

**VICTOR BABEȘ UNIVERSITY OF MEDICINE  
AND PHARMACY FROM TIMIȘOARA  
FACULTY OF MEDICINE  
DEPARTMENT II – MICROSCOPIC MORPHOLOGY**

**COSMA M.T. ANDREI-ALEXANDRU**



# **PhD THESIS**

**CLINICAL AND TISULAR FACTORS WITH IMPACT  
ON CLEAR CELL RENAL CELL CARCINOMA  
PROGNOSIS AND METASTASIS**

## **A B S T R A C T**

Scientific Coordinator  
**Prof. ANCA MARIA CÎMPEAN, MD PhD**

**Timișoara  
2025**

## INTRODUCTION

Renal cancer is a public health issue with a global incidence of 7 for men and 10 for women, with a total of over 430,000 newly diagnosed cases in 2020. Renal carcinoma is the 11th most common cause of death in Romania, accounting for 848 fatalities (3,8/100,000 people) in 2019. Renal cell carcinoma is often more common as people age; the mean age of occurrence is 64, but most patients receive their diagnosis between the ages of 65 and 74. Rarely are patients under 45 years old given a diagnosis. By the end of 2022, the American Cancer Society predicts that over 79,000 new instances of kidney cancer will be detected nationwide (50,290 males and 28,710 females). The question of identifying both carcinogenic compounds, like trichloroethylene, and protective compounds, like coffee consumption, arises in addition to the well-known risk factors for the development of kidney cancer, such as smoking, obesity, or high blood pressure. It is noteworthy to mention that the use of decaffeinated coffee has been linked to an increased risk of colorectal cancer. Imaging diagnosis is crucial for both the early stages of the patient's condition and the evaluation of the patient's response to treatment, whether the condition is metastatic or not. The computed tomography system may recognise metastases, lymphadenopathy, or local invasion. On the other hand, by highlighting the renal vein with a potential tumor microthrombus in the lumen, magnetic resonance imaging can supplement computed tomography scans with extra information. The PET scan assay is not widely used in the diagnosis or staging of ccRCC. Its basis is the tumor cells' ability to metabolise radiolabeled glucose. Both the American Urological Association and the European Society for Medical Oncology recommend active surveillance for patients in the early stages of the disease (T1a/T1b) and with tumor weights less than 4 cm. A renal biopsy is required to confirm the diagnosis of renal carcinoma and is necessary before any oncological treatment, particularly systemic therapy is started for patients with metastases. It is rare, or perhaps extraordinary, for this technique to have complications such as bleeding or remote tumour seeding.

In the era of personalised medicine, research is being done to find novel biomarkers so that patient groups with comparable genetic abnormalities can receive the most tailored treatments. One type of non-coding RNA that is mostly found in the cytoplasm is called circular RNA. The microarray examination of renal cancer cells

showed that overexpression of this type of RNA corresponded with a worse prognosis, suggesting that it is involved in cell proliferation and, consequently, in progression and metastasis.

## **AIM OF THE STUDY**

Despite the advancements in the diagnosis and treatment over the past two decades, it remains a highly lethal malignancy of the urinary system. Chloride intracellular channel 1 (CLIC1) first described in 1997 it is a protein that belongs to the family of ion channels of chlorine and has been identified to have a role in various fundamental biological processes, including maintenance of cell volume, ion homeostasis, trans-epithelial transport, and pH regulation but also, regulates the cell cycle, as well as cell proliferation, apoptosis, and differentiation. CLIC1 is involved in tumor angiogenesis, possibly by regulating the expression of integrins on endothelial cell surfaces. CLIC1 is expressed in the normal kidney, but also in ccRCC tumor cells and may act as sensor or effector of cellular proliferation, invasion and metastasis. Furthermore, it was found to be expressed, not only in ccRCC tumor cells, but also in tumor blood vessel endothelial cells, suggesting that it could be used as a new potential endothelial marker for tumor angiogenesis assessment. Its expression in both tumor and endothelial cells may be a sign for the development of future anti-CLIC1 therapy, able to target both tumor and its associated vessels.

TLS, formed by mature dendritic cells in a T-cell zone, together with a B-cell follicle including a germinal center, are present in most solid cancers, as an ectopic lymphoid tissue surrounding the tumor. It is known that the higher density of TLS into the tumor, the better the patient's prognosis. ccRCC shows less frequently and also dysfunctional TLS than other cancers.

One of the objectives was to characterise of CLIC1 positive vascular network in tumor and stromal compartments by using NFA (Network Formation Assay) digital tool with special focus on the ccRCC vessel's ability to form vascular loops and branching points, but even more, to assess the tumor-stroma interplay by applying CLIC1 immunohistochemical expression in both tumor and stromal components.

## MATERIAL AND METHODS

The case selection was focused on OncoHelp Clinic Database, Timisoara, Romania, where there were registered patients admitted for chemotherapy. One hundred cases of renal cancer had been selected for the current retrospective study but only 80 had a complete clinico-pathologic profile and certified as cc-RCC by histopathology. Metastatic sites were described and evaluated, being correlated with clinical features, as age, sex, BMI, but also with biological picture, as hemoglobin, number of leukocytes, neutrophils, platelets. Even more, creatinine, being a functional parameter of the kidney has been assessed.

Patients were classified according to age in three groups: 35-50, 51-65 and 66-86 years old, but also by sex (18 cases females, rest of them, males). Inclusion and exclusion criteria were applied for an accurate selection.

Tumor fragments measuring one to three centimetres were gathered after open surgery (radical nephrectomy). The components were fixed in 10% formalin for a duration of 48 hours. Following the fixative's removal through a water wash, the inclusion in the paraffin came next.

*Histopathological Assessment:* Hematoxylin-eosin staining, which is necessary for the histological diagnosis, was applied. Following dewaxing and hydration, the process involved colouring for 30 seconds with Haematoxylin Harris, washing under running water for five minutes, washing with distilled water for five minutes, colouring for two minutes with eosin, and again washing with distilled water for five minutes. Next, the material was dehydrated for five minutes in each of two absolute ethyl alcohol baths, dried at room temperature, clarified for twenty minutes in benzene, and mounted in Canadian balm.

