

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL II – HISTOLOGIE

NOVĂCESCU DORIN



TEZĂ DE DOCTORAT

MARKERI NUCLEARI ÎN CARCINOMUL RENAL

REZUMAT

Conducător Științific
PROF. UNIV. DR. RAICA MARIUS

Timișoara
2022

CUPRINS

| | |
|---------------------------------|------|
| Lista lucrărilor publicate..... | V |
| Lista abrevierilor..... | VI |
| Indexul figurilor..... | VII |
| Indexul tabelor..... | VIII |
| Mulțumiri..... | IX |
| INTRODUCERE..... | XI |

PARTEA GENERALĂ – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

| | |
|--|----|
| 1. Diagnosticul clinic al carcinomului renal..... | 1 |
| 1.1. Semiologie și evoluție naturală | 1 |
| 1.2. Rolul imagisticii multimodale în evaluarea clinică | 5 |
| 2. Diagnosticul contemporan de certitudine al carcinomului renal..... | 9 |
| 2.1. Colorații convenționale și evaluare morfologică | 9 |
| 2.2. Rolul imunohistochimiei în diagnosticul differential | 10 |
| 2.3. Patologia moleculară a carcinomului renal și aplicații clinice emergente pentru evaluarea prognosticului | 13 |
| 3. Analiza perspectivelor viitoare privind biomarkerii nucleari ai carcinomului renal | 20 |
| 3.1. Expresia Ki-67 și prognosticul carcinomului renal..... | 20 |
| 3.2. Expresia antigenului Wilm's tumor 1 în carcinomul renal la adult | 23 |
| 3.3. Dimerii de pirimidină și carcinogeneza carcinomului renal..... | 26 |

PARTEA SPECIALĂ

| | |
|--|----|
| 1. Obiective științifice..... | 31 |
| 2. Material și metodă..... | 34 |
| 2.1. Stratificarea cohortei globale de carcinoame renale | 35 |
| 2.2. Procesarea tisulară, evaluarea morfologică și selecția cazurilor..... | 37 |
| 2.3. Imunohistochimia țintită | 39 |

| | |
|---|-----|
| 2.4. Analiza statistică a subpopulațiilor relevante de carcinom renal imunoreactiv | 43 |
| 3. Rezultate | 45 |
| 3.1. Modele de expresie pentru WT1 în carcinomul renal la adult | 45 |
| 3.2. Imunoreactivitatea carcinomului renal pentru dimeri de timină | 50 |
| 3.3. Analiza modelelor de expresie pentru Ki-67 în carcinomul renal | 62 |
| 4. Discuții | 72 |
| 4.1. WT1, carcinomul renal la adult și tranziția epitelial-mezenchimală | 72 |
| 4.2. Noul model de expresie a dimerilor de timină în carcinomul renal | 94 |
| 4.3. Ki-67 ca biomarker prognostic în carcinomul renal | 105 |
| 5. Concluzii și contribuții personale | 108 |
| BIBLIOGRAFIE | 112 |
| ANEXE | I |

REZUMAT

Actuala teză de doctorat include o parte generală, teoretică, și o parte specială, compusă din trei articole originale distincte, publicate anterior în reviste științifice de specialitate. Partea teoretică se axează pe colectarea și integrarea datelor relevante disponibile în literatură, în vederea caracterizării adecvate a contextului contemporan, respectiv a motivației științifice, pentru investigațiile retrospective subsecvente, incluse în partea specială, care documentează, utilizând imunohistochimia (IHC), expresia unor noi biomarkeri cheie în carcinomul renal (RCC), și anume: antigenul WT1, dimerii de timină (TDs) și Ki-67. Pentru a atinge acest obiectiv, a fost elaborată o analiză cuprinzătoare a definițiilor clinice ale RCC, semiologiei și modalităților imagistice disponibile actualmente pentru detectarea și evaluarea clinică a RCC, diagnosticul diferențial anatomopatologic și de certitudine al RCC, subtiparea și evaluarea prognosticului. De asemenea, se evaluează instrumentele clinice emergente pentru screening-ul RCC, stratificarea riscului și predicția răspunsului terapeutic, identificându-se, totodată, lacunele existente în cunoștințele actuale și definindu-se noi direcții de cercetare promițătoare. Ulterior, partea specială adresează aceste subiecte de cercetare emergente, subliniate în partea generală, prin evaluarea modelelor de imunoexpresie în RCC a biomarkerilor cheie mai sus menționați, care au fost documentați ca fiind subinvestigați, însă posibil utili pentru îmbunătățirea managementului clinic și a rezultatelor terapeutice în RCC..

