

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

**„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL II HISTOLOGIE**

CĂLĂRAȘ ADELA MARIA



TEZĂ DE DOCTORAT

**IDENTIFICAREA MARKERILOR PREDICTIVI PENTRU
REZISTENȚA LA TERAPIA ANTIANGIOGENICĂ ȘI
ANTIVASCULARĂ ÎN CANCERUL RENAL**

Conducător de doctorat

PROF. UNIV. DR. ANCA MARIA CÎMPEAN

Conducător de doctorat cotutelă

CONF. UNIV. DR. EUGEN MELNIC

Timișoara

2023

INTRODUCERE

Cancerul renal sau mai precis, carcinomul cu celule renale (RCC) are câteva particularități. Clinic evoluează perioade îndelungate indolente, fără simptomatologie zgomotoasă și în multe cazuri bolnavii se prezintă la medic în stadii avansate de evoluție. Pe de altă parte, examinarea microscopică a acestor tumori relevă în majoritatea cazurilor celule tumorale relativ bine diferențiate, uniforme, cu rare cazuri la care se observă mitoze atipice și anaplazii celular-nucleare. Cu toate acestea, rata de creștere a RCC este relativ mare, progresia locală fiind urmată relativ repede de extensia la distanță, pe cale venoasă și limfatică. Căutarea unor noi metode diagnostice, a unor potențiale ținte terapeutice este o necesitate în perioada actuală din mai multe motive, pe de o parte datorită supraviețuirii reduse din cazurile aflate în stadiu avansat, răspunsului insuficient la terapia adjuvantă, și în plus, creșterea numărului de cazuri din ultimele decade.

Una dintre caracteristicile generale ale tumorilor renale este reprezentată de vascularizația foarte bogată, atât în aria tumorală, cât și peritumorală. Mult timp s-a considerat că vasele din jurul tumorii sunt vase sanguine preexistente, dilatate, iar cele din interiorul tumorii erau de fapt incluse în proliferare. Astăzi știm că celulele tumorale sunt capabile să secrete factori angiogenici și să formeze propriile vase care se conectează la circulația sistemică. Acest proces de formare de noi vase din cele preexistente poartă numele de angiogeneză, și este prezent practic la toate tumorile solide umane și animale, ca o necesitate a progresiei locale a tumorii.

Un alt aspect important este acela că celulele tumorale sunt capabile să secrete factori de creștere angiogenici, care stimulează formarea de noi vase sanguine. Interesant, aceste vase sunt diferite structural și molecular de cele normale. Și nu în ultimul rând, procesul de angiogeneză poate fi inhibat prin blocarea factorilor de creștere și a receptorilor specifici, și prin normalizarea rețelei de vase sanguine asociate tumorii.

Terapia antiangiogenică a început în urmă cu peste 25 de ani, dar rezultatele obținute pe modele experimentale nu au fost confirmate de experiența clinică. Primul anticorp monoclonal umanizat creat împotriva unui factor de creștere a fost bevacizumab-ul (Avastin), dar care nu s-a demonstrat a fi eficient în RCC, deși acestea sunt intens vascularizate și secretă cantități importante de VEGF.

Având în vedere necunoscutele legate de medicația antiangiogenică la cazurile cu RCC, în lucrarea de față am studiat prin metodele biologiei moleculare la nivel proteic, elementele cu potențială implicare în rezistența la terapie, dar și ținte potențiale și elemente cu rol în predicția răspunsului terapeutic. Considerăm că această abordare este de avangardă în cunoașterea profilului molecular al RCC și își poate aduce contribuția la modificarea strategiei terapeutice.

Există în prezent numeroase dovezi, care certifică pe de o parte rolul angiogenezei în progresia RCC, și pe de altă parte, faptul că inhibiția formării de noi vase poate limita expansiunea tumorii. Spre deosebire de alte localizări ale bolii neoplazice, în RCC angiogeneza, deși intens studiată, este mai puțin înțeleasă ca evoluție moleculară, și ca formare a unor tipuri particulare de vase.

Din aceste motive, obiectivele pe care ni le-am propus în cercetarea prezentă sunt următoarele:

1. Definire procesului de angiogeneză și de vasculogeneză în aria tumorală și peritumorală a RCC.
2. Identificarea tipurilor particulare de vase sanguine din aria tumorală.
3. Clarificarea valorii prognostice a densității microvasculare și identificarea vaselor care pot reprezenta o țintă pentru medicația antivasculară.
4. Corelația dintre tipurile de vase nou formate și expresia factorilor de creștere cu potențial angiogenic, luând în considerare în special VEGF, PDGF, FGF.
5. Identificarea principalelor elemente moleculare cu expresie la nivel proteic care pot fi implicate în rezistența la terapia antiangiogenică.
6. Expresia factorilor predictivi pentru răspunsul favorabil la medicația adjuvantă.

1. CARACTERIZAREA MORFOLOGICĂ A TUMORILOR RENALE STUDIATE

În vederea evaluării morfologice a cazurilor, și a stabilirii diagnosticului histopatologic, am utilizat tehnica colorației clasice hematoxină-eozină.