*Immunohistochemical techniques:* Using DakoCytomation equipment, immunohistochemical processing was carried out, and microwave heat was used to remove the mask. To implement immunohistochemistry procedures, three processes had to be followed: dewaxing for thirty minutes at 58°C on a thermostat; washing and paraffin removal at room temperature in two benzene baths; and rehydrating in the corresponding solutions. Ten minutes for each of the following: benzene 1, benzene 2, alcohol 100%, alcohol 95%, alcohol 80%, alcohol 70%, and distilled water for an additional ten minutes.

Using a Grundium OCUS 20 Microscope (Grundium, Tampere, Finland), haematoxylin and eosin-stained and immunohistochemistry slides were scanned and stored in the Case Centre Slide Library (3DHistech, Budapest, Hungary) as svx files. The slides were uploaded from this digital library to QuPath version 0.4.2, an open-source platform for analysing microscopic slides' bioimages. QuPath used integrated software together with its extensions, such as Vascular Analysis and Fiji, to analyse the slides. Using QuPath annotation tools, we identified three stromal locations for each instance that had the highest density of stromal blood vessels around tumour sites and TLSs (where they are present).

Statistical analysis was performed by using correlation tests in between groups and subgroups. A p value less than 0.05 was considered significantly statistic while a p value < 0.001 has been considered as strongly significant statistical data.

## RESULTS

Eighteen cases constitute the initial cohort of patients aged 35-50 years, accounting for 25.71% of the total cases included in the study. In this group, 22.2% were female, while the remainder were male. Among the 18 patients, 61.1% exhibited lung metastases, with one case presenting pleural metastases. In this age category, 5.56% exhibited liver metastases (1 patient), 11.12% had cerebral metastases, 16.67% presented lymph nodal metastases, and 27.8% showed bone metastases. Only 5.56% exhibited skin metastases. The relationships among various metastatic sites were as follows: 22.2% exhibited metastases in two locations: lung and bone; 11.2% in lung and brain; and 5.56% in lung and liver. Additionally, we identified two cases with a triple association: the first case (5.56%) involved lung, brain, and bone, while the second case (5.56%) involved lung, bone, and liver. In the initial age group, a significant statistical correlation was identified between lymph node and skin metastases ( $p=0.02$ ). We observed a statistical correlation between cerebral metastases and the number of leukocytes and neutrophils ( $p=0.003$ ), as well as between neutrophils and bone metastases ( $p=0.039$ ). The G grading demonstrated a statistical correlation with lung metastases ( $p=0.037$ ) and liver metastases ( $p=0.027$ ).

In the cohort of patients aged 51-65 years, 21.27% were female and 78.72% were male. In the context of TNM staging, the distribution of T values is as follows: 23.47% for T1, 10.63% for T2, 44.68% for T3, and 14.9% for T4. The grading criteria were 4.25% for G1, 31.91% for G2, 27.65% for G3, and 29.78% for G4. At diagnosis, 53.19% of patients exhibited distant metastases, while the rest patients lacked metastatic lesions. In stage IV, 61.5% exhibited a single metastatic lesion, 23.12% presented with two metastatic sites, and the remaining cases had three distinct locations of distant lesions. A significant correlation has been found in between G and liver metastases. In the initial age group, none of the participants exhibited skin metastatic lesions, although all patients were classified as stage IV of the disease. The case distribution for the gender indicates that, within this age category, 23% were female and 76% were male. 53.4% had lung metastases, whereas pleural and liver metastases were observed in 15.38% of patients each. Additionally, 11.53% of participants exhibited metastases in the brain and lymph nodes, and 34.61% showed bone metastases. Among those with lung lesions, 76.92% were male, 23.07% exhibited both lung and pleural metastases, and only 7.69% had concurrent lung, liver, brain, and lymphatic abnormalities. Upon diagnosis, 50% of patients with hepatic secondary lesions displayed involvement of additional organs: 25% had both liver and bone involvement, while 25% presented with liver and lung involvement. Of the cerebral lesions, 66.6% were single, whereas 33.3% exhibited a triad including the brain, lung, and pleura. Upon analyzing lymph node metastases, we found that 33.3% were solitary lesions, 33.3% involved both lymph nodes and lung, and the remaining 33.3% included lymph nodes, lung, and pleural involvement. Bone lesions represented the second most prevalent distant metastases, behind lung lesions, with 34.61% of cases in this age range categorized as bone metastases. Among the bone lesions, 66.6% were classified as solitary, whereas 33.34% were linked to lesions in the lungs, liver, or lymphatic system. A comprehensive analysis of patients in the 51-65 age group revealed a significant statistical correlation between lung and pleural metastases ( $p < 0.001$ ).

Among patients aged 66 to 86 years, 26.7% were female and 73.3% were male. In terms of TNM staging, 20% were classified as T1, 13.4% as T2, 43.3% as T3, and 6.67% as T4. All instances of T1 were exclusively male, whereas T2 and T4 exhibited a gender distribution of 50% males and 50% females. T3 comprised 75% males and 25% females. Conversely, for the N parameter, 53.4% were classified as

N0, while the remaining cases were categorized as Nx. The M parameter indicated that, within this age category, 33.4% were classified as M0, while 66.7% presented with metastases at diagnosis. Among metastatic-free patients, 60% were male and 40% were female. In the category of distant lesions, 80% of the subjects were male, while 20% were female. In the final cohort, 80% exhibited lung metastases, 20% demonstrated pleural metastases, 10% had liver involvement, and 30% presented with bone and cerebral metastatic lesions. Twenty percent of cases exhibited both lymphatic and cutaneous lesions. Regarding the number of metastases, we found that 20% exhibited a single metastatic lesion (50% in the lung and 50% in bone), while 40% presented a double association of metastases, with the lung consistently involved. The second site of lesion, following the lung, has been characterized as highly heterogeneous: 50% in bone, 25% in liver, and 25% in brain. The triple association was observed in 40% of all metastatic cases, with 75% exhibiting lung localization. In this cohort with lung distant lesions, 66.6% exhibited pleural, lymphatic, and bone metastases, while 33.4% had brain and skin as the second and third sites of metastasis. In terms of sex distribution, 25% of the participants were female, while 75% were male. Instances of triple association absent lung involvement (25%) exhibited lesions in the skin, lymphatic system, and brain. The majority of cases with distant metastases occurred in individuals aged 66 to 70 years, representing 71.42% of all cases within this group. In the group aged 71-80 years, 50% of cases exhibited metastases, whereas in the 81-86 age group, the incidence of distant lesions reached 100%. In this age group, the distribution of the G parameter was identified as follows: 26.7% for G1, 46.6% for G2, and 26.6% for G3. In the G1 category, 50% did not exhibit metastatic lesions at diagnosis; however, 25% presented with both double and triple metastatic associations. The G2 group exhibited 42.85% of cases free from metastasis, while 28.57% demonstrated double metastatic association (42.85% lung, 14.28% pleural). Liver metastases were not observed in this group; however, brain and skin lesions were identified in 14% of cases for both locations, along with lymphatic and bone metastases at 28.57% for both locations. Fifty percent of the G3 category exhibited a single metastatic lesion, whereas twenty-five percent presented with double and triple associations. Seventy-five percent exhibited lung metastases, associated with pleural involvement in 25% of cases, cerebral involvement in 25%, and bone involvement in 50%. In the G3