Investigarea imunoexpresiei WT1 în RCC la adulți (aRCC) a permis elaborarea și publicarea a 2 articole originale, în timp ce un al treilea articol suplimentar, făcut public recent, documentează, pentru prima dată, modele noi de expresie pentru TDs în RCC. Rezultatele investigației Ki-67 sunt actualmente în faza de analiză statistică, urmând să fie curând publicate de asemenea. Așadar, teza actuală evaluează prezența și modelele de imunoexpresie pentru antigenul WT1, ca indicator al tranziției epitelial-mezenchimale în aRCC, respectiv, pentru TDs, ca leziuni genomice nou documentate în țesutul tumoral al RCC.

Populația globală de studiu tezei actuale cuprinde o serie consecutivă de 134 de cazuri de RCC, tratate chirurgical în cadrul Secției de Urologie a Spitalului Județean Arad, în perioada 2015-2018. Toți pacienții au fost operați per primam (nefrectomie parțială sau radicală), fără a se administra terapie sistemică

neoadjuvantă în prealabil. Piese native de exereză rezultante au fost prelucrate adițional și fixate în blocuri parafină, în cadrul Departamentului local de Morfopatologie. Pentru cazurile incluse în această populație globală de studiu, am colectat toate datele clinice relevante disponibile. Trebuie însă menționat faptul că această bază de date, alături de probele biologice aferente, a fost construită treptat, de-a lungul ultimilor 4 ani, de la debutul actualei inițiative de cercetare. Astfel, investigațiile noastre inițiale, care vizează imunoexpresia WT1, respectiv TDs, au evaluat doar 90 de probe de RCC, din 2016-2017, deoarece restul probelor de RCC nu fuseseră încă obținute. Așadar, deși subpopulațiile individuale de RCC, definite pentru fiecare biomarker, sunt derivate din aceeași cohortă globală de cazuri de RCC, acestea nu sunt omogene. De asemenea, menționăm faptul că blocurile de parafină au fost secționate în repetate rânduri, inițial pentru investigația WT1, iar apoi pentru cea a TDs. În consecință, chiar dacă în cadrul ambelor investigații, au fost evaluate aceleași probe tisulare de RCC, din cauză procesului de secționare repetată, lamelele histologice rezultate au demonstrat variabilitate în ceea ce privește prezența țesutului renal sănătos adiacent tumorii, criteriul central de includere în studiu pentru ambele investigații. Implicit, subpopulațiile finale de RCC incluse în fiecare investigație nu au fost indentice, cazuistica suprapunându-se doar parțial. Ulterior, alte 44 de cazuri de RCC, tratate în aceeași clinică, în 2015 și/sau 2018, au devenit disponibile și au fost incluse în investigația imunoexpresiei Ki-67.

După deparafinarea preliminară, lamelele de RCC rezultate au fost colorate convențional cu hematoxină-eozină (HE), în mod automat, folosind Leica Autostainer XL și apoi reevaluate morfologic. Principalul criteriu de includere pentru imunocolorația WT1 a fost prezența țesutului renal sănătos în imediata vecinătate a tumorii pe secțiunile colorate HE, întrucât expresia podocitară a WT1 în corpusculii renali normali a reprezentat controlul pozitiv intern al imunoreacției WT1. În schimb, pentru imunoreacția TDs, controlul pozitiv a fost extern, fiind reprezentat de multiple probe in vivo de țesut cutanat sănătos. Chiar și așa, includerea în populația de studiu a investigației ce vizează imunoreactivitatea TDs a necesitat în continuare aceeași prezență obligatorie a țesutului renal sănătos în imediata vecinătate a tumorii pe secțiunile colorate HE deoarece, ca și în cazul RCC, expresia TDs în țesutul renal sănătos nu a fost investigată până acum. Criteriile de includere în studiu pentru analiza imunoreactivității Ki-67 au fost: prezența de țesut tumoral RCC viabile, fără artefacte și/sau zone extinse de necroză. Pentru investigația Ki-67, controlul pozitiv al

