del rene (cod.223.0)

I pazienti che rientravano nei criteri dello studio erano 18, di cui 17 maschi e una femmina.

I dati demografici della popolazione in studio sono riportati nella (TabellaVI):

Numerosità campione	18
-Maschi	17
-Femmine	1
Età media alla nefrectomia	53.4±11.2 anni. (range 34- 69 anni)
Pazienti trapiantati	12
-Donatore deceduto	11
-Doppio trapianto	2
-Singolo trapianto	8
-Rene e pancreas	1
-Donatore vivente	1
--Precedentemente in emodialisi	9
--Precedentemente in dialisi peritoneale	3
Pazienti in dialisi	6
-Emodialisi	2
-Dialisi peritoneale	4
Patologia di Base	
GN a deposito di IgA (malattia di Berger)	4
Glomerulosclerosi focale	2
Rene policistico	2
Nefropatia diabetica	1
Nefroangiosclerosi	1
GN cronica	1
GN mesangioproliferative	1

GN acuta post-infettiva	1
GN in corso di porpora di Schönlein-Henoch	1
IRC di ndd	3
Sdr di Alport	1

Tabella VI: Dati demografici dei pazienti

Sono stati inclusi 12 pazienti trapiantati di rene o rene-pancreas, a distanza mediamente di 126.5 ± 50.7 mesi, e 6 pazienti in trattamento dialitico, con un tempo medio in dialisi prima della comparsa della neoplasia di 53.7 ± 86.7 mesi.

Per ogni paziente abbiamo calcolato il tempo (in mesi) trascorso tra inizio della dialisi e la diagnosi del tumore, in questo tempo è compreso anche il tempo che hanno trascorso tra trapianto e tumore. Il tempo minimo tra inizio dialisi e diagnosi del tumore è 2 mesi e il massimo è di 227 mesi con una media di 102.1 ± 72 mesi. I pazienti trapiantati che hanno avuto il tumore dopo il trapianto sono 12. Per loro abbiamo valutato il tempo trascorso tra trapianto e diagnosi del tumore, il minimo tempo è stato di 5 mesi mentre il massimo è stato di 201 mesi, la media è stata di 98.75 ± 55.4 mesi.

La terapia immunosoppressiva a cui erano sottoposti i pazienti trapiantati è riportata nella (tabella VII).

Tabella VII: Terapia immunosoppressiva nei pazienti trapiantati. (Csa=Ciclosporina, TAC=Tacrolimus, MMF=Micofenolato Mofetile, St=Steroidi)

Terapia immunosoppressiva	Numero pazienti 12 (%)
Tac+MMF+St	7 (58%)
Tac+MMF	2 (17%)
Csa+St	2 (17%)
CsA +MMF+St	1 (8%)

Tra i pazienti in trattamento dialitico, 4 sono stati sottoposti a trapianto di rene successivamente alla nefrectomia, con un tempo medio tra nefrectomia e trapianto di 15.5 ± 15.1 mesi. La terapia immunosoppressiva era (Tacrolimus+Sirolimus+steroidi) in 3 casi e (Tacrolimus+MMF+Steroidi) in un caso.

Sono stati eseguiti 19 interventi di nefrectomia: 9 nefrectomie destre, 8 nefrectomie sinistre e 2 nefrectomie bilaterali.

In 11 pazienti è stata usata la tecnica laparoscopica tradizionale (58%). In un caso è stata usata la tecnica laparoscopica hand-assisted (5%). L'approccio laparotomico è stato usato in 5 pazienti (26%), quello lombotomico in 2 casi (11%). (Tabella VIII)

Tipo di nefrectomia	Numero di interventi	Percentuali
Laparoscopica	11	58%
Laparoscopica hand-assisted	1	5%
Laparotomica	5	26%
Lombotomica	2	11%
Sinistra	8	42%
Destra	9	47%
Bilaterali	2	11%

Tabella VIII: Tipo di intervento di nefrectomia.

Tecniche chirurgiche

L'intervento di "nefrectomia radicale" consiste nell'asportare il rene ed il surrene contestualmente al grasso perirenale. Quando la lesione renale non è in contatto con il surrene quest'ultimo può essere risparmiato. L'intervento viene eseguito usualmente in caso di tumore renale che abbia un diametro superiore a 4 cm. Al di sotto di queste dimensioni è possibile eseguire l'asportazione della sola massa tumorale risparmiando il rene. Tuttavia questa distinzione non si applica al caso dei pazienti uremici, in cui la chirurgia conservativa non viene considerata.

Nefrectomia laparotomica.

L'accesso chirurgico consiste in una laparotomia mediana, con incisione anteriore transperitoneale. Dopo lo scollamento parieto-colico, si isolano i vasi gonadici e l'uretere, che viene sezionato. Si procede quindi con la legatura e sezione dei

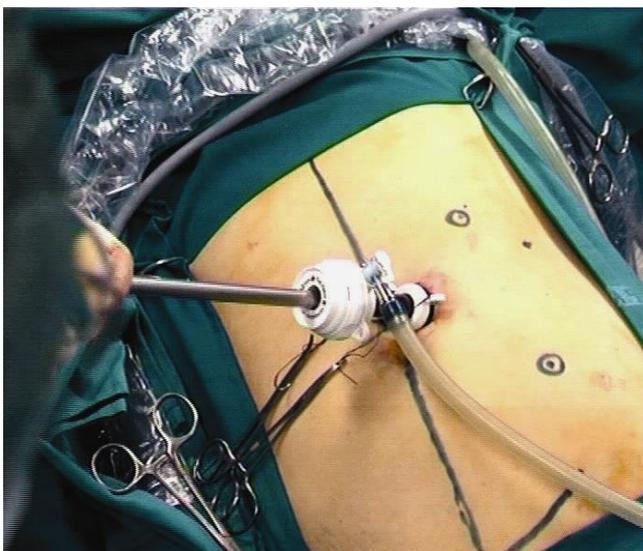
vasi renali. Il rene viene isolato mantenendo intatta la capsula di Gerota, che viene asportata. Nel caso della nefrectomia radicale viene inoltre asportato il surrene contestualmente al rene. Di prassi, insieme alla nefrectomia radicale viene eseguita una linfadenectomia loco regionale.

Nefrectomia lombotomica

L'accesso chirurgico prevede un' incisione sul fianco al di sotto dell'undicesima costa. Il paziente viene posizionato in decubito laterale, con il tavolo operatorio spezzato al fine di estendere il fianco opposto. I muscoli latissimus dorsi, la porzione anteriore dell'obliquo esterno, l'obliquo interno ed il muscolo trasversale con la fascia trasversale vengono sezionati in modo da poter accedere allo spazio retroperitoneale. Si procede con la legatura e sezione dei vasi renali e uretere e l'asportazione del rene con la fascia di Gerota.

Nefrectomia laparoscopica

Figura 6: Posizione del paziente dei trocar nella nefrectomia laparoscopica.



Il posizionamento del paziente prevede una rotazione sul fianco di 45°. L'accesso nella cavità peritoneale può essere effettuato con tecnica open o con ago di Verres. Nella nostra esperienza è sempre stata utilizzata la tecnica open con accesso sovraombelicale transrettale ipsilaterale al rene da asportare. I trocars operativi vengono posizionati in fossa iliaca ed in fianco ipsilaterali alla nefrectomia ed uno in regione epigastrica. Il colon viene mobilizzato e scollato fino alla flessura, la vena gonadica viene sezionata così come la vena surrenalica (nella nefrectomia sinistra). L'uretere viene individuato ed isolato. La sezione dei vasi renali viene effettuata con due EndoGIA separate, ed il rene viene isolato mantenendo intatta la capsula di Gerota. L'estrazione del rene prevede l'introduzione di un sacchetto Endo-Catch attraverso una incisione sovrapubica di Pfannenstiel. Il rene viene pertanto rimosso evitando il contatto con la parete addominale.

Nella fase prospettica dello studio sono stati inclusi pazienti sottoposti a nefrectomia per malattia policistica dell'adulto (APKD) e sospetta neoformazione del rene nativo nel periodo compreso tra dicembre 2014 a dicembre 2015 presso l'U.O.C. Trapianti Rene e Pancreas dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

I dati demografici della popolazione in studio sono riportati nella tabella IX.