Pe materialul pe care l-am studiat și care aparține la 90 cazuri de tumori maligne renale, am identificat leziunea tumorală la 90 cazuri, parenchim renal normal la 11 cazuri și parenchim renal modificat, limitrof tumori, la 79 cazuri.

Carcinoamele renale cu celule clare identificate (n=71), au reprezentat majoritatea cazurilor, și au fost caracterizate prin prezența unor celule rotunde sau poligonale, cu citoplasmă abundentă și clară datorită conținutului crescut în glicogen, cu nucleii în diferite grade evolutive, de la nucleii mici fără nucleoli, la nucleii mari, globulari cu nucleoli multipli. Unele cazuri au prezentat zone de necroză extinsă, cu subfuziuni hemoragice, celule cu citoplasma granulară și conținut hemosiderinic cu, sau fără, invazia capsulei renale, și infiltrat inflamator în proporții diferite, aflat la granița dintre țesutul tumoral și țesutul renal normal. Un aspect particular au prezentat cazurile de ccRCC cu aspect microchistic, ce s-au caracterizat prin multiple microchiste, subfuziuni hemoragice, celule tumorale dispuse în insule și cuiburi. În rare cazuri am identificat forme, care au prezentat metaplazie de tip pseudocartilaginos, și numeroase vase cu calcificări intraluminale.

Am identificat însă și cazuri de ccRCC, care au prezentat celule cu citoplasma eozinofilică, uneori granulată, cu un conținut crescut în mitocondri.

Formele de RCC papilar (n=11) au fost caracterizate prin celule tumorale, dispuse de-a lungul unor axuri conjunctive bine vascularizate, aceste celule având pe de-o parte o citoplasmă bazofilă mai clară, cu nucleii cu grad scăzut, întâlnite în RCC papilar tip 1 (n=4), iar pe de altă parte, având o citoplasmă eozinofilă, granulară, nucleii cu grad înalt caracteristice în RCC papilar tipul 2 (n=7).

La carcinomul sarcomatoid (n=5) am observat o structură complet modificată, reprezentată de celule cu aspect rabdoid, sarcomatoid, celule pleomorfe cu citoplasma acidofilă și striatii longitudinale, dar și celule cu aspect stelat și prelungiri citoplasmatiche groase, cu miofibroblaste abundente, toate elementele celulare prezentând interconexiuni frecvente.

Într-unul din cazurile studiate am identificat forma de carcinom renal cu ducte colectoare, care a fost caracterizat prin prezența unor structuri tubulare sau tubulo-papilare, tapetate de celule tumorale.

Gradul de diferențiere, apreciat după protocolul menționat la partea generală, a fost reprezentat predominant de un grad de diferențiere G2, caracterizat prin nucleii eozinofilici vizibili la microscopie x400, 19 cazuri au avut un grad de diferențiere G3 cu nucleoli acidofili, măriți în volum, proeminenți, vizibili la microscopie x100, în 5 cazuri s-a evidențiat un grad de diferențiere G1, cu nucleii cu bazofilie, fără nucleoli evidente, gradul de diferențiere G4 în care celulele au fost multinucleate, gigante cu diferențiere sarcomatoidă de tip rabdoid, a fost întâlnit în 7 cazuri.

1.1 IDENTIFICAREA MICROVASELOR ASOCIATE TUMORII ȘI VALOAREA PROGNOSTICĂ A DENSITĂȚII MICROVASCULARE (MVD)

În urma imunoreacției pentru CD34, în rinichiul neinvadat tumoral, s-a observat prezența unui număr foarte mare de vase, dispuse ordonat, cu dimensiuni similare, peste 90% prezintă lumen permeabil în medulară, localizate printre tubi, dispoziție care se păstrează atât pe secțiuni transversale, cât și longitudinale, iar în anumite porțiuni ale medularei se observă ramificațiile vasa recta.

În ceea ce privește rezultatele obținute pe țesutul tumoral și peritumoral, am constatat prezența de vase peritumorale care au un lumen larg, inegale ca dimensiuni și prezintă fenomene de intususcepție. În zona peritumorală apar deja vase sanguine fără lumen, de dimensiuni distincte și formă neregulată, dar minoritară. Vasele din aria tumorală formează o rețea cu mare densitate care mimează numeric densitatea din rinichiul normal. Vasele formează o rețea cu ramificații extinse și prelungiri, în majoritatea cazurilor reprezentând un contiguu.

În cazul carcinomului renal cu celule clare, pe același câmp microscopic, coexistă diferite tipuri de rețele vasculare. În cazuri rare, am identificat vase, care au prezentat celule tumorale migrate intraluminal.

Distingem la unele cazuri o formă de rețea pe care o denumim segmentată, în care, deși sunt multe vase sanguine pe secțiunea histologică, majoritatea nu sunt conectate unele cu altele, și cele mai multe nu prezintă lumen bine definit. Pe cazuistica noastră acest aspect, corespunde relativ constant, cu forma de carcinom renal papilar.