imunoreacției a fost de asemenea extern. Am folosit același protocol ca pentru evaluarea TDs și am procesat probe adiționale de țesut cutanat sănătos in vivo. Epidermul a fost constant pozitiv în straturile bazale și parabazale pentru Ki-67. Spre deosebire de investigațiile anterioare, o imunoreacție Ki-67 pozitivă a fost considerată valabilă numai atunci când produsul final de reacție a fost strict nuclear, fără colorare citoplasmatică.

După constituirea subpopulațiilor de cazuri de RCC, distince și specifice fiecărei investigații individuale, probele biologice au fost prelucrate în continuare, în vederea obținerii imunocolorațiilor țintite, după cum urmează: 56 de cazuri colorate pentru WT1; 54 de cazuri pentru TDs; 120 de cazuri pentru Ki-67. După evaluarea preliminară, pentru fiecare investigație individuală, cazurile care au îndeplinit criteriile de includere au fost clasificate în continuare, pe baza morfologiei și a arhitecturii tumorale predominante. Investigațiile WT1 și TDs au utilizat sistemul de clasificare clasic al subtipurilor convenționale de RCC: 1 – celule clare (ccRCC), 2 – papilar (pRCC) și 3 – cromofob (chRCC), adăugându-se însă subtipul 4 - RCC cu dediferențiere sarcomatoidă (svRCC), ca entitate raportată separat. Pentru Ki-67, s-a făcut o distincție morfologică suplimentară, în cadrul subgrupului ccRCC, între variantele solide și microchistice. În cadrul tuturor investigațiilor, a fost evaluată agresivitatea celulară, pe baza trăsăturilor nucleare predominante, cuantificate folosind sistemul de clasificare WHO/ISUP 2017 (G1/G2/G3/G4).

Colorațiile imunohistochimice țintite au fost realizate în manieră automatizată, folosind aparatul Bond Max autostainer (Leica Biosystems), iar anticorpii primari utilizați au fost: pentru WT1 - clona WT49 (ready to use, monoclonal, N-terminus targeted, Leica Biosystem, Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne); pentru TDs - clona KTM53 (monoclonal mouse antihuman thymine dimer clone, diluție 1:10.000, Kamiya Biomedical Company, Seattle, WA); pentru Ki-67 - clona MM1 (mouse anti-human Ki67 antigen monoclonal antibody, Leica Biosystem, Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne).

Densitatea imunoreactivității WT1 fost evaluată și raportată pentru toate cazurile de RCC incluse în studiu, utilizând următorul protocol: 0 - imunoreacție WT1 absentă; +1 - <2% celularitate tumorală pozitivă; +2 - <10% celularitate tumorală pozitivă; +3 - >10% celularitate tumorală pozitivă. Atât imunoreacția nucleară, cât și cea citoplasmatică, au fost incluse în definiția pozitivității pentru WT1. De asemenea, imunoreacțiile WT1 au fost caracterizate calitativ, în ceea ce privește intensitatea și

omogenitatea colorației, prin comparație cu controlul pozitiv intern (podocitele): slab, moderat și intens.