Numerosità campione*	16*
-Maschi	11
-Femmine	5
Età media alla nefrectomia	59.3±9.1 anni. (range 39-74 anni)
Pazienti trapiantati	3
-Donatore deceduto	3
-Singolo trapianto	3
--Precedentemente in emodialisi	1
--Precedentemente in dialisi peritoneale	1
Precedentemente preemptive	1
Pazienti in dialisi	6
-Emodialisi	5
-Dialisi peritoneale	1
-Preemptive (iniziano trattamento emodialitico dopo intervento di nefrectomia)	5
Patologia di Base	
Rene policistico	10
IRC di ndd	1
Nefropatia diabetica	1

Tabella IX: Dati demografici dei pazienti

* Sono stati inoltre valutati ed inseriti nel campione due soggetti non affetti da IRC e non trapiantati; in particolare una paziente sottoposta ad intervento di nefrectomia sinistra laparoscopica per aneurisma della arteria renale e conseguente autotrapianto del rene nativo. La paziente è stata successivamente

sottoposta ad espianto del rene per trombosi venosa. Nel secondo caso si tratta di un paziente sottoposto a nefrectomia del rene nativo per neoplasia, all'esame istologico riscontro di Carcinoma a Cellule Chiare grado di Furhman 4, T3aNxMx; entrambi i pazienti sono stati inseriti nel gruppo di studio con lo scopo di cercare di creare diversi gruppi di soggetti da confrontare tra loro (soggetti sani, soggetti trapiantati e soggetti con insufficienza renale cronica).

Tutti gli interventi di nefrectomia sono stati eseguiti secondo le tecniche precedentemente descritte.

La terapia immunosoppressiva a cui erano sottoposti i pazienti trapiantati è riportata nella (tabella X).

Terapia immunosoppressiva	Numero pazienti 3 (18.75%)
mTor+St	1
Tac+mTor+St	1
Tac+ St	1

Tabella X: Terapia immunosoppressiva nei pazienti trapiantati. (Csa=Ciclosporina, TAC=Tacrolimus, MMF=Micofenolato Mofetile, mTor=inibitori dimTor/Everolimus, St=Steroidi)

Citofluorimetria

I campioni di tessuto renale fresco, precedentemente conservato in soluzione fisiologica a 4°C, sono stati frammentati con bisturi (2x2 mm), lavati in HBSS e quindi sottoposti a digestione enzimatica con 1 mg/ml di collagenasi di tipo II a 37°C per 20 min. La sospensione cellulare così ottenuta è stata filtrata attraverso un setaccio con maglie di 80 µm e lavata con PBS sterile. Le cellule risospese in PBS+BSA 2% p/v sono state poi aliquotate e sottoposte a marcatura (30 min a 4°C) con specifici anticorpi coniugati ad opportuni fluorofori per identificare e studiare le sottopopolazioni presenti mediante analisi citofluorimetrica. Le cellule epiteliali sono state identificate con un anticorpo anti-pan-citocheratina e caratterizzate per la presenza di CD80, HLA-ABC ed HLA-DR. Le sottopopolazioni linfocitarie sono state identificate mediante marcatura con anticorpi anti-CD8 e CD4 e caratterizzate per l'espressione di CD28, CD38, CD25 e FoxP3. Per l'acquisizione dei campioni e successiva analisi è stato utilizzato il programma CellQuest su citofluorimetro FACScalibur (Becton Dickinson).

Istologia e Immunoistochimica

I reni asportati sono stati inviati a fresco per l'esame anatomopatologico. Dopo il prelievo per citofluorimetria sono stati fissati in formalina tamponata al 10%. Sono stati eseguiti prelievi per l'istologia nella zona contigua al prelievo per citofluorimetria e in altre zone.

I prelievi sono stati disidratati nella serie scalare degli alcoli, diafanizzati in xilolo e inclusi in paraffina. Per l'esame istologico sezioni di 0,5 micrometri

montate su vetrini sono state sparaffinate con xilolo e idratate in serie decrescente di alcoli e colorate con Ematossilina Eosina, PAS, Tricromica.

Per l'esame immunoistochimico sezioni di tessuto di 3 µm su vetrini elettrostatici, sono state sparaffinate con xilolo e idratate in serie decrescente di alcoli. Veniva poi eseguita l'inibizione della per ossidasi endogena con acqua ossigenata al 3% per 10'. Si eseguiva successivamente lo smascheramento antigenico specifico per ogni anticorpo (tabella XI); veniva quindi aggiunto l'anticorpo primario opportunamente diluito (vedi tabella) per 45' a temperatura ambiente.

Dopo i lavaggi in tampone fosfato (PBS) si eseguiva la rilevazione con Polimero Kit Ultravision (due passaggi da 10' rispettivamente), ditta Thermo Scientific.

Dopo lavaggi in PBS si eseguiva lo sviluppo della reazione con diaminobenzadine (ditta Dako) per massimo 5'.

Si procedeva a controcolorazione nucleare con ematossilina.

Infine, dopo disidratazione e passaggio in xilolo, i vetrini venivano montati con balsamo Eukit ed osservati al microscopio.

Nome Anticorpo	Smascheramento Antigenico	Diluizione	Ditta Produttrice
CD3	MW CITRATO pH = 6	1 : 200	DAKO
CD20	MW CITRATO pH = 6	1 : 200	DAKO
CD4	MW EDTA pH = 6	1 : 200	DAKO
CD68	MW EDTA pH = 6	1 : 200	DAKO
CD80	MW CITRATO pH = 6	1 : 100	ReD Systems

Tabella XI: smascheramento antigenico specifico per singolo anticorpo

Analisi statistica.

Nella fase retrospettiva dello studio sono stati utilizzati il test non parametrico di Mann Whitney ed il test χ^2 sono stati utilizzati nel confronto delle caratteristiche delle neoplasie nella popolazione dei pazienti dializzati con quella dei trapiantati. Sono considerati significativi i valori di $p < 0.05$. Per il test di Mann Whitney il valore di U è stato comparato con il valore limite del caso specifico.

Per tutte le analisi statistiche è stato usato il software IBM SPSS Statistics.

Nella fase prospettica dello studio i confronti sono stati fatti con Mann-Whitney U test.

RISULTATI

Fase retrospettiva. Dall'analisi delle cartelle cliniche e dalle cartelle ambulatoriale di follow-up del paziente dializzato o trapiantato è stato possibile risalire a:

- modalità di diagnosi della neoplasia renale
- presenza di sintomatologia associata
- caratteristiche della neoplasia
- outcome del paziente.

Paziente	Localizzazione del tumore	Dimensioni del tumore (cm)	Istologia	Stadiazione TNM, Grado Fuhrman	Follow-up	Trattamento
1	Sx	3	Cellule chiare	T _{1a} ,2	50	Laparotomia
	Dx	1	Cellule chiare	T _{1a} ,2		Laparoscopia
	Dx	1.5	Adenoma papillare			Laparoscopia
2	Dx	1.7	Cellule chiare	T ₁ ,2	44	Laparotomia
3	Sx	2.3	Cellule chiare	T _{1a} ,2	1	Laparoscopia
4	Sx	0.7	Papillare	T ₁	18	Laparoscopia
5	Sx	2.5	Cellule chiare	T ₁ ,3	35	Laparoscopia
6	Dx	1.5	Papillare	T ₁ ,1	33	Laparoscopia
7	Dx	1.3	Papillare	T ₁	31	Lombotomia
8	Sx	1.8	Papillare	T _{1a} ,2	31	Lombotomia
9	Dx	3	Papillare	T _{1a}	8	Laparoscopica H-A
10	Dx	1.3	Cellule chiare	T _{1a} ,2	18	Laparoscopica
11	Dx	5	Papillare	T ₁ ,2	7	Laparotomia
12	Sx	5	Cellule chiare	T _{1b} ,2	1	Laparoscopica
13	Dx	8	Papillare	T ₂ ,2	4	Laparotomia
14	Dx	1.3	Papillare	T _{1a} ,3	77	Laparotomia
15	Sx		Oncocitoma		21	Laparoscopia
16	Sx		Adenoma papillare		9	Laparoscopia
17	Dx	4.3	Cellule chiare	T _{1a} ,2	1	Laparoscopia
18	Sx	5	Cellule chiare	T _{1b} ,3	3	Laparoscopia

Tabella XI. Dati sulla neoplasia dei pazienti e sull'intervento eseguito.

All'esame istologico del pezzo operatorio, nel 85% (17 casi) è stata effettuata diagnosi di neoplasia maligna. Tra i tumori maligni, in 9 casi si trattava di carcinoma a cellule chiare (45%), in 8 casi di carcinoma papillare (40%). I tumori che all'esame istologico del pezzo operatorio si sono rivelati benigni erano in due casi un adenoma papillare (10%) e in uno oncocitoma (5%) (Tabella XI). La diagnosi di malattia cistica acquisita si associava a tre casi di carcinoma papillare.

Tabella XII: Tipo istologico delle neoplasie

Tipo di tumore	Numero pazienti (%)
Tumori maligni	17 (85%)
-Carcinoma a cellule chiare	9 (45%)
-Carcinoma papillare	8 (40%)
Tumori benigni	3 (15%)
-Adenoma papillare	2 (10%)
-Oncocitoma renale	1 (5%)

Per quanto riguarda la stadiazione TNM, 16 pazienti erano in stadio T1 (94%), 1 paziente era in stadio T2 (6%).

Il grado Fuhrman è stato valutato in 16 casi su 17 di tumore maligno (Tabella XIII)

Tabella XIII: Stadiazione e grado dei tumori.

