

I.O.S.U.D. UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA  
ȘCOALA DOCTORALĂ U.M.F CRAIOVA

**TEZĂ DE DOCTORAT**

**ROLUL TRANZIȚIEI EPITELIO-MEZENCHIMALE ÎN PROGRESIA  
CARCINOAMELOR RENALE CU CELULE CLARE**

COORDONATOR ȘTIINȚIIFIC:

**Prof. univ. dr. CRISTIANA EUGENIA SIMIONESCU**

DOCTORAND:

**BIANCA CĂTĂLINA NAIDIN (ANDREIANA)**

**CRAIOVA 2019**

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b> .....	1
<b>STADIUL CUNOAȘTERII</b> .....	1
<b>CAPITOLUL I. Epidemiologia și factorii de risc ai carcinomului renal cu celule clare</b> .....	1
I.1. Epidemiologia carcinomului renal cu celule clare.....	1
I.2. factori de risc ai carcinoamelor renale cu celule clare.....	1
<b>CAPITOLUL II. Carcinogeneza carcinomului renal cu celule clare</b> .....	1
II.1. Gene implicate în carcinomul renal ereditar.....	1
II.2. Căi de semnalizare.....	1
<b>CAPITOLUL III. Rolul tranziției epitelio-mezenchimale în carcinoamele renale cu celule clare</b> .....	2
III.1. Rolul tranziției epitelio-mezenchimale în carcinogeneză.....	2
III.2. Rolul tranziției epitelio-mezenchimale în CRCC .....	2
<b>CERCETĂRI PERSONALE</b> .....	2
<b>SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI</b> .....	2
<b>CAPITOLUL IV. Material și metode</b> .....	2
IV.1. Materialul studiat.....	2
IV.2. Metode utilizate în cercetare.....	3
<b>CAPITOLUL V. Rezultate</b> .....	3
V.1. Studiul clinico-epidemiologic al carcinoamelor renale cu celule clare.....	3
V.2. Studiul morfologic al carcinoamelor renale cu celule clare.....	3
V.3. Studiul imunohistochimic al carcinoamelor renale cu celule clare.....	3
<b>CAPITOLUL VI. Discuții</b> .....	4
VI.1. Discuții asupra studiului histopatologic.....	4
VI.2. Discuții asupra studiului imunohistochimic.....	4
<b>CAPITOLUL VII. Concluzii</b> .....	5
<b>BIBLIOGRAFIE</b> .....	7

## INTRODUCERE

În ultima perioadă, tranziția epitelio-mezenchimală (TEM) a primit o atenție copleșitoare, existând numeroase rapoarte științifice care s-au preocupat de modificările genelor și expresia ARNm, proteină compatibilă cu TEM și de posibila corelare a acestora cu invazia tumorală, prognosticul și metastazarea.

TEM este un process biologic prin care celulele epiteliale își pierd polaritatea și contactul celulă-celulă și capătă fenotip mezenchimal [340]. Procesul se caracterizează prin pierderea markerilor epiteliali și supraexpresia celor mezenchimali, având astfel rol cheie în procesul de invazie și metastazare [133, 316]. Acest proces implică reprogramarea moleculară a celulei interesate, prin scăderea expresiei E-caderinei, care menține adeziunea celulă-celulă și reorganizarea citoscheletului, cu creșterea expresiei N-caderinei sub acțiunea unor factori de transcripție, precum SNAIL, SLUG, TWIST1 și ZEB1.

Cuvinte cheie: CRCC, AE1/AE3, Vimentină, E-caderină, N-caderină, P-caderină, SNAIL, SLUG, TWIST1, ZEB1, Fibronectină.

## STADIUL CUNOAȘTERII

### **CAPITOLUL I. Epidemiologia și factorii de risc ai carcinomului renal cu celule clare**

Carcinomul renal (CR) reprezintă 4% dintre malignitățile adulților [369], și este al treilea cel mai frecvent tip de tumoră cu localizare urologică, după carcinomul de prostată și cel de vezică urinară. La nivel global incidența CR, rata incidenței și a mortalității variază substanțial, fiind mai mare în țările dezvoltate față de cele în curs de dezvoltare [210].

