

---

TEZĂ DE DOCTORAT - REZUMAT

# Optimizarea diagnosticului în cancerul bronhopulmonar

---

Doctorand **Antonia Haranguș**

---

Conducător de doctorat Prof.dr. **Ioana Neagoe**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	17
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Epidemiologia cancerului bronhopulmonar</b>	21
1.1. Incidență. Mortalitate. Supraviețuire.	21
1.2. Factori de risc	21
1.2.1. Fumatul și cancerul pulmonar	21
1.2.2. Poluanții atmosferici	22
1.3. Perspective și necesități de viitor	22
<b>2. Profilul morfologic și molecular al cancerului pulmonar</b>	23
2.1. Clasificarea histopatologică a cancerului pulmonar	23
2.2. Profilul molecular al cancerului pulmonar	24
2.2.1. Cancerul pulmonar non-microcelular	24
2.2.1.1. Adenocarcinomul pulmonar	25
2.2.1.2. Carcinomul scuamos pulmonar	28
2.2.2. Cancerul pulmonar cu celule mici	30
2.2.3. Rolul miARN în dezvoltarea și progresia cancerului bronhopulmonar	30
2.2.4. miARN-urile circulante și cancerul bronhopulmonar	34
<b>3. Metode de diagnostic endoscopic în cancerul bronhopulmonar</b>	35
3.1. Bronhoscopia flexibilă	35
3.2. Ecografia endobronșică cu puncție aspirativă transbronșică	36
3.2.1. Aspecte tehnice	37
3.2.2. Citologia rapidă on-site	37
3.2.3. Diagnosticul molecular prin EBUS-TBNA	37
<b>4. Diagnosticul cancerului bronhopulmonar prin „biopsie lichidă”</b>	38
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteza de lucru/obiective</b>	43
<b>2. Studiul 1 – Optimizarea diagnosticului în cancerul bronhopulmonar prin EBUS-TBNA</b>	45
2.1. Introducere	45
2.2. Ipoteza de lucru	46
2.3. Material și metodă	46
2.4. Rezultate	48
2.5. Discuții	53
2.6. Concluzii	55
<b>3. Studiul 2. Evaluarea nivelului de expresie miARN la nivel tisular în cancerul pulmonar non-microcelular la bărbați – identificarea semnăturii moleculare specifice prin microarray</b>	57
3.1. Introducere	57
3.2. Ipoteza de lucru	58

3.3. Material și metodă	59
3.4. Rezultate	61
3.5. Discuții	70
3.6. Concluzii	71
<b>4. Studiul 3. Evaluarea nivelului de expresie miRNA la nivel tisular în cancerul pulmonar non-microcelular la bărbați - validarea semnăturii moleculare specifice</b>	73
4.1. Introducere	73
4.2. Ipoteză de lucru	74
4.3. Material și metodă	75
4.4. Rezultate	77
4.5. Discuții	79
4.6. Concluzii	81
<b>5. Discuții generale</b>	83
<b>6. Concluzii generale</b>	85
<b>7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	87
<b>REFERINȚE</b>	89

CUVINTE CHEIE: cancer pulmonar, EBUS-TBNA, microARN, microarray

## INTRODUCERE

Cancerul bronhopulmonar continuă să reprezinte o problemă la nivel global prin mortalitatea sa ridicată, cauzată în principal de diagnosticul tardiv și posibilitățile terapeutice limitate. Latența apariției simptomatologiei în acest tip de cancer, accesul restrâns la tehnicile de diagnostic și randamentul diagnostic variabil al unora din acestea, influențează supraviețuirea pacienților.

Metodele endoscopice de diagnostic, considerate tehnici cu invazivitate redusă, precum bronhoscopia flexibilă cu biopsie endobronșică, reprezintă deseori alegerea optimă pentru obținerea de probe biotice la pacienții eligibili, și anume pacienți cu expresie endobronșică a tumorii. Până la introducerea EBUS-TBNA în practica clinică, pacienții fără expresie endobronșică tumorală, cu tumori tangențiale la arborele bronșic sau cu adenopatii mediastinale și/sau hilare erau diagnosticați prin metode chirurgicale, cu invazivitate și riscuri crescute. Dezvoltarea de noi terapii, precum imunoterapia sau terapia țintită cu inhibitori tirozin-kinazici, a creat necesitatea de a obține probe biotice adecvate cantitativ și calitativ pentru a ajunge cât mai rapid la un diagnostic histopatologic și molecular complet. Astfel a apărut nevoia de studii pentru a crește încrederea în capacitatea EBUS-TBNA de a obține un diagnostic adecvat la pacienții cu cancer pulmonar. Prima parte a acestei lucrări își propune să demonstreze valoarea acestei investigații, precum și contribuția citologiei on-site la diagnosticul histopatologic și molecular al cancerului pulmonar.