group, we did not identify metastatic lesions in the hepatic, lymphatic, or skin systems.

Eighteen cases have been part of the first group of patients between 35-50 years old, representing 25,71% from all cases included into the study. In this group 22,2% were females, and the rest were males. From these 18 patients, 61,1% showed lung metastases, followed by one single case with pleural metastases. Even more, in this category of age, 5,56% presented liver metastases (1 patient), 11,12% cerebral metastases, 16,67% lymph nodal metastases and 27,8% bone metastases. Only 5,56% presented metastases of the skin. The associations between multiple metastatic sites were as follows: 22,2% showed metastases in two sites: lung and bone, 11, 2% lung and brain and 5,56% lung and liver. Moreover, we identified 2 cases with triple association: first (5,56%, lung-brain-bone), and the second one (5,56%), lung-bone-liver.

Regarding the biological parameters, we obtain statistic correlation between cerebral metastases and number of leukocytes and neutrophiles ( $p=0,003$ ), but also between neutrophiles and bone metastases ( $p=0,039$ ). Even more, the G grading showed statistic correlation with lung metastases ( $p=0.037$ ), but also with liver metastases ( $p=0,027$ ). For the other metastatic sites, it has been identified one single inverse correlation between lymph node metastases and the grading ( $p=0,013$ ). For patients between 51-65 years old we identified that 21,27% of them were females, therefore, 78,72% were represented by males. Regarding the T value from the TNM staging, 23,47% presented T1, 10,63%-T2, 44,68%-T3 and 14,9%-T4. On the other hand, the grading parameter showed 4,25% G1, 31,91% - G2, 27,65% - G3 and 29,78% - G4. Concerning the existence of metastases, 53,19% of them showed distant lesions at diagnosis, the rest of them being metastatic free. From stage IV category, 61,5% showed a single metastatic lesion, 23,12%, two metastatic sites, and the rest of them, three different locations of distant lesions. We observed that despite the first age group, in this category none of the subjects presented skin metastatic lesions, nonetheless, all patients were in stage IV of disease. The dispersal of cases regarding the gender, in this category of age 19,23% were females, and 80,76% males.

53,4% presented lung metastases, pleural metastases were identified in 15,38% of cases, and liver location of lesions, 15,38%. Even more, 11,53% of cases showed brain and lymph node metastases, despite 34,61% with bone mets. In the



category with lung lesions, 76,92% were males, 23,07% of them presented both lung and pleural metastases, and only 7,69% associated lung, liver, brain and lymphatic lesions.

Concerning the existence of hepatic secondary lesions at diagnosis, 50% of them presented association with other involved organs: 25% both liver and bone, 25% liver and lung. Regarding the cerebral lesions, 66,6% of them were solitary, but 33,3% showing triple association (brain, lung and pleural). In the category of lymph node metastases, we identified that 33,3% were single lesions, 33,3% both lymph and lung, and the rest of 33,3% - lymph, lung and pleural.

The second most common distant lesion, after the lung, was represented by the bone, as from all cases in this category of age, 34,61% were bone mets. In the category of bone lesions, 66,6% were single lesions, despite 33,34% association between bone and lung, liver or lymphatic.

CLIC1 was found to be positive in both tumor cells and stromal components. A percentage of 88% out of total cases showed positive reaction in tumor cells with a heterogeneous distribution amongst tumor areas but also with a high heterogeneity related to the expression into all three main cellular components: cytoplasm (C), membrane (M) and nucleus (N). In about 27,27% of cases, we found a combined CLIC1 expression in all three cellular components and we noted this as NCM expression, while NM and NC expression was found in 25.58% and 14% of cases respectively. About 23.25% of cc-RCC cases expressed CLIC1 in only one cellular component: 4.65% had N expression exclusively, 2.32 % M expression and 16.28% showed C expression only.

Tumor stromal components as blood vessels endothelial cells, fibroblasts, diffuse lymphoid infiltrate and Tertiary Lymphoid Structures (TLSs) cells also expressed CLIC1. CLIC1- positive TLSs were detected for about 66% out of total number of cc-RCC cases. Inside this TLSs positive subgroup, a percentage of 90.62% of cases had CLIC1 expression in both tumor cells and TLSs.

Another common histological structure positive for CLIC1 was the vascular network found inside the tumor but also in the stromal compartment. CLIC1 positive endothelial cells lined the small, highly branched capillaries invading the tumor areas or forming networks in the stromal compartment. CLIC1 positivity was limited to the small capillaries but was negative in the endothelium of big arterial or venous vessels. Intratumor vascular network can be easily seen especially in cc-RCC cases

with negative tumor cells for CLIC1. Inside tumor area, CLIC1 positive vessels formed highly interconnected networks while in the peritumoral stromal compartment CLIC1 positive capillaries did not interact each other and are unbranched.

For TLSs positive cc-RCC subgroup, we observed a predominance of cytoplasmic and membrane expression of CLIC1 in tumor cells (CLIC1-T), few of them having CLIC1 nuclear expression. CLIC1 positive microvessel density (CLIC1-MVD) was significantly correlated to CLIC1 expression pattern in tumor cells ( $p=0.026$ ) suggesting that tumor cells expressing CLIC1 may have an angiogenic potential to stromal vessels most probably mediated by CLIC1 itself. The size and extent of the main tumor, assessed by T parameter from TNM staging, were significantly correlated to CLIC1 pattern ( $p=0.028$ ) but also to CLIC1-MVD ( $p=0.004$ ) and nodal status (N parameter,  $p=0.035$ ). The highest number of significant correlations was found for M parameter with CLIC1-pattern ( $p=0.031$ ), CLIC1-MVD ( $p=0.009$ ) and T ( $p<0.001$ ).