La forma sarcomatoidă vasele au o rată de proliferare mai lentă decât celulele tumorale, motiv pentru care nu se formează rețeaua extensivă pe care am observat-o la carcinomul renal cu celule clare cu diferențiere bună. Majoritatea vaselor sunt mici, neregulate, și unele dintre ele conțin în lumen emboli cu celule tumorale. Acest aspect de invazie vasculară tumorală este doar rareori observat la carcinoamele renale cu celule clare bine diferențiate. Ocazional am observat arii întinse de secțiune, care au prezentat doar elemente CD34 pozitive, intratumorale, fără lumen care, cu cea mai mare probabilitate semnaleză procese de înmugurire endotelială rapidă. Ca formă particulară menționăm dispoziția și concentrarea focală de vase, între plaje extinse de celule tumorale, uneori în aceste vase am observat celule tumorale raportate ca invazie vasculară. De asemenea am constatat că, densitatea rețelei vasculare se reduce odată cu creșterea gradului de diferențiere.

Densitatea microvasculară este parametrul cel mai frecvent evaluat pentru studiul angiogenezei intratumorale. După mai mulți ani de entuziasm asupra acestei metode, în ultimii ani au fost publicate câteva articole care pun la îndoială acuratețea prognostică a MVD în tumorile renale. Pentru a elucida acest aspect am studiat și calculat MVD la cazurile incluse în studiul nostru și am corelat rezultatele cu parametri clinico-patologici de prognostic convențional. Am identificat diferență semnificativă între carcinomul cu celule clare, cu cele

mai mari valori, și celelalte tipuri de tumori renale, fără ca acesta să fie un indicator diagnostic. Am evaluat corelațiile dintre MVD și ceilalți parametri clinico-patologici de prognostic și am obținut următoarele date: cu stadiul, $p=0.023$, cu supraviețuirea la 3 ani, p mai mic de 0.21; cu gradul de diferențiere $p=0.07$; cu forma histopatologică p mai mic de 0.002, dar numai pentru forma sarcomatoidă. MVD nu s-a corelat cu metastazele limfonodale ($p=0.4$), dar s-a corelat puternic cu metastazele pulmonare (p mai mic de 0.0001). Am remarcat și faptul că toate cazurile cu metastaze pulmonare au prezentat valori foarte mari ale MVD în tumora primară, de obicei peste 1000 pe mm^2 . Această observație ne-a condus la studiul invaziei limfovaskulare. Dintre cazurile incluse în studiu am identificat invazie limfovaskulară cu metoda de colorație pentru CD34 la 19 cazuri.

Concluzii

Metoda de colorație pentru CD34 este utilă pentru studiul morfologiei vaselor intra- și peritumorale din carcinoamele rinichiului. Este principala metodă utilizată pentru calcularea MVD, dar rezultatele noastre infirmă valoarea sa prognostică, cu excepția predicției metastazelor pulmonare. Pe de altă parte este utilă pentru ameliorarea rezultatelor referitoare la invazia vasculară cu emboli tumorali, element cu mare importanță prognostică.

1.2 TIPURILE DE VASE ASOCIATE TUMORII RENALE, SEMNIFICAȚIE PROGNOSTICĂ ȘI IMPACT TERAPEUTIC

Pentru identificarea tipurilor de vase din aria tumorală am aplicat dubla imunocolorare cu CD34, ca marker endotelial, și actină de tip mușchi neted, ca marker de celule endoteliale. În parenchimul renal din vecinătatea tumorii majoritatea vaselor sanguine sunt de tip matur, atât la nivelul corticalei cât și medularei. Semnalul pentru CD34 este mai intens la nivelul corpusculilor renali, deoarece citoplasma celulelor mezangiale este foarte fină. Vasele mature au forme diferite, dimensiunile cele mai mari fiind observate la nivelul medularei interne și a hilului.

Vasele din medulară sunt aproape toate de tip matur, semnalul cel mai intens pentru actină fiind prezent la vasa recta și cel mai slab la capilarele izolate tubulare.

La interfața dintre parenchimul renal și tumoră la majoritatea cazurilor de RCC cu celule clare, am observat o acumulare masivă de miofibroblaste care se aseamănă structural cu cele capsulare, doar că aici formează un sincițiu dens și gros. Din fasciculele groase de miofibroblaste sunt desprinse grupuri mici de celule poligonale actin pozitive, situate la interfața dintre celule tumorale și stromă.

La toate cazurile au fost identificate mai multe tipuri de vase, celule endoteliale sub formă de muguri fără lumen, care exprimă doar CD34 omologate ca vase imature sau/și celule lider, vase cu lumen de dimensiuni variabile colorate pentru CD34, dar fără celule perivaskulare, acestea au fost asociate cu vasele de tip intermediar. Vasele mature au prezentat dublu semnal endotelial și perivaskular, având dintotdeauna lumen permeabil.