Cauzele CR includ 3 factori majori de risc: fumatul, obezitatea și hipertensiunea. În timp ce studiile epidemiologice au stabilit că fiecare dintre acești factori are conexiune etiologică cu CR, mecanismele prin care acționează și interacțiunile dintre ei nu au fost decât parțial elucidate [257].

### **CAPITOLUL II. Carcinogeneza carcinomului renal cu celule clare**

Carcinogeneza renală include intervenția a numeroase căi de semnalizare. Fiecare dintre cele 7 gene cunoscute pentru implicarea în patogenia CR: VHL (von Hippel-Lindau), MET (gena

care codează proteina tirozin-kinază), FLCN (foliculină), TSC1 (complexul scleroză tuberoasă 1), TSC2 (complexul scleroză tuberoasă 2), FH (fumarat hidratataza) și SDHB (succinat dehidrogenaza B), sunt implicate în căi de semnalizare care răspund la stresul metabolic și/sau la stimularea nutritivă [181, 355].

### **CAPITOLUL III. Rolul tranziției epitelio-mezenchimale în prognosticul carcinoamelor renale cu celule clare**

TEM este un proces complex prin care celulele își pierd caracteristicile epiteliale și obțin un fenotip mezenchimal [183]. În procesul TEM, celulele canceroase scapă din situl primar și invadează țesuturi la distanță prin vasele de sânge și limfatice. În plus, fenotipul TEM este adesea însoțit de scăderea nivelului markerilor epiteliali E-caderină și zonula occludens 1 (ZO-1) și creșterea nivelului markerilor mezenchimali și de transcripție, cum ar fi N-caderina, Twist1 și Twist2, care rezultă într-o creștere a motilității [42]. Mai mult decât atât, s-a raportat o asociere între expresia E-caderinei sau vimentinei și progresia tumorală și rata de supraviețuire (OS) într-o varietate de tipuri de cancer, inclusiv cancer pulmonar și carcinom nazofaringian [149]. În plus, s-a descoperit că SLUG și SNAIL scad nivelul E-caderinei prin legarea la promotorul E-caderinei [223].

## **CERCETĂRI PERSONALE**

### **SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI**

Acest studiu își propune evaluarea implicării TEM în carcinogeneza carcinomului renal cu celule clare (CRCC), cu scopul de a identifica posibili factori prognostici și ținte terapeutice. Cercetarea este una de actualitate și obținerea unor corelații semnificative statistic între markerii și factorii de prognostic studiați susține implicarea TEM în carcinogeneza CRCC, precum și aplicabilitatea acestora în prognosticul și terapia pacienților cu CRCC.

### **CAPITOLUL IV. Material și metode**

Studiul a fost unul analitic, retrospectiv și prospectiv, care a cuprins 50 de cazuri de CRCC diagnosticate în perioada 2015-2017.

**Studiul clinico-epidemiologic** a furnizat date privind: anul, sexul, vârsta pacienților și dimensiunea tumorii.

**Studiul histopatologic** a urmărit principalele parametrii histologici ai tumorii: gradul Fuhrman, invazia vasculară, invazia în țesutul adipos; invazia și depășirea capsulei; prezența/absența adenopatiei metastatice, prezența/absența metastazelor la distanță, stadiul tumoral, necroza, transformarea sarcomatoidă și patternul de creștere.

**Studiul imunohistochimic** a urmărit evaluarea expresiei unor markeri implicați în TEM în CRCC, cum sunt AE1/AE3, Vimentină, E-caderină, N-caderină, P-caderină, SNAIL, SLUG, TWIST1, ZEB1, Fibronectină.

Rezultatele obținute au fost supuse analizei statistice și s-au folosit teste statistice pentru evaluarea diferențelor dintre scorurile de imunoreactivitate obținute pentru fiecare caz în parte, considerând diferență semnificativă un nivel  $p < 0.05$ .

