

UNIVERSITATEA „OVIDIUS” DIN CONSTANȚA
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ
DOMENIUL MEDICINĂ
ANUL UNIVERSITAR 2024-2025

Abordări multidimensionale în caracterizarea carcinoamelor renale prin integrarea analizelor de tip omic

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat: Prof.univ.dr. Mariana Așchie

Comisia de îndrumare și integritate academică:

Conf.Univ.dr.Madalina Bosoteanu

CS I dr. Anca Florentina Mitroi

CS I dr. Georgeta-Camelia Cozaru

Doctorand: Burlacu Ionuț

CONSTANȚA – 2025

CUPRINS

Lista cu abrevieri utilizate in text.....	9
---	---

Introducere.....	14
------------------	----

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Capitolul 1. Considerații generale privind carcinoamele renale

1.1. Clasificare histopatologică și epidemiologie	17
1.2. Aspecte clinico-patologice ale carcinoamelor renale.....	20
1.3. Stadializare și prognostic	25
1.4. Limitările diagnosticului convențional	27

Capitolul 2. Biologia moleculară a carcinomului renal

2.1. Introducere generală în biologia moleculară tumorală	29
2.2. Alterări genetice și epigenetice specifice subtipurilor tumorale	31
2.2.1. Carcinomul cu celule clare (clear cell RCC, ccRCC).....	31
2.2.2. Carcinomul papilar (papillary RCC, pRCC).....	31
2.2.3. Carcinomul cromofob (chromophobe RCC, chRCC).....	32
2.2.4. Carcinoamele rare: RCC cu translocatii, medular, Bellini.....	32
2.2.5. Importanța integrării genetice și epigenetice în clasificare.....	33
2.3. MicroARN – Regulatori epigenetici în carcinomul renal.....	33
2.3.1. Dereglarea microARN-urilor în carcinomul renal.....	33
2.3.2. microARN-uri cu rol oncogen în RCC (oncomiR).....	34
2.3.3. Tehnici de analiză a microARN-urilor.....	35
2.4. Profiluri moleculare integrate și clasificări recente	36
2.4.1. Contribuția TCGA și a altor baze de date omice	36
2.4.2. Clasificări funcționale și semnături transcriptomice.....	37
2.4.3. Integrarea microARN-urilor în clasificarea moleculară și perspective clinice..	38

Capitolul 3. Examinarea imunohistochimică în evaluarea carcinomului renal

3.1. Rolul imunohistochimiei în patologia tumorală renală.....	41
3.1.1. Importanța IHC în caracterizarea tumorilor renale	41
3.1.2. Utilizarea IHC în diagnostic diferențial și stadializare	42
3.1.3. Rolul imunohistochimiei în cercetarea moleculară.....	42
3.2. Markerii imunohistochimici utilizați în carcinomul renal	43

3.2.1. Markeri de linie și de diferențiere epitelială	44
3.2.2. Markeri utili în clasificarea subtipurilor histologice de RCC	44
3.2.3. Markeri cu valoare prognostică și predictivă.....	45
3.2.4. Expresia markerilor în contextul profilurilor moleculare	46
3.3. Interpretarea imunohistochemiei: limite și soluții moderne	46
3.3.1. Subiectivitatea evaluării vizuale	46
3.3.2. Standardizarea incompletă a tehnicilor IHC	47
3.3.3. Heterogenitatea tumorală	47
3.3.4. Soluții moderne: digitalizarea și analiza automatizată.....	48
3.3.5. Integrarea IHC în platforme multidimensionale	49
3.4. Digitalizarea patologiei și analiza IHC asistată de inteligență artificială	49
3.4.1. Analiza IHC digitală: de la scor vizual la cuantificare automatizată	50
3.4.2. Algoritmi de inteligență artificială în analiza IHC	50
3.4.3. Beneficii ale integrării AI în analiza IHC	51
Capitolul 4. Inteligența artificială în analiza patologică	
4.1. Introducere în inteligența artificială în medicină	52
4.1.1. Tipuri de inteligență artificială utilizate în medicină	53
4.1.2. Avantajele IA în cercetarea oncologică și diagnostic patologic	53
4.2. Componentele inteligenței artificiale relevante pentru analiza cancerului renal	54
4.2.1. Machine Learning (Învățare automată).....	54
4.2.2. Deep Learning (Învățare profundă)	55
4.2.3. Computer Vision (Viziune computerizată)	55
4.2.4. Natural Language Processing (NLP)	56
4.2.5. Data Integration și multimodal learning	56
4.3. Aplicații specifice ale inteligenței artificiale în carcinomul renal	57
4.3.1. Clasificarea histologică automată a subtipurilor RCC.....	57
4.3.2. Analiza și scorarea automată a markerilor imunohistochimici	57
4.3.3. Corelarea datelor histopatologice și moleculare	58

4.3.4. Predicția prognosticului și a răspunsului la tratament	58
4.3.5. Asistență decizională în practică clinică.....	58
4.4. Integrarea datelor multi-omice cu inteligența artificială.....	59
4.4.1. Ce înseamnă „multi-omic”?	60
4.4.2. Algoritmi și abordări utilizate pentru integrarea multi-omice	60
4.4.3. Aplicații practice și potențial translational.....	61
4.5. Provocări și considerente etice ale utilizării inteligenței artificiale în medicină	62
II.CONTRIBUȚIE PERSONALĂ	
Capitolul 5. Fundamentele studiului-motivație,scop, ipoteze și obiective	
5.1. Motivația studiului.....	64
5.2. Scopul studiului.....	64
5.3. Ipoteze de cercetare.....	65
5.4. Obiectivele cercetării.....	65
5.4.1. Obiective principale.....	65
5.4.2. Obiective secundare.....	66
Capitolul 6. Metodologia cercetării.....	
6.1. Selecția cazurilor.....	68
6.2. Metode de cercetare.....	70
6.2.1. Examinarea histopatologică a pieselor de nefrectomie.....	70
6.2.2. Examinarea imunohistochimică.....	72
6.2.3. Extracția și purificarea speciilor de microARN din ser, exozomi și țesuturi.....	74
6.2.4. Determinarea calității, cantității și integrității a ARN-ului extras.....	83
6.2.5. Revers-transcrierea și detecția miARN-urilor prin PCR în timp real.....	88
6.3. Normalizarea și analiza cantitativă a datelor qPCR.....	97

6.4. Analiza statistică.....	98
------------------------------	----

Capitolul 7. Rezultate si discutii

7.1. Caracteristicile demografice și clinico-patologice ale lotului studiat.....	99
7.2. Analiza histopatologica si imunohistochimică a cazurilor studiate.....	118
7.3. Analiza expresiei genelor miARN.....	151
7.3.1. Gena hsa-miR-21.....	151
7.3.2. Gena hsa-miR-30c.....	154
7.3.3. Gena hsa-miR-182.....	156
7.4. Fezabilitatea diagnostică și prognostică a speciilor de miARN.....	159
7.5. Corelarea expresiei genelor miARN în raport cu variabilele clinicopatologice.....	168
7.6. Corelații între compartimentele de expresie ale miARN-urilor și implicațiile lor biologice în RCC.....	173

Capitolul 8. Discuții și concluzii finale.....177

8.1. Discuții.....	177
8.2. Concluzii.....	182

Capitolul 9. Originalitate si contributiile inovative ale tezei de cercetare

9.1. Originalitatea tezei.....	187
9.2. Limitările studiului.....	187
9.3. Direcții viitoare de cercetare.....	188

Bibliografie.....190

Lista publicațiilor.....218

Lista figurilor.....219

Lista tabelelor.....228

Teza de doctorat cuprinde:

- 228 de pagini, dintre care 47 constituie Partea Generală
- 85 de figuri
- 19 de tabele
- 262 de referințe bibliografice

Notă: în prezentul rezumat cuprinsul a fost păstrat sub aceeași formă ca în teza de doctorat.

INTRODUCERE

Carcinomul renal reprezintă a șaptea cauză de cancer la bărbați și a noua la femei și constituie o problemă majoră de sănătate publică prin incidența aflată în creștere și prin heterogenitatea biologică și clinică [1,2]. Cele mai frecvente subtipuri histopatologice sunt carcinomul cu celule clare (ccRCC), carcinomul papilar (pRCC, tip 1 și tip 2) și carcinomul cromofob (chRCC), fiecare cu particularități morfologice, moleculare și prognostice distincte [3,4]. În practica clinică, diagnosticul corect și stratificarea prognostică sunt adesea îngreunate de variabilitatea histologică și de prezentarea clinică nespecifică, ceea ce impune integrarea metodelor imunohistochimice și moleculare în evaluarea acestor tumori.

Imunohistochimia (IHC) rămâne un instrument indispensabil pentru diagnosticarea și clasificarea RCC, completând analiza histopatologică convențională. Panelul clasic include markeri de diferențiere epitelială și de linie precum PAX8, CAIX, CD10, CD117, Vimentin, AMACR, RCC și CK7, care permit diferențierea între subtipuri și confirmarea originii renale [5,6]. În paralel, markerii cu valoare prognostică și predictivă, precum VEGF și c-MET, au câștigat un rol central. În ccRCC, supraexpresia VEGF este direct legată de inactivarea genei VHL și de activarea căilor hipoxie-induse, corelându-se cu angiogeneza tumorală intensă și cu potențialul de răspuns la terapii anti-VEGF [7,8]. În pRCC, supraexpresia c-MET are o valoare dublă: pe de o parte, facilitează diagnosticul diferențial, iar pe de altă parte, constituie o țintă terapeutică validată, cu aplicații clinice în inhibitorii MET [9,10].

În ultimii ani, microARN-urile (miARN) au devenit biomarkeri de interes major în RCC, având roluri atât oncogenice, cât și supresoare tumorale. În prezenta lucrare au fost investigate trei specii cu relevanță deosebită: miR-21-5p, recunoscut ca oncomiR clasic, asociat cu proliferarea și invazivitatea ccRCC [11]; miR-30c, implicat în reglarea tranziției epitelio-mezenchimale și cu potențial rol în sensibilitatea la terapii țintite [12] și miR-182-5p, asociat cu progresia tumorală și cu formele agresive de RCC [13]. Studiul expresiei acestor miARN-uri în diferite compartimente biologice-țesut tumoral, ser și exozomi circulanți-oferă o perspectivă complexă asupra mecanismelor epigenetice implicate în carcinogeneză.

Analiza intercompartimentală a demonstrat că aceste microARN-uri nu se exprimă izolat, ci reflectă un echilibru dinamic între tumora primară și mediul circulant. Corelațiile dintre expresia

tisulară, serică și cea exozomală pot contribui la definirea unor biomarkeri neinvazivi, capabili să reflecte fidel biologia tumorală și să ofere informații valoroase pentru diagnosticul precoce, monitorizarea evoluției și evaluarea prognosticului.

Astfel, integrarea imunohistochimiei cu analiza expresiei microARN-urilor și cu evaluarea corelațiilor intercompartimentale susține o abordare multidimensională în caracterizarea carcinomului renal, cu implicații directe pentru medicina personalizată.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Considerații generale privind carcinomul renal

Carcinomul renal constituie cea mai frecventă tumoră malignă a parenchimului renal și un model de heterogenitate oncologică, atât din punct de vedere histopatologic, molecular și clinic. În ultimele două decenii, progresele în înțelegerea mecanismelor de carcinogeneză au modificat profund abordarea acestei patologii, orientând practica medicală către o caracterizare integrată și multidimensională.

Clasificarea histopatologică, conform OMS 2022, include trei entități majore – carcinomul cu celule clare, carcinomul papilar și carcinomul cromofob – cărora li se adaugă subtipuri rare precum carcinomul medular, carcinomul de ducte colectoare și tumorile cu translocatii MiT [4]. Această diversitate reflectă nu doar aspecte morfologice distincte, ci și fundamente genetice și moleculare particulare, cu impact prognostic și terapeutic major.

La nivel epidemiologic, incidența RCC este în creștere constantă, cu variații geografice relevante. Discrepanța dintre incidența mai redusă și mortalitatea relativ ridicată raportată în România, comparativ cu media europeană, sugerează limitări în depistarea precoce și în accesul la terapii inovative, constituind un argument pentru intensificarea eforturilor de screening și personalizare a tratamentului [14].