Vasele imature și mature au avut întotdeauna același aspect, spre deosebire de vasele intermediare care prezintă numeroase elemente de tranziție. Aspectele în care vasele intermediare prezintă pe un perete celule perivaskulare și pe celălalt nu, sunt frecvente. Din acest punct de vedere, am subclasificat vasele intermediare observate în trei subtipuri: subtipul 1, fără nici un semnal pentru celulele perivaskulare, subtipul 2, semnale discontinue pe unul dintre pereți, și subtipul 3 cu semnal continuu pentru celulele perivaskulare pe cel puțin 50% din contur. Nu am întâlnit în literatură o astfel de subclasificare, dar considerăm că este utilă pentru aprecierea eficienței terapiei antivaskulare.

Pe arii întinse predomină vasele intermediare și de tranziție, pe care le-am descris la majoritatea cazurilor de RCC cu celule clare, forma solidă. Vasele mature sunt prezente aproape exclusiv în septurile conjunctive groase în stroma tumorală și în spațiul peritumoral, ele apar, doar excepțional, în aria tumorală propriu-zisă. La aceleași cazuri, în multe situații, se observă momentul adărierii celulelor perivasculare la peretele extern al vasului. În această situație celulele perivasculare, actin pozitive, sunt poligonale și ovoidale și sunt grupate la unul dintre polii vasului.

Aceste aspecte pe care le-am descris până în prezent la RCC cu celule clare (majoritatea cazurilor din studiu), arată că rețeaua cu maximă densitate este formată predominant din vase intermediare. Atunci când rețeaua este mai spațiată, laxă, peste 90% dintre vase sunt intermediare pure (subtip1), deci lipsite complet de celule perivasculare. În acest sens, am identificat celule perivasculare aparent migratorii, sau care nu au realizat apoziția.

În RCC cu celule clare varianta cu microchiste și rețea laxă, majoritatea vaselor sunt mature, deși au dimensiuni mici aproape toate celulele perivasculare sunt dispuse în strat.

Toate aceste aspecte conduc la ideea că vasele din aria tumorală suferă un proces rapid de maturare morfologică, ceea ce explică numărul redus de celule tumorale aferente fiecărei ramificații, acest proces fiind mai evident la periferia tumorii, la frontul de proliferare. Cu cât densitatea rețelei vasculare din aria tumorală este mai mare, cu atât mai numeroase sunt vasele de tip matur chiar dacă din punct de vedere dimensional nu corespund definiției inițiale.

La carcinomul cromofob rețeaua este laxă, formată din vase sanguine rare și majoritatea sunt de tip matur, chiar dacă multe dintre ele au lumen foarte îngust sau neidentificabil.

La carcinomul papilar vasele din aria tumorală sunt rare, alungite cu puține ramificații jumătate cel puțin de tip matur cu lumen îngust și nu formează rețele.

În carcinomul sarcomatoid peste 90% din vasele identificate sunt de tip matur și cu cea mai mare probabilitate reprezintă vase preexistente ale stromei invadate de tumoră. Așa cum am arătat mai sus, tumorile renale sunt caracterizate de marcată heterogenitate din punct de vedere al rețelei vasculare, aspect mult mai evident în aria tumorală. Evaluarea numerică întâmpină numeroase probleme tehnice pe secțiunile colorate prin dublă imunoreacție, iar în prezent, din datele care ne stau la dispoziție, nu există un soft specializat care să diferențieze tipurile de vase intratumorale între ele. Din acest motiv propunem spre aplicare un test calitativ observațional, bazat pe examinarea a 10 câmpuri consecutive alese la mărirea de x200 și aprecierea procentuală a vaselor cu un singur semnal *CD34 pentru (endoteliu) și cu dublu semnal (CD34 pentru endoteliu/actină de tip mușchi neted pentru celulele perivasculare). Din datele prezentate se confirmă densitatea vasculară cea mai mare în grupul carcinoamelor cu celule clare, dar și în acest grup am observat marcată heterogenitate vasculară. Unele cazuri au prezentat valoare maximă a scorului, altele au prezentat un număr semnificativ de vase mature. Aceasta conduce la ipoteza existenței unei substanțe care induce maturarea rapidă a vaselor nou-formate, chiar dacă sunt de dimensiuni foarte mici. Având în vedere numărul relativ mic de carcinoame cromofobe și papilare credem că sunt necesare serii mai mari pentru a confirma aceste rezultate. Nu am observat vreo corelație statistică semnificativă între scorul calculat și celelalte elemente de prognostic clinico-patologice. Aceasta conduce la utilizarea acestui scor ca element individual de prognostic.

Concluzii

Descriem trei subtipuri particulare de vase sanguine intermediare în aria tumorală cu implicații potențiale în eficiența terapiei antivasculară.

Distribuția rețelei vaselor intermediare mature și imature este dependentă de forma histopatologică dar cu variații relativ mari în special în RCC cu celule clare.

Indiferent de tipul tumoral dezvoltarea vaselor se produce la fel.