Global statistical analysis of all cases included in the present study. In the category of age among 66-86, global statistic evaluation did not show correlation between TNM, age, sex and G. According to M parameter it has been identified a statistical association with lung metastases ( $p<0,001$ ). TNM parameters did not correlate with pleural, liver and cerebral lesions. Even more, global analysis presented a significant statistical association among skin and cerebral lesions, despite G which was not associated distant metastases.

## CONCLUSIONS

cc-RCC metastatic potential is highly heterogeneous amongst different age subgroups. For the younger patients subgroup (aged 35 to 50 years old) brain, bone and liver are the most common sites of cc-RCC metastases and the first 2 out of three are directly and significantly influenced by the peripheral blood neutrophils counts. Liver metastases are most common in women. Lymph node metastases may favor the appearance of skin metastases, but this finding must be validated by further studies. Age group ranged between 51 to 65 years old had the lowest metastatic rate and totally lack the presence of skin metastases but is governed by the presence of lung and pleural metastases with a high prevalence in males and

partially positive correlated to neutrophils count. Inverse correlation between brain metastases and neutrophils count suggests a protective role of circulating neutrophils against brain metastases development in this age group. Divergent data in these two age subgroups related to neutrophils/brain metastases appearance suggests the presence of a high neutrophils' heterogeneity with dual role dependently by age and maybe by other factors which were not previously reported. The elderly patients group (66-85 years old) was the unique group with the highest percentage of multiple metastases sites but also where neutrophils and platelets are highly correlated suggested a higher risk of thrombosis. We proved that tumor-stroma interaction in ccRCC is depended by CLIC1 expression which seems to act as a mediator for communication in between tumor cells and tumor stroma. By comparatively assessment of TLS positive and negative cases, we found significant differences related to nodal and distal metastases, which were influenced by CLIC1 expression in tumor cells. CLIC1 MVD for peritumoral blood vessels was highly correlated to CLIC1 expression pattern in tumor, which also influenced the size and local invasion of the tumor. This highly depended by CLIC1 pattern especially when CLIC1 was expressed at the level of the tumor cells membrane. Lack of TLS in the stroma strongly favoured nodal and distant metastases.

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
“VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
DEPARTAMENTUL II – MORFOLOGIE MICROSCOPICĂ**

**COSMA M.T. ANDREI-ALEXANDRU**



**TEZĂ DE DOCTORAT**  
**IMPACTUL PROGNOSTIC ȘI METASTATIC AL FACTORILOR  
CLINICO-TISULARI ÎN CARCINOAMELE RENALE CU  
CELULE CLARE**

**R E Z U M A T**

Conducător de doctorat:  
**PROF. UNIV. DR. ANCA MARIA CÎMPEAN**

**Timișoara  
2025**

## INTRODUCERE

Cancerul renal reprezintă o problemă de sănătate publică cu o incidență globală de 7 la bărbați și 10 la femei, cu un total de peste 430.000 de cazuri nou diagnosticate în 2020. Carcinomul renal este a 11-a cauză de deces ca frecvență în România, provocând 848 de decese (3,8/100.000 de persoane) în 2019. Carcinomul renal este adesea mai frecvent pe măsură ce populația îmbătrânește; vârsta medie de diagnostic este de 64 de ani, dar majoritatea pacienților sunt diagnosticați între 65 și 74 de ani. Rareori pacienții cu vârsta sub 45 de ani sunt depistați cu această neoplazie. Până la sfârșitul anului 2022, Societatea Americană de Cancer preconizează că peste 79.000 de noi cazuri de cancer renal vor fi detectate la nivel național (50.290 bărbați și 28.710 femei). Întrebarea identificării atât a compușilor carcinogeni, precum tricloretilena, cât și a compușilor protectori, precum consumul de cafea, apare pe lângă factorii de risc bine cunoscuți pentru dezvoltarea cancerului renal, cum ar fi fumatul, obezitatea sau hipertensiunea arterială. Este demn de menționat că utilizarea cafelei decofeinizate a fost asociată cu un risc crescut de cancer colorectal. Diagnosticul imagistic este crucial atât pentru stadiile incipiente ale afecțiunii, cât și pentru evaluarea răspunsului pacientului la tratament, indiferent dacă boala este metastatică sau nu. Sistemul de tomografie computerizată poate depista metastazele la distanță, adenopatiile sau invazia locală. Pe de altă parte, prin evidențierea venei renale cu un potențial microtromb tumoral în lumen, imagistica prin rezonanță magnetică poate completa scanările tomografice cu informații suplimentare. Evaluarea prin PET-CT nu este utilizată pe scară largă în diagnosticul sau stadializarea ccRCC. Acesta din urmă se bazează pe capacitatea celulelor tumorale de a metaboliza glucoza radiomarcată. Atât Asociația Urologică Americană, cât și Societatea Europeană de Oncologie Medicală recomandă supravegherea activă pentru pacienții în stadiile incipiente ale bolii (T1a/T1b) și cu încărcătură tumorală mai mică de 4 cm. O biopsie renală este necesară pentru a confirma diagnosticul de carcinom renal și este necesară înainte de a începe orice tratament oncologic, în special terapia sistemică, pentru pacienții cu metastaze. Este rar, sau poate chiar extraordinar, ca această tehnică să aibă complicații precum sângerarea sau semănarea tumorilor la distanță.

În era medicinei personalizate, se efectuează cercetări pentru a găsi biomarkeri noi, astfel încât grupurile de pacienți cu anomalii genetice comparabile să

poată primi cele mai adaptate tratamente. Un tip de ARN necodificator care se găsește în principal în citoplasmă se numește ARN circular. Examinarea microarray a celulelor tumorale renale a arătat că supraexprimarea acestui tip de ARN corespundea cu un prognostic mai prost, sugerând că este implicat în proliferarea celulară și, în consecință, în progresia și metastazarea bolii.