Factorii etiologici implicați sunt multipli și complecși. Pe lângă factorii de risc sporadici-fumat, obezitate, hipertensiune arterială, expuneri ocupaționale [15,16,17], există și contexte ereditare bine definite, precum sindroamele von Hippel–Lindau, Birt–Hogg–Dubé, HLRCC și scleroza tuberoasă [18,19,20]. Aceste sindroame conferă un risc tumoral particular, cu debut precoce, caracteristici clinico-patologice distincte și o semnificație aparte pentru consilierea genetică și managementul familial.

Din perspectivă clinico-patologică, RCC este adesea asimptomatic în stadiile incipiente, diagnosticul fiind frecvent incidental. Manifestările clasice sunt rare, iar tabloul clinic poate fi dominat de sindroame paraneoplazice complexe. Histopatologia fiecărui subtip conferă date prognostice importante: carcinomul papilar tip 2 se asociază cu evoluție agresivă, în timp ce carcinomul cromofob are, în general, prognostic favorabil.

Stadializarea TNM (ediția a 8-a AJCC/UICC) și gradarea nucleară ISUP constituie repere esențiale pentru evaluarea prognosticului și ghidarea conduitei terapeutice [4]. Supraviețuirea variază semnificativ în funcție de stadiu, oscilând de la peste 90% pentru formele incipiente la sub 15% pentru cele metastatice, confirmând valoarea predictivă a acestor parametri.

În pofida progreselor, limitele abordării convenționale rămân evidente: heterogenitatea intratumorală, subiectivitatea evaluării morfologice și interpretarea semi-cantitativă a imunohistochemiei. Aceste constrângeri impun o schimbare de paradigmă, spre o caracterizare multidimensională ce integrează morfologia, imunohistochemia, datele moleculare și instrumentele digitale bazate pe inteligență artificială, deschizând perspective pentru diagnosticul și tratamentul personalizat al carcinomului renal.

2. Biologia moleculară a carcinomului renal

Carcinomul renal constituie un exemplu paradigmatic al heterogenității moleculare în oncologie, definind o categorie de tumori a căror evoluție clinică și răspuns terapeutic sunt profund influențate de peisajul genomic și epigenomic. Progresele înregistrate în ultimele două decenii au demonstrat că analiza moleculară nu are doar valoare descriptivă, ci și consecințe directe asupra diagnosticării diferențiale, stratificării prognostice și selecției terapeutice.

○ Alterări genetice caracteristice

În carcinomul cu celule clare, inactivarea genei VHL reprezintă evenimentul inițiator fundamental, prezent în majoritatea cazurilor. Pierderea funcționalității proteinei VHL determină acumularea factorilor inductibili de hipoxie (HIF), cu transactivarea genelor pro-angiogenice, între care VEGF, PDGF și GLUT1 ocupă un rol central. Acest mecanism molecular explică fenotipul hipervascular caracteristic și sensibilitatea ccRCC la terapiile anti-angiogenice. În plus, alterări în gene precum PBRM1, BAP1 și SETD2 definesc subgrupuri cu semnificație prognostică distinctă, sugerând existența unor căi alternative de progresie tumorală [21-27].

Carcinomul papilar prezintă particularități notabile între cele două subtipuri. În pRCC tip 1, mutațiile activatoare ale genei c-MET induc proliferare și invazie prin activarea receptorului pentru hepatocyte growth factor, justificând dezvoltarea și aplicarea inhibitorilor de MET. În schimb, pRCC tip 2 se asociază frecvent cu mutații ale FH, definind contextul sindromului HLRCC, cunoscut pentru agresivitatea clinică și potențialul metastatic precoce [10,28,29].

Carcinomul cromofob, deși relativ mai indolent, este corelat cu alterări ale genei FLCN, caracteristice sindromului Birt–Hogg–Dubé, precum și cu pierderi cromozomiale multiple. În formele rare, precum carcinomul medular, pierderea expresiei SMARCB1/INI1 are rol diagnostic, iar tumorile cu translocății din familia MiT implică fuziuni la nivelul TFE3 sau TFEB, recunoscute prin profil imunohistochimic și confirmate prin tehnici moleculare [30-33].

- **Căi de semnalizare implicate**

Mecanismele de carcinogeneză renală converg asupra unor rețele de semnalizare intracelulară care modulează angiogeneza, metabolismul și rezistența la moarte celulară. Calea HIF/VEGF domină peisajul molecular al ccRCC și fundamentează utilizarea terapiei anti-VEGF [23]. Dereglarea mTOR conferă avantaje proliferative și metabolice, constituind rațiunea pentru inhibitorii specifici utilizați în practica oncologică. În carcinomul papilar, activarea c-MET/HGF se corelează cu fenotip invaziv și prognostic defavorabil. În plus, interacțiunile dintre căile Wnt/TGF- β , PI3K/AKT și mecanismele epigenetice adaugă un nivel suplimentar de complexitate și explică variabilitatea răspunsului terapeutic.

- **Rolul microARN-urilor**

Un domeniu emergent al biologiei moleculare renale îl constituie microARN-urile, molecule mici de ARN necodant cu funcție reglatorie post-transcripțională. Profilurile de expresie alterată a miARN-urilor disting între subtipuri histologice, reflectă gradul de agresivitate tumorală și oferă potențial de biomarkeri circulanți. Dintre acestea, miR-21-5p se comportă ca un oncomiARN, asociat cu rezistența la tratament și prognostic nefavorabil, miR-30c-5p are un rol supresor, iar reducerea expresiei sale a fost corelată cu progresia tumorală, iar miR-182-5p participă la procesele de proliferare și invazie celulară [11,12,13]. Analiza comparativă a expresiei acestora în țesut tumoral, ser și exozomi permite identificarea unor corelații inter-compartimentale cu valoare diagnostică și prognostică.

- **Implicații clinice și terapeutice**

Integrarea acestor date a schimbat paradigma terapeutică a carcinomului renal, înlocuind abordarea exclusiv chirurgicală cu strategii bazate pe terapii țintite (anti-VEGF, inhibitori MET, inhibitori mTOR) și imunoterapii de nouă generație. În perspectivă, caracterizarea multidimensională care îmbină analiza histopatologică, imunohistochimia, profilul genetic și expresia microARN-urilor, alături de algoritmi de inteligență artificială, promite să asigure un cadru de diagnostic și tratament personalizat, adaptat la specificul fiecărui pacient.

3. Examinarea imunohistochimică în evaluarea carcinomului renal

Imunohistochimia (IHC) reprezintă un instrument indispensabil în diagnosticul diferențial al tumorilor renale, completând examinarea histopatologică clasică. Panelul standard include markeri precum PAX8, CAIX, CD10, CK7, CD117, AMACR, RCC și Vimentin utilizați pentru diferențierea între principalele subtipuri de carcinom renal.

În carcinomul cu celule clare (ccRCC), expresia puternic pozitivă a CAIX și CD10, asociată cu PAX8, permite confirmarea originii renale și distingerea față de alte tumori metastatice. În carcinomul papilar (pRCC), CK7 și AMACR sunt de obicei pozitivi, în timp ce markerii de tip cromofob (CK7 difuz, CD117) caracterizează carcinomul cromofob (chRCC) [4].

Dincolo de diagnosticul diferențial, IHC furnizează informații de valoare prognostică. VEGF este frecvent supraexprimat în ccRCC și se corelează cu angiogeneza accentuată și agresivitatea biologică, constituind baza terapiilor anti-angiogenice. În pRCC, supraexpresia c-MET este relevantă atât prognostic, cât și ca țintă terapeutică, fiind asociată în special cu tipul 1 și cu cazurile cu evoluție desfavorabilă.

Prin urmare, imunohistochimia, prin rolul dublu – diagnostic și prognostic, rămâne un pilon central în caracterizarea carcinomului renal, în special atunci când este integrată cu date moleculare și clinice.

4. Inteligența artificială în analiza patologică

Inteligența artificială (IA) reprezintă o direcție emergentă în patologia renală, cu potențial major de a completa evaluarea histopatologică și imunohistochimică tradițională. Prin integrarea algoritmilor de învățare automată și a tehnologiilor de patologie digitală, IA permite analiza cantitativă a imaginilor histologice și imunohistochimice, depășind limitele subiectivității umane. Aplicațiile actuale includ segmentarea automată a nucleilor și a structurilor tisulare, cuantificarea expresiei markerilor imunohistochimici și identificarea patternurilor subtile de heterogenitate tumorală. Platforme precum QuPath și rețelele neuronale convoluționale (CNN) au demonstrat utilitate în analiza tumorilor renale, oferind date reproductibile și obiective.

În carcinomul cu celule clare, IA facilitează evaluarea angiogenezei și a expresiei VEGF, iar în carcinomul papilar poate sprijini cuantificarea expresiei c-MET. De asemenea, integrarea analizei imagistice cu date moleculare (inclusiv profilul microARN) conturează modele predictive capabile să distingă subtipuri tumorale și să anticipeze evoluția clinică [34-37].

Limitările actuale sunt legate de standardizarea algoritmilor, dimensiunea redusă a cohortelor și necesitatea validării multicentrice. Totuși, prin capacitatea de a corela date morfologice, imunohistochimice și moleculare, IA se conturează ca un instrument indispensabil pentru viitoarele abordări multidimensionale în diagnosticul și prognosticul carcinomului renal.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

5. Fundamentele studiului: motivație, scop, ipoteză și obiective

Motivația studiului

În dezvoltarea carcinomul renal componenta genetică are o implicație importantă, reflectată atât de sindroamele ereditare (VHL, BHD/FLCN, HLRCC/FH, HPRC/MET, TSC etc.), cât și de predispoziția familială, care cresc semnificativ riscul de neoplazie renală și justifică detecția precoce și stratificare robustă a riscului în populațiile cu antecedente familiale. În paralel, ghidurile clinice actuale recomandă nefrectomia parțială (pentru pastrarea a cât mai mulți nefroni funcționali) drept opțiune preferată pentru tumorile renale încadrabile T1 și, selectiv, T2—beneficiu major ce depinde critic de diagnosticul timpuriu (cu potențial de a evita nefrectomia totală la o parte dintre pacienți).

Scopul studiului

Scopul cercetării a fost aprofundarea mecanismelor moleculare și fenotipice implicate în carcinomul renal cu celule clare, precum și identificarea unor biomarkeri cu valoare diagnostică, prognostică și predictivă, integrați într-un model aplicabil în practica clinică.

În acest context, studiul vizează dezvoltarea și validarea unui cadru integrativ (molecular și imunohistochimic) pentru detecția precoce, stratificarea riscului și monitorizarea carcinomului renal, cu accent pe:

- evaluarea miR-21-5p, miR-30c și miR-182-5p în țesut, ser și exozomi (biopsie lichidă);
- corelarea lor cu panelul IHC standard (PAX8, CAIX, CD10, CK7, CD117, AMACR ± RCC marker/Vimentin) și cu markeri de prognostic/predicție (VEGF, c-MET);
- utilitatea clinică pentru pacienți cu risc familial, în vederea identificării într-un stadiu incipient, când rezecția parțială renală poate fi privilegiată față de nefrectomia radicală.

Ipoteze de cercetare

Pornind de la datele obținute din literatura de specialitate recentă, prezenta teză a fost construită pe următoarele ipoteze de cercetare:

1. Dacă expresia diferențiată a microARN-urilor miR-21-5p, miR-30c și miR-182-5p este asociată cu mecanismele fundamentale ale carcinogenezei renale (proliferare, invazie, metastazare), susținând rolul lor de biomarkeri moleculari diagnostici.
2. Dacă integrarea analizelor moleculare (miARN) cu panelul imunohistochimic standardizat (PAX8, CAIX, CD10, CK7, CD117), completat de markeri predictivi și prognostici (VEGF, c-MET), crește acuratețea diagnosticului diferențial și permite o stratificare mai fidelă a riscului tumoral.
3. Dacă valorile microARN-urile circulante, detectate în exozomi și ser, pot constitui „biopsii lichide” cu valoare clinică, utile în diagnostic, monitorizarea postoperatorie și în predicția recurenței tumorale.
4. Dacă corelarea expresiei imunohistochimice (ex. VEGF, c-MET) cu profilul de expresie al miARN-urilor poate contura rețele funcționale comune, cu valoare în înțelegerea mecanismelor de angieneză, invazie și progresie tumorală.