Propunem pentru prima dată un scor de cuantificarea a tipurilor de vase din aria tumorală, ca element predictiv pentru răspunsul potențial la terapia antivasculară. Rata dintre vasele imature, intermediare și mature poate fi un indicator al răspunsului la terapie în special în RCC cu celule clare. Rezultatele noastre susțin că terapia antivasculară nu este eficientă la cazurile cu carcinom sarcomatoid. Postulăm existența unei substanțe necunoscute care induce maturarea rapidă a vaselor din aria tumorală, dar nu acționează în mediul peritumoral.

1.3 Expresia VEGF a și VEGF₁₆₅

Angiogeneza este un proces continuu, multistadial, aflat sub directă influență a mai multor factori de creștere. În capitolele precedente am prezentat particularitățile vaselor sanguine asociate tumorilor renale, insistând asupra caracterului lor activat și proliferativ. Pentru ca acest proces să ducă la formarea permanentă de noi vase sanguine este necesară intervenția unor factori de creștere cu acțiune specifică asupra celulelor endoteliale atât normale, cât și asociate tumorii, dintre care cel mai bine caracterizat în prezent este factorul de creștere al endoteliului vascular (VEGF).

VEGF a fost raportat de mai multe studii cu referire specială la tumorile renale. De altfel, parenchimul renal este un binecunoscut control pozitiv pentru reacția la VEGF-A (228). Pe baza observațiilor clinico-patologice, FDA a aprobat în ultimii ani utilizarea mai multor molecule pentru tratamentul RCC, așa cum sunt sorafenib, sunitinib, pazopanib și altele. Multe sunt de fapt inhibitori ai VEGFR2.

VEGF_{165b} este izoforma anti-angiogenică majoră, prima descoperită din grupul VEGF_{xxx}b și până în prezent cea mai studiată. mARN al VEGF_{165b} a fost izolat original din cortexul renal uman, iar proporția formelor inhibitorii este predominantă prin comparație cu formele pro-angiogenice.

În tumorile renale incluse în studiu (n=90) reacția pentru VEGF-A a fost pozitivă în celulele tumorale, fără alte elemente din micromediul tumoral, inclusiv vasele sanguine.

La RCC convențional cu celule clare majoritatea cazurilor pozitive au prezentat intensitate moderată în celulele tumorale. În forma cu microchiste majoritatea celulelor pozitive delimitează pseudolumenele și justifică una dintre funcțiile principale ale acestui factor de creștere, respectiv hiperpermeabilizarea endoteliului. În RCC cu celule clare am putut observa la același caz aspecte care se încadrează la +1, +2 sau +3 și alternează cu zone negative. Componenta care a ocupat peste 10% din aria examinată a fost luată în considerare pentru raportare.

La cazurile de carcinom papilar produsul final de reacție a fost dispus constant omogen în citoplasmă, fin granular. În carcinomul sarcomatoid reacția pozitivă a fost de cele mai multe ori heterogenă, iar celulele tumorale colorate cu intensitate maximă au fost distribuite aleatoriu în aria tumorală, cu multe celule tumorale izolate sau dispuse în grupuri mici intens pozitive. Doar două cazuri cu diferențiere G4 au prezentat aproape toate celulele tumorale intens pozitive.

Din totalul de 90 de cazuri incluse în studiu, 62 (68.88%) au fost pozitive pentru VEGF. Majoritatea au fost încadrate la scor +1 și +2. Nu am obținut nicio corelație statistic semnificativă cu factorii clinico-patologici de prognostic și nici cu densitatea microvasculară.

VEGF165b a fost efectuat imunohistochimic după tehnica similară cu cea pentru VEGF-A. A fost aplicat același scor de evaluare ca și pentru VEGF-A. În stroma tumorală am observat constant prezența unor celule de dimensiuni medii, izolate sau în aglomerări, la unele dintre ele fiind vizibil caracterul granular al produsului final de reacție. Aceste celule au fost observate predominant la cazurile la care reacția a fost negativă în celulele tumorale și în zonele în care este prezent infiltratul inflamator limfoplasmocitar. Aceste celule sunt prezente și în plină arie tumorală printre celulele maligne. În literatura de specialitate nu am găsit date referitoare la expresia VEGF165b în celule stromale și nici în elementele micromediului tumoral al carcinomului cu celule renale.

Dintre cele 90 de tumori incluse în studiu 17 au fost pozitive (18.88%) pentru VEGF165b. La toate tumorile pozitive, în celulele tumorale, intensitatea reacției a fost scorificată cu +1, semnificativ mai slab decât pentru VEGF-A. Acest aspect semnalează dis-balanța dintre factorii angiogenici și inhibitori ai angiogenezei în timpul proliferării tumorale, care conduce la proliferarea de vase sanguine. Toate cazurile de carcinom cu celule clare au fost caracterizate prin aspect heterogen, spre deosebire de tumorile papilare, la care celulele au fost colorate slab și omogen. Am obținut corelație statistic semnificativă cu densitatea microvasculară din carcinomul papilar ($p < 0.0023$) și corelație inversă cu MVD din carcinomul cu celule clare ($p < 0.0017$).