## SCOP

În ciuda progreselor în diagnostic și tratament din ultimele două decenii, carcinomul renal rămâne o malignitate extrem de letală a sistemului urinar. Canalul intracelular de clor 1 (CLIC1), descris pentru prima dată în 1997, este o proteină care aparține familiei canalelor ionice de clor și a fost identificată ca având un rol în diverse procese biologice fundamentale, inclusiv menținerea volumului celular, homeostazia ionică, transportul transepitelial și reglarea pH-ului, dar, de asemenea, reglează ciclul celular, precum și proliferarea celulară, apoptoza și diferențierea. CLIC1 este implicat în angiogeneza tumorală, posibil prin reglarea expresiei integrinelor pe suprafețele celulelor endoteliale. CLIC1 este exprimat în rinichiul normal, dar și în celulele tumorale ale ccRCC și poate acționa ca senzor sau efector al proliferării celulare, invaziei și metastazării. În plus, s-a constatat că este exprimat nu doar în celulele tumorale renale, ci și în celulele endoteliale ale vaselor de sânge tumorale, sugerând că ar putea fi utilizat ca un nou marker endotelial potențial pentru evaluarea angiogenezei tumorale. Expresia sa în celulele tumorale și endoteliale poate fi un semn pentru dezvoltarea unei viitoare terapii anti-CLIC1, capabile să vizeze atât tumora, cât și vasele asociate acesteia.

TLS, formate din celule dendritice mature într-o zonă T, împreună cu un folicul B care include un centru germinal, sunt prezente în majoritatea tumorilor solide, ca un țesut limfoid ectopic care înconjoară tumora. Se știe, de asemenea, cu cât densitatea TLS în tumoră este mai mare, cu atât prognosticul pacientului este mai bun. ccRCC prezintă TLS mai rar și, de asemenea, disfuncționale decât alte tipuri de cancer.

Unul dintre obiective a fost caracterizarea rețelei vasculare pozitive pentru CLIC1 în compartimentele tumorale și stromale prin utilizarea instrumentului digital NFA (Network Formation Assay), cu un accent special pe capacitatea vaselor ccRCC

de a forma bucle vasculare și puncte de ramificare, dar mai mult decât atât, evaluarea interacțiunii tumoră-stromă prin aplicarea expresiei imunohistochimice CLIC1 atât în componentele tumorale, cât și în cele stromale.

## **MATERIAL-METODĂ**

Selecția cazurilor s-a concentrat pe baza de date a Clinicii OncoHelp din Timișoara, România, unde au fost înregistrați pacienți admiși pentru tratament sistemic. O sută de cazuri de cancer renal au fost selectate pentru studiul retrospectiv actual, dar doar 80 aveau un profil clinico-patologic complet și erau certificate ca cc-RCC prin rezultat histopatologic. Localizările metastatice au fost descrise și evaluate, fiind corelate cu caracteristicile clinice, cum ar fi vârsta, sexul, IMC, dar și cu parametri biologici, cum ar fi hemoglobina, numărul de leucocite, neutrofile, trombocite. Mai mult, creatinina, fiind un parametru funcțional al rinichiului, a fost evaluată.

Pacienții au fost clasificați în funcție de vârstă în trei grupuri: 35-50, 51-65 și 66-86 de ani, dar și după sex (18 cazuri femei, restul bărbați). Criteriile de includere și excludere au fost aplicate pentru o selecție precisă.

Pe de altă parte, fragmentele tumorale cu dimensiuni cuprinse între unu și trei centimetri au fost colectate după o intervenție chirurgicală deschisă (nephrectomie radicală). Componentele au fost fixate în formalină 10% timp de 48 de ore. După îndepărtarea fixatorului printr-o spălare cu apă, a urmat includerea în parafină.

*Evaluare histopatologică:* Colorarea cu hematoxin-eozină, care este necesară pentru diagnosticul histologic, a fost aplicată. După deparafinare și hidratare, procesul a implicat colorarea timp de 30 de secunde cu Hematoxin Harris, spălarea sub apă curentă timp de cinci minute, spălarea cu apă distilată timp de cinci minute, colorarea timp de două minute cu eozină și din nou spălarea cu apă distilată timp de cinci minute. Apoi, materialul a fost deshidratat timp de cinci minute în fiecare dintre cele două băi de alcool etilic absolut, uscat la temperatura camerei, clarificat timp de douăzeci de minute în benzen și montat în balsam de Canada.

*Tehnici imunohistochimice:* Folosind echipamente DakoCytomation, procesarea imunohistochimică a fost efectuată, iar căldura cu microunde a fost utilizată pentru a îndepărta mascarea. Pentru a implementa procedurile de

imunohistochimie, au trebuit urmate trei procese: deparafinarea timp de treizeci de minute la 58°C pe un termostat; spălarea și îndepărtarea parafinei la temperatura camerei în două băi de benzen; și rehidratarea în soluțiile corespunzătoare. Zece minute pentru fiecare dintre următoarele: benzen 1, benzen 2, alcool 100%, alcool 95%, alcool 80%, alcool 70%, și apă distilată pentru încă zece minute.

Folosind un microscop Grundium OCUS 20 (Grundium, Tampere, Finlanda), preparatele colorate cu hematoxină și eozină și cele de imunohistochimie au fost scanate și stocate în Biblioteca de Lame a Centrului de Cazuri (3DHistech, Budapesta, Ungaria) ca fișiere svf. Lamele au fost încărcate din această bibliotecă digitală în QuPath versiunea 0.4.2, o platformă open-source pentru analizarea bioimagisticii lamelelor microscopice. QuPath a folosit software integrat împreună cu extensiile sale, cum ar fi Vascular Analysis și Fiji, pentru a analiza lamele. Folosind instrumentele de anotare QuPath, am identificat trei locații stromale pentru fiecare caz care avea cea mai mare densitate de vase de sânge stromale în jurul site-urilor tumorale și TLS-urilor (unde sunt prezente).

Analiza statistică a fost efectuată folosind teste de corelație între grupuri și subgrupuri. O valoare p mai mică de 0,05 a fost considerată statistic semnificativă, în timp ce o valoare  $p < 0,001$  a fost considerată date statistice extrem de semnificative.