Classificazione dei tumori	Tipi	Numero dei pazienti
Classificazione TNM	T1N _x M _x	16 (94%)
	T2N _x M _x	1 (6%)
	T3N _x M _x	0 (0%)
	T4N _x M _x	0 (0%)
Grado Fuhrman	1	3 (19%)
	2	10 (62%)
	3	3 (19%)
	4	0 (0%)
	Non specificato	1

La diagnosi è stata eseguita tramite un esame ecografico addominale in 19 casi. In 2 casi è stato diagnosticato il tumore durante il controllo ecografico di routine del paziente dializzato, in 3 la diagnosi è stata fatta durante gli esami per l'immissione in lista di trapianto. In un caso la diagnosi è stata fatta con una TAC per altra causa. Nei 14 casi di pazienti trapiantati, la diagnosi è stata fatta in occasione di un controllo ecografico programmato nel follow-up post-trapianto.

L'esame ecografico dimostrava aree nodulari, cistiche, ipoecogene di dimensioni che variavano da 0.7 mm a 80 mm. In ogni paziente è stato fatto un esame TC con mezzo di contrasto per approfondimento diagnostico.

Outcome dei pazienti

Due pazienti sono deceduti all'età di 65 e 69 anni. La causa del decesso è stata rispettivamente: pancreatite acuta e cause infettive. Nessun paziente ha avuto recidiva di malattia dopo un follow-up medio di 22 ± 20 mesi (range 1-77 mesi).

In 7 casi il follow-up è stato effettuato presso l'Oncologia dell'AO di Padova, per gli altri 11 pazienti il follow-up è stato eseguito presso la Nefrologia del territorio di competenza (1 paziente) o presso il Centro Trapianti (10 pazienti). Per nessuno dei pazienti è stata necessaria terapia adiuvante. Il follow-up è stato eseguito a distanza di 3 mesi dalla nefrectomia e dopo ogni 6 mesi.

In un paziente si sono verificate altre 2 neoplasie durante il follow-up: un adenocarcinoma prostatico a distanza di un anno dalla nefrectomia e un melanoma maligno a distanza di 2 anni dalla nefrectomia.

Il confronto tra i pazienti che sono stati sottoposti alla nefrectomia dopo il trapianto e quello di pazienti che sono stati sottoposti a nefrectomia quando erano in terapia dialitica è riportato nella (Tabella XIV)

	Trapiantati (%)	Dialisi (%)	Valore p
Età alla nefrectomia	52.5±11.01	55.3±12.56	0.60 u=30 Valore dell'U del test di Mann Whitney significativo se <14
Genere			
M	11 (92%)	6 (100%)	
F	1 (8%)	0 (0%)	
Tipo di tumore			0.009
Cellule chiare	9 (64%)	1 (17%)	
Papillare	2 (14%)	5 (83%)	
Tumori benigni	3 (22%)	0 (0%)	
Grado Fuhrman			0.53
1	3 (25%)	0 (0%)	
2	7 (58%)	3 (75%)	
3	2 (17%)	1 (25%)	
4	0 (0%)	0 (0%)	
T stage			0.44
1	10 (91%)	6 (100%)	
2	1 (9%)	0 (0%)	
3	0 (0%)	0 (0%)	
4	0 (0%)	0 (0%)	

Tabella XIV: Differenze tra il gruppo dei dializzati e trapiantati.

Fase prospettica. All'esame istologico del pezzo operatorio, nel 18.7 (3 casi) è stata effettuata diagnosi di neoplasia maligna. Tra i tumori maligni, in 2 casi si trattava di carcinoma a cellule chiare (66%), in 1 caso di carcinoma papillare (34%). La malattia policistica dell'adulto (APKD) si associava in un caso alla presenza di carcinoma a cellule chiare.

La stadiazione e il grado del tumore sono riportati nella tabella XV.

Tabella XV: Stadiazione e grado dei tumori.

Classificazione dei tumori	Tipi	Numero dei pazienti
Classificazione TNM	T3aNxMx	1
	T1NxMx	1
	T1NxMx	
Grado Fuhrman	1	–
	2	2
	3	-
	4	1

Nessun paziente ha avuto recidiva di malattia dopo un follow-up medio di 3.4± mesi (range 3-5mesi).

Valutazione dell'attivazione delle cellule epiteliali che assumono il ruolo di cellule presentanti l'antigene, e dell'attivazione dei linfociti citotossici

Ad un'analisi puramente descrittiva la percentuale di cellule epiteliali CD80+ risulta essere maggiore nei soggetti carcinoma renale rispetto ai soggetti sani; anche l'intensità di fluorescenza media delle cellule epiteliali CD80+ risulta essere maggiore nei soggetti con carcinoma renale rispetto ai soggetti sani.

Confrontando la percentuale delle cellule epiteliali HLA-ABC+ nei due gruppi, i valori ottenuti risultano essere tendenzialmente aumentati nei pazienti affetti da neoplasia renale sia per quanto riguarda l'intensità di fluorescenza media sia per quanto riguarda la percentuale di cellule che superano il gate e che quindi vengono catalogate come positive (HLAABCm e HLADRm rappresentano l'intensità media della fluorescenza per cellula, mentre HLAABCr e HLADRr rappresentano la percentuale di cellule positive).

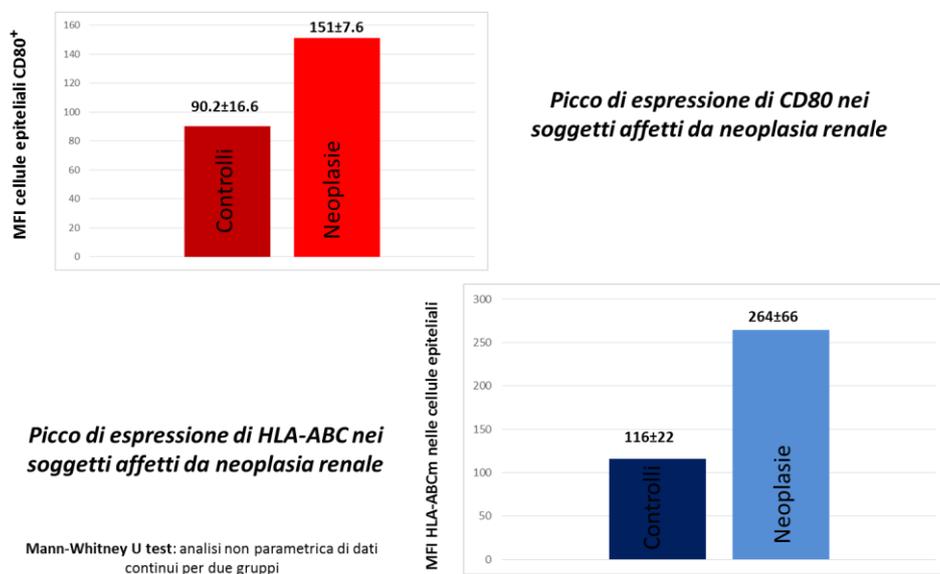
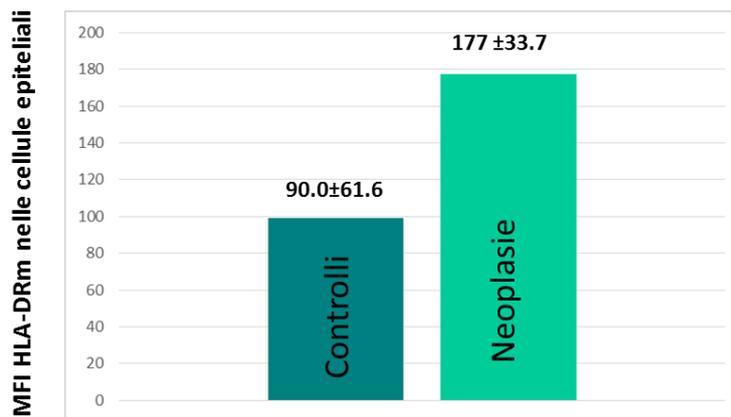


Figura 7: Espressione di CD80 e HLA-ABC



Picco di espressione di HLA-ABC nei soggetti affetti da neoplasia renale

Figura 8: Espressione di CD80 e HLA-ABC nelle cellule epiteliali

L'analisi eseguita all'immunoistochimica ha evidenziato un elevato infiltrato istomonocitario CD68+, mentre invece scarso è risultato l'infiltrato linfocitario nei pazienti affetti da neoplasia sia per quanto riguarda i linfociti T che i linfociti B.

Il CD80 è risultato positivo nel parenchima attiguo a poche neoplasie renali, non in maniera significativa.

Figura 8: carcinoma a cellule chiare in paziente con IRC; A: zona non affetta da tumore, B: zona affetta da tumore.