Obiective principale

1. Analiza profilului de expresie al miR-21-5p, miR-30c și miR-182-5p în țesut tumoral/netumoral, ser și exozomi.
2. Evaluarea valorii diagnostice a miARN-urilor selectate, individual și în combinație, prin analiza performanțelor ROC și a corelațiilor clinicopatologice.
3. Validarea conceptului de „liquid biopsy” în oncologia renală prin compararea expresiei miARN-urilor din compartimentul tumoral cu cel circulant (ser și exozomi).
4. Investigarea expresiei imunohistochimice a panelului standard (PAX8, CAIX, CD10, CK7, CD117, AMACR, RCC, Vimentin) și a markerilor suplimentari VEGF și c-MET, cu evidențierea corelațiilor cu parametrii clinicopatologici și moleculari.

Obiective secundare

1. Prelucrarea și evaluarea histopatologică a pieselor operatorii/biopsiilor de carcinom renal, cu aplicarea panelului imunohistochimic complet.
2. Izolarea și purificarea microARN-urilor din țesut tumoral/netumoral, ser și exozomi, urmată de evaluarea calității și integrității acestora prin metode standardizate.
3. Revers-transcrierea și cuantificarea expresiei miARN-urilor selectate prin RT-qPCR, cu normalizarea și analiza statistică a datelor.
4. Corelarea rezultatelor moleculare și imunohistochimice cu parametrii clinico-patologici (vârstă, sex, dimensiune tumorală, grad ISUP, stadiu TNM, invazie, metastaze).
5. Testarea asocierilor funcționale între expresia VEGF și miR-21-5p, respectiv între expresia c-MET și miR-182-5p, pentru a identifica posibile interacțiuni biologice relevante.
6. Explorarea utilității monitorizării dinamice a nivelurilor serice și exozomale ale miARN-urilor în urmărirea postoperatorie și în evaluarea răspunsului la tratament.

6. Metodologia cercetării

Selecția cazurilor

Au fost selectate cazuri de pacienți diagnosticați cu carcinom renal (ccRCC, papillary RCC, chromophobe RCC, RCC cu translocații, forme rare), între anii 2019–2024.

Pentru Studiul 1:

- lot retrospectiv/prospectiv, selecție din arhiva SCAP (178 de cazuri);
- criterii de includere: diagnostice confirmate, blocuri FFPE disponibile, absența tratamentului neoadjuvant.

Pentru Studiul 2:

Studiul s-a desfășurat în perioada iunie 2019 – noiembrie 2021 și a inclus 26 de perechi de probe tisulare: țesut renal tumoral și țesut non-tumoral adiacent, prelevat la o distanță de minimum 5 cm față de leziunea tumorală, pentru a reduce riscul de contaminare tumorală. Probele au fost obținute de la pacienți internați în cadrul Secției de Urologie a Spitalului Clinic Județean de Urgență „Sfântul Apostol Andrei” Constanța (SCJU), care prezentau suspiciune clinică de tumoră renală și au fost supuși intervenției de nefrectomie radicală. De asemenea, au fost recoltate probe

de sânge periferic preoperator, cu scopul de a extrage fracția serică pentru analize ulterioare, inclusiv izolare de microARN exozomal.

Prelucrarea pieselor operatorii și stabilirea diagnosticului histopatologic au fost realizate în cadrul Serviciului Clinic de Anatomie Patologică (SCAP), conform protocoalelor naționale de bună practică în patologie, asigurând acuratețea și reproductibilitatea rezultatelor. Activitatea de cercetare a fost aprobată de Comisia Locală de Etică pentru Aprobarea Studiilor Clinice și de Cercetare.

Toți pacienții incluși în studiu au semnat consimțământul informat, exprimând acordul pentru utilizarea probelor biologice în scopuri științifice și pentru procesarea datelor cu caracter personal în conformitate cu reglementările naționale și europene (GDPR – Regulamentul (UE) 2016/679).

Analizele de biologie moleculară (inclusiv extracția de ARN total și cuantificarea expresiei genice prin qRT-PCR) și testările imunohistochimice au fost efectuate în cadrul Centrului de Cercetare pentru Studiul Morfologic și Genetic în Patologia Malignă – CEDMOG, Universitatea „Ovidius” din Constanța.

Metode de cercetare

○ Examinarea histopatologica a pieselor de nefrectomie

Examinarea histopatologică a pieselor de nefrectomie constituie standardul de diagnostic al tumorilor renale, implicând o succesiune riguroasă de etape. După recoltarea intraoperatorie și transportul conform normelor de siguranță, piesele sunt supuse prelucrării macroscopice și fixării în formol, urmate de recoltarea fragmentelor reprezentative din tumoră, parenchim adiacent, capsule, grăsime perirenală, hil și, după caz, glanda suprarenală. Fragmentele sunt procesate automat, incluse în parafină și secționate la 3–5 μ m, pentru a permite evaluarea microscopică standard cu hematoxilină-eozină. Analiza histologică vizează identificarea tipului tumoral, gradul de diferențiere, prezența necrozei, invazia capsulei, grăsimii perirenale și a structurilor vasculare sau adiacente, precum și aprecierea marginilor de rezecție. În paralel, sunt efectuate prelevări dedicate biologiei moleculare, conservate în soluție RNeasy® și stocate criogenic, asigurând astfel integritatea materialului pentru analize ulterioare de expresie genică și microARN.

○ *Examinarea imunohistochimică*

Examinarea imunohistochimică a fost utilizată pentru confirmarea diagnosticului și pentru caracterizarea moleculară a tumorilor renale. Analiza s-a bazat pe anticorpi monoclonali direcționați împotriva markerilor uzuali în carcinomul renal – CK7, PAX8, CD10 și RCC. Secțiunile tisulare fixate și incluse în parafină au fost procesate prin deparafinare, rehidratare și demascare antigenică, urmate de incubarea cu anticorp primar și secundar, amplificare polimerică și dezvoltarea reacției cromogenice cu DAB. Preparatele au fost contracolorate și montate permanent, obținându-se evidențierea specifică a expresiei markerilor imunohistochimici relevanți pentru subtiparea și evaluarea prognostică a carcinomului renal.

○ *Extracția și purificarea speciilor de miARN din ser, exozomi și țesuturi*

Kit-urile miRCURY Exosome, miRNeasy Serum/Plasma și miRNeasy Mini oferă metode rapide și eficiente pentru izolarea și purificarea ARN-ului total, inclusiv a fracțiilor de ARN cu dimensiuni mici (<200 nucleotide) din exozomi, ser și țesuturi de origine umană.

Kitul **miRCURY** funcționează pe principiul reducerii stratului de hidratare care înconjoară particulele aflate în suspensie. Prin amestecarea probei cu bufferul de precipitare, stratul de hidratare este redus, permițând precipitarea particulelor subcelulare, inclusiv cele <100 nm, prin centrifugare la viteză redusă. În cazul probelor de ser, se elimină celulele reziduale, resturile celulare, trombocitele și corpi apoptotici. Pentru o îndepărtare mai eficientă a trombocitelor și a microveziculelor mari, probele sunt prefiltrate prin filtre de 0,2 μm.

Kitul **miRNeasy Serum/Plasma** este proiectat special pentru izolarea ARN-ului total, inclusiv a speciilor de ARN <200 nucleotide, din ser și plasmă. Procedura implică liza pe bază de fenol/guanidină și purificarea pe coloane cu membrană de silice. QIAzol, un reactiv monofazic de fenol și tiocianat de guanidină, asigură liza completă, denaturarea RNazelor și proteinelor și îndepărtarea ADN-ului. Faza apoasă este separată de faza organică după adăugarea cloroformului și este supusă precipitației cu etanol. ARN-ul se leagă de membrana de silice în prezența sărurilor chaotropice, este spălat și eluat cu apă RNase-free.

Kitul **miRNeasy Mini** este destinat extracției ARN-ului total din țesuturi solide și utilizează o combinație între liza în mediu guanidină-fenol și purificarea pe coloană de silice. Probele tisulare sunt inițial omogenizate în reactivul QIAzol Lysis, care facilitează disocierea completă a componentelor celulare, inactivarea RNazelor și separarea fracțiilor macromoleculare. Adăugarea

cloroformului și centrifugarea amestecului generează două faze distincte: o fază apoasă superioară, care conține ARN-ul, și o fază organică inferioară, în care se localizează ADN-ul și proteinele. ARN-ul din faza apoasă este precipitat cu etanol și aplicat pe coloanele RNeasy Mini. În prezența sărurilor chaotrope, moleculele de ARN cu lungimi >18 nucleotide se fixează pe membrana de silice, în timp ce contaminanții sunt eliminați prin spălări succesive. ARN-ul de înaltă puritate este apoi eluat în apă RNase-free, fiind adecvat pentru aplicații ulterioare precum qRT-PCR, microarray sau secvențiere de nouă generație (NGS).

- ***Determinarea calității, cantității și integrității ARN-ului extras***

Evaluarea purității și cantității ARN-ului a fost realizată prin măsurători de absorbție în spectrul UV, utilizând un spectrofotometru NanoDrop One. Metoda se bazează pe principiul legii Beer-Lambert, conform căreia absorbția luminii este direct proporțională cu concentrația moleculelor analizate.

Lungimile de undă utilizate pentru analiză:

260 nm – absorbția acizilor nucleici (ARN și ADN)

280 nm – absorbția proteinelor (în special a triptofanului și tirozinei)

230 nm – absorbția contaminanților organici (fenol, guanidine)

240 nm și 320 nm – absorbție de fond, pentru corectarea zgomotului optic

Rapoartele spectrale relevante:

OD_{260/280} – un indicator al contaminării cu proteine; valori între 1.8 și 2.2 sunt considerate acceptabile.

OD_{260/230} – reflectă prezența compușilor organici; valori peste 1.8 indică un ARN de calitate.

În cazul probelor cu cantități reduse de ARN, evaluarea concentrației și a integrității moleculelor prin spectrofotometrie UV devine limitativă. Pentru o analiză mai precisă a acestor mostre, se recomandă utilizarea sistemului TapeStation 2200, a metodei de qRT-PCR cantitativ sau a cuantificării fluorometrice.

Revers-transcrierea și detecția speciilor de miARN prin PCR în timp real

Kitul TaqMan® Advanced miRNA este special conceput pentru cuantificarea speciilor de microARN mature dintr-o varietate de probe biologice, inclusiv țesuturi, ser sau plasmă. Procesul de cuantificare presupune parcurgerea mai multor etape succesive.

În prima etapă, pornind de la ARN-ul total izolat, poli(A) polimeraza adaugă o coadă poliadenilică la capătul 3' al moleculelor de miARN mature. Ulterior, în a doua etapă, un adaptor specific este ligat la capătul 5' al acestor molecule. Această modificare permite inițierea eficientă a reacției de transcriere inversă, realizată cu ajutorul unui primer universal de tip RT (reverse transcription), rezultând sinteza ADN-ului complementar (ADNc) corespunzător miARN-urilor din probă.

În etapa următoare are loc amplificarea uniformă a ADNc-ului obținut, printr-o reacție denumită miR-Amp, care asigură creșterea cantității de produs necesară detecției.

Pentru detecția specifică și cuantificarea în timp real, se utilizează reacția de PCR (Polymerase Chain Reaction) cu sonde de tip TaqMan® MGB. În această etapă, primerii sens și antisens se hibridizează la secvențele complementare ale ADNc-ului țintă, iar sonda TaqMan®, marcată cu un colorant reporter la capătul 5' și un supresor non-fluorescent la capătul 3', se atașează la regiunea amplificată, între cei doi primeri.