## REZULTATE

Optsprezece cazuri constituie cohorta inițială de pacienți cu vârste cuprinse între 35 și 50 de ani, reprezentând 25,71% din totalul cazurilor incluse în studiu. În acest grup, 22,2% erau femei, în timp ce restul erau bărbați. Printre cei 18 pacienți, 61,1% au prezentat metastaze pulmonare, un caz având metastaze pleurale. În această categorie de vârstă, 5,56% au prezentat metastaze hepatice (1 pacient), 11,12% au avut metastaze cerebrale, 16,67% au prezentat metastaze nodale limfatice, iar 27,8% au arătat metastaze osoase. Numai 5,56% au prezentat metastaze cutanate. Relațiile dintre diferitele site-uri metastatice au fost următoarele: 22,2% au prezentat metastaze în două locații: plămân și os; 11,2% în plămân și creier; și 5,56% în plămân și ficat. În plus, am identificat două cazuri cu o asocieră tripletă: primul caz (5,56%) a implicat plămân, creier și os, în timp ce al doilea caz



(5,56%) a implicat plămân, os și ficat. În grupul de vârstă inițial, a fost identificată o corelație statistică semnificativă între metastazele ganglionare și cele cutanate ( $p=0.02$ ). Am observat o corelație statistică între metastazele cerebrale și numărul de leucocite și neutrofile ( $p=0.003$ ), precum și între neutrofile și metastazele osoase ( $p=0.039$ ). Clasificarea G a demonstrat o corelație statistică cu metastazele pulmonare ( $p=0.037$ ) și metastazele hepatice ( $p=0.027$ ).

În cohorta pacienților cu vârste cuprinse între 51-65 de ani, 21,27% erau femei și 78,72% erau bărbați. În contextul stadializării TNM, distribuția valorilor T este următoarea: 23,47% pentru T1, 10,63% pentru T2, 44,68% pentru T3 și 14,9% pentru T4. Criteriile de clasificare au fost 4,25% pentru G1, 31,91% pentru G2, 27,65% pentru G3 și 29,78% pentru G4. La diagnosticare, 53,19% dintre pacienți prezentau metastaze la distanță, în timp ce restul pacienților nu aveau leziuni metastatice. În stadiul IV, 61,5% au prezentat o singură leziune metastatică, 23,12% au avut două site-uri metastatice, iar restul cazurilor au avut trei locații distincte ale leziunilor la distanță. A fost găsită o corelație semnificativă între G și metastazele hepatice. În grupul de vârstă inițial, niciunul dintre participanți nu a prezentat leziuni metastatice ale pielii, deși toți pacienții au fost clasificați în stadiul IV al bolii. Distribuția cazurilor pe sexe indică faptul că în această categorie de vârstă 23% erau femei și 76% erau bărbați. 53,4% aveau metastaze pulmonare, în timp ce metastazele pleurale și hepatice au fost observate la câte 15,38% dintre pacienți. În plus, 11,53% dintre participanți au prezentat metastaze la nivelul creierului și ganglionilor limfatici, iar 34,61% au prezentat metastaze osoase. Printre cei cu leziuni pulmonare, 76,92% erau bărbați, 23,07% prezentau atât metastaze pulmonare, cât și pleurale, iar doar 7,69% aveau leziuni secundare pulmonare, hepatice, cerebrale și limfatice concomitente. La diagnostic, 50% dintre pacienții cu leziuni hepatice secundare prezentau implicarea organelor suplimentare: 25% aveau atât implicare hepatică, cât și osoasă, în timp ce 25% prezentau implicare hepatică și pulmonară. Dintre leziunile cerebrale, 66,6% erau unice, în timp ce 33,3% prezentau o triadă incluzând creierul, plămânul și pleura. La analiza metastazelor ganglionare, am constatat că 33,3% erau leziuni solitare, 33,3% implicau atât ganglionii limfatici, cât și plămânii, iar restul de 33,3% includeau ganglioni limfatici, plămâni și implicare pleurală. Leziunile osoase au reprezentat a doua cele mai frecvente metastaze la distanță, după leziunile pulmonare, cu 34,61% din cazuri în acest interval de vârstă fiind clasificate ca metastaze osoase. Printre leziunile

osoase, 66,6% au fost clasificate ca solitare, în timp ce 33,34% au fost legate de leziuni în plămâni, ficat sau limfonoduli. O analiză cuprinzătoare a pacienților din grupa de vârstă 51-65 a relevat o corelație statistică semnificativă între metastazele pulmonare și cele pleurale ( $p < 0.001$ ).

Printre pacienții cu vârste cuprinse între 66 și 86 de ani, 26,7% erau femei și 73,3% erau bărbați. În ceea ce privește stadializarea TNM, 20% au fost clasificați ca T1, 13,4% ca T2, 43,3% ca T3 și 6,67% ca T4. Toate cazurile de T1 au fost exclusiv de sex masculin, în timp ce T2 și T4 au prezentat o distribuție de gen de 50% bărbați și 50% femei. T3 a fost compus din 75% bărbați și 25% femei. În schimb, pentru parametrul N, 53,4% au fost clasificați ca N0, în timp ce restul cazurilor au fost categorisite ca Nx. Parametrul M a indicat că, în această categorie de vârstă, 33,4% au fost clasificați ca M0, în timp ce 66,7% prezentau metastaze la diagnostic. Printre pacienții fără metastaze, 60% erau bărbați și 40% erau femei. În categoria leziunilor distale, 80% dintre subiecți erau bărbați, în timp ce 20% erau femei. În cohortul final, 80% au prezentat metastaze pulmonare, 20% au demonstrat metastaze pleurale, 10% au avut implicare hepatică, iar 30% au prezentat leziuni metastatice osoase și cerebrale. Douăzeci la sută dintre cazuri au prezentat atât leziuni limfatice, cât și cutanate. În ceea ce privește numărul de metastaze, am constatat că 20% au prezentat o singură leziune metastatică (50% în plămân și 50% în os), în timp ce 40% au prezentat o asocieră dublă de metastaze, cu plămânul implicat în mod constant. Al doilea loc al leziunii, după plămân, a fost caracterizat ca fiind extrem de heterogen: 50% în os, 25% în ficat și 25% în creier. Asocieră triplă a fost observată în 40% din toate cazurile metastatice, 75% având localizare pulmonară. În această cohortă cu leziuni pulmonare la distanță, 66,6% au prezentat metastaze pleurale, limfatice și osoase, în timp ce 33,4% au avut creierul și pielea ca al doilea și al treilea loc de metastază. În ceea ce privește distribuția pe sexe, 25% dintre participanți erau femei, în timp ce 75% erau bărbați. Cazurile de asocieră triplă fără implicarea plămânilor (25%) au prezentat leziuni la nivelul pielii, sistemului limfatic și creierului. Majoritatea cazurilor cu metastaze la distanță au apărut la indivizi cu vârste cuprinse între 66 și 70 de ani, reprezentând 71,42% din toate cazurile din acest grup. În grupul de vârstă 71-80 de ani, 50% dintre cazuri au prezentat metastaze, în timp ce în grupul de vârstă 81-86 de ani, incidența leziunilor distale a atins 100%. În acest grup de vârstă, distribuția parametrului G a fost identificată astfel: 26,7% pentru G1, 46,6% pentru G2 și 26,6% pentru G3. În categoria G1, 50%