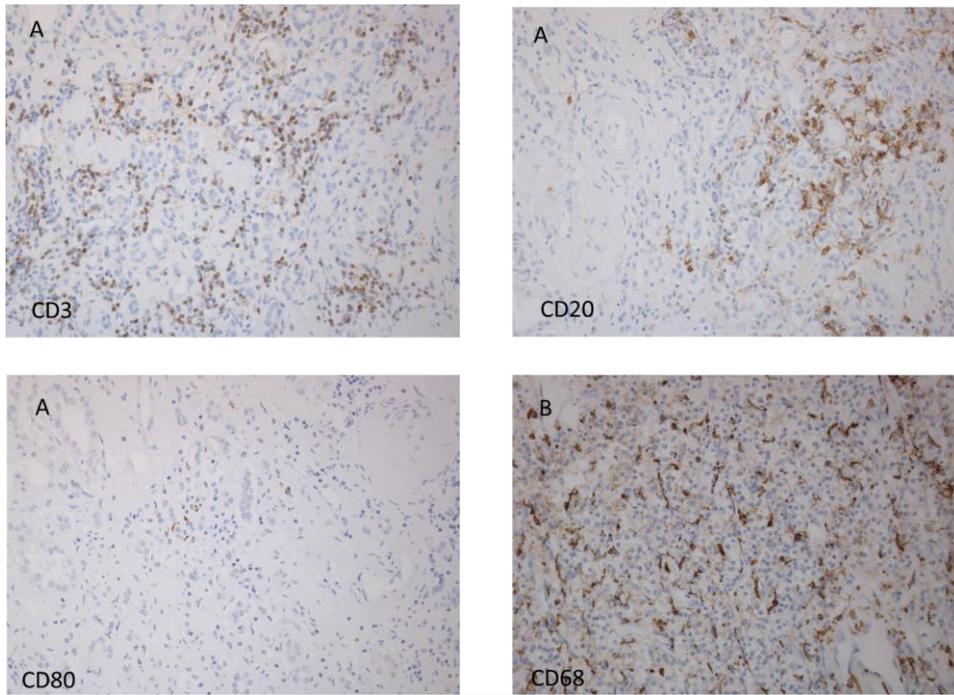


Figura 9: carcinoma papillare in paziente con IRC affetto da APKD;

A: zona non affetta da tumore, B: zona affetta da tumore.

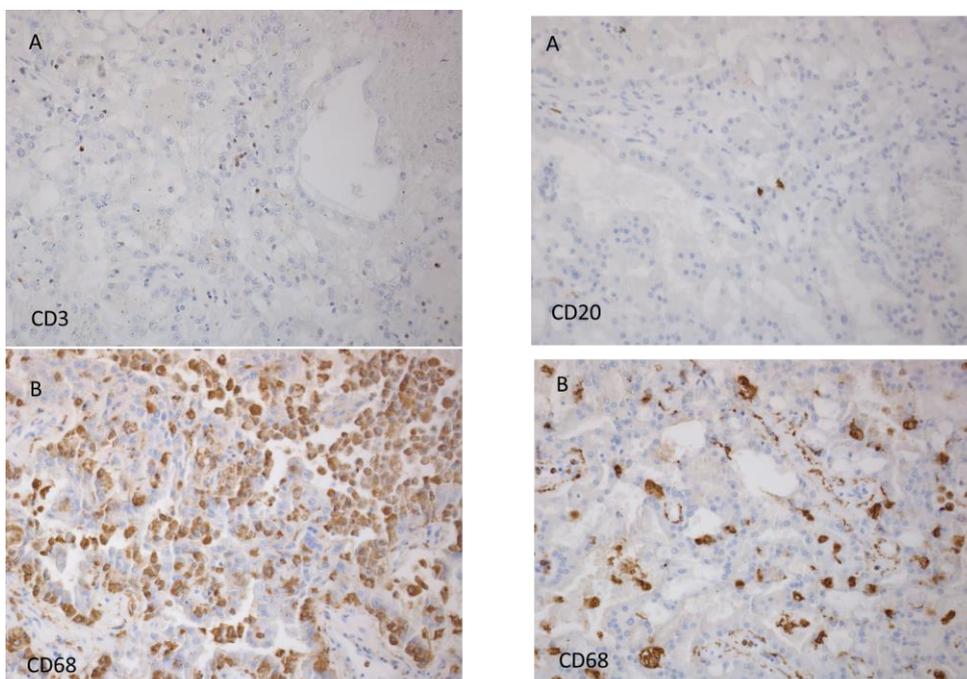
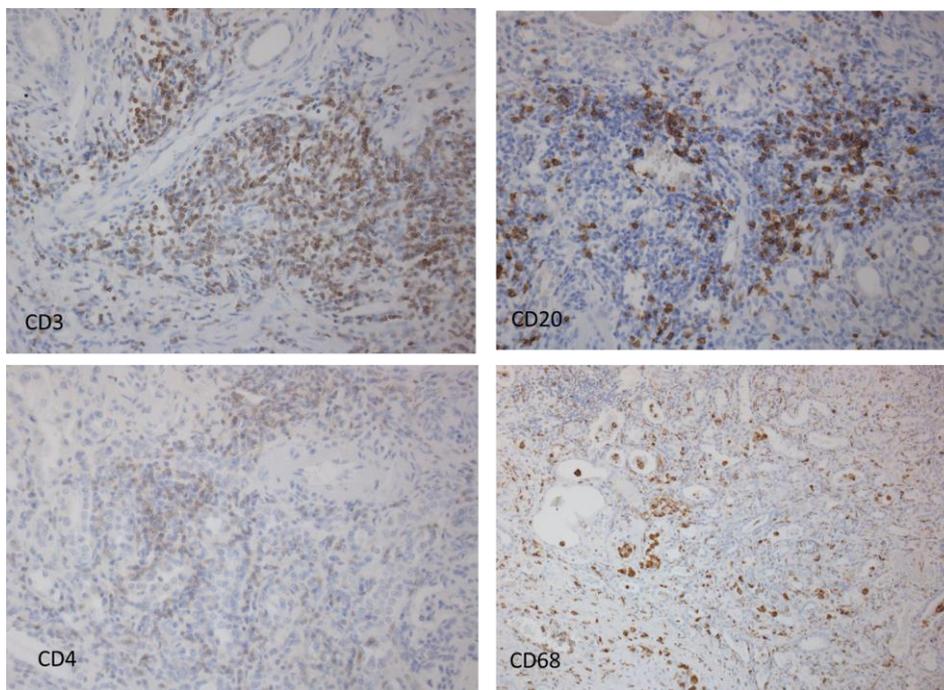


Figura 10: rene espantato per trombosi non affetto da neoplasia



DISCUSSIONE

I carcinomi renali avvengono nello 0.5 -3.9% dei trapiantati di rene.[54] Il rischio di sviluppare carcinoma renale nei pazienti trapiantati è da 10 a 100 volte superiore a quello della popolazione generale.[55] I carcinomi renali rappresentano circa il 3.6% delle neoplasie che si sviluppano nei pazienti trapiantati. Diversi fattori sono responsabili di questa particolare incidenza di tumori renali nei pazienti trapiantati: un precedente abuso di analgesici, un precedente carcinoma renale (anche se rimosso), formazioni cistiche renali insorte nel corso dell'uremia. [56][57]

La correlazione tra tumore renale e malattia cistica acquisita nei pazienti in stadio terminale dell'insufficienza renale è stata descritta per la prima volta nel 1977. [58] Da allora diversi studi sono stati condotti sull'associazione tra tumore renale e IRC in stadio terminale. Chandhoke et al.,(1992) non aveva trovato una correlazione tra i due [59] , successivamente Moudouni SM et al, ha osservato un'aumentata incidenza di tumori renali dei reni nativi nei pazienti trapiantati [35] e nei pazienti in trattamento dialitico (1.7%) rispetto alla popolazione generale. Questo ultimo ha descritto che 44 pazienti su 2624 pazienti in dialisi avevano presentato il RCC con una media di 11.2 anni dal inizio della dialisi e 36 di loro avevano la malattia cistica acquisita. Una correlazione positiva è stata trovata anche in una casistica di pazienti trapiantati [60] nel 2007 da Ianhez et al., che ha riportato un'incidenza dello 0.7% ad una distanza media dal trapianto di 8.4 anni ed in tutti i casi era associata una malattia cistica acquisita.[61] Uno studio condotto da Pope et al., ha dimostrato che non esistono differenze significative per quanto riguarda la presentazione della patologia in 7 pazienti

trapiantati e 13 dializzati che avevano RCC. C'era solo un tasso più alto di mortalità nei pazienti trapiantati. Il risultato è stato attribuito alla terapia immunosoppressiva.[41]

Chi Yen Cheung et al. riporta un'incidenza di neoplasie renali nei pazienti trapiantati di 1.2%, in uno studio condotto su un campione di 1003 pazienti trapiantati. [62]

Nella casistica dell'U.O.C. Trapianti Rene e Pancreas di Padova, sono stati eseguiti 1595 trapianti di rene dal 1988 al 2013, e il riscontro di neoplasia renale sui reni nativi è avvenuto in 12 pazienti trapiantati, ed in 11 casi si trattava di tumori con istologia maligna (0.7%). Sembra pertanto che la nostra esperienza confermi i dati della letteratura secondo cui l'incidenza di neoplasia renale nel nefrotrapiantato sia circa 15-30 volte maggiore rispetto alla popolazione generale (in Italia l'incidenza è dello 0.024%). Il tipo istologico e lo stadio della neoplasia alla diagnosi nella popolazione generale differiscono da quelli riportati nella popolazione in dialisi e nefrotrapiantata in quanto il carcinoma papillare risulta più frequente nei trapiantati, e lo stadio alla diagnosi è generalmente più precoce, come riportato in (Tabella XIII)

Tabella XVI: Risultati del nostro studio e studi su campioni di casi sporadici di tumore.