Atunci când sonda este intactă, fluorescența colorantului reporter este inhibată prin mecanismul de transfer de energie de tip Förster (FRET-Fluorescence Resonance Energy Transfer). În timpul elongării, ADN-polimeraza degradează sonda care este hibridizată la secvența țintă, separând astfel colorantul reporter de supresorul de fluorescență. Acest proces determină eliberarea fluorescenței reporterului, semnal care este proporțional cu cantitatea de ampliconi formați. Fluorescența observată crește progresiv în cursul ciclurilor succesive de amplificare, fiind direct proporțională cu cantitatea inițială de miARN matur prezent în probă. Deoarece detecția fluorescenței are loc numai dacă sonda este perfect complementară cu secvența țintă și aceasta este eficient amplificată, reacțiile nespecifice nu sunt înregistrate.

Normalizarea datelor obținute prin reacția de polimerizare în timp real

În acest studiu, pentru normalizarea nivelurilor de expresie ale speciilor de microARN mature din țesuturile de carcinom renal (RCC) și din probele serice exozomale, au fost utilizate strategii de normalizare diferențiate.

În analiza țesuturilor, expresia microARN-urilor în mostrele tumorale RCC a fost comparată cu cea din țesutul renal normal adiacent, recoltat de la aceiași pacienți. În cazul probelor serice, normalizarea nivelurilor exozomale de microARN s-a realizat raportat la un grup de control

format din indivizi sănătoși, potriviți ca vârstă și sex, fără antecedente oncologice sau comorbidități relevante.

Pentru cuantificarea relativă a expresiei genelor de microARN, s-a utilizat metoda comparației valorilor pragului ciclic (C_t – cycle threshold) obținute pentru genele de interes în eșantioanele tumorale și serice ale pacienților, comparativ cu cele din țesuturile normale adiacente sau serurile calibratoare. Calibratorul a constat într-un eșantion seric provenit de la subiecți sănătoși clinic, aliniați din punct de vedere al vârstei și sexului cu pacienții din lotul de studiu.

Valorile C_t din fiecare eșantion au fost normalizate folosind o genă de referință endogenă stabilă: RNU44 pentru probele tisulare și miR-16-5p pentru cele serice. Fiecare probă a fost analizată în triplicat, atât pentru microARN-urile de interes, cât și pentru controalele endogene, pentru a asigura reproducibilitatea și acuratețea rezultatelor.

Analiza datelor s-a efectuat conform metodei $2^{-\Delta\Delta C_t}$, unde $\Delta\Delta C_t$ exprimă diferența relativă a expresiei genei țintă între eșantioanele studiate și calibrator. Valoarea ΔC_t a fost calculată prin scăderea mediei valorilor C_t ale genei de referință din media valorilor C_t ale genei de interes.

Rezultatele au fost exprimate sub formă de expresie relativă (RQ) sau fold change (FC), folosind formula $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$. Astfel:

un $RQ > 1$ indică supraexprimarea genei de interes;

un $RQ < 1$ indică subexprimarea acesteia;

un $RQ \approx 1$ sugerează o expresie comparabilă între cele două tipuri de eșantioane.

Această strategie de cuantificare relativă oferă un grad crescut de flexibilitate și reduce variabilitatea experimentală, permițând compararea expresiei genelor miARN între diferite condiții biologice și tipuri de probe.

Analiza statistica

Datele obținute au fost analizate și reprezentările grafice au fost realizate utilizând programul statistic MedCalc, versiunea 19.0.3. Variabilele calitative au fost exprimate ca frecvență absolută (n) și procent (%), iar variabilele cantitative ca medie $\pm$ deviație standard (SD) sau mediana și interval intercuartilic (IQR, 25%–75%), în funcție de distribuția datelor.

Distribuția normală a variabilelor continue a fost verificată prin testul Kolmogorov-Smirnov. În situațiile în care valoarea p asociată testului a fost $<0,05$, ipoteza de distribuție normală a fost respinsă și s-au utilizat teste non-parametrice.

Compararea între două grupuri s-a realizat cu testul t pentru eșantioane independente în cazul datelor cu distribuție normală și varianță omogenă, respectiv cu testul Mann–Whitney U pentru date cu distribuție non-normală.

Compararea între mai mult de două grupuri a fost efectuată prin ANOVA unidirecțională, urmată de testul LSD pentru comparațiile post-hoc în cazul datelor cu distribuție normală și varianțe egale, respectiv prin testul Kruskal–Wallis pentru date non-parametrice.

Pentru variabilele categorice, s-au utilizat testul χ^2 (chi-pătrat) sau testul exact Fisher, în funcție de dimensiunea eșantioanelor și de frecvențele așteptate.

Corelațiile între două variabile continue au fost evaluate utilizând coeficientul de corelație Spearman (ρ). Pragul de semnificație statistică a fost stabilit la $p < 0,05$, valoare sub care ipoteza nulă a fost respinsă.

Fezabilitatea diagnostică a microARN-urilor investigate ca potențiali biomarkeri tisulari și serici la pacienții cu carcinom renal (RCC) a fost evaluată prin analiza curbelor ROC (Receiver Operating Characteristic). Performanța diagnostică a fost caracterizată prin sensibilitate (rata real-pozitivă) și 1-specificitate (rata fals-pozitivă) pentru diferite praguri. Indicele Youden ($J = \text{sensibilitate} + \text{specificitate} - 1$) a fost utilizat pentru determinarea pragului optim de discriminare și maximizarea arii de sub curba ROC (AUC).

7. Rezultate si discuții

Studiul nr.1

Caracteristicile demografice și clinico-patologice ale lotului studiat

Din totalul de 178 cazuri, 169 (94,95%) au fost tumori maligne, iar 9 cazuri (5,05%) tumori benigne. Dintre neoplazmele maligne, carcinomul renal cu celule clare a predominat net, fiind diagnosticat în 133 cazuri (74,7%). Carcinoamele papilare au reprezentat 14 cazuri (7,9%), iar carcinomul cromofob 5 cazuri (2,8%). S-au mai identificat entități rare precum: carcinom de ducte colectoare (1 caz, 0,6%), carcinom neuroendocrin renal (1 caz, 0,6%), carcinoame uroteliale invazive de grad scăzut (6 cazuri, 3,4%), de grad înalt (9 cazuri, 5,1%), respectiv o metastază renală de adenocarcinom cu fenotip tract digestiv (1 caz, 0,6%). În ceea ce privește tumorile benigne, au fost înregistrate: 1 tumoră fibroasă solitară, 3 oncocitoame și 5 angiomiolipoame.

Analiza distribuției demografice a celor 178 de pacienți incluși în studiu a arătat o serie de particularități relevante pentru înțelegerea contextului epidemiologic.

În ceea ce privește vârsta, s-a constatat că 63 de pacienți (35,4%) au avut vârsta ≤ 65 ani, în timp ce restul de 115 pacienți (64,6%) au depășit această limită. Această repartitie confirmă tendința raportată în literatura internațională, conform căreia incidența cancerului renal crește progresiv odată cu vârsta, cu un vârf de diagnostic în decada a șasea și a șaptea de viață.

Din punct de vedere al mediului de proveniență (demografie), majoritatea pacienților – 110 cazuri (61,8%) – au fost din mediul urban, în timp ce 68 cazuri (38,2%) proveneau din mediul rural. Această diferență poate reflecta accesul mai facil al populației urbane la servicii medicale și metode de diagnostic imagistic, favorizând depistarea tumorilor renale în faze mai precoce.

Referitor la sexul pacienților, lotul studiat a inclus 71 de femei (39,9%) și 107 bărbați (60,1%), menținând raportul de predominanță masculină descris în majoritatea studiilor epidemiologice, unde bărbații sunt afectați de aproximativ două ori mai frecvent decât femeile.

Un aspect de interes epidemiologic și clinic în patologia tumorală renală îl reprezintă distribuția cazurilor în funcție de localizarea la nivelul rinichiului, stâng sau drept. Analiza cohortului de pacienți incluși în studiu a evidențiat o repartitie relativ echilibrată între cele două părți, fără diferențe semnificative statistice, ceea ce este concordant cu datele raportate în literatura de specialitate. Această simetrie relativă sugerează că mecanismele carcinogenetice implicate nu prezintă un tropism lateralizat, ci sunt determinate de factori de risc sistemici (hipertensiune, obezitate, fumat, predispoziții genetice), la care se adaugă particularități microvasculare și anatomice locale.

Dimensiunea tumorală nu doar că reflectă extinderea bolii, dar are și valoare prognostică independentă, pacienții cu leziuni < 4 cm prezentând rate de supraviețuire semnificativ mai mari față de cei cu tumori voluminoase. În plus, chirurgia conservatoare este mai frecvent posibilă în cazul tumorilor mici, crescând șansele de menținere a funcției renale. În cazul lotului studiat dimensiune maximă tumorală (cm) a fost distribuită astfel: $\leq 4 = 50$ (30.67%); $\leq 10 = 32$ (19.63%); $\leq 7 = 68$ (41.72%); $> 10 = 13$ (7.98%).

Analiza histopatologica si imunohistochimică a tumorilor renale

Patologia tumorală renală se caracterizează printr-o mare diversitate histogenetică și morfologică, reflectată atât în aspectele macroscopice, cât și în tabloul microscopic și imunohistochimic. În evaluarea completă a acestor neoplasme, analiza macroscopică a piesei chirurgicale are un rol central, permițând corelarea dimensiunilor, aspectului de secțiune și relației cu structurile perirenale cu tabloul histologic și molecular.

Imunohistochimia (IHC) este indispensabilă în diagnosticul diferențial al tumorilor renale, mai ales în situațiile cu aspecte morfologice atipice sau suprapuse. Panelurile de markeri IHC facilitează nu doar diagnosticul pozitiv și diferențial, ci și identificarea variantelor rare, cu impact direct asupra prognosticului și tratamentului.

În cadrul lotului de 178 pacienți examinați între 2019–2024, s-a efectuat o analiză imunohistochimică extinsă pentru 68 de cazuri, la care s-au adăugat două cazuri suplimentare din anul 2025, reprezentând:

- carcinom tubulo-mucinos și cu celule fusiforme (MTSCC),
- carcinom renal dezvoltat pe boală polichistică dobândită (ACKD-RCC).

Astfel, analiza imunohistochimică s-a realizat pe un total de 70 de cazuri, selecționate pe baza particularităților morfologice și a necesității de diagnostic diferențial.

Lotul studiat a fost constituit predominant din carcinoame renale cu celule clare și carcinoame papilare, confirmând ponderea majoritară a acestor două subtipuri histologice în patologia tumorală renală. Aplicarea panelului imunohistochimic clasic (PAX8, CK7, CD10, CD117, RCC, Vimentin, AMACR) a permis validarea diagnosticului diferențial și definirea arhitecturii imunofenotipice a fiecărui caz, oferind totodată informații de stratificare prognostică. În completarea acestuia, analiza expresiei VEGF și c-MET a adus date suplimentare cu relevanță clinică, subliniind rolul biomarkerilor moleculari în caracterizarea integrată a RCC.

În carcinomul cu celule clare, supraexpresia VEGF s-a corelat cu gradul crescut de angiogeneză tumorală, reflectând activarea căii HIF–VEGF caracteristice acestei entități. Această constatare confirmă importanța VEGF ca marker prognostic, dar și ca țintă terapeutică majoră, având în vedere sensibilitatea demonstrată a ccRCC la terapiile anti-angiogenice. În schimb, în carcinomul papilar, markerul dominant s-a dovedit a fi c-MET, ale cărui niveluri crescute de expresie au fost asociate cu un fenotip proliferativ și invaziv, în special în subtipul papilar tip 1.

Acest profil sugerează implicarea activării căii MET/HGF în evoluția biologică a pRCC și justifică dezvoltarea terapiei țintite anti-MET pentru cazurile cu evoluție agresivă sau refractare.

Prin urmare, corelarea imunohistochimiei clasice cu evaluarea expresiei VEGF și c-MET consolidează valoarea caracterizării morfomoleculare a carcinomului renal, oferind un cadru mai precis de interpretare diagnostică și prognostică. Această integrare permite nu doar delimitarea subtipurilor histologice, ci și orientarea către strategii terapeutice personalizate, în concordanță cu particularitățile biologice ale fiecărei entități tumorale.