Imunoreacțiile nucleare pentru TDs au fost caracterizate prin multipli parametri, pornind de la distincția fundamentală între localizările celularității pozitive (în țesutul tumoral vs. în țesutul renal sănătos adiacent tumorii). Prezența imunoreactivității pentru TDs în țesutul tumoral, a fost documentată printr-un parametru simplu de expresie, tip „da/nu” (TD+/-), fiind ulterior caracterizată suplimentar prin valorile scorurilor de cuantificare: cantitativ (SQ), calitativ (SI), și cumulativ (ST) - suma valorilor celor două scoruri anterioare ($ST = SQ + SI$). Scorul SQ reflectă densitatea pozitivității pentru TDs a țesutului tumoral, iar valorile sale sunt definite într-un câmp microscopic la mărirea de x400, după cum urmează: 0 - negativ pentru TDs; +1 - 1%-10% nucleu pozitiv; +2 - 11%-25% nucleu pozitiv; +3 - >26% nucleu pozitiv. Scorul SI reflectă calitatea imunoreacției pentru TDs în țesutul tumoral, iar valorile sale sunt definite astfel: 0 - negativ pentru TDs; +1 - reacție slabă, mai puțin intensă decât controlul extern; +2 - reacție moderată, intensitate similară cu controlul extern; +3 - reacție puternică, mai intensă decât controlul extern. În mod similar, în ceea ce privește imunoreactivitatea pentru TDs în țesutul renal sănătos adiacent tumorii, un parametru de expresie simplificat tip „da/nu” (HKE+/-) a fost utilizat pentru cuantificarea pozitivității. Localizarea tisulară a acestor celule renale sănătoase pozitive pentru TDs, adică expresia tubulară (HTE) și/sau expresia stromală/endotelială (HSE), a fost raportată în aceeași manieră simplificată („da/nu”).

Pentru Ki-67, densitatea imunoreacției pozitive a fost cuantificată după cum urmează: 0 - <1% celule cu nucleu pozitiv; +1 - 2-10% nucleu pozitiv; +2 - 11-25% nucleu pozitiv; +3 - >20% nucleu pozitiv. Evaluarea menționată mai sus s-a efectuat pe câmp microscopic la mărirea de x200. De asemenea au fost evaluate anizocariile (absente - 0, ușoare - 1, moderate - 2, severe - 3). Mitozele observate pe secțiuni colorate pentru Ki-67 au fost evaluate ca absente (0), rare (1-2/câmp), medii (3-5/câmp) și frecvente (peste 5/câmp).

Analiza statistică a cohorței de cazuri de RCC evaluate pentru expresia de TDs s-a realizat utilizând software-ul SPSS v.27 (IBM, Chicago, Illinois, SUA), pe un sistem de operare Microsoft Windows. Investigația expresiei WT1 a raportat un număr foarte limitat de cazuri pozitive. Prin urmare, analiza statistică a fost considerată inutilă. Cohorta de RCC pozitivă pentru Ki-67 este momentan încă în curs de evaluare statistică, însă rezultatele vor fi cu siguranță publicate în curând in extenso.

Dintre cele 56 de cazuri de RCC, considerate viabile pentru imunocolorația WT1, 38 au fost ccRCC, 8 pRCC, 3 chRCC și 7 svRCC. Evaluarea nucleară a acestor tumori a stratificat adițional cohorta: G1 – 21, G2 – 23, G3 – 4 și G4 – 8. Țesutul renal normal, adiacent tumorii, a manifestat în mod constant, pentru toate cazurile evaluate, imunoreacție nucleară WT1 a podocitelor și, de asemenea, a celulelor epiteliale ce alcătuiesc foița parietală a capsulei Bowman. Produsul final de reacție a demonstrat, în mod constant, o colorație maronie intensă, pentru controlul intern pozitiv menționat mai sus. În 5 cazuri de RCC (8,92%), negative pentru WT1 intratumoral, am identificat la nivelul capsulei renale, dar nu și în pseudocapsula tumorală, numeroase celule stromale intens pozitive pentru WT1 (fibroblaști/miofibroblaști), situate la o distanță semnificativă de țesutul tumoral. În mod similar, în 3 cazuri de RCC cu țesut tumoral negativ pentru WT1, celulele endoteliale intratumorale au manifestat imunoreactivitate nucleară pentru WT1. Așadar, din cohorta de 56 de cazuri de RCC evaluate pentru imunoexpresie WT1, 49 au demonstrat absența imunoreactivității tumorale pentru WT1. Toate cele 7 cazuri pozitive pentru WT1 intratumoral au fost subtipul ccRCC și au manifestat imunoreacția la nivel nuclear exclusiv. Dintre acestea, doar 2 cazuri au avut o densitate mare de celule tumorale pozitive (+3). Intensitatea colorației produsului final de reacție, din nucleii tumorali pozitivi, a fost similară, per ansamblu, cu cea a controlului pozitiv intern (podocitele) sau mai mare, cu excepția celor 2 cazuri cu densitate mare a celulelor tumorale pozitive, care au manifestat o intensitate mai mică decât controlul.