Avansările tehnologice continue în domeniul genomicii cancerului bronhopulmonar și a terapiilor oncologice personalizate cresc în permanență necesitatea studierii peisajului molecular, cu descoperirea de noi biomarkeri tisulari și circulanți. Tehnologia microarray poate detecta expresia a mii de gene în același timp utilizând lame de microscop care conțin mii de secvențe cunoscute de acizi ribonucleici. Pe lângă genele codificatoare de proteine, o mare parte a genomului este necodificant. Înțelegerea contribuției moleculelor necodificante la inițierea, dezvoltarea și extensia cancerului pulmonar poate duce la descoperiri importante în diagnosticul, terapia și prognosticul pacienților. Una dintre cele mai semnificative clase ale acestei părți a genomului este reprezentată de miARN-uri, cu roluri esențiale în carcinogeneză, roluri precum proliferarea, diferențierea și apoptoza celulară. Descoperirea proceselor influențate de miARN-uri și a căilor de semnalizare în care sunt implicate este de interes în dezvoltarea ulterioară de terapii personalizate. Ultimele două părți ale acestei teze își propun să evalueze modelele de expresie ale miARN-urilor și mecanismele specifice în care acestea sunt implicate la pacienții de gen masculin cu cancer pulmonar non-microcelular. Pentru aceasta s-au utilizat probe-pereche de țesut tumoral și țesut normal adiacent recoltate prin bronhoscopie flexibilă cu biopsie endobronșică, precum și probe de plasmă, recoltate de la pacienți cu NSCLC. Datele obținute prin tehnica de microarray au fost incluse într-o analiză care a integrat și datele publice din TCGA (the Cancer Genome Atlas), obținându-se astfel o semnătură comună formată din miARN-uri cu expresie modificată. Aceasta ar putea contribui în viitor la terapia personalizată a pacienților de sex masculin cu NSCLC, punând în valoare diferențe specifice legate de sex. Analiza funcțională a datelor obținute și identificarea genelor țintă pot aduce clarificări în interacțiunile care au loc la nivelul căilor de semnalizare din NSCLC la bărbați și detectarea de noi ținte terapeutice. Obiectivul ultimei părți a fost validarea prin qRT-PCR în probe de țesut a miR-183-3p și miR-34c-5p din semnătura moleculară comună, precum și validarea în plasmă a miR-34-5p. Aceste experimente au avut ca scop evaluarea utilității viitoare a miARN-urilor alese ca biomarkeri tisulari, iar a miR-34-5p inclusiv ca biomarker plasmatic.

Această teză își propune optimizarea diagnosticului în cancerul bronhopulmonar atât la nivel clinic, cât și paraclinic, cu scopul final de a contribui la creșterea supraviețuirii pacienților diagnosticați cu această patologie.

## **CONTRIBUȚIA PERSONALĂ**

Impactul pe care îl are cancerul bronhopulmonar asupra mortalității prin cancer și rata mică a supraviețuirii pacienților diagnosticați în stadii avansate, determină necesitatea permanentă a dezvoltării unor noi modalități de a îmbunătăți diagnosticul în această patologie. Aceasta se poate realiza la nivelul multiplelor etape ale diagnosticului.

### **Studiul 1. Optimizarea diagnosticului în cancerul bronhopulmonar prin EBUS-TBNA**

EBUS-TBNA reprezintă o metodă minim-invazivă care combină vizualizarea directă a căilor aeriene cu puncția transbronșică aspirativă ghidată ecografic a adenopatiilor hilare și mediastinale sau a tumorilor extraluminale care se află în contact direct cu lumenul căilor aeriene. Avantajul principal al metodei constă în posibilitatea efectuării diagnosticului și a stadializării mediastinului cu o singură investigație. Studiile recente efectuate în vederea demonstrării utilității testării moleculare pe specișenele mici obținute prin EBUS-TBNA la pacienții cu cancer pulmonar au fost de mici dimensiuni și nu au fost însoțite de citologie rapidă on-site (ROSE) în fiecare caz. Impactul utilizării ROSE în creșterea randamentului EBUS este contradictoriu.

Scopul realizării studiului de față a fost de a evalua modul în care EBUS-TBNA poate optimiza diagnosticul cancerului pulmonar. Având în vedere raportările contradictorii privind eficiența și contribuția ROSE, am calculat randamentul diagnostic al acestei metode în diagnosticul cancerului pulmonar comparativ cu diagnosticul histopatologic. În final, am evaluat fezabilitatea testării moleculare (EGFR, ALK, PD-L1) pe specișenele mici obținute prin EBUS-TBNA cu ajutorul ROSE.

Am realizat un studiu de tip retrospectiv pe un lot de 100 pacienți de la Clinica de Pneumoftiziologie Leon Daniello, Cluj-Napoca, la care s-a efectuat EBUS-TBNA de către un medic bronholog cu experiență în domeniu. Procedura s-a realizat în anestezie generală și a fost însoțită de ROSE, la pacienți care au prezentat la examinările imagistice o formațiune tumorală pulmonară cu adenopatii mediastinale și/sau hilare. Fragmentul principal obținut prin TBNA a fost introdus în parafină, iar blocul examinat de către medicul anatomopatolog. S-a analizat în continuare, în funcție de rezultatul histopatologic, profilul mutațional (EGFR, ALK, PD-L1) pe specișenele de mici dimensiuni obținute prin TBNA.

69 pacienți de sex masculin și 31 de sex feminin au fost incluși în studiu. Majoritatea adenopatiilor puncționate s-au regăsit în stația ganglionară 7 (subcarinară), stația 4R (paratraheală inferioară dreaptă) și 10R (hilară dreaptă). S-au efectuat, în medie, câte 4 puncții per ganglion. Un diagnostic sigur de malignitate a putut fi precizat on-site în 80% din cazuri. Cea mai frecvent identificată patologie a fost adenocarcinomul în 34% din cazuri, iar la 34% din pacienți, citologul a putut preciza existența celulelor maligne, fără a le putea caracteriza. Proporția crescută a adenocarcinomului diagnosticat prin EBUS-TBNA poate fi corelat cu faptul că acest tip histopatologic are o localizare preponderent periferică în parenchimul pulmonar, fiind mai rar diagnosticat prin