Concluzii

Expresia imunohistochimică a VEGF-A a fost identificată la 62 (68.88%) dintre cele 90 de cazuri incluse în studiu. Nu am găsit corelație statistic semnificativă între expresia VEGF-A, factorii clinico-patologici de prognostic și densitatea microvasculară. Semnalăm reducerea marcată a expresiei de VEGF165b în toate formele histopatologice de RCC și corelația inversă cu densitatea microvasculară. Descriem pentru prima oară existența unor celule din micromediul tumoral intens pozitive pentru VEGF165b.

1.4 Heterogenitatea moleculară a căii PDGF definește trei subgrupuri distincte de carcinoame cu celule renale

În interiorul heterogenității micromediului carcinomului renal două componente principale par a fi responsabile pentru dezvoltarea rapidă a rezistenței la terapie: vasele de sânge tumorale și profilul imunogen. Compartimentele vasculare și imunogene ale ccRC sunt cele mai "vizate" compartimente din ccRCC, terapiile antiangiogenice și inhibitorii punctelor de control imun fiind, în acest moment standardul de aur pentru tratamentul cancerului renal.

Din cauza discrepanțelor dintre numărul mare și morfologia neobișnuită a vaselor de sânge din ccRCC (în ciuda unei rate scăzute de proliferare a celulelor endoteliale) și stadiul foarte matur al acestor vase de sânge tumorale, am considerat că studiul axei PDGF-B/PDGFR β este obligatoriu în ccRCC corelat cu izoforma inhibitoare a factorului de creștere endotelială vasculară (VEGF), VEGF 165b.

Evaluarea microscopică inițială a fiecărei probe ccRCC a inclus stabilirea gradului tumorii. Opt cazuri au fost marcate ca având tumori de gradul 2, și 4 cazuri cu tumori de

gradul 3. Am detectat un proces angiogenic ridicat în interiorul masei tumorale, cu o densitate mare a vaselor de sânge tumorale identificate în toate etapele procesului angiogenic (muguri, corzi, structuri asemănătoare tubilor, vase perfuzate).

Toate cazurile au prezentat vase de sânge tumorale stabile evidențiate prin imunocolorare CD34/SMAct în întreaga zonă sau doar în zonele izolate în masa tumorală. Cele mai multe vase de sânge tumorale au arătat o rețea de celule perivasculare supradimensionate evidențiate prin colorare SMA pozitiv. De asemenea, dispunerea celulelor perivasculare SMA-pozitive nu a fost normală (strâns atașată la circumferința exterioară a peretelui vasului), fiind parțial detașată sau fiind distribuită ca structuri asemănătoare punților între buclele vaselor de sânge tumorale mici.

Pe baza acestor observații microscopice preliminare, împreună cu o expresie imunohistochimică ridicată a PDGF-BB raportată anterior de echipa noastră și dat fiind faptul că achiziția celulelor perivasculare este determinată de calea PDGF-B/PDGFR, am efectuat TaqMan Array pentru a evidenția particularitățile profilului de expresie a genelor căii PDGF în vederea identificării unor legături între supraexpresia genică și prezența timpurie, neobișnuită, morfologia și distribuția celulelor perivasculare pozitive SMAct.

Evaluarea imunohistochimică a PDGF-B/PDGFR β a arătat că toate cele 12 cazuri de ccRCC au fost pozitive pentru PDGF-BB prin imunohistochimie și ARN, dintre care 91,6% au fost confirmate de RT-PCR. Profilul de expresie genetic al căii PDGF a fost evaluat în corelare cu rezultatele noastre anterioare privind expresia imunohistochimică și ARN a VEGF și, de asemenea, cu clasificarea noastră anterioară care stratifică tipurile de vase de sânge tumorale din ccRCC în 4 categorii: reticulare, difuze, fasciculare și trabeculare.

Pe baza analizei rezultatelor TaqMan Array, un profil de expresie genică a căii PDGF (HeatMap) a fost creat automat de software-ul de analiză Data Assist. Analiza HeatMap a evidențiat gene implicate în mai multe căi ale supraexpresiei PDGF. Genele cu cea mai mare supraexpresie au fost: PIK3C3 (VsP34), SLC9A3, STAT1, JAK2, SHC2, SRF și CHUK.

Pe baza analizei genetice a căii PDGF în ccRCC, corelată cu expresia VEGF și tipurile de vase de sânge tumorale, am definit trei subgrupuri de carcinoame renale care pot avea trei opțiuni terapeutice diferite. Primul este subgrupul VEGF-high care prezintă supraexpresie PIK3C3 (VPS34) și SLC9A3. Acest grup include atât modele vasculare reticulare, cât și difuze și ar putea fi eligibil pentru o opțiune terapeutică combinată a agenților anti-VEGF și a inhibitorilor PIK3C3. Al doilea grup poate fi definit ca VEGF-low care prezintă o supraexprimare similară a PIK3C3 (VPS34) și SLC9A3. Pentru acest grup, terapia anti-PDGF-PDGFR poate fi potrivită. Al treilea subgrup pe care l-am numit subgrup JAK/STAT se caracterizează prin supraexpresia a 5 gene, potrivite pentru terapia anti JAK/STAT asociată cu inhibitorii PIK3C3 și IKK.