## **CAPITOLUL V. Rezultate**

În cadrul studiului clinico-epidemiologic am constatat că majoritatea pacienților au aparținut categoriei de vârstă 60-69 de ani, peste jumătate au fost de sex masculin (64%) și majoritatea cazurilor s-au prezentat la nivelul rinichiului drept (60%).

Analiza histopatologică a indicat că cele mai multe cazuri (17 cazuri, 34%) au corespuns categoriei cu dimensiuni  $> 4\text{cm}$  și  $\leq 7\text{cm}$ , majoritatea a fost reprezentată de CRCC cu grad Fuhrman scăzut 37 de cazuri (74%) și jumătate din cazuri au prezentat pattern mixt (25 de cazuri, 50%). Necroza a fost prezentă în (26 de cazuri, 52%), invazia în țesutul adipos a fost prezentă în 32 de cazuri (64%), iar invazia vasculară a fost prezentă doar în 11 cazuri (22%). Potrivit clasificării pTNM am constatat că cele mai multe tumori au aparținut stadiului tumoral III, cu 30 de cazuri (60%).

Imunoreacția pentru AE1/AE3 a fost identificată în toate cele 50 de cazuri de CRCC analizate imunohistochimic, cu localizare la nivel citoplasmatic, marcajul fiind superior în cazurile cu grad Fuhrman scăzut și stadiu incipient.

Imunoreacția Vimentinei a fost identificată în toate cele 50 de cazuri de CRCC analizate imunohistochimic, cu localizare la nivel citoplasmatic, cu localizare la nivel citoplasmatic, marcajul fiind superior în cazurile cu grad Fuhrman crescut și stadiu avansat.

Imunoreacția pentru E-caderină a fost identificată în 70% din cele 50 de cazuri de CRCC analizate imunohistochimic, cu localizare la nivel citoplasmatic, cu marcaj superior în cazurile cu grad Fuhrman scăzut și stadiu incipient.

Imunoreacția pentru N-caderină a fost identificată în 72% din cele 50 de cazuri de CRCC analizate imunohistochimic, cu localizare la nivel citoplasmatic și membranar și cu SC mai mare în cazurile cu grad Fuhrman înalt.

Imunoreacția pentru P-caderină a fost identificată în 92% din cazuri de CRCC analizate imunohistochimic, cu localizare la nivel citoplasmatic, membranar și nuclear, cu SC mai mare în cazurile cu grad Fuhrman înalt.

Imunoreacția pentru Snail a fost identificată în 92% din cazuri, cu localizare la nivel citoplasmatic, CRCC cu grad Fuhrman scăzut au prezentat un procent mediu de celule marcate de  $19.05 \pm 11.77$ , intensitatea reacțiilor fiind slabă sau moderată.

Imunoreacția pentru SLUG a fost identificată în 96% din cazuri, cu un procent mediu de celule tumorale pozitive mai mare în stadiile incipiente, I și II ( $54.58 \pm 25.97$ ;  $57 \pm 33.27$ ) și intensitatea reacțiilor predominant moderată.

Imunoreacția Twist1 a fost identificată în 90% din cazuri, iar procentul mediu al celulelor imunomarcate a fost mai mare în stadiile avansate III/IV ( $45.64 \pm 23$ ;  $65 \pm 21.79$ ), cu intensitate moderată și crescută.

Imunoreacția ZEB1 a fost identificată în 70% din cazuri, CRCC cu grad Fuhrman scăzut au prezentat un procent mediu de celule tumorale marcate de  $35.51 \pm 22.14$ , intensitatea reacțiilor a fost predominant slabă, cu un SC mediu de 2.35.