Deși PAX8 este considerat un marker nuclear sensibil și specific pentru tumorile epiteliale renale, trebuie subliniat că există și situații particulare de negativitate imunohistochimică, în special în metastazele renale de la neoplasme non-renale. În aceste cazuri, lipsa expresiei PAX8 poate orienta diagnosticul către o origine extrarenală, în contrast cu tumorile primare renale unde markerul este, în general, pozitiv. Totodată, s-au raportat și excepții rare de carcinom renal primar PAX8–, mai ales în forme slab diferențiate sau dediferențiate, ceea ce justifică utilizarea unui panel imunohistochimic extins pentru confirmarea diagnosticului (în corelație cu expresia CAIX). Integrarea acestor aspecte în practica curentă are o importanță majoră pentru diferențierea dintre tumorile renale primare și metastatice, evitând erorile de clasificare și asigurând o conduită terapeutică corectă.

Studiul nr.2.

Analiza expresiei genelor miARN

Analiza expresiei genelor miARN s-a realizat utilizând metoda comparativă $\Delta\Delta C_t$. Pentru fiecare eșantion, valorile C_t au fost normalizate în raport cu genele de referință selectate, obținându-se valorile ΔC_t . Media valorilor ΔC_t a fost utilizată pentru compararea diferențelor statistice dintre grupurile de eșantioane (NRT vs. RCC), oferind o estimare robustă a variației expresiei între condițiile analizate.

Expresia relativă a fiecărui miARN a fost calculată ca raport de expresie prin aplicarea formulei $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$, care permite interpretarea modificărilor de expresie în termeni de fold change. Pentru o caracterizare mai robustă a distribuției datelor, mediana valorilor RQ a fost utilizată pentru a evalua gradul de supraexpresie sau subexpresie a fiecărui miARN, indicând de câte ori nivelul de exprimare este crescut sau redus la pacienții cu carcinom renal în comparație cu grupul martor.

○ **Gena hsa-miR-21-5p**

În studiul de față, expresia genei hsa-miR-21 a prezentat o creștere semnificativă statistic în țesutul tumoral renal comparativ cu eșantioanele normale adiacente, valoarea medie ΔC_t fiind de 5.25 față de 1.79 ($P < 0.001$). Această diferență indică un profil de supraexpresie tumorală a miR-21, sugerând implicarea sa în mecanismele de progresie și invazie tumorală. La nivel circulant, s-a evidențiat o creștere semnificativă a expresiei miR-21 atât în serul pacienților cu RCC (5.92; 95% CI: 4.67–7.69), cât și în exozomii serici (5.29; 95% CI: 4.24–6.67), comparativ cu lotul martor (1.61; 95% CI: 1.06–3.58 și, respectiv, 1.92; 95% CI: 1.18–2.85; $P < 0.001$). Prezența concomitentă a acestui miARN în ser și în fracția exozomală subliniază rolul exozomilor ca vehicule principale de transport și stabilizare a miARN-urilor circulante, facilitând comunicarea intercelulară și promovând fenomenele pro-neoplazice. Expresia relativă a genei miR-21 a arătat o supraexpresie de aproximativ 2,79 ori în țesutul tumoral (2.79; 95% CI: 1.76 – 3.65), 4.90 ori în ser (4.90; 95% CI: 3.01– 6.48) și 3,44 ori în exozomii serici (3.44; 95% CI: 2.48 – 4.40), confirmând potențialul acesteia ca biomarker tisular și circulant în carcinomul renal.

○ **Gena-miR-30c**

Expresia genei miR-30c a fost semnificativ mai redusă în țesutul tumoral renal comparativ cu țesutul normal adiacent, valorile medii ΔC_t fiind de 3,69 (95% CI: 3,07–4,61) versus 6,17 (95% CI: 5,76–7,15; $P < 0,001$). În ceea ce privește componenta circulantă, miR-30c a prezentat o scădere semnificativă atât în ser, cât și în exozomii serici ai pacienților cu RCC, comparativ cu lotul martor. Nivelul seric a fost de 3,76 (95% CI: 2,86–4,61) față de 6,23 în lotul martor (95% CI: 5,06–7,48; $P = 0,002$), iar nivelul din exozomii serici a fost de 3,24 (95% CI: 2,89–3,71) comparativ cu 5,53 în lotul martor (95% CI: 4,37–6,61; $P = 0,001$). Analiza expresiei relative a arătat o subexpresie de aproximativ 2.55 ori în țesutul tumoral (95% CI: 2.01 – 3.09), de 1.54 ori în ser (95% CI: 1.39 – 2.23) și de 1.37 ori în exozomii serici (95% CI: 1.09 – 2.23), confirmând potențialul miR-30c ca biomarker tisular și circulant în carcinomul renal.

○ Gena miR-182-5p

Referitor la expresia genei hsa-miR-182-5p, aceasta a prezentat o creștere statistic semnificativă în țesutul tumoral renal comparativ cu eșantioanele normale adiacente, valoarea medie ΔCt fiind de 4,26 (IC 95%: 1,09–2,01) față de 1,79 (IC 95%: 0,51–0,85; $P < 0,0001$). Această diferență sugerează un profil de supraexpresie tumorală al miR-182-5p. La nivel circulant, creșterea expresiei a fost mai redusă decât în țesut: 1,30 (IC 95%: 1,14–1,71) în ser comparativ cu lotul martor 0,91 (IC 95%: 0,55–1,06; $P = 0,0012$). În exozomi, expresia a prezentat o creștere mai evidentă, cu valori de 2,36 (IC 95%: 1,67–3,23) la pacienții cu RCC, comparativ cu lotul martor 1,51 (IC 95%: 1,21–1,97; $P = 0,005$). Analiza expresiei relative a evidențiat o supraexprimare a miR-182-5p, estimată la 2,55 ori în țesutul tumoral (IC 95%: 2,01–3,09), 1,54 ori în ser (IC 95%: 1,39–2,23) și 1,37 ori în exozomii serici (IC 95%: 1,09–2,23), confirmând potențialul miR-182-5p ca biomarker tisular și circulant în carcinomul renal.

Fezabilitatea diagnostică și prognostică a speciilor de miARN

Analiza performanței receptorului (ROC) a fost utilizată pentru a evalua fezabilitatea diagnostică și prognostică a speciilor de miARN selectate în rol de biomarkeri tisulari și circulanți în carcinomul renal.

Curbele ROC permit vizualizarea sensibilității (rata de adevărat pozitiv) și specificității (rata de fals pozitiv) în funcție de diferite valori prag pentru fiecare miARN analizat. Performanța diagnostică a fiecărui miARN, respectiv capacitatea de a discrimina între țesutul tumoral și țesutul non-tumoral, a fost exprimată prin aria de sub curba ROC (AUC).

Având în vedere că rezultatele expresiei miARN sunt exprimate ca valori continue (ΔCt), pentru fiecare biomarker a fost stabilită o valoare prag optimă (cut-off). Aceasta a fost determinată prin identificarea punctului de pe curba ROC unde indicele Youden (sensibilitate + specificitate – 1) a atins valoarea maximă, indicând cel mai bun compromis între sensibilitate și specificitate.

Rezultatele obținute indică faptul că nivelurile de expresie ale miARN-urilor selectate pot constitui instrumente utile în diferențierea țesuturilor tumorale de cele adiacente normale, precum și în discriminarea probelor serice și a exozomilor față de lotul martor la pacienții cu carcinom renal (RCC). Performanța diagnostică a acestor biomarkeri a evidențiat valori ale sensibilității cuprinse între 57.69% și 92.31% iar specificitatea a variat între 65.38% și 96.15% .

De asemenea, performanța diagnostică a combinațiilor acestor biomarkeri a evidențiat valori ale sensibilității cuprinse între 80.77% și 96.15% iar specificitatea a variat între 88.46% și 100%.

Se observă că miR-21-5p a prezentat o arie sub curba ROC (AUC) de 0.87 în analiza tisulară, asociată cu o sensibilitate de 65.38% și o specificitate de 96.15% ($P < 0.001$). În compartimentul circulant, valorile au fost comparabile: în exozomi, sensibilitatea a fost de 92.31%, iar specificitatea de 73.08%, cu o AUC de 0.87, iar în ser, sensibilitatea a fost de 92.31% și specificitatea de 65.38%, corespunzând unei AUC de 0.83 ($P < 0.001$).

miR-30c a evidențiat o AUC de 0.81 în analiza efectuată la nivel tisular, asociată cu o sensibilitate și o specificitate de 80.77% ($P < 0.001$). În compartimentul circulant, performanțele au fost comparabile: în exozomi, AUC-ul a fost de 0.76, cu o sensibilitate de 76.92% și o specificitate de 73.08%, iar în ser, valoarea AUC a fost de 0.74, corespunzând unei sensibilități de 76.92% și unei specificități de 69.23% ($P < 0.001$).

La nivel tisular, miR-182 a evidențiat o AUC de 0.86, asociată cu o sensibilitate de 92.31% și o specificitate de 69.23% ($P < 0.001$). În compartimentul circulant, performanțele au fost comparabile: în exozomi, valoarea AUC a fost de 0.72, cu o sensibilitate de 57.69% și o specificitate de 84.62%, iar în ser, AUC a înregistrat valoarea de 0.76, corespunzând unei sensibilități de 73.08% și unei specificități de 76.92% ($P < 0.001$).

Pentru a evalua fezabilitatea diagnostică și a combinațiilor de miARN-uri pentru țesut, exozomi și ser, au fost generate modele predictive utilizând regresia logistică. Combinațiile celor 3 miARN-uri studiate (miR-21, miR-30c și miR-182) au demonstrat o performanță superioară comparativ cu fiecare analiză individuală.

La nivel tisular, valoarea AUC este 0.94, având o sensibilitate de 96.15% și o specificitate de 92.31% ($P < 0.001$). În compartimentul circulant, pentru combinația miARN-urilor din exozomi AUC-ul a fost de 0.93, asociat cu o sensibilitate de 80.77% și o specificitate de 100% ($P < 0.001$), iar pentru combinația miARN-urilor în ser, AUC-ul a fost de 0.95, cu o sensibilitate de 92.31% și o specificitate de 88.46% ($P < 0.001$).

Corelarea expresiei genelor miARN în raport cu variabilele clinicopatologice

Relevanța clinică a expresiei diferențiale a speciilor de miARN analizate în acest studiu (miR-21-5p, miR-30c și miR-182-5p) a fost evaluată în raport cu o serie de parametri

clinicopatologici, care includ: sexul, vârsta, localizarea tumorii primare, gradul de diferențiere tumorală (ISUP), invazia venoasă, invazia capsulară, invazia perineurală, statusul limfatic (pN), prezența metastazelor (pM) și dimensiunea tumorală.

Analiza statistică nu a evidențiat nicio corelație semnificativă între expresia relativă a miARN-urilor studiate (în toate cele trei compartimente biologice: țesut, exozomi și ser) și următorii parametri: sex, vârstă, localizarea topografică intra-renală a tumorii (pol superior, mediu sau inferior), dimensiunea maximă tumorală sau invazie perineurală. Aceste observații sugerează că expresia acestor microARN-uri este relativ independentă de caracteristicile demografice și de distribuția intrarenală, dar poate fi influențată de fenotipul tumoral la nivel molecular și de agresivitatea biologică.

Cu toate acestea, s-au identificat corelații semnificative statistic, cu relevanță potențială pentru stratificarea prognostică și pentru înțelegerea mecanismelor tumorale:

- miR-21-5p exprimat în exozomi a prezentat o asociere semnificativă cu localizarea tumorală renală (rinichi drept vs. stâng), cu o valoare $p = 0.02$. Această observație ar putea sugera un pattern de secreție exozomală influențat de micro-mediul local sau de particularități anatomice și vasculare diferite între cei doi rinichi, ipoteză care necesită însă validare suplimentară.
- miR-182-5p exprimat în țesut tumoral a fost de asemenea semnificativ asociat cu localizarea tumorală ($p = 0.02$) la fel ca și miR-182-5p exprimat în exozomi, cu o valoare $p = 0.03$. Corelația comună între aceste compartimente biologice subliniază consistența expresiei miR-182-5p în funcție de localizarea tumorală și deschide posibilitatea utilizării fracțiunii exozomale ca biomarker non-invaziv.
- O altă corelație semnificativă a fost observată între miR-182-5p din țesut și implicarea ganglionară (stadiul pN), valoarea p fiind 0.04. Acest aspect sugerează un posibil rol al miR-182-5p în promovarea diseminării limfatice în RCC, susținând literatura care îl implică în procesele de migrație și invazie celulară în alte tipuri de cancer.