	Risultati del nostro studio	Risultati nella popolazione negli Usa (1711) [5]	Popolazione Europea (4774) [2]
Età alla diagnosi del tumore	53.4±11.2 anni	61±9.78 anni	61±9.1 anni
Istologia			
Carcinoma a cellule chiare	9 (45%)	1219 (71%)	4162 (87%)
Carcinoma papillare	8 (40%)	251 (15%)	405 (8%)
Altri	3 (15%)	241 (14%)	207 (5%)
Stadiazione TNM			
T ₁	16 (94%)	1056 (62%)	2303 (48%)
T ₂	1 (6%)	178 (10%)	667 (14%)
T ₃	0	455 (27%)	1722 (36%)
T ₄	0	22 (1%)	82 (1%)

Questa differenza è probabilmente dovuta al monitoraggio ecografico di routine che avviene nei pazienti in dialisi, in quelli in lista d'attesa per trapianto e nel follow-up post-trapianto.

Le casistiche in cui viene eseguito un monitoraggio ecografico di routine nel paziente trapiantato evidenziano infatti che la diagnosi avviene in uno stadio più iniziale: Doublet JD et nel suo studio con 129 pazienti trapiantati, ha condotto regolarmente esami ecografici in tutti i pazienti e ha riscontrato 5 tumori renali tutti in stadio pT₁ [38]; mentre, in assenza di un protocollo di monitoraggio di routine, uno studio retrospettivo condotto in Giappone su 1744 pazienti ha descritto 22 casi di neoplasia renale con le seguenti stadiazioni: 12 pT₁, 3pT₂ e 7pT₃. [63]

Fare un screening di massa della popolazione generale nell'età in cui è più probabile la comparsa del tumore renale potrebbe ridurre i decessi dovuti a questa neoplasia, ma data la rarità dei casi sporadici (15/100.000 abitanti) il vantaggio di sopravvivenza non giustificerebbe la spesa sanitaria. Per quanto riguarda la popolazione dializzata, un'analisi eseguita diversi anni fa concludeva che, trattandosi di pazienti con bassa aspettativa di sopravvivenza, i benefici di tale screening fossero dubbi: infatti, l'ecografia di screening avrebbe condotto all'esecuzione di costose analisi di secondo livello, e a trattamenti spesso più rischiosi per il paziente rispetto al reale beneficio di sopravvivenza.[64]

Le linee guida KDIGO suggeriscono che alcune forme di nefropatia (sclerosi tuberosa, nefropatia da analgesici e malattia cistica acquisita) dovrebbero essere

sorvegliate con maggiore attenzione per l'aumentato rischio di carcinoma renale.
[65]

Anche se l'incidenza del tumore renale è maggiore nei pazienti trapiantati e nei pazienti con malattia cistica acquisita [66], la Società Americana dei Trapianti non ha ancora messo a punto delle linee guida per uno screening ecografico. [67] Schwarz et al., nel suo studio raccomanda un protocollo di controllo dei pazienti trapiantati ,con un ecografia dei reni nativi che deve essere parte del programma di follow-up post trapianto, almeno una volta all'anno.[66]

La proposta suggerita da Goh et al., in base alla ottima prognosi dei loro pazienti sottoposti a screening ecografico, è di eseguire, nei pazienti trapiantati, una ecografia dei reni nativi entro un mese dal trapianto e successivamente ogni 5 anni in assenza di cisti a carico dei reni nativi, o ogni 2 anni se sono presenti cisti renali.[19]

Le Linee guida Italiane per la sorveglianza ambulatoriale dei pazienti trapiantati di rene, riconoscono l'importanza di una diagnostica precoce soprattutto nel paziente trapiantato, in cui si hanno frequentemente metastasi interessanti linfonodi, fegato, polmoni, con frequente invasione delle vene renali e della vena cava. Infatti circa il 40% dei pazienti trapiantati con carcinomi renali muoiono come conseguenza di tale patologia.[39]

Tuttavia non esprimono una raccomandazione sulla necessità di eseguire un follow-up ecografico. Benché poi venga riconosciuto la particolare aggressività dei tumori uroteliali, che si presentano con un quadro ampiamente diffuso al momento della diagnosi in più della metà dei pazienti e con una mediana di sopravvivenza di soli 17 mesi [60], non raccomandano di eseguire uno screening

citologico urinario nel paziente trapiantato. Il motivo di questa scelta è dovuto al fatto che la maggior quantità d'urina origina dal rene trapiantato e non da quelli nativi; viene considerato utile lo screening citologico per una diagnosi precoce solo per pazienti che hanno anamnesi d'abuso d'analgesici. [68]

Non vi sono Linee Guida Italiane né Europee al momento che chiariscano se sia raccomandato, e con che frequenza, eseguire una ecografia di routine dei reni nativi nel paziente in dialisi. Al contrario, per il paziente uremico in valutazione per l'idoneità al trapianto di rene esistono delle Linee Guida anche nel nostro Paese, che si rifanno a quelle proposte dalla Commissione della Società Americana dei Medici Trapiantatori per la selezione dei candidati al trapianto renale, pubblicate al Journal of the American Society of Nephrology 1995. Secondo tali protocolli, è opportuno eseguire una ecografia annualmente in tutti i pazienti in lista d'attesa.[69][68]

Un limite all'esecuzione di screening con ecografia è che quest'esame non è in grado di diagnosticare neoplasie di piccole dimensioni. L'utilizzo di Tac e RMN è generalmente limitato alla diagnostica di secondo livello, benché non raramente anche queste indagini non riescano a chiarire la diagnosi differenziale di malignità nel rene multicistico o atrofico.

La TC presenta un'accuratezza molto elevata per le masse renali e ha una sensibilità maggiore dell'ecografia per le lesioni di piccole dimensioni. Le lesioni cistiche possono essere classificate come benigne in presenza di un contorno

regolare, assenza di calcificazione e contenuto omogeneo. La distinzione fra cisti complicate e tumori maligni non è sempre agevole.

Inoltre l'adenoma papillare e l'oncocitoma renale sono lesioni benigne che spesso sono incluse nella diagnosi differenziale delle neoplasie renali, e possono talora essere difficili da distinguere dai tumori maligni, sia clinicamente che radiologicamente e patologicamente. [70]

Per quanto riguarda le neoplasie papillari ne sono stati descritti di due tipi: tipo I caratterizzato dalla presenza di piccole cellule con scarso citoplasma, disposte in unico strato a livello della membrana basale. I tumori papillari di tipo I sono più frequentemente multifocali. Per quanto riguarda il tipo II si caratterizzano per la presenza di cellule con elevato grado nucleare e con citoplasma eosinofilo. Sulla base delle dimensioni vengono classificati in: fino a 0.5 cm adenoma papillare (istologicamente assomiglia al tipo I), da 0.5 a 2 cm neoplasia papillare a basso grado di malignità, sopra i 2 cm si parla di carcinoma papillare. Il papillare di tipo I ha una prognosi migliore rispetto al tipo II (71).

Lhose C.M. et al. in un studio del 2002 condotto su 2042 pazienti trattati con nefrectomia radicale tra gennaio 1978 e dicembre 1998 ha evidenziato come la sopravvivenza dei pazienti affetti da carcinoma papillare di tipo I a dieci anni è del 100%, del 90 % per i pazienti affetti da carcinoma papillare tipo II e nettamente inferiore per i pazienti affetti da carcinoma a cellule chiare.

L'oncocitoma è un tumore benigno che rappresenta circa il 3-4% dei tumori renali. Esso si caratterizza come una lesione rotondeggiante, omogenea, con contorni regolari e può presentare una caratteristica cicatrice centrale di aspetto stellato;

all'angiografia si può osservare una vascolarizzazione a ruota di carro. L'oncocitoma potrebbe rappresentare una lesione precancerosa e se ne consiglia l'asportazione chirurgica.