Imunoreacția Fibronectinei a fost identificată în 78.33% din cazuri, cu pattern citoplasmatic și nuclear. Marcajul a variat în funcție de gradul nuclear Fuhrman în ceea ce privește procentul de celule imunomarcate și intensitatea acestuia

## **CAPITOLUL VI. Discuții**

CRCC reprezintă aproximativ 65-75% dintre toate cancerurile renale [210]. Datele descrise în literatură arată că această neoplazie malignă are o incidență maximă în decada 6-7 de viață, fiind mai des întâlnită la bărbați [210]. Dimensiunea inițială a tumorii este reflectată în stadializarea TNM și are rol prognostic în CR [58, 270]. Gradul Fuhrman și stadiul tumoral sunt considerați cei mai importanți factori de prognostic în CRCC, mai multe studii indicând sistemul de clasificare

Fuhrman ca pe un factor de prognostic al supraviețuirii, independent de stadiul tumoral [88, 239]. Raportările din literatură confirmă că incidența crescută a invaziei vasculare este asociată cu stadiile tumorale avansate [117]. De asemenea, datele din literatură confirmă rezultatele noastre, în mai multe studii stadiul tumoral fiind corelat cu dimensiunea tumorii, invazia vasculară, necroza și rata de supraviețuire la 5 ani [377].

CRCC este o tumoră particulară, cu un pattern mixt, epitelial și mezenchimal, leziunile exprimând și citokeratine (CK) și Vimentină. În literatură există studii care au raportat o specificitate de 100% și o sensibilitate de 88% a CK A1/AE3 pentru metastazele CRCC [348]. Supraexpresia Vimentinei se corelează cu prognosticul nefavorabil și creșterea tumorală, fiind intens studiată ca marker al TEM, însă rolul acesteia în progresia cancerului rămâne incert [271].

Caderinele clasice sunt glicoproteine transmembranare de adezivitate intercelulară, fiind reprezentate de E-caderină, N-caderină, P-caderină [101]. O caracteristică importantă a TEM este pierderea expresiei E-caderinei [271, 133]. În ultimii ani, un interes particular a fost îndreptat spre switch-ul caderinic, care este din ce în ce mai utilizat în monitorizarea procesului TEM [372].

Studii recente au relevat implicarea mai multor factori de transcripție, cu rol cheie în TEM printre care SNAIL, SLUG, Twist1 și ZEB1 [203]. Raportările din literatura de specialitate confirmă rezultatele cercetării efectuate cu privire la supraexpresia SNAIL în CRCC cu grad Fuhrman înalt [206]. În alte studii s-a arătat că expresia crescută SLUG a fost asociată semnificativ cu supraviețuirea îmbunătățită, în contrast cu expresia Snail care a fost negativ asociată cu supraviețuirea, în timp ce asocierea în cazul E-caderinei a fost ne semnificativă [206]. În alte studii s-a raportat faptul că Twist1 are un rol crucial în agresivitatea tumorală [107, 233], dar cu toate că expresia Twist1 a fost asociată cu un prognostic nefavorabil și în CRCC [107, 233], semnificația patologică a acestuia în CR nu este pe deplin înțeleasă [233].

În ceea ce privește Fibronectina, studiul lui Kondisetty este printre puținele care arată că expresia acestui marker în citoplasma CR este asociată cu o rată mai mare a mortalității asociată bolii, indicând un rol posibil în progresia acestor carcinoame [148].

## **CAPITOLUL VII. Concluzii**

Studiul efectuat, ce a cuprins un număr de 50 de cazuri de CRCC, a permis următoarele concluzii:

- Analiza *clinico-epidemiologică* pentru perioada de timp investigată (2015-2017) a indicat vârsta medie de diagnostic a fost de  $60.18 \pm 10$  ani, majoritatea pacienților fiind de sex masculin (64%), cu o valoare medie a dimensiunilor tumorale de  $6.7 \pm 2.9$  cm, cele mai multe (34%) aparținând categoriei  $>4$  și  $\leq 7$  cm;
- Studiul *histopatologic* al cazurilor analizate a evidențiat că peste jumătate din CRCC au prezentat grad Fuhrman scăzut (74%), iar 26% grad Fuhrman înalt;
- Histologic pattern-ul de tip mixt a fost prezent în jumătate din cazuri (50%), necroza tumorală în 52%, invazia vasculară în 22% și invazia în țesutul adipos în 64% din cazuri;
- Încadrarea pTNM tumorilor a indicat: 24% din cazuri în stadiul I, 10% stadiul II, 60% stadiul III, 6% stadiul IV;
- Studiul *imunohistochimic* a cuprins toate cele 50 de cazuri de CRCC, utilizând markeri implicați în TEM: epiteliali, mezenchimali și de transcripție;
- Imunomarcajul pentru AE1/AE3 a fost identificat în toate cele 50 de cazuri, analiza statistică a evidențiat asocieri semnificative statistic ale expresiei AE1/AE3 cu gradul nuclear Fuhrman ( $p=0.008$ );
- Imunoreacția pentru Vimentină a fost identificată în toate cazurile, cu asocieri semnificative între expresia Vimentinei și gradul nuclear Fuhrman ( $p=0.000$ ), respectiv invazia vasculară ( $p=0.047$ ).
- Imunoreacția pentru E-caderină a fost identificată în 70% din cazuri; cu asocieri semnificative între SC înalt al E-caderinei și gradul nuclear Fuhrman scăzut ( $p=0.000$ ), respectiv cu absența invaziei vasculare ( $p=0.031$ ); în plus E-caderina a prezentat corelație liniară negativă cu Vimentina ( $p<0.05$ , Pearson).
- Imunoreacția pentru N-caderină a fost identificată în 72% din cazuri, cu asocieri semnificative între expresia N- caderinei și gradul Fuhrman ( $p=0.048$ );
- Imunoreacția pentru P-caderină a fost identificată în 92% din cazuri, cu asocieri semnificative între expresia P-caderinei și gradul Fuhrman ( $p=0.049$ ); în plus între P-caderina și E-caderină a existat o corelație liniară negativă ( $p<0.05$ , Pearson), respectiv corelație liniară pozitivă între P-caderină și N-caderină ( $p<0.05$ , Pearson).
- Imunoreacția pentru SNAIL a fost identificată în 92% din cazuri; cu asocieri semnificative între expresia Snail și gradul nuclear Fuhrman ( $p=0.007$ ), invazia în țesutul adipos ( $p=0.03$ ) și



stadiul tumoral ( $p=0.007$ ); în plus am obținut corelație liniară pozitivă între N-caderină și SNAIL ( $p<0.05$ , Pearson);

- Imunomarcajul pentru SLUG a fost identificat în 96%; cu asocieri semnificative statistic între expresia SLUG și gradul Fuhrman ( $p=0.008$ ), invazia în țesutul adipos ( $p=0.001$ ), extensia tumorală ( $p=0.006$ ), invazia vasculară ( $p=0.011$ ), necroza ( $p=0.014$ ) și stadiul tumoral ( $p=0.006$ ); în plus a existat corelație liniară pozitivă între SLUG și E-caderină ( $p<0.05$ , Pearson), respectiv corelație negativă între Vimentină și SLUG ( $p<0.05$ , Pearson);
- Imunoreacția pentru Twist1 a fost identificată în 90% din cazuri, cu asocieri semnificative între expresia Twist1 și gradul nuclear Fuhrman ( $p=0.003$ ), extensia tumorală ( $p=0.05$ ), invazia în țesutul adipos ( $p=0.001$ ) și stadiul tumoral ( $p=0.03$ );
- Imunoreacția pentru ZEB1 a fost identificată în 70% din cazuri, cu asocieri semnificative între expresia ZEB1 și gradul Fuhrman ( $p=0.008$ );
- Imunoreacția pentru Fibronectină a fost identificată în 78% din cazuri, cu marcaj superior în cazul tumorilor cu grad Fuhrman înalt; analiza statistică nu a relevat asocieri semnificative cu factorii histopatologici investigați ( $p>0.05$ );

### **Bibliografie selectivă**

42. Chang JW, Gwak SY, Shim GA, et al. EZH2 is associated with poor prognosis in head-and-neck squamous cell carcinoma via regulating the epithelial-to-mesenchymal transition and chemosensitivity. *Oral Oncol.* 2016; 52: 66-74.