Corelații între compartimentele de expresie ale miARN-urilor și implicațiile lor biologice în RCC

Expresia diferențiată a miARN-urilor în multiple compartimente biologice (tumoral, exozomal și plasmatic) oferă oportunități valoroase pentru identificarea de biomarkeri moleculari cu aplicabilitate clinică, atât în diagnosticul precoce, cât și în monitorizarea evoluției neoplaziei. În cadrul acestui studiu, analiza coeficientului de corelație Spearman a fost aplicată pentru a evalua consistența expresiei miR-21, miR-30c și miR-182 între compartimentul tisular și cel circulant (ser și exozomi).

Rezultatele au demonstrat corelații semnificative statistic între expresia miARN-urilor din țesutul tumoral și cea din exozomi sau ser, cu cele mai robuste relații observate între țesut și exozomi:

- miR-21 țesut – miR-21 exozomi: $\rho = 0.662$; $p = 0.0002$
- miR-30c țesut – miR-30c exozomi: $\rho = 0.578$; $p = 0.0020$
- miR-182 țesut – miR-182 exozomi: $\rho = 0.656$; $p = 0.0003$

Aceste corelații puternice susțin ipoteza conform căreia exozomii reprezintă vehicule biologice fidele care reflectă profilul molecular al țesutului tumoral. Având în vedere că exozomii sunt eliberați activ de către celulele tumorale și conțin molecule specifice (ARN, proteine, lipide) cu rol în comunicarea intercelulară, consistența dintre expresia din țesut și cea exozomală evidențiază potențialul acestora de a fi utilizați drept biomarkeri non-invazivi, cu valoare prognostică sau predictivă în carcinomul renal.

În ceea ce privește compartimentul seric, s-au remarcat de asemenea corelații semnificative, în special pentru:

- miR-30c țesut – miR-30c ser: $\rho = 0.688$; $p = 0.0001$
- miR-182 țesut – miR-182 ser: $\rho = 0.623$; $p = 0.0007$

Aceste date întăresc validitatea profilului circulant de miARN-uri ca o reflectare fidelă a expresiei tumorale, dar și ca o sursă ușor accesibilă pentru evaluarea moleculară a pacienților cu RCC. Totuși, corelația între miR-21 țesut – ser ($\rho = 0.326$; $p = 0.1042$) nu a atins pragul de semnificație statistică, ceea ce poate sugera o eliberare diferențială a miR-21 în ser, posibil prin

mecanisme extracelulare alternative (ex. agregate proteice, vezicule non-exozomale), sau o degradare mai rapidă a acestuia în circulație.

În ansamblu, aceste corelații susțin ipoteza unei relații funcționale între expresia tumorală și semnătura circulantă a miARN-urilor, consolidând argumentul în favoarea utilizării exozomilor și serului ca surse complementare de biomarkeri în RCC. Observațiile obținute se aliniază cu studii recente care au demonstrat stabilitatea ridicată a miARN-urilor în exozomi, precum și potențialul acestora în detectarea precoce și prognosticarea diverselor tipuri de cancer.

8. Discuții și concluzii finale

Analiza integrată a datelor obținute în cadrul prezentei teze, prin corelarea expresiei microARN-urilor cu rezultatele testelor imunohistochimice, a permis conturarea unor perspective noi asupra mecanismelor moleculare și fenotipice implicate în carcinomul renal cu celule clare. Studiul microARN-urilor selectate (miR-21-5p, miR-30c și miR-182-5p) a demonstrat rolul esențial al acestora în proliferare, invazie și metastazare, precum și potențialul lor de biomarkeri circulanți, capabili să furnizeze informații diagnostice și prognostice. În paralel, utilizarea panelului imunohistochimic standardizat (PAX8, CAIX, CD10, CK7, CD117) completat cu markeri de predicție și prognostic (VEGF, c-MET) a consolidat valoarea translatională a investigației, oferind un plus de acuratețe în diagnosticul diferențial și în stratificarea riscului tumoral.

Rezultatele arată că integrarea celor două tipuri de analize – moleculară și imunohistochimică – nu doar că îmbunătățește înțelegerea etiopatogenezei carcinomului renal, dar oferă și instrumente cu valoare clinică directă, cu aplicabilitate în medicina personalizată. Prin faptul că PAX8, marker consacrat pentru tumori renale, își poate pierde expresia mai ales în metastaze, devine evidentă necesitatea corelării cu alți markeri imunohistochimici și cu datele de expresie microARN pentru a asigura un diagnostic corect și complet. Astfel, rezultatele obținute conturează un model integrativ, în care biomarkerii moleculari și imunohistochimici acționează complementar, deschizând calea spre algoritmi multimarker ce pot sprijini deciziile terapeutice și monitorizarea pacienților.

1. Profilul de expresie diferențiat al miR-21-5p, miR-182-5p și miR-30c susține rolul acestora ca biomarkeri moleculari în carcinomul renal.

2. miR-21-5p și miR-182-5p sunt consistent supraexprimate în toate compartimentele (tisular, seric și exozomi), sugerând un rol oncogen în dezvoltarea și progresia tumorală.
3. miR-30c este subexprimat, indicând o posibilă funcție supresor tumoral pierdută în RCC.
4. Exozomii reprezintă o sursă stabilă și informativă de biomarkeri moleculari, cu corelații semnificative față de compartimentul tumoral.
5. Combinația celor trei miARN-uri oferă o performanță diagnostică excelentă, cu valori AUC peste 0.90, consolidând ideea unui panel de testare moleculară integrat.
6. Asocierile identificate cu variabile clinicopatologice subliniază potențialul acestor molecule în stratificarea prognostică și personalizarea conduitei terapeutice.
7. Monitorizarea dinamicii nivelurilor acestor miARN-uri în ser sau exozomi poate furniza informații utile privind recurența tumorală postoperatorie sau răspunsul la tratament, sugerând aplicabilitatea lor în urmărirea clinică longitudinală a pacienților cu carcinom renal.
8. Testele imunohistochimice rămân o componentă esențială în diagnosticul diferențial al tumorilor renale, în special în subclasificarea acestora. Panelul clasic de anticorpi utilizat în rutina anatomo-patologică include: PAX8, CAIX, CD10, CK7, CD117, AMACR și RCC marker, fiecare având utilitate în distingerea între subtipurile histologice (de exemplu, ccRCC vs. papilar vs. cromofob). În mod particular, exprimarea intensă și difuză a CAIX este sugestivă pentru ccRCC, în timp ce pozitivarea CK7 este tipică pentru carcinomul papilar renal.
9. Pe lângă acești markeri standard, analiza imunohistochimică a factorilor VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) și c-MET (receptorul tirozinkinazei codificat de proto-oncogen MET) oferă informații valoroase privind angiogeneza tumorală și potențialul invaziv. Studiile recente, inclusiv observațiile din cohorta analizată, au arătat corelații între expresia VEGF și gradul nuclear ISUP, precum și între supraexpresia c-MET și stadiile avansate ale bolii, sugerând rolul acestora ca factori predictivi de evoluție agresivă.
10. Corelând expresia markerilor imunohistochimici cu nivelul miARN-urilor analizate, se remarcă un posibil paralelism funcțional între supraexpresia VEGF și miR-21-5p, ambele asociate cu angieneză și progresie tumorală. De asemenea, miR-182-5p, implicat în reglarea răspunsului la stres și reparația ADN, ar putea avea legături funcționale cu

activarea c-MET, implicat în mobilitatea celulară și metastazare. Aceste observații necesită validare suplimentară, dar deschid direcții de cercetare integrativă multi-omică.

Prin urmare, rezultatele acestui studiu contribuie la consolidarea conceptului de "liquid biopsy" în oncologia renală și susțin integrarea miARN-urilor și a markerilor imunohistochimici (inclusiv VEGF și c-MET) în algoritmi de diagnostic și prognostic. Abordarea integrată moleculară-morfologică poate ghida medicina de precizie în carcinomul renal, asigurând o mai bună stratificare a pacienților și o monitorizare mai eficientă a bolii.

9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Originalitatea tezei

- **Abordare integrativă inovatoare**-teza propune corelarea expresiei miARN-urilor în multiple compartimente biologice (țesut tumoral, ser și exozomi derivați din plasmă) cu datele clinicopatologice și imunohistochimice, într-un model unitar și aplicabil în practica clinică.
- **Primă analiză pe o cohortă românească**-este pentru prima dată când, în cadrul unei populații autohtone, se investighează simultan miR-21-5p, miR-30c și miR-182-5p, alături de markerii VEGF și c-MET, integrați într-un model predictiv complex de diagnostic, prognostic și monitorizare.
- **Inovație metodologică prin biopsia lichidă** -utilizarea tehnologiilor moderne de extracție și profilare moleculară a exozomilor reprezintă un element de frontieră în diagnosticul non-invaziv al cancerului renal și conferă un plus de valoare științifică tezei.
- **Explorarea microambientului tumoral**-studiul aduce o perspectivă originală prin evaluarea miARN-urilor extrase nu doar din țesutul tumoral, ci și din zone adiacente netumorale, aspect esențial pentru înțelegerea persistenței moleculare a bolii și a riscului de recurență precoce.
- **Fezabilitatea monitorizării dinamice**-lucrarea demonstrează posibilitatea evaluării miARN-urilor în probe de sânge recoltate pre- și postoperator, ceea ce oferă o sursă neinvazivă, repetabilă și accesibilă pentru urmărirea longitudinală a pacienților. Analiza

circulantă a acestor biomarkeri reflectă în timp real evoluția moleculară tumorală, deschizând perspective promițătoare pentru implementarea biopsiei lichide renale în practica clinică.

Limitările studiului

O limitare majoră a studiului este reprezentată de dimensiunea relativ redusă a eșantionului, care poate influența robustețea statistică a anumitor corelații. De asemenea, studiul a fost realizat pe un subtip histologic dominant (ccRCC), fără extindere asupra altor entități rare sau mixte de carcinom renal. Lipsa unei validări externe (cohortă independentă sau studii multicentrice) limitează generalizarea rezultatelor. De asemenea, tehnologiile utilizate (qPCR, IHC convențională) deși standardizate, nu surprind complexitatea funcțională a rețelelor moleculare implicate în tumorigeneză.

Direcții viitoare de cercetare

Având în vedere rezultatele obținute în cadrul prezentei teze, perspectivele viitoare de cercetare în domeniul patologiei renale se conturează pe mai multe direcții complementare, menite să extindă atât aria de aplicabilitate a microARN-urilor, cât și valoarea lor clinică în diagnosticul, prognosticul și monitorizarea pacienților cu afecțiuni renale.

- O primă direcție vizează studiul dinamicii microARN-urilor circulante după nefrectomie. Analiza longitudinală a nivelurilor serice de miR-21-5p, miR-30c și miR-182-5p înainte și după excizia chirurgicală ar putea furniza date esențiale privind valoarea acestor biomarkeri în monitorizarea postoperatorie, identificarea precoce a recurențelor sau a metastazelor, precum și în stratificarea pacienților în funcție de riscul evolutiv [261]. Acest tip de abordare ar aduce un plus semnificativ practicii clinice, prin caracterul său minim invaziv și prin potențialul de a completa informațiile furnizate de imagistica de urmărire.
- O a doua direcție o constituie extragerea și analiza microARN-urilor din **exosomii urinari**, colectați atât preoperator, cât și postoperator. Urina reprezintă un fluid biologic accesibil și neinvaziv, iar exosomii conțin un repertoriu stabil de microARN-uri ce reflectă procesele moleculare intratumorale [262]. Studiarea modificărilor expresiei miR-21-5p, miR-30c și miR-182-5p în exosomii urinari înainte și după intervenția chirurgicală ar putea deschide noi perspective în monitorizarea minim invazivă a pacienților, cu potențial de a deveni teste complementare în practica curentă.