Cohorta de cazuri de RCC selectate pentru investigația imunoexpresiei TDs, a fost compusă din 39 ccRCC, 8 pRCC, 4 chRCC și 3 svRCC. Clasificarea nucleară a nuanțat adițional stratificarea riscului pentru aceste cazuri: G1 - 15, G2 - 26, G3 - 9 și G4 - 4. Imunoreacția țintită utilizată pentru TDs a fost validată de controlul pozitiv extern utilizat, și anume multiple eșantioane de țesut cutanat indemn, recoltate in vivo. Aceste eșantioane nu au fost expuse suplimentar la radiație ultravioletă (UVR), în afara expunerii lor inerente din mediul natural, nici înainte, nici după recoltarea biopsiilor tisulare. După cum era de așteptat, chiar dacă aceste eșantioane cutanate netratate au fost în mare parte negative pentru TDs, zone sporadice imunoreactivitate difuză nucleară pentru TDs au fost întâlnite, cu precădere la nivelul epidermului bazale, glandelor sudoripare și celularității endoteliale stromale. Produsul final de reacție a prezentat, în mod constant, o colorație maronie intensă, exclusiv nucleară,

pentru controlul extern pozitiv mai sus menționat, atingând intensitate maximă în epiderm - straturile celulare bazale/parabazale.

În mod remarcabil, din cele 54 de tumori evaluate, 42 (77,8%) au fost pozitive, manifestând imunoexpresie nucleară pentru TDs în țesutul tumoral. Mai departe, se raportează documentarea completă a parametrilor de cuantificare a imunoreacției pentru TDs. În timpul evaluării microscopice a probelor de RCC pozitive pentru TDs, am identificat două modele principale de distribuție a imunoexpresiei TDs în țesutul tumoral, și anume: 1) expresie heterogenă a TDs, cu densitate și intensitate moderată până la mare, concentrată la nivelul frontului de proliferare și/sau de-a lungul zonei de tranziție, între tumoră și țesutul renal sănătos, dar inconsistent în zonele tumorale mai centrale; 2) expresie omogenă, difuză și de intensitate mare a TDs, majoritatea celularității țesutului tumoral fiind pozitivă.

Aceste două modele predominante, aparent organizate și recurente, ale imunoreactivității nucleare pentru TDs, din rândul populației de RCC evaluate, au fost observate, cel puțin parțial, în țesutul tumoral al majorității (33 de probe), dintre cele 42 de cazuri de RCC analizate și pozitive pentru TDs, cu valori moderate/mari ale scorului cumulativ ($ST \geq 3$). Adițional, un al treilea model de distribuție a imunoreactivității pentru TDs, dezorganizat, aparent aleatoriu, cu densitate scăzută ($SQ = +1$) și intensitate variabilă ($SI = +1/+2$), a fost de asemenea întâlnit, însă mai rar. Pentru 9 dintre tumorile pozitive pentru TDs, s-a raportat o imunoreacție nucleară slabă, prezentă în doar câteva cuiburi izolate de celule tumorale, cu celularitate stromală tumorală în mare parte negativă, expresia nucleară a TDs fiind distribuită în mod aleatoriu intratumoral. Țesutul renal sănătos adiacent este, de asemenea, în general negativ în acest al treilea model de distribuție, excepție făcând 2 dintre cazurile de RCC evaluate, care au demonstrat imunoexpresie pentru TDs atât în țesutul tumoral, cât și în țesutul sănătos adiacent (celule tubulare).