Concluzii

Am demonstrat aici heterogenitatea profilului de expresie a PDGF în ccRCC, legată de patenurile vasculare, invazia tumorală și gradul tumorii. Prin corelarea profilului genic de expresie a căii PDGF și modelele vasculare în ccRCC, am definit 3 subgrupuri distincte ccRCC care pot avea un impact potențial asupra alegerii celei mai bune strategii terapeutice pentru fiecare pacient. Vor fi necesare studii suplimentare pentru a elucida originea celulelor perivasculare din jurul vaselor tumorale și, de asemenea, pentru a evalua mecanismele

moleculare responsabile pentru maturarea timpurie și rapidă a vaselor de sânge tumorale în ccRCC.

1.5 Proteina canalului transmembranar de clor (CLIC1) expresia în vasele de sânge tumorale a carcinoamelor cu celule renale clare (cc CRC)

Descoperirea și validarea noilor markeri endoteliali este imperativă pentru dezvoltarea de noi terapii țintite în carcinoamele cu celule renale.

Între viitorii markeri candidați, canalul intracelular clorură 1 (CLIC1) pare a fi o țintă terapeutică promițătoare atât pentru celulele tumorale, cât și pentru celulele endoteliale din patologii maligne.

Pe baza datelor raportate recent în literatura de specialitate, cu privire la transferul vezicular al microveziculelor de la celulele maligne glioblastomale la celulele endoteliale microvasculare, am considerat interesant să evaluăm expresia CLIC1 în endoteliul tumoral al vaselor de neoformație în cazul ccRCC și, de asemenea, să discutăm impactul acestuia asupra progresiei tumorale.

Expresia CLIC1 a fost cuantificată în celulele tumorale (ccRCC-TC), dar și în endoteliul vaselor de sânge tumorale, ca densitate microvasculară CLIC1 (ccRCC-TBvsE). Un procent de 87,5% din cazurile ccRCC au avut zone cu celule tumorale pozitive CLIC1 cu distribuție omogenă sau heterogenă în zona tumorală. Prezența CLIC1 la nivel endotelial a fost înregistrată în aproximativ 65% din totalul cazurilor și 59% din cazuri au avut co-localizare CLIC1 atât în celulele tumorale, cât și în endoteliul vaselor de sânge tumorale.

Expresia CLIC1 în celulele tumorale a împărțit cazurile de ccRCC 4 clase. Douăsprezece la sută din totalul cazurilor au fost incluse în Clasa 0. Pentru această clasă, nu s-a găsit nicio corelație semnificativă între microdensitatea CLIC1-MVD și parametrii pTNM (*valoarea p* = 0,543 pentru T, *valoarea p* = 0,862 pentru N și *valoarea p* = 0,862).

Clasa 1 a inclus cel mai mic număr de cazuri, dar toate au avut vase de sânge tumorale pozitive la CLIC1, cu o densitate cuprinsă între 10 și 17 vase/câmp microscopic X 20. Pe baza analizei statistice se pare că pentru clasa 1, prezența CLIC1 nu a influențat stadializarea TNM (*valoarea p* = 0,614 pentru valoarea T și *valoarea p* = 0,386 pentru N).

Pentru cazurile incluse în Clasa 2, expresia CLIC1 în vasele de sânge tumorale a fost semnificativ invers corelată cu parametrul N din sistemul de stadializare TNM (*valoarea p* = 0,004).

Microdensitatea CLIC1-MVD crescută pentru cazurile din Clasa 3 a avut impact asupra parametrilor T și M (*valoarea p* = 0,007 pentru valoarea T și *p* = 0,006 pentru M). De asemenea, s-au observat corelații semnificative între parametrii de stadializare a TNM. Parametrul T a fost corelat semnificativ cu parametrul N (*valoarea p* = 0,033), dar o corelație puternică a fost observată între parametrii T și M (*valoarea p* < 0,001).

CLIC1 este cunoscut pentru capacitatea mare de translocare între cele trei compartimente celulare principale (nucleu, citoplasmă și membrană). Am evaluat această variabilitate în relație cu microdensitatea CLIC1-MVD și parametrii TNM.

Douăzeci și patru la sută dintre cazuri au exprimat CLIC1 în toate cele trei compartimente celulare ale celulelor tumorale (nuclear-N, citoplasma-C și membrana-M). Am definit acest lucru ca subgrup NMC. În cadrul acestui grup, mai mult de jumătate dintre cazuri au fost catalogate ca pT2b, 3a, 3b și 4. Pentru cazul catalogat pT4 din grupul NMC, a fost observată o invazie limfo-vasculară extinsă. Emboliile limfatice și vasculare au fost pozitive la NMC-CLIC1, similar cu celulele din zona tumorală.