Questi tumori vengono spesso trovati in associazione alla presenza di carcinoma a cellule chiare dello stesso rene o talvolta del rene controlaterale, e la nefrectomia radicale risulta l'unico mezzo affidabile per raggiungere sia la diagnosi che il trattamento definitivo.[72]

G.Li et al ha condotto uno studio su 162 masse solide renali ,diagnosticate con l'ecografia e TC, per le quali è stata posta indicazione alla nefrectomia delle quali solo l'istologia ha potuto distinguere tra (145 carcinomi e 17 tumori benigni).[73]

Nella nostra casistica, la decisione di sottoporre i pazienti a nefrectomia radicale si è basata su test di imaging di primo livello (ecografia) e secondo livello (TAC o RMN), tuttavia in 3 casi, solo la diagnosi istologica ha potuto identificare le lesioni benigne. Riteniamo quindi che, in caso di dubbio diagnostico o di lesioni senza chiari caratteri di malignità alle indagini di secondo livello, sia comunque opportuno procedere con la nefrectomia e la definizione istologica. La biopsia delle lesioni rimane controindicata per l'elevato rischio di disseminazione neoplastica.[72]

Circa il 25-30% dei pazienti cui viene diagnosticato un carcinoma renale sporadico, ha la contemporanea presenza di metastasi singole o multiple ed in questi casi, la prognosi è severa.[74] Allo stato attuale, in questi pazienti, infatti, non è stato dimostrato un reale beneficio curativo derivante dai trattamenti chemioterapici o radiante ed anche la chirurgia ha sempre conservato un aspetto

marginale.

La nefrectomia radicale non ha finora incontrato un consenso univoco nella malattia metastatica all'esordio, anche se da sempre viene considerata una terapia palliativa o di necessità, in caso di pazienti che presentano dolore, ipertensione, eritrocitosi, ipercalcemia severa. Infatti, la sola nefrectomia nel carcinoma renale metastatico non ha mai dimostrato un aumento della sopravvivenza globale, che in questo stadio si aggira attorno al 10-20% a 5 anni.

Per molti anni la terapia unica per questo tumore in fase metastatica era la terapia con IFN- α o/e interleuchina IL-2.[75] I risultati non erano soddisfacenti. Negli ultimi anni sono state sperimentate terapie target che agiscono sul Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) inibendo l'angiogenesi (Bevacizumab), sulle Tirosina Kinasi (TK) (Sunitinib, Pazopanib, Sorafenib) e sul mammalian target of rapamycin (mTOR: Temsirolimus, Everolimus).[76]

Le linee guida della National Comprehensive Cancer Network (NCCN) e European Association of Urology (EAU) danno indicazioni per il trattamento del carcinoma a cellule chiare e dei carcinomi non a cellule chiare. Secondo la NCCN, per il carcinoma a cellule chiare metastatico la prima linea è composta da Sunitinib, Bevacizumab +IFN- α e Pazopanib se la prognosi è buona. Se la prognosi è scarsa si usa il Temsirolimus. Per la seconda linea si usano Sorafenib, Sunitinib, e Pazopanib se il trattamento con le citochine ha fallito. Secondo la EAU come prima linea si usa Sunitinib, Bevacizumab+IFN- α e pazopanib per pazienti a basso rischio e temsirolimus per pazienti ad alto rischio. Come seconda linea, Everolimus è raccomandato in caso di fallimento della terapia con inibitori

delle tirosina chinasi. Sorafenib e Pazopanib sono raccomandati in caso di fallimento della terapia con citochine.[77][78]

Nella popolazione di pazienti trapiantati, il ruolo della terapia immunosoppressiva nell'insorgenza e nella progressione della malattia neoplastica renale non è chiarito. Tuttavia, l'efficacia dimostrata dall'utilizzo di farmaci inibitori di m-TOR in associazione a dosi minimizzate di inibitori della calcineurina suggerisce che questo possa essere il protocollo immunosoppressivo di scelta per i pazienti sottoposti a trapianto renale che sviluppano una neoplasia renale.

L'effetto benefico degli inibitori m-TOR sulla prevenzione del cancro nei pazienti sottoposti a trapianto è stata documentata in diversi studi clinici. Stallone G et al., ha riportato effetti benefici nel sarcoma di Kaposi in 15 pazienti trapiantati.[79]

De Fijter et al., ha condotto uno studio su 53 pazienti trapiantati diagnosticati con tumori cutanei (non melanomi) su i quali era stata cambiata la terapia immunosoppressiva da inibitori di calcineurina in inibitori di m-TOR, e ha osservato che in 37 pazienti c'è stata una remissione del tumore.[80]

Nello studio condotto da Cheung C.Y, in 10 pazienti su 12 è stato introdotto nella terapia immunosoppressiva il Sirolimus (mTORi), ed in tutti i pazienti è stata ridotta l'esposizione agli inibitori della calcineurina.[62]

Nella nostra casistica, tra i 10 pazienti trapiantati sottoposti a nefrectomia per neoplasia maligna, nessuno assumeva terapia con mTOR-inibitori al momento della diagnosi, e nel successivo decorso 2 casi sono stati convertiti ad un regime immunosoppressivo di minimizzazione degli inibitori della calcineurina in associazione a everolimus.

I 4 pazienti trapiantati di rene successivamente alla nefrectomia per tumore renale sono stati inseriti in lista mediamente 15.5 ± 15.1 mesi dopo l'intervento chirurgico. Non si è ritenuto infatti necessario attendere un intervallo libero da malattia più lungo poiché si trattava di piccoli tumori in stadio T1 a basso grado. Come infatti previsto dalle Canadian Society of Transplantation consensus guidelines on eligibility for kidney transplantation, benché sia raccomandato attendere almeno 2 anni dalla guarigione della neoplasia renale prima di procedere con il trapianto, tumori incidentali, di piccole dimensioni, potrebbero non necessitare di alcun periodo di intervallo prima dell'accesso alla lista d'attesa. Al contrario, neoplasie di grandi dimensioni, invasive o sintomatiche potrebbero richiedere più di 5 anni di attesa. [69]

La terapia immunosoppressiva di scelta prevedeva l'utilizzo di mTOR-inibitori in associazione a basse dosi di tacrolimus (3 casi), soltanto in un caso non è stato utilizzato mTOR inibitore a causa di un elevato rischio immunologico.

Un possibile ruolo nello sviluppo delle neoplasie può essere giocato dal sistema immunitario nell'ambito di quello che chiamiamo immunosorveglianza o immunoediting, in cui i tumori presentando un profilo antigenico peculiare vengono riconosciuti come non-self pur sviluppandosi da cellule del medesimo individuo. I linfociti T sono i principali protagonisti di questi meccanismi e per essere attivati hanno bisogno della presenza di un segnale costimolatorio in aggiunta alla presentazione dell'antigene. L'assenza di costimolazione infatti induce la cellula all'anergia e permette al tumore di eludere il sistema immunitario.

E' qui che si inserisce la seconda parte della nostra ricerca il cui obiettivo principale è quello di analizzare il microambiente immunitario in cui si sviluppa il carcinoma renale nei pazienti affetti da IRC e trapiantati. Le neoplasie renali sono tra i tumori in cui il meccanismo di escape sembra giocare un ruolo fondamentale nella progressione della malattia (81); numerosi studi infatti hanno evidenziato la presenza di un importante infiltrato di cellule T principali effettori della risposta immunitaria, in particolare linfociti T e cellule NK. L'elusione dell'immunosorveglianza può essere secondaria o ad un'alterazione intrinseca del tumore stesso, che in questo modo non viene riconosciuto dal sistema immunitario o può essere secondaria ad un alterazione del sistema immunitario nei pazienti affetti da carcinoma renale.

In aggiunta il tessuto tumorale, include numerosi e diversi fattori di secrezione, come fattori di accrescimento, citochine, chemochine e componenti della matrice extracellulare. Secondo alcuni studi l'incremento di linfociti T e mastociti nel tessuto tumorale sembra essere correlato con la progressione della malattia e sembra avere anche un ruolo prognostico in termini di outcome. Nel suo studio Polimero et al.(82), ha evidenziato un aumento delle cellule Treg CD4+/CD25/Foxp3+ nel carcinoma renale rispetto ad altri tipi di tumore; nello stesso studio, a conferma dell'importante ruolo di Treg nell'immunosorveglianza, un incremento di Treg nel tessuto tumorale correleva con un riduzione della sopravvivenza libera da malattia.

Ad un analisi puramente descrittiva, valutando l'attivazione delle cellule epiteliali che assumono il ruolo di cellule presentanti l'antigene e l'attivazione die linfociti T citossici, abbiamo visto che la percentuale di cellule CD80+ sembra essere

aumentata nei soggetti con neoplasia renale rispetto ai soggetti sani. La maggiore attivazione del CD80 viene espressa sia in termini in intensità di fluorescenza sia come percentuale di cellule positive che superano i gate. L'attivazione dei CD80 non sembra essere stata sufficiente per impedire lo sviluppo della neoplasia renale, ma ha probabilmente un ruolo nel controllo della progressione della neoplasia, che infatti in nessuno dei nostri pazienti la neoplasia si presentava ad uno stadio avanzato; inoltre alcuni aspetti peculiari dei pazienti affetti da IRC, quali la compromissione delle difese immunitarie e la maggiore suscettibilità a infezioni croniche, potrebbero avere un ruolo nei meccanismi di immunosorveglianza.