58. Chan Y, Yu Y, Wang G, et al. Inhibition of MicroRNA-381 Promotes Tumor Cell Growth and Chemoresistance in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Med Sci Monit.* 2019;25:5181-5190.

340. Voulgari A, Pintzas A. Epithelial–mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1796(2):75–90.

348. Weinbreck N, Marie B, Bressenot A, et al. Immunohistochemical markers to distinguish between hemangioblastoma and metastatic clear-cell renal cell carcinoma in the brain: utility of aquaporin1 combined with cytokeratin AE1/AE3 immunostaining. *Am J Surg Pathol.* 2008; 32(7):1051–1059.

355. Wong SHM, Fang CM, Chuah LH, et al. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018;121:11-22.

369. Zacchia M, Vilasi A, Capasso A, et al. Genomic and proteomic approaches to renal cell carcinoma. *J Nephrol.* 2011; 24(2):155–164.

375. Zeng J, Zhan P, Wu G, et al. Prognostic value of Twist in lung cancer: Systematic review and meta-analysis. *Transl Lung Cancer Res.* 2015;4:236-41.

316. Thiery J.P. Acloque H., Huang R.Y, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009; 139(5): 871–890

270. Sanjmyatav J, Matthes S, Muehr M, et al. Identification of high-risk patients with clear cell renal cell carcinoma based on interphase-FISH. *Br J Cancer*, 2014; 110(10): 2537–2543.
271. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2011; 68(18):3033–3046.
272. Savagner P. Epithelial-mesenchymal transitions: from cell plasticity to concept elasticity, *Curr. Top. Dev. Biol*. 2015; 112: 273–300.
206. Mikami S, Katsube KI, Oya M, et al. Expression of Snail and Slug in renal cell carcinoma: E-cadherin repressor Snail is associated with cancer invasion and prognosis. *Lab Invest*. 2011; 91(10):1443–1458.
203. Meng FD, Li Y, Tian X, et al. Synergistic effects of snail and quercetin on renal cell carcinoma Caki-2 by altering AKT/mTOR/ERK1/2 signaling pathways. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8(6):6157–6168.
223. Naber HP, Drabsch Y, Snaar-Jagalska BE, et al. Snail and Slug, key regulators of TGF- $\beta$ -induced EMT, are sufficient for the induction of single-cell invasion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 435: 58-63.
210. Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE. World Health Organization (WHO) Classification of tumours of the urinary system and male genital organs. International Agency for Research on Cancer (IARC) Press. Lyon, France, 2016.
257. Randall E Harris – Epidemiology of chronic disease. Global Perspectives. Jones & Bartlett Learning, 2013.
183. Liu Y, Zeng S, Jiang X, et al. SOX4 induces tumor invasion by targeting EMT-related pathway in prostate cancer. *Tumour Biol*. 2017; 39(5):1010428317694539.
181. Linehan WM, Srinivasan Ramaprasad, Schmidt Laura S. The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nat Rev Urol*. 2010; 7(5): 277–285.
149. Kong FF, Qu ZQ, Yuan HH, et al. Overexpression of FOXM1 is associated with EMT and is a predictor of poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 2014; 31: 2660-2668.
133. Kalluri R, Weinberg R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin. Invest*. 2009; 119(6): 1420–1428
107. Harada KI, Miyake H, Kusuda Y, et al. Expression of epithelial–mesenchymal transition markers in renal cell carcinoma: impact on prognostic outcomes in patients undergoing radical nephrectomy. *BJU Int*. 2012; 110(11c):E1131–7.
48. Frank I, Blute ML, Cheville JC, et al. An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGN score. *J Urol*. 2002; 168:2395–400.