Această constatare sugerează că translocția CLIC1 este indusă nu numai în celulele tumorale, ci și în endoteliul vaselor de sânge tumorale.

Departe de tumora în zona subcapsulară, au fost observați emboli tumorali pozitivi la CLIC1-NMC, în interiorul vaselor de sânge cu endoteliul pozitiv la CLIC1.

Analiza statistică aplicată subgrupului CLIC1-NMC a relevat o corelație semnificativă între parametrul CLIC1-MVD și M (*valoarea $p < 0,001$*). De asemenea, s-a observat o corelație semnificativă între parametrul T și N (*valoarea $p = 0,021$*) și M (*valoarea $p = 0,032$*).

Nu am identificat corelații semnificative între CLIC-MVD și parametrii TNM în oricare dintre celelalte patternuri (NC, NM, C, N, M).

Am analizat expresia CLIC1 (scăzută sau crescută) în cazurile de ccRCC cu posibil impact asupra supraviețuirii pacienților în funcție de stadializarea TNM. Am identificat un număr total de 528 cazuri cu ccRCC din baza de date TCGA. Analiza supraviețuitii a fost bazată pe gradul scăzut sau crescut al expresiei CLIC1 mRNA în relație cu stadiul tumoral.

Analiza globală a tuturor 528 de cazuri din baza de date TCGA, a arătat că 35,7% dintre aceștia au avut o expresie CLIC1 mRNA crescută. Au fost identificate diferențe semnificative, în supraviețuire, între cazurile cu expresie CLIC1 crescută sau scăzută dependent de stadiul tumoral și sex.

Concluzii

CLIC1 prezintă o expresie heterogenă în celulele tumorale și endoteliul vaselor tumorale din cadrul ccRCC și influențează stadiul tumoral, progresia bolii și potențialul metastatic ganglionar și la distanță. Pe baza datelor experimentale anterioare și a datelor studiului de față, CLIC1 eliberat de celulele tumorale și de embolii tumorali intravasculari prezintă un puternic efect angiogen, efect susținut de prezența intratumorală și peritumorală a vaselor mici și bine definite, tapetate cu endoteliu pozitiv pentru CLIC1 și cu o morfologie înalt sugestivă pentru un proces intens angiogenic. Expresia CLIC1, atât în celulele tumorale cât și în cele endoteliale, face ca acesta să fie o posibilă țintă dublă pentru terapiile pe bază de anticorpi, terapii dovedite eficiente pe modele experimentale de ccRCC.

Concluzii generale

1. Heterogenitatea ccRCC este departe de a fi elucidată în prezent, atât din punct de vedere morfologic și molecular cât și din punct de vedere al comportamentului clinic, al răspunsului la terapie dar și dezvoltarea rezistenței la tratamentele personalizate fiind o reală provocare pentru comunitatea științifică mondială.
2. Rezultatele din prezenta lucrare se bazează pe observațiile microscopice fundamentale morfologice și imunohistochimice, care au descris o heterogenitate vasculară și de expresie a factorilor angiogenici în ccRCC.

3. Evaluarea convențională trebuie să fie însoțită de analiza genică a căilor angiogenice VEGF și PDGF, deja descrise în literatură și recunoscute ca făcând parte din procesul angiogenic al ccRCC, pentru că aceasta poate defini subclase distincte și poate identifica pacienții care vor dezvolta rezistența ulterioară la terapia personalizată deja utilizată în practica clinică.
4. Analiza genică a căilor VEGF și PDGF.
5. Microdensitatea vasculară nu este suficientă pentru a evalua micromediul angiogenic al tumorilor renale, din cauza discrepanțelor dintre expresia factorilor de creștere proangiogenici și valorile microdensității vasculare.
6. Evaluarea tipurilor de vase tumorale și a capacității acestora de a achiziționa celule perivasculare, a definit existența a trei tipuri morfologice de vase diferite ca pattern de creștere și de maturare.
7. Analiza de tip TAqMan a căilor VEGF și PDGF, care a derivat din observația microscopică anterioară, a identificat trei subgrupe moleculare de ccRCC caracterizate de o expresie genică particulară care le definesc și care recomandă aplicarea unei terapii personalizate diferențiate.
8. Identificarea expresiei CLIC1 și caracterizarea acestuia în celulele tumorale, dar și în celulele endoteliale din vasele tumorale, a identificat un subgrup de risc cu impact asupra progresiei și metastazării.
9. Expresia duală a CLIC1 în celulele tumorale și în endoteliul vaselor tumorale, îl recomandă ca țintă pentru terapia personalizată care să vizeze în același timp, atât compartimentul tumoral cât și compartimentul stromal vascular.
10. Cele trei subgrupe de ccRCC definite prin analiza genică, determină diferențierea terapiei antiangiogenice/antivasculară în funcție de tipul genelor supraexprimate, ceea ce determină un răspuns optim personalizat la acest tip de tratament.