nu au prezentat leziuni metastatice la diagnostic; totuși, 25% au avut atât asocieri metastatice duble, cât și triple. Grupul G2 a prezentat 42,85% din cazuri fără metastaze, în timp ce 28,57% au demonstrat o asociere metastatică dublă (42,85% pulmonară, 14,28% pleurală). Metastazele hepatice nu au fost observate în acest grup; cu toate acestea, leziunile cerebrale și cutanate au fost identificate în 14% din cazuri pentru ambele locații, împreună cu metastaze limfatice și osoase la 28,57% pentru ambele locații. Cincizeci la sută din categoria G3 au prezentat o singură leziune metastatică, în timp ce douăzeci și cinci la sută au avut asocieri duble și triple. 75% au prezentat metastaze pulmonare, asociate cu implicarea pleurală în 25% din cazuri, implicarea cerebrală în 25% și implicarea osoasă în 50%. În grupul G3, nu am identificat leziuni metastatice în sistemele hepatic, limfatic sau cutanat.

Optsprezece cazuri au făcut parte din primul grup de pacienți cu vârste între 35-50 de ani, reprezentând 25,71% din toate cazurile incluse în studiu. În acest grup, 22,2% erau femei, iar restul erau bărbați. Dintre acești 18 pacienți, 61,1% au prezentat metastaze pulmonare, urmate de un singur caz cu metastaze pleurale. Mai mult, în această categorie de vârstă, 5,56% au prezentat metastaze hepatice (1 pacient), 11,12% metastaze cerebrale, 16,67% metastaze nodale limfatice și 27,8% metastaze osoase. Numai 5,56% au prezentat metastaze cutanate. Asocierile între multiplele site-uri metastatice au fost următoarele: 22,2% au prezentat metastaze în două site-uri: plămân și os, 11,2% plămân și creier și 5,56% plămân și ficat. În plus, am identificat 2 cazuri cu asociere triplă: primul (5,56%, plămân-creier-os), iar al doilea (5,56%), plămân-os-ficat.

În ceea ce privește parametrii biologici, obținem o corelație statistică între metastazele cerebrale și numărul de leucocite și neutrofile ( $p=0,003$ ), dar și între neutrofile și metastazele osoase ( $p=0,039$ ). Mai mult, gradarea G a arătat o corelație statistică cu metastazele pulmonare ( $p=0,037$ ), dar și cu metastazele hepatice ( $p=0,027$ ). Pentru celelalte site-uri metastatice, s-a identificat o singură corelație inversă între metastazele ganglionare limfatice și gradare ( $p=0,013$ ). Pentru pacienții cu vârste între 51-65 de ani, am identificat că 21,27% dintre ei erau femei, prin urmare, 78,72% erau reprezentați de bărbați. În ceea ce privește valoarea T din stadializarea TNM, 23,47% au prezentat T1, 10,63%-T2, 44,68%-T3 și 14,9%-T4. Pe de altă parte, parametrul de gradare a arătat 4,25% - G1, 31,91% - G2, 27,65% - G3 și 29,78% - G4. În ceea ce privește existența metastazelor, 53,19% dintre acestea au prezentat leziuni la distanță la diagnostic, restul fiind fără metastaze. Din categoria stadiului IV, 61,5% au prezentat o singură leziune metastatică, 23,12%,

două focare metastatice, iar restul, trei locații diferite ale leziunilor la distanță. Am observat că, în ciuda primei grupe de vârstă, în această categorie niciunul dintre subiecți nu a prezentat leziuni metastatice cutanate, totuși, toți pacienții erau în stadiul IV al bolii. Dispersia cazurilor în funcție de sex, în această categorie de vârstă, 19,23% erau femei și 80,76% bărbați.

53,4% au prezentat metastaze pulmonare, metastazele pleurale au fost identificate în 15,38% din cazuri, iar localizarea leziunilor la nivel hepatic, 15,38%. Mai mult, 11,53% dintre cazuri au prezentat metastaze cerebrale și ganglionare, în ciuda faptului că 34,61% aveau metastaze osoase. În categoria cu leziuni pulmonare, 76,92% erau bărbați, 23,07% dintre aceștia prezentau atât metastaze pulmonare, cât și pleurale, iar doar 7,69% asociau leziuni pulmonare, hepatice, cerebrale și limfatice.

În ceea ce privește existența leziunilor hepatice secundare la diagnostic, 50% dintre acestea au prezentat asocierea cu alte organe implicate: 25% atât ficat, cât și os, 25% ficat și plămân. În ceea ce privește leziunile cerebrale, 66,6% dintre acestea erau solitare, dar 33,3% prezentau o asociere triplă (creier, plămân și pleură). În categoria metastazelor ganglionare, am identificat că 33,3% erau leziuni unice, 33,3% atât ganglionare cât și pulmonare, iar restul de 33,3% - ganglionare, pulmonare și pleurale. A doua cea mai frecventă leziune la distanță, după plămân, a fost reprezentată de os, deoarece din toate cazurile din această categorie de vârstă, 34,61% erau metastaze osoase. În categoria leziunilor osoase, 66,6% au fost leziuni unice, în ciuda asocierii de 33,34% între os și plămân, ficat sau limfatic.