- De asemenea, se conturează ca relevantă și extinderea investigațiilor asupra tumorilor benigne renale, precum oncocitomul sau angiomiolipomul, pentru a evalua dacă aceleași microARN-uri (miR-21-5p, miR-30c, miR-182-5p) prezintă modificări de expresie în aceste entități. Compararea profilului microARN între leziunile benigne și cele maligne ar putea contribui la dezvoltarea unor algoritmi diferențiali, extrem de utili în situațiile clinice în care diagnosticul este dificil doar pe baza criteriilor imagistice sau histopatologice convenționale.

În plus, validarea acestor rezultate în cohorte extinse și multicentrice, precum și integrarea datelor obținute cu informații de transcriptomică globală, proteomică și imunohistochimie, ar permite construirea unor modele predictive complexe. Utilizarea inteligenței artificiale și a algoritmilor de învățare automată ar putea facilita identificarea unor semnături multimarker robuste, cu aplicabilitate clinică directă.

În ansamblu, direcțiile viitoare de cercetare derivă din ipoteza centrală confirmată de prezenta teză: microARN-urile nu doar reflectă procesele fundamentale ale carcinogenezei renale, ci pot fi valorificate ca biomarkeri versatili, detectabili în fluide biologice și complementari markerilor imunohistochimici, deschizând perspective reale pentru implementarea unei medicine personalizate în patologia tumorală renală.

Bibliografie:

1. Cirillo L, Innocenti S, Becherucci F. Global epidemiology of kidney cancer. *Nephrol Dial Transplant*. 2024 May 31;39(6):920-928. doi: 10.1093/ndt/gfae036. PMID: 38341277.
2. Scelo G, Larose TL. Epidemiology and Risk Factors for Kidney Cancer. *J Clin Oncol*. 2018 Oct 29;36(36):JCO2018791905. doi: 10.1200/JCO.2018.79.1905. Epub ahead of print. PMID: 30372394; PMCID: PMC6299342.
3. Muglia VF, Prando A. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiol Bras*. 2015 May-Jun;48(3):166-74. doi: 10.1590/0100-3984.2013.1927. PMID: 26185343; PMCID: PMC4492569.
4. Goswami PR, Singh G, Patel T, Dave R. The WHO 2022 Classification of Renal Neoplasms (5th Edition): Salient Updates. *Cureus*. 2024 Apr 17;16(4):e58470. doi: 10.7759/cureus.58470. PMID: 38765391; PMCID: PMC11100973.
5. Kim M, Joo JW, Lee SJ, Cho YA, Park CK, Cho NH. Comprehensive Immunoprofiles of Renal Cell Carcinoma Subtypes. *Cancers (Basel)*. 2020 Mar 5;12(3):602. doi: 10.3390/cancers12030602. PMID: 32150988; PMCID: PMC7139472.
6. Berezowski, B.; Boothe, R., Jr.; Chaplin, B.; Del Vecchio, S.J.; Fares, Z.; Humphries, T.L.R.; Ng, K.L.; Noonan, T.; Samaratunga, H.; Urquhart, A.; et al. Biomarkers in Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Immunohistochemical Validation Study. *Cancers* 2025, 17, 2588. <https://doi.org/10.3390/cancers17152588>
7. Shi L, Lv R, Li C, Han D, Ren Z, Ren G. Expression of vascular endothelial growth factor C in renal cell carcinoma and its correlation with pathological parameters and prognosis. *Transl Androl Urol*. 2020 Aug;9(4):1670-1677. doi: 10.21037/tau-20-970. Retraction in: *Transl Androl Urol*. 2024 Jan 31;13(1):192. doi: 10.21037/tau-2023-04. PMID: 32944528; PMCID: PMC7475675.
8. Sanz del Pozo M, Gimeno Pelegrín J, Rodríguez Muñoz N, Utrilla Berberana D, Bascuas Hernandez J, López Del Val A, Gomez Barrera M, Azua Romeo J, Capapé Poves V, Borque Fernando Á, Sánchez Zalabardo JM, Sáez Gutiérrez B. Expression and prognostic value of VEGF, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, and E-Cadherin in clear cell renal cell carcinoma. *J Urol Oncol*. 2025;23(2):132-9. doi:10.22465/juo.255000080004.
9. Albiges L, Heng DYC, Lee JL, Walker S, Mellemaard A, Ottesen L, Frigault MM, L'Hernault A, Wessen J, Choueiri T, Cancel M, Signoretti S. Impact of MET status on treatment outcomes in papillary renal cell carcinoma: A pooled analysis of historical data. *Eur J Cancer*. 2022 Jul;170:158-168. doi: 10.1016/j.ejca.2022.04.021. Epub 2022 May 28. PMID: 35640484.

10. Choueiri TK, Heng DY, Lee JL, Cancel M, Verheijen RB, Mellema A, Ottesen LH, Frigault MM, L'Hernault A, Szigyarto Z, Signoretti S, Albiges L. Efficacy of Savolitinib vs Sunitinib in Patients With MET-Driven Papillary Renal Cell Carcinoma: The SAVOIR Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2020 Aug 1;6(8):1247-1255. doi: 10.1001/jamaoncol.2020.2218. Erratum in: *JAMA Oncol.* 2020 Sep 1;6(9):1473. doi: 10.1001/jamaoncol.2020.2873. PMID: 32469384; PMCID: PMC7260692.
11. Xu MY, Wang X, Yue SY, Meng QW, Bai XX, Chen L, Li RR, Zhang K, Xu LF, Guan Y, Liang CZ. hsa-miR-21-5p can serve as a standard biomarker in clear cell renal cell carcinoma by promoting tumor progression and influencing immune evasion. *Discov Oncol.* 2025 Sep 26;16(1):1738. doi: 10.1007/s12672-025-03263-y. PMID: 41003869; PMCID: PMC12474789.
12. Lin S, Li X, Ge Z, Chen W, Li Y, Zhang P, Wu Y, Wang W, Chen S, Zhou H, Tao L, Lai Y. A panel of three serum microRNAs as a potential diagnostic biomarker for renal cell carcinoma. *Sci Rep.* 2025;15:18135. doi:10.1038/s41598-025-65988-y.
13. Kulkarni P, Dasgupta P, Bhat NS, Shahryari V, Shiina M, Hashimoto Y, Majid S, Deng G, Saini S, Tabatabai ZL, Yamamura S, Tanaka Y, Dahiya R. Elevated miR-182-5p Associates with Renal Cancer Cell Mitotic Arrest through Diminished MALAT-1 Expression. *Mol Cancer Res.* 2018 Nov;16(11):1750-1760. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0762. Epub 2018 Jul 23. PMID: 30037856; PMCID: PMC6214767.
14. Senkin S, Moody S, Díaz-Gay M, Abedi-Ardekani B, Cattiaux T, Ferreira-Iglesias A, Wang J, Fitzgerald S, Kazachkova M, Vangara R, Le AP, Bergstrom EN, Khandekar A, Otlu B, Cheema S, Latimer C, Thomas E, Atkins JR, Smith-Byrne K, Cortez Cardoso Penha R, Carreira C, Chopard P, Gaborieau V, Keski-Rahkonen P, Jones D, Teague JW, Ferlicot S, Asgari M, Sangkhathat S, Attawettayanon W, Świątkowska B, Jarmalaite S, Sabaliauskaite R, Shibata T, Fukagawa A, Mates D, Jinga V, Rascu S, Mijuskovic M, Savic S, Milosavljevic S, Bartlett JMS, Albert M, Phouthavongsy L, Ashton-Prolla P, Botton MR, Silva Neto B, Bezerra SM, Curado MP, Zequi SC, Reis RM, Faria EF, de Menezes NS, Ferrari RS, Banks RE, Vasudev NS, Zaridze D, Mukeriya A, Shangina O, Matveev V, Foretova L, Navratilova M, Holcatova I, Hornakova A, Janout V, Purdue MP, Rothman N, Chanock SJ, Ueland PM, Johansson M, McKay J, Scelo G, Chanudet E, Humphreys L, de Carvalho AC, Perdomo S, Alexandrov LB, Stratton MR, Brennan P. Geographic variation of mutagenic exposures in kidney cancer genomes. *Nature.* 2024 May;629(8013):910-918. doi: 10.1038/s41586-024-07368-2. Epub 2024 May 1. PMID: 38693263; PMCID: PMC11111402.
15. Baral A, Cranford HM, Sharma J, Pinheiro PS. The prognostic role of cigarette smoking in Kidney Cancer Survival. *Cancer Med.* 2023 Jul;12(13):14756-14766. doi: 10.1002/cam4.6104. Epub 2023 May 18. PMID: 37199389; PMCID: PMC10358187.

16. Aurilio G, Piva F, Santoni M, Cimadamore A, Sorgentoni G, Lopez-Beltran A, Cheng L, Battelli N, Nolè F, Montironi R. The Role of Obesity in Renal Cell Carcinoma Patients: Clinical-Pathological Implications. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 13;20(22):5683. doi: 10.3390/ijms20225683. PMID: 31766196; PMCID: PMC6888048.
17. Alcala K, Mariosa D, Smith-Byrne K, Nasrollahzadeh Nesheli D, Carreras-Torres R, Ardanaz Aicua E, Bondonno NP, Bonet C, Brunström M, Bueno-de-Mesquita B, Chirlaque MD, Christakoudi S, Heath AK, Kaaks R, Katzke V, Krogh V, Ljungberg B, Martin RM, May A, Melander O, Palli D, Rodriguez-Barranco M, Sacerdote C, Stocks T, Tjønneland A, Travis RC, Vermeulen R, Chanock S, Purdue M, Weiderpass E, Muller D, Brennan P, Johansson M. The relationship between blood pressure and risk of renal cell carcinoma. *Int J Epidemiol.* 2022 Aug 10;51(4):1317-1327. doi: 10.1093/ije/dyac042. PMID: 35312764; PMCID: PMC9365619.
18. Ashouri K, Mohseni S, Tourtelot J, Sharma P, Spiess PE. Implications of Von Hippel-Lindau Syndrome and Renal Cell Carcinoma. *J Kidney Cancer VHL.* 2015 Sep 25;2(4):163-173. doi: 10.15586/jkcvhl.2015.41. PMID: 28326271; PMCID: PMC5345519.
19. Nezami, B.G.; Teh, B.T.; Lin, X.; Yang, X.J. Molecular Pathogenesis of Renal Neoplasms in Patients with Birt–Hogg–Dubé Syndrome. *J. Mol. Pathol.* 2024, 5, 478-496. <https://doi.org/10.3390/jmp5040032>
20. Mercken K, Van Berkel B, De Wever L. Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer (HLRCC) Syndrome: Case Report. *J Belg Soc Radiol.* 2024;108(1):79. doi:10.5334/jbsr.3687.
21. Clark PE. The role of VHL in clear-cell renal cell carcinoma and its relation to targeted therapy. *Kidney Int.* 2009 Nov;76(9):939-45. doi: 10.1038/ki.2009.296. Epub 2009 Aug 5. PMID: 19657325; PMCID: PMC2963106.
22. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature.* 2013 Jul 4;499(7456):43-9. doi: 10.1038/nature12222. Epub 2013 Jun 23. PMID: 23792563; PMCID: PMC3771322.
23. Choueiri TK, Kaelin WG Jr. Targeting the HIF2-VEGF axis in renal cell carcinoma. *Nat Med.* 2020 Oct;26(10):1519-1530. doi: 10.1038/s41591-020-1093-z. Epub 2020 Oct 5. Erratum in: *Nat Med.* 2024 Oct;30(10):3027. doi: 10.1038/s41591-024-03260-8. PMID: 33020645.
24. Cohen RB, Oudard S. Antiangiogenic therapy for advanced renal cell carcinoma: management of treatment-related toxicities. *Invest New Drugs.* 2012 Oct;30(5):2066-79. doi: 10.1007/s10637-012-9796-8. Epub 2012 Feb 12. PMID: 22327313; PMCID: PMC3432793.
25. Hakimi AA, Ostrovnya I, Reva B, Schultz N, Chen YB, Gonen M, Liu H, Takeda S, Voss MH, Tickoo SK, Reuter VE, Russo P, Cheng EH, Sander C, Motzer RJ, Hsieh JJ; ccRCC Cancer Genome Atlas (KIRC TCGA) Research Network investigators. Adverse outcomes in clear cell renal cell carcinoma with mutations of 3p21 epigenetic regulators BAP1 and SETD2: a report by MSKCC and the KIRC TCGA research network. *Clin Cancer Res.* 2013 Jun 15;19(12):3259-67.