Primul model de distribuție, cu imunoreactivitate heterogenă pentru TDs, observat în evaluarea probelor de RCC cu țesut tumoral pozitiv, nu este menținut în zonele tumorale mai centrale și nici în mod constant de-a lungul frontului de proliferare, de altfel. Celularitatea RCC TD-pozitivă dominantă, cu intensitate moderată, poate fi observată în frontul de proliferare mai activ mitotic. Cu toate acestea, în apropierea zonei de tranziție propriu-zise, între țesutul tumoral și țesutul renal sănătos adiacent, au fost observate două variante conformaționale. Fie,

imunoreacția pentru TDs se poate extinde în tubii renali sănătoși din apropierea tumorii, fie țesutul sănătos adiacent tumorii își pierde expresia de TDs cu totul.

În ceea ce privește stroma tumorală pozitivă pentru TDs, multiple linii celulare care au demonstrat imunoreactivitate nucleară. Stroma tumorală pozitivă pentru TDs a fost mai prevalentă în subgrupul cu distribuție omogenă a imunoreactivității în țesutului tumoral și a favorizat zonele de tranziție tumoră-țesut sănătos, mai ales când se demonstrează infiltrat inflamator abundent pe HE, la acest nivel. Au fost identificate celule stromale pozitive (fibroblaști) și, difuz, în celule imune reactive, în principal macrofage, care se învecinează de obicei cu celulele tumorale pozitive. Ca observație izolată, am întâlnit un vas arterial intratumoral pozitiv pentru TDs, imunoreactiv atât la nivelul endoteliului, cât și la nivelul miocitelor parietale. În plus, am identificat un total de 20 de specimene RCC (37%), cu celularitate pozitivă pentru TDs, în țesutul renal sănătos adiacent tumorii, iar 2 dintre aceste cazuri nu au manifestat celularitate tumorală pozitivă.

A fost efectuată o analiză statistică a cohorței de RCC inclusă în studiul expresiei TDs. Am efectuat testele Chi-Pătrat și Fisher pentru a analiza proporțiile dintre subgrupurile de RCC, pozitive, respectiv negative pentru TDs. Prin Student's t-test, s-au determinat diferențele medii ale variabilelor continue distribuite normal. Coeficientul de corelație Spearman a fost calculat pentru a determina dacă există asocieri semnificative între variabilele studiate. Nivelul de semnificație necesar a fost mai mic sau egal cu 0,05. Nu au fost observate diferențe semnificative statistic între loturile de studiu. Majoritatea tumorilor pozitive pentru TDs, 18 probe (42,8%), au avut densitate celulară moderată (SQ=+2). Cea mai răspândită valoare a scorului calitativ, atribuită la 19 probe (45,2%), a fost de asemenea moderată (SI=+2). Scorul cumulativ variază, cu valori de la +2 la +6, cu o prevalență ridicată pentru valorile medii: 3 (26,2%), 4 (28,6%) și 5 (23,8%). Analiză ulterioară a corelației variabilelor, folosind corelația lui Spearman, a demonstrat că, de fapt, parametrul mai simplist, tip „da/nu” (TD+/-), care cuantifică prezența TDs în țesutul tumoral, manifestă o corelație negativă moderată, semnificativă statistic, cu stadiul RCC la diagnostic, în timp ce scorurile de expresie mai sofisticate (SQ,SI,ST), nu manifestă corelații semnificative statistic cu niciunul dintre parametrii clinici de prognostic bine-cunoscuți pentru RCC, incluși în analiză. Astfel, aparent, expresia TDs asociază un stadiu redus al RCC la diagnostic. Această corelație necesită validare suplimentară,

deoarece studiul actual evaluează un eșantion mic de RCC, din care ~80% au un stadiu TNM scăzut la diagnostic (1 sau 2).

Interesant este faptul că parametrul simplu „da/nu” pentru cuantificarea expresiei TDs în țesutul renal sănătos adiacent tumorii (HKE), a manifestat corelații pozitive moderate, semnificative statistic, cu toți parametri individuali colectați pentru imunoreacția țintită a țesutului tumoral, cu excepția parametrului TD+/-, tip „da/nu”, pentru prezența expresiei tumorale a TDs. În mod surprinzător, singura asociere semnificativă statistic identificată pentru HSE este cu cN, și anume o corelație pozitivă moderată între aceste două variabile, ceea ce înseamnă că expresia stromală/endotelială a TDs în țesutul renal adiacent tumorii poate fi un marker predictiv pentru diseminarea limfatică în RCC. Această afirmație prezintă în mod evident necesitatea de a fi validată. În primul rând, corelația nu echivalează cu cauzalitatea și, în al doilea rând, analiza statistică a fost făcută pe un subgrup mic de cazuri, dintre care doar un caz a prezentat HSE pozitiv, însă într-adevăr cu confirmarea anatomopatologică a diseminării limfatice retroperitoneale.