CLIC1 a fost găsit pozitiv atât în celulele tumorale, cât și în componentele stromale. Un procent de 88% din totalul cazurilor a arătat o reacție pozitivă în celulele tumorale, cu o distribuție heterogenă între zonele tumorale, dar și cu o mare heterogenitate legată de expresia în toate cele trei componente celulare principale: citoplasmă (C), membrană (M) și nucleu (N). În aproximativ 27,27% din cazuri, am găsit o expresie combinată a CLIC1 în toate cele trei componente celulare și am notat aceasta ca expresie NCM, în timp ce expresiile NM și NC au fost găsite în 25,58% și respectiv 14% din cazuri. Aproximativ 23,25% dintre cazurile de cc-RCC au exprimat CLIC1 într-un singur component celular: 4,65% au avut expresie N exclusiv, 2,32% expresie M și 16,28% au arătat doar expresie C.

Componentele stromale ale tumorii, cum ar fi celulele endoteliale ale vaselor de sânge, fibroblastele, infiltratul limfoid difuz și celulele Structurilor Limfoide Terțiare

(TLSs) au exprimat de asemenea CLIC1. TLS-urile pozitive pentru CLIC1 au fost detectate în aproximativ 66% din numărul total de cazuri de cc-RCC. În cadrul acestui subgrup pozitiv pentru TLS-uri, un procent de 90,62% din cazuri au avut expresie CLIC1 atât în celulele tumorale, cât și în TLS-uri.

O altă structură histologică comună pozitivă pentru CLIC1 a fost rețeaua vasculară găsită în interiorul tumorii, dar și în compartimentul stromal. Celulele endoteliale pozitive pentru CLIC1 căpățeau capilarele mici, foarte ramificate, care invadeau zonele tumorale sau formau rețele în compartimentul stromal. Pozitivitatea CLIC1 a fost limitată la capilarele mici, dar a fost negativă în endoteliul vaselor arteriale sau venoase mari. Rețeaua vasculară intratumorală poate fi observată cu ușurință, în special în cazurile de cc-RCC cu celule tumorale negative pentru CLIC1. În interiorul zonei tumorale, vasele pozitive pentru CLIC1 au format rețele interconectate, în timp ce în compartimentul stromal peritumoral, capilarele pozitive pentru CLIC1 nu interacționează între ele și sunt nebranșate.

Pentru subgrupul pozitiv TLSs cc-RCC, am observat o predominanță a expresiei citoplasmice și membranare a CLIC1 în celulele tumorale (CLIC1-T), câteva dintre acestea având expresie nucleară a CLIC1. Densitatea microvasculară pozitivă pentru CLIC1 (CLIC1-MVD) a fost semnificativ corelată cu modelul de expresie CLIC1 în celulele tumorale ( $p=0.026$ ), sugerând că celulele tumorale care exprimă CLIC1 pot avea un potențial angiogenic pentru vasele stromale, cel mai probabil mediat de CLIC1 însuși. Dimensiunea și extinderea tumorii primare, evaluate prin parametrul T din stadializarea TNM, au fost semnificativ corelate cu modelul CLIC1 ( $p=0.028$ ), dar și cu CLIC1-MVD ( $p=0.004$ ) și statusul nodal (parametrul N,  $p=0.035$ ). Cel mai mare număr de corelații semnificative a fost găsit pentru parametrul M cu CLIC1-pattern ( $p=0.031$ ), CLIC1-MVD ( $p=0.009$ ) și T ( $p<0.001$ ).

Analiza statistică globală a tuturor cazurilor incluse în prezentul studiu. În categoria de vârstă între 66-86, evaluarea statistică globală nu a arătat o corelație între TNM, vârstă, sex și G. Conform parametrului M, a fost identificată o asocieră statistică cu metastazele pulmonare ( $p<0,001$ ). Parametri TNM nu se corelează cu leziunile pleurale, hepatice și cerebrale. Mai mult, analiza globală a prezentat o asocieră statistică semnificativă între leziunile cutanate și cele cerebrale, în ciuda faptului că G nu a fost asociat cu metastazele la distanță.

## CONCLUZII

Potențialul metastatic al cc-RCC este extrem de heterogen între diferitele subgrupuri de vârstă. Pentru subgrupul de pacienți mai tineri (cu vârste cuprinse între 35 și 50 de ani), creierul, oasele și ficatul sunt cele mai frecvente localizări metastatice a cc-RCC, iar primele două dintre acestea sunt direct și semnificativ influențate de numărul de neutrofile din sângele periferic. Metastazele hepatice sunt cele mai frecvente la femei. Metastazele ganglionare pot favoriza apariția metastazelor cutanate, dar această constatare trebuie validată prin studii suplimentare. Grupa de vârstă cuprinsă între 51 și 65 de ani a avut cea mai scăzută rată de metastazare și nu a prezentat deloc metastaze cutanate, dar este guvernată de prezența metastazelor pulmonare și pleurale cu o prevalență ridicată la bărbați și parțial corelată pozitiv cu numărul de neutrofile. Corelația inversă între metastazele cerebrale și numărul de neutrofile sugerează un rol protector al neutrofilelor circulante împotriva dezvoltării metastazelor cerebrale în acest grup de vârstă. Date divergente în aceste două subgrupuri de vârstă legate de apariția neutrofilelor/metastazelor cerebrale sugerează prezența unei mari heterogenități a neutrofilelor cu un rol dual, în funcție de vârstă și poate de alți factori care nu au fost raportați anterior. Grupul de pacienți vârstnici (66-85 de ani) a fost singurul grup cu cel mai mare procent de multiple site-uri de metastaze, dar și unde neutrofilele și trombocitele sunt foarte corelate, sugerând un risc mai mare de tromboză. Am demonstrat că interacțiunea tumoră-stromă în ccRCC depinde de expresia CLIC1, care pare să acționeze ca un mediator pentru comunicarea dintre celulele tumorale și stroma tumorală. Prin evaluarea comparativă a cazurilor pozitive și negative pentru TLS, am găsit diferențe semnificative legate de metastazele nodale și la distanță, care au fost influențate de expresia CLIC1 în celulele tumorale. MVD CLIC1 pentru vasele de sânge peritumorale a fost puternic corelat cu modelul de expresie CLIC1 în tumoră, care a influențat de asemenea dimensiunea și invazia locală a tumorii. Acest aspect depindea foarte mult de modelul CLIC1, în special atunci când CLIC1 era exprimat la nivelul membranei celulelor tumorale. Lipsa TLS în stroma a favorizat puternic metastazele nodale și la distanță.