La medesima osservazione può essere effettuata per quanto riguarda la presentazione dell'antigene da parte delle cellule epiteliali, vediamo infatti che percentuale di cellule HLA-ABC+ risulta essere tendenzialmente aumentata nei soggetti con neoplasia, anche in questo caso il dato viene confermato sia per quanto riguarda l'MFI che per quanto riguarda la percentuale di cellule positive all'escape.

Limiti dello studio

Il limite principale dello studio, nella fase prospettica, è rappresentato senza dubbio dalla scarsa numerosità del campione che non ha reso possibile creare dei gruppi confrontabili fra loro, ma abbiamo dovuto limitarci per il momento ad un'analisi di tipo descrittivo.

CONCLUSIONI

L'analisi della casistica di neoplasie a carico dei reni nativi in pazienti dializzati o sottoposti a trapianto renale ha confermato che l'incidenza di tale patologia è più frequente rispetto alla popolazione generale. La diagnosi delle neoplasie renali che viene effettuata nell'ambito di programma di follow-up nel paziente trapiantato di rene e di screening nel paziente uremico consente di individuare neoplasie in stadio precoce, migliorandone l'outcome e riducendo la necessità di terapie adiuvanti.

La frequente evenienza di dubbi diagnostici o di lesioni senza chiari caratteri di malignità alle indagini di secondo livello, associati al riscontro di neoplasie maligne all'esame istologico, inducono a procedere con la nefrectomia, ovvero ad un trattamento più aggressivo e meno attendista rispetto alla popolazione generale. Riteniamo che, in presenza di tumori renali diagnosticati occasionalmente in corso di screening pre-trapianto, in assenza di metastasi dimostrabili e/o di fattori prognostici sfavorevoli, dopo la "bonifica neoplastica" non sia necessario procrastinare i tempi del trapianto, che può quindi essere eseguito in successione ragionevolmente rapida. Il ruolo potenzialmente anti-neoplastico degli inibitori di mTOR induce, quando possibile, a preferire questi farmaci nel regime immunosoppressivo dei pazienti trapiantati con riscontro di neoplasia renale ed in coloro che vengono sottoposti a trapianto di rene con un'anamnesi positiva per carcinoma renale.

BIBLIOGRAFIA

1. Aghighi M, Mahdavi-Mazdeh M, Zamyadi M et al. Changing epidemiology of end-stage renal disease in last 10 years in Iran. *Iran J Kidney Dis.* 2009 Oct;3(4):192-6
2. 2013 ATLAS OF CKD & ESRD. <http://www.usrds.org>
3. National Chronic Kidney Disease Fact Sheet 2010. <http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/factsheets/kidney.htm>
4. Limido A, Nichelatti M, Postorino M. et al., Come cambia la popolazione uremica nel registro nazionale di dialisi e trapianto. *G Ital Nefrol* 2012; 29 (S58): S21-S26
5. Jemal, A., Siegel, R., Xu, J. and Ward, E. (2010), *Cancer Statistics, 2010*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 60: 277–300.
6. Ahmedin Jemal, Rebecca Siegel, Jiaquan Xu, Elizabeth Ward. *Cancer statistic 2010*.
7. Chaan S. Ng, Christopher G. Wood, Paul M. Silverman, Nizar M. Tannir, Pheroze Tamboli, Carl M. Sandler. *Renal Cell Carcinoma: diagnosis, staging, and surveillance*.
8. Sito web. <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/type/kidney-cancer/treatment/statistics-and-outlook-for-kidney-cancer>
9. Pantuck AJ, Zisman A, Belldegrun AS. The changing natural history of renal cell carcinoma. *J Urol* 2001; 166:1611–1623

10. American Cancer Society. How is kidney cancer staged? 2007. American Cancer Society Website. www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_4_3X_How_is_kidney_cancer_staged_22.asp?rnav=cri. Accessed October 16, 2007
11. Shanks JH. Pathology of renal cell carcinoma: recent developments. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 1999; 11:263–268
12. Bostwick DG, Eble JN. Diagnosis and classification of renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am* 1999; 26:627–635
13. Matas AJ, Simmons RL, Kjellstrand CM, Buselmeier TJ, Najarian JS. Increased incidence of malignancy during chronic renal failure. *Lancet*. 1975 Apr 19;1(7912):883-6.
14. Curtis JR. Cancer and patients with end-stage renal failure. *Br Med J* 1982; 284:69-70.
15. Neuzillet Y, Comité de Transplantation de l'Association Française d'Urologie, Comité de Cancérologie de l'Association Française d'Urologie, Tillou X, Mathieu R, Long JA ; et al., (2011). Renal cell carcinoma (RCC) in patients with end-stage renal disease exhibits many favorable clinical, pathologic, and outcome features compared with RCC in the general population. *Eur Urol*. 2011 Aug;60(2):366-73.
16. Schollmeyer P, Bozkurt F. The immune system of the uremic patient: hemodialysis vs CAPD. *Clin Nephrol* 1988; S37-40.
17. Akizawa T, Kinugasa E, Koshikawa S. Increased risk of malignancy and blood-membrane interactions in uremic patients. *Nephrol Dial Transplant* 1994; S162-4.

18. Cengiz K, Block AM, Hossfeld DK, Anthon R, Anthon S, Sandberg AA. Sister chromatid exchange and chromosome abnormalities in uremic patients. *Cancer Genet Cytogenet.* 1988 Nov;36(1):55-67.
19. Goh A, Vathsala A. (2011) Native renal cysts and dialysis duration are risk factors for renal cell carcinoma in renal transplant recipients. *Am J Transplant.*;11(1):86-92.
20. J.E.Lee, S.H.Han,B.C.Cho, J.T Park, T.H Yoo, B.S Kim, H.C Park, S.W. Kang, H.Y Lee, D.S Han, S.K Ha and K.H Choi. (2009) Cancer in Patients on Chronic Dialysis in Korea.*J Korean Med Sci 2009; 24 (Suppl 1): S95-101*
21. Ishikawa I. Renal cell carcinoma in chronic hemodialysis patients—a 1990 questionnaire study in Japan. *Kidney International Supplement*;Jun1993, Issue 41, pS-167.
22. Hajj P, Ferlicot S, Massoud W, Awad A, Hammoudi Y, Charpentier B, Durrbach A, Droupy S, Benoît G. Prevalence of renal cell carcinoma in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease and chronic renal failure. *Urology.* 2009 Sep;74(3):631-4
23. Matson MA, Cohen EP. Acquired cystic kidney disease: occurrence, prevalence, and renal cancers. *Medicine (Baltimore).* 1990; 69: 217-26.
24. Gehrig JJ Jr, Gottheiner TI, Swenson RS. Acquired cystic disease of end-stage kidney. *Am J Med* 1985; 79: 609-20.
25. Horiguchi T, Ishikawa I. Immunohistochemical study in acquired cystic disease of the kidney: expression of vimentin, epidermal growth factor,

- epidermal growth factor receptor and c-erb B2 gene product. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* 1993; 35: 797-807.
26. Herrera GA. C-erb B-2 amplification in cystic renal disease. *Kidney Int* 1991; 40: 509-13.
27. Hughson MD, Hennigar GR, McManus JFA. Atypical cysts, acquired renal cystic disease, and renal tumors in end-stage dialysis kidneys. *Lab Invest* 1980; 42: 475-80.
28. Ishikawa I, Kovacs G. High incidence of papillary renal cell tumors in patients on chronic hemodialysis. *Histopathology* 1993; 22: 135-9
29. Terasawa Y, Suzuki Y, Morita M, Kato M, Suzuki K, Sekino H. Ultrasonic diagnosis of renal cell carcinoma in emodialysis patients. *J Urol*. 1994 Sep;152(3):846-51.
30. Ishikawa I, Honda R, Yamada Y, Kakuma T. Renal cell carcinoma detected by screening shows better patient survival than that detected following symptoms in dialysis patient. *Ther Apher Dial*. 2004 Dec;8(6):468-73.
31. Gulanikar AC, Daily PP, Kilambi NK, Hamrick-Turner JE, Butkus DE. Prospective pretransplant ultrasound screening in 206 patients for acquired renal cysts and renal cell carcinoma. *Transplantation* 1998; 66: 1669-72.
32. Tosaka A, Ohya K, Yamada K, Ohashi H, Kitahara S, Sekine H, Takehara Y, Oka K. Incidence and properties of renal masses and symptomatic renal cell carcinoma detected by abdominal ultrasonography. *J Urol* 1990; 144: 1097-9