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3886. Epub 2013 Apr 25. PMID: 23620406; PMCID: PMC3708609.

26. Kapur P, Peña-Llopis S, Christie A, Zhrebker L, Pavía-Jiménez A, Rathmell WK, Xie XJ, Brugarolas J. Effects on survival of BAP1 and PBRM1 mutations in sporadic clear-cell renal-cell carcinoma: a retrospective analysis with independent validation. *Lancet Oncol.* 2013 Feb;14(2):159-167. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70584-3. Epub 2013 Jan 16. PMID: 23333114; PMCID: PMC4674067.

27. Turajlic S, Xu H, Litchfield K, Rowan A, Horswell S, Chambers T, O'Brien T, Lopez JI, Watkins TBK, Nicol D, Stares M, Challacombe B, Hazell S, Chandra A, Mitchell TJ, Au L, Eichler-Jonsson C, Jabbar F, Soultati A, Chowdhury S, Rudman S, Lynch J, Fernando A, Stamp G, Nye E, Stewart A, Xing W, Smith JC, Escudero M, Huffman A, Matthews N, Elgar G, Phillimore B, Costa M, Begum S, Ward S, Salm M, Boeing S, Fisher R, Spain L, Navas C, Grönroos E, Hobor S, Sharma S, Aurangzeb I, Lall S, Polson A, Varia M, Horsfield C, Fotiadis N, Pickering L, Schwarz RF, Silva B, Herrero J, Luscombe NM, Jamal-Hanjani M, Rosenthal R, Birkbak NJ, Wilson GA, Pipek O, Ribli D, Krzystanek M, Csabai I, Szallasi Z, Gore M, McGranahan N, Van Loo P, Campbell P, Larkin J, Swanton C; TRACERx Renal Consortium. Deterministic Evolutionary Trajectories Influence Primary Tumor Growth: TRACERx Renal. *Cell.* 2018 Apr 19;173(3):595-610.e11. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.043. Epub 2018 Apr 12. PMID: 29656894; PMCID: PMC5938372.

28. Cancer Genome Atlas Research Network; Linehan WM, Spellman PT, Ricketts CJ, Creighton CJ, Fei SS, Davis C, Wheeler DA, Murray BA, Schmidt L, Vocke CD, Peto M, Al Mamun AA, Shinbrot E, Sethi A, Brooks S, Rathmell WK, Brooks AN, Hoadley KA, Robertson AG, Brooks D, Bowlby R, Sadeghi S, Shen H, Weisenberger DJ, Bootwalla M, Baylin SB, Laird PW, Cherniack AD, Saksena G, Haake S, Li J, Liang H, Lu Y, Mills GB, Akbani R, Leiserson MD, Raphael BJ, Anur P, Bottaro D, Albiges L, Barnabas N, Choueiri TK, Czerniak B, Godwin AK, Hakimi AA, Ho TH, Hsieh J, Ittmann M, Kim WY, Krishnan B, Merino MJ, Mills Shaw KR, Reuter VE, Reznik E, Shelley CS, Shuch B, Signoretti S, Srinivasan R, Tamboli P, Thomas G, Tickoo S, Burnett K, Crain D, Gardner J, Lau K, Mallery D, Morris S, Paulauskis JD, Penny RJ, Shelton C, Shelton WT, Sherman M, Thompson E, Yena P, Avedon MT, Bowen J, Gastier-Foster JM, Gerken M, Leraas KM, Lichtenberg TM, Ramirez NC, Santos T, Wise L, Zmuda E, Demchok JA, Felau I, Hutter CM, Sheth M, Sofia HJ, Tarnuzzer R, Wang Z, Yang L, Zenklusen JC, Zhang J, Ayala B, Baboud J, Chudamani S, Liu J, Lolla L, Naresh R, Pihl T, Sun Q, Wan Y, Wu Y, Ally A, Balasundaram M, Balu S, Beroukhir R, Bodenheimer T, Buhay C, Butterfield YS, Carlsen R, Carter SL, Chao H, Chuah E, Clarke A, Covington KR, Dahdouli M, Dewal N, Dhalla N, Doddapaneni HV, Drummond JA, Gabriel SB, Gibbs RA, Guin R, Hale W, Hawes A, Hayes DN, Holt RA, Hoyle AP, Jefferys SR, Jones SJ, Jones CD, Kalra D, Kovar C, Lewis L, Li J, Ma Y, Marra MA, Mayo M, Meng S, Meyerson M, Mieczkowski PA, Moore RA, Morton D, Mose LE, Mungall AJ, Muzny D, Parker JS, Perou CM, Roach J, Schein JE, Schumacher SE, Shi Y, Simons JV, Sipahimalani P, Skelly T, Soloway MG, Sougnez C, Tam A, Tan D, Thiessen N, Veluvolu U,

Wang M, Wilkerson MD, Wong T, Wu J, Xi L, Zhou J, Bedford J, Chen F, Fu Y, Gerstein M, Haussler D, Kasaian K, Lai P, Ling S, Radenbaugh A, Van Den Berg D, Weinstein JN, Zhu J, Albert M, Alexopoulou I, Andersen JJ, Auman JT, Bartlett J, Bastacky S, Bergsten J, Blute ML, Boice L, Bollag RJ, Boyd J, Castle E, Chen YB, Cheville JC, Curley E, Davies B, DeVolk A, Dhir R, Dike L, Eckman J, Engel J, Harr J, Hrebinko R, Huang M, Huelsenbeck-Dill L, Iacocca M, Jacobs B, Lobis M, Maranchie JK, McMeekin S, Myers J, Nelson J, Parfitt J, Parwani A, Petrelli N, Rabeno B, Roy S, Salner AL, Slaton J, Stanton M, Thompson RH, Thorne L, Tucker K, Weinberger PM, Winemiller C, Zach LA, Zuna R. Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2016 Jan 14;374(2):135-45. doi: 10.1056/NEJMoal505917. Epub 2015 Nov 4. PMID: 26536169; PMCID: PMC4775252.

29. Guérin C, et al. Recording and classifying MET receptor mutations in cancers. *eLife*. 2024;13:e92762.

30. Gupta S, Kang HC, Ganeshan D, Morani A, Gautam R, Choyke PL, Kundra V. The ABCs of BHD: An In-Depth Review of Birt-Hogg-Dubé Syndrome. *AJR Am J Roentgenol*. 2017 Dec;209(6):1291-1296. doi: 10.2214/AJR.17.18071. Epub 2017 Oct 5. PMID: 28981362.

31. Davis CF, Ricketts CJ, Wang M, Yang L, Cherniack AD, Shen H, Buhay C, Kang H, Kim SC, Fahey CC, Hacker KE, Bhanot G, Gordenin DA, Chu A, Gunaratne PH, Biehl M, Seth S, Kaiparettu BA, Bristow CA, Donehower LA, Wallen EM, Smith AB, Tickoo SK, Tamboli P, Reuter V, Schmidt LS, Hsieh JJ, Choueiri TK, Hakimi AA; The Cancer Genome Atlas Research Network; Chin L, Meyerson M, Kucherlapati R, Park WY, Robertson AG, Laird PW, Henske EP, Kwiatkowski DJ, Park PJ, Morgan M, Shuch B, Muzny D, Wheeler DA, Linehan WM, Gibbs RA, Rathmell WK, Creighton CJ. The somatic genomic landscape of chromophobe renal cell carcinoma. *Cancer Cell*. 2014 Sep 8;26(3):319-330. doi: 10.1016/j.ccr.2014.07.014. Epub 2014 Aug 21. PMID: 25155756; PMCID: PMC4160352.

32. Qu, Y., Wu, X., Anwaier, A. et al. Proteogenomic characterization of MiT family translocation renal cell carcinoma. *Nat Commun* 13, 7494 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34460-w>.

33. McCamy W, Yousefiasl M, Tretiakova M, Jagtiani M, Hall E. Metastatic SMARCB1-Deficient Renal Medullary Carcinoma without Hemoglobinopathy with Durable and Dramatic Response to Pembrolizumab plus Lenvatinib: Case Report. *Case Rep Oncol*. 2024 Sep 17;17(1):1025-1033. doi: 10.1159/000540937. PMID: 39474526; PMCID: PMC11521492.

34. Distante A, Marandino L, Bertolo R, Ingels A, Pavan N, Pecoraro A, Marchioni M, Carbonara U, Erdem S, Amparore D, Campi R, Roussel E, Calìo A, Wu Z, Palumbo C, Borregales LD, Mulders P, Muselaers CHJ; EAU Young Academic Urologists (YAU) Renal Cancer Working Group. Artificial Intelligence in Renal Cell Carcinoma Histopathology: Current Applications and Future Perspectives. *Diagnostics (Basel)*. 2023 Jul 6;13(13):2294. doi: 10.3390/diagnostics13132294. PMID: 37443687; PMCID: PMC10340141.

35. Li MY, Pan Y, Lv Y, Ma H, Sun PL, Gao HW. Digital pathology and artificial intelligence in renal cell carcinoma focusing on feature extraction: a literature review. *Front Oncol.* 2025 Jan 24;15:1516264. doi: 10.3389/fonc.2025.1516264. PMID: 39926279; PMCID: PMC11802434.
36. M.P. Humphries, P. Maxwell, M. Salto-Tellez, QuPath: The global impact of an open source digital pathology system, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, Volume 19, 2021, Pages 852-859, ISSN 2001-0370, <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.022>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S200103702100026X>).
37. G.T. Gibney, S.A. Aziz, R.L. Camp, P. Conrad, B.E. Schwartz, C.R. Chen, W.K. Kelly, H.M. Kluger, c-Met is a prognostic marker and potential therapeutic target in clear cell renal cell carcinoma, *Annals of Oncology*, Volume 24, Issue 2, 2013, Pages 343-349, ISSN 0923-7534, <https://doi.org/10.1093/annonc/mds463>.

Lista publicații

Articole in extenso publicate în reviste ISI, cu factor de impact:

1. **Burlacu Ionuț**; Așchie, M.; Cozaru, G.C.; Deacu, M.; Vizireanu, G.M.; Mitroi, A.N.; Mitroi, A.F.; Brînzan, C.S. The miR-21-5p, miR-30c-5p, and miR-182-5p as Biomarkers in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: A Southeastern Romanian Cohort Study. *Genes* 2025, *16*, 650. <https://doi.org/10.3390/genes16060650>, indexat Web of Science (SCIE), PubMed, Scopus, factor de impact 2,4.
2. **Burlacu Ionuț**; Așchie, M.; Boșoteanu, M.; Bălțătescu, G.I.; Dinu, A. Mucinous Tubular and Spindle Cell Carcinoma of the Kidney: A Rare Renal Neoplasm—Case Report and Literature Review. *Reports* 2025, *8*, 189. <https://doi.org/10.3390/reports8040189>, indexat Web of Science (ESCI), PubMed, factor de impact 0,6.

Articole științifice publicate in extenso in reviste cotate BDI - autor principal/autor corespondent/ultim autor/autori cu contribuție egală:

1. **Burlacu Ionuț**, Așchie Mariana, Deacu Mariana, Cozaru Georgeta Camelia, Brînzan Costel Stelian, Cojocaru Oana, Dinu Alexandra, Talpeș Raluca, Iorga Ionuț-Ciprian, Enciu Manuela Acquired cystic disease associated renal cell carcinoma clinically manifested as a retroperitoneal hematoma – brief presentation and review of the literature, *ARS Medica Tomitana* 2025, *2*(31): pag.59-64, doi: 10.2478/arism-2025-0009.
2. Gabriela Izabela Bălțătescu, Nicolae Dobrin, **Burlacu Ionuț**. The Role and Financial Implications of Digital Pathology for the System Health. *Ovidius University Annals. Economic Sciences Series* 2020;20(1):845-851, jurnal indexat BDI (EBSCO, DOAJ, RePEc, ERIH PLUS, Cabell's Directories).