În cadrul investigației imunoexpresiei Ki-67, din cele 134 de cazuri de RCC eșantionate, am identificat leziunea tumorală în 120 de cazuri, doar 73 de cazuri incluzând interfața RCC/țesut renal normal pe secțiunea evaluată. Astfel, doar 120 de cazuri de RCC au putut fi incluse în cohorta de studiu pentru Ki-67. Majoritatea cazurilor au fost ccRCC (98 de cazuri). Printre aceste ccRCC, s-a observat existența unui subgrup de tumori cu aspect microchistic, adică multiple microchisturi și sufuzii hemoragice, cu celule tumorale dispuse în insule și cuiburi. Astfel, aceste morfologii au constituit o subpopulație distinctă, de ccRCC microchistic (9 cazuri), diferită de ccRCC solide (restul de 89 de cazuri). În plus, am identificat 11 pRCC (pRCC tip 1 - 4 cazuri și pRCC tip 2 - 7 cazuri), 6 chRCC și 5 svRCC. Gradingul nuclear a clasat 5 cazuri ca G1, 58 ca G2, 50 ca G3 și 7 ca G4.

În ceea ce privește țesutul renal adiacent tumorii, foarte rare celule, cu nuclei pozitivi pentru Ki-67, au fost observate la nivelul mezangiului, sistemului tubular al nefronului și ca elemente izolate din infiltratul inflamator, dacă acesta a fost prezent. La toate cazurile au fost sub 1% celule cu nuclei pozitivi, indiferent de tipul lor microscopic. Reacția pentru Ki-67 în celulele tumorale a fost diferită ca densitate și intensitate de la un caz la altul, și a fost caracterizată prin heterogenitate marcată, unele zone fiind caracterizate prin aglomerări majore de nuclei pozitivi. Pozitivarea pentru Ki67 a fost mai evidentă la periferia tumorii, în imediata vecinătate a frontului de

proliferare. De asemenea, un număr mare de celule pozitive a fost observat în vecinătatea vaselor sanguine de neoformație. Practic, fiecare caz a prezentat valori definite ale indexului de proliferare, și astfel Ki-67 devine un marker individual de prognostic.

Un număr de 12 cazuri au fost negative pentru Ki-67, în sensul că nu au prezentat celule cu nucleu pozitiv în aria tumorală. La cazurile la care mitozele au fost absente și anizocariile prezente, rata de proliferare a Ki-67 a fost de obicei încadrată între 2 și 10%. Prezența mitozelor și a anizocariilor marcate se asociază cu index de marcaj Ki-67 crescut. Am observat densitate mai mare de celule Ki-67 pozitive în ariile tumorale din vecinătatea frontului de proliferare și a celor localizate în vecinătatea infiltratului inflamator cronic, prezent uneori în aria tumorală. Tumorile cu densitate mare de celule cu nucleu Ki-67 pozitiv au fost de grad G2, G3 și G4, și nu am obținut corelație statistic semnificativă între aceste două elemente. Cele mai frecvente cazuri notate cu +3 la imunoreacția pentru Ki-67 au fost conform așteptărilor, carcinoamele slab diferențiate, sarcomatoide. Surprinzător, am obținut valori foarte mici la carcinoamele papilare. Valori medii ale indexului de proliferare au fost observate în ccRCC varianta solidă și în chRCC. Varianta microchistică de ccRCC a prezentat doar rare celule pozitive, majoritatea notate cu +1.