33. Goldfarb DA, Neumann HPH, Penn I, Novick AC. Result of renal transplantation in patients with renal cell carcinoma and von Hippel-Lindau disease. *Transplantation* 1997 Dec 27; 64: 1726-9.
34. Press GA, McClennan BL, Melson GL, Weyman PJ, Mauro MA, Lee JK. Papillary renal cell carcinoma: CT and sonographic evaluation. *Am J Roentgenol.* 1984; 143: 1005-9.
35. Moudouni SM, Lakmichi A, Tligui M, Rafii A, Tchala K, Haab F, Gattegno B, Thibault P, Doublet JD. Renal cell carcinoma of native kidney in renal transplant recipientis. *BJU Int.* 2006 Aug;98(2):298-302.
36. Penn I. Post-trasplantation malignancies: the role of immunosuppression. *Drug Saf.* 2000 Aug;23(2):101-13.
37. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson DT, Wang C. Cancer after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant* 2004;4:905-913
38. Doublet JD, Peraldi MN, Gattegno B, Thibault P, Sraer JD. Renal cell carcinoma of native kidneys: prospective study of 129 renal transplant patients. *JUrol.* 1997; 158: 42-4.
39. Penn I. Primary kidney tumors before and after renal transplantation. *Transplantation* 1995; 59: 480-5
40. Hoshida Y, Nakanishi H, Shin M, Satoh T, Hanai J, Aozasa K. et al. Renal neoplasias in patients receiving dialysis and renal transplantation: clinico-pathological features and p53 gene mutations. *Transplantation* 1999 Aug 15; 68: 385-90
41. Pope JC, Koch MO, Bluth RF. Renal cell carcinoma in patients with end stage renal disease: a comparison of clinical significance in patients

- receiving hemodialysis and those with renal transplants. *Urology* 1994; 44: 497-501
42. H.H Lee, K.H Choi, S.C Yang, and W.K Han. Renal cell carcinoma in kidney transplant recipients and dialysis patient. *Korean J Urol.* 2012 April; 53(4): 229–233.
43. Hitoshi Masuda, Kazunori Kihara, Yasuhisa Fujii, Fumitaka Koga, Kazutaka Saito, Mizuaki Sakura, Yohei Okada and Satoru Kawakami. Renal Cell Carcinoma in Dialysis Patients with End Stage Renal Disease: Focus on Surgery and Pathology.
44. Benett W, Vella JP. Transplantation. In Glasscock RJ (editor): *Nephrology Self Assessment Program (Neph sap)* 2005;4:1-3
45. A Lindholm, S Ohlman, D Albrechtsen *et al.* The impact of acute rejection episodes on long-term graft function and outcome in 1347 primary renal transplants treated by 3 cyclosporine regimens. *Transplantation*, 56 (1993), pp. 307–315.
46. I Penn. Occurrence of cancers in immunosuppressed organ transplant recipients PI Tearaski, JM Cecka (Eds.), *Clinical transplants.*, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles (1994), pp. 99–109.
47. Salvatori M, Bertoni E. sorveglianza immunologica ed oncogenesi: ruolo degli inibitori del segnale di proliferazione. *G Ital Nefrol* 2010; s10-s18.
48. Jacques D, Maryvonne H, Diego C. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *The Lancet* Volume 351, Issue 9103, 28 February 1998, Pages 623–628.

49. Martin P, Gallagher, Patrick J, Kelly Angela C, Webster. Long-Term Cancer Risk of Immunosuppressive Regimens after Kidney Transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*.
50. Clayton PA, McDonald SP, Chapman JR, Chadban SJ. Mycophenolate versus azathioprine for kidney transplantation: a 15-year follow-up of a randomized trial. *Transplantation*. 2012 Jul 27;94(2):152-8.
51. Campistol JM, Eris J, Oberbauer R, et al. Sirolimus therapy after early cyclosporine withdrawal reduces the risk for cancer in adult renal transplantation. *J Am Soc Neph* 2006; 17: 581-9.
52. Stallone G, Infante B, Schena A et al. Rapamycin for treatment of chronic allograft nephropathy in renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3755-62.
53. Campistol JM, Albanell J, Arns W, et al. Use of proliferation signal inhibitors in the management of post-transplant malignancies--clinical guidance. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22 (Suppl 1): i36-41.
54. Kliem V, Kolditz M, Behrend M, et al. Risk of renal cell carcinoma after kidney transplantation. *Clin Transplant* 1997; 11: 255-8.
55. Sheil AGR, Disney APS, Mathew TG, Amiss N. *De novo* malignancy emerges as a major cause of morbidity and late failure in renal transplantation. *Transplant Proc* 1993; 25: 1383-4.
56. Bokemeyer C, Thon WF, Brunkhorst T, Kuczyk MA, Pichlmayr R, Kliem V. High frequency of urothelial cancers in patients with kidney transplantations for end-stage analgesic nephropathy. *J Cancer* 1996; 32A: 175-6.

57. Levine LA, Gburek BM. Acquired cystic disease and renal adenocarcinoma following renal transplantation. *J Urol* 1994;151:129-32 .
58. Dunnill Ms, Millard PR, Oliver D. Acquired cystic disease of the kidneys: a hazard of long term intermittent maintenance haemodialysis. *J Clin Pathol* 1977;30:868-77.
59. Chandhoke PS, Torrence RJ, Clayman RV, Rothstein M. Acquired cystic disease of the kidney: a management dilemma. *J Urol* 1992;147:969-74
60. Kojima Y, Takahara S, Miyake O, Nonomura N, Morimoto A, Mori H. Renal cell carcinoma in renal transplant patients. *Urology* 2007; 69:462-4.
61. Ianhez LE , Lucon M, Nahas WC, Sabbaga E, Saldanha LB, Lucon AM, et al. Renal cell carcinoma in renal transplant patients. *Urology* 2007;69:462-4.
62. C.Y. Cheung, M.F Lam, K.C Lee et al. Renal cell carcinoma of native kidney in Chinese renal transplant recipients: a report of 12 cases and review of the literature. *Int Urol Nephrol* (2011) 43:675-680.
63. Hoshida Y, Tsukuma H, Yasunaga Y et al (1997) Cancer risk after renal transplantation in Japan. *Int J cancer* 71:517-520.
64. Sarasin FP, Wong JB, Levey AS et al. Screening for acquired cystic kidney disease: A decision analytic perspective. *Kidney Int* 1995; 48: 207–219.
65. KDIGO Clinical Practice Guideline for the Care of Kidney Transplant Recipients.

66. Schwarz A, Vatandaslar S, Merkel S, Haller H (2007). Renal cell carcinoma in transplant recipients with acquired cystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2:750-756.
67. Kasiske BL, Vazquez MA, Harmon WE et al. (2000) American society of transplantation: recommendations for the outpatient surveillance of renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 11(Suppl 15):S1-86
68. F. Bartolomeo, R. Bonofiglio, F. caruso et al., Guida pratica per la valutazione del candidato al trapianto renale.
69. Greg Knoll, Sandra Cockfield, Tom Blydt-Hansen et al., Canadian Society of Transplantation consensus guidelines on eligibility for kidney transplantation.
70. Ligato S, Ro JY, Tamboli P, Amin MB, Ayala AG. Benign tumors and tumor-like lesions of the adult kidney. Part I: Benign renal epithelial neoplasms. *Adv Anat Pathol*. 1999 Jan;6(1):1-11.
71. Comparison of standardised and nonstandardized nuclear grade of renal carcinoma to predict outcome among 2.042 patients. *Am J Clin Pathol*. 2002 Dec;118(6):877-86.
72. Licht MR. Renal adenoma and oncocytoma. *Semin Urol Oncol*. 1995 Nov;13(4):262-6.
73. Li G, Cuilleron M, Gentil-Perret A, Tostain J. Characteristics of image-detected solid renal masses: implication for optimal treatment. *Int J Urol*. 2004 Feb;11(2):63-7.
74. Ljunberg B, Hanbury DC, Kuczyk MA et al. Guidelines on renal cell carcinoma. *EAU Guidelines 2007*, pag. 6

75. Oudard S, George D, Medioni J, Motzer R. Treatment options in renal cell carcinoma: past present and future. *Ann Oncol* 2007; 18 Suppl 10:x25-31.
76. Finley DS, Pantuck AJ, Belldegrun AS. Tumor biology and prognostic factors in renal cell carcinoma. *Oncologist* 2011;16Suppl 2:4-13.
77. NCCN: Kidney cancer ,NCCN 2012 Clinical Practice Guidelines in Oncology V.1.2012, Cat 1&2A
78. EAU: Guideline on Renal Cell Carcinoma 2010, GradeA.
79. Stallone G, Schena A, Infante B et al., Sirolimus for Kaposi's sarcoma in renal-transplant recipients. *N Eng J Med* 2005; 352: 1317-1323.
80. De Fijter JW. Use of proliferation signal inhibitors in non-melanoma skin cancer following renal-transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22 Suppl 1:i23-i26.
81. Bizzari M., Cucina A. Tumor and microenvironment: a chance to reframe the paradigm of carcinogenesis? *Biomed research international*. 2014; 934-938.
82. Polimero M., Napolitano M., Costantini S., Portella L., Esposito A., Capone f., Guerriero E., Trotta A, m Zanotta S., Pucci L., Longo n., Perdona S., et al., Regulatory T cells, interleukin IL6, IL8, vascular endothelial growth factor (VEGF), CXCL10, CXCL11. Epidermal growth factor (EGF) and hepatocyte growth factor (HGF) as surrogate markers of host immunity in patients with renal cell carcinoma *BJU Int* 2013; 112:686-696