Privind retrospectiv, WT1 este o genă complexă, cu o multitudine de izoforme transcripționale, care acționează asupra unui sistem la fel de complex de căi de semnalizare moleculară. Datele privind expresia proteinei WT1 în aRCC sunt destul de limitate și foarte inconsecvente. Diverși anticorpi pentru IHC, care țintesc zone diferite ale proteinei WT1 (C-/N-terminus), au demonstrat diferite rate de imunoreactivitate, respectiv modele de distribuție. În investigația noastră, am folosit, pentru prima dată, clona WT49, un anticorp anti-WT1 N-terminus recent, pentru a evalua expresia proteinei WT1 pe o cohortă de aRCC (cea mai mare raportată până în prezent). Spre deosebire de datele existente, în ciuda includerii reacției citoplasmice în definiția pozitivității pentru WT1, raportăm exclusiv imunoreacții nucleare anti-WT1 cu clona WT49, însă, totodată, cea mai mare rată de pozitivitate nucleară WT1 în aRCC de până acum (12,5%). Analize suplimentare, comparative, ale mai multor anticorpi disponibili comercial sunt esențiale pentru a standardiza cuantificarea expresiei proteinei WT1, în aRCC și numeroasele sale subtipuri.

Reprezentând prima investigație de acest gen, a doua noastră analiză imunohistochimică s-a concentrat pe evaluarea expresiei TDs în țesutul tumoral al

probelor de RCC și în țesutul renal sănătos adiacent tumorii, folosind un anticorp monoclonal anti-TDs, clona KTM53. Rezultatele noastre ilustrează o nouă și pronunțată asociere între RCC și o leziune genomică mutagenă de mare semnificație biologică, despre care se credea anterior că apare exclusiv în timpul expunerii la UVR. Din cele 54 de specimene de RCC evaluate, 77,8% au prezentat expresie nucleară intratumorală pentru TDs și 37% în parenchimul renal sănătos adiacent tumorii. A fost elaborat un raport cuprinzător privind parametrii de cuantificare, cantitativi și calitativi, ai imunoreacției nucleare pentru TDs. De asemenea, raportăm identificarea a două modele principale de distribuție a imunoreactivității intratumorale pentru TDs în RCC. O analiză moleculară riguroasă suplimentară este necesară pentru a înțelege/valida pe deplin semnificația biologică a acestei expresii nou documentate a TDs în RCC.

În cea mai recentă investigație întreprinsă, am studiat rata de proliferare a celulelor tumorale în RCC, utilizând comparativ evaluarea morfologică și imunoexpresia Ki-67. Rezultatele preliminare arată o rată relativ scăzută de proliferare celulară în cadrul tumorilor evaluate. În schimb, variantele morfologice microchistice ale ccRCC și pRCC au asociat, în mod constant, expresie crescută de Ki-67. Cu toate acestea, imunoreactivitatea Ki-67 nu s-a corelat cu gradul de diferențiere a RCC. În aceste condiții, Ki-67 ar putea fi un marker de prognostic individual și de apreciere a eficienței terapiei cu inhibitori ai factorilor de creștere umanizați. Datele noastre susțin aplicarea metodei de identificare a Ki-67 în cadrul panelului de anticorpi utilizați pentru diagnosticul și prognosticul tuturor tumorilor renale.

În concluzie, dincolo de limitările identificate și de lipsa de validare a rezultatelor tezei actuale, investigațiile imunohistochimice întreprinse au permis incursiuni teoretice provocatoare, într-un univers molecular nou și fundamental redefinit, deși încă speculativ, care implică abateri importante de la definițiile tradiționale ale carcinogenezei în RCC. Schimbările de perspectivă propuse de rezultatele imunohistochimice, trebuie obligatoriu validate prin analize genetice riguroase suplimentare. Acestea fiind spuse, considerăm importante noile direcții de cercetare identificate, având potențialul de a contribui semnificativ la identificarea aplicațiilor clinice ideale pentru aceste instrumente moleculare promițătoare, biomarkerii asociați RCC. Dacă nu altceva, aceste experimente de gândire privind patogenеза RCC, aduc o contribuție inerentă prin perspectiva lor unică, stimulând dezbaterea științifică, însă acceptând totodată faptul că premisele moleculare noi pe care sunt fondate, sunt încă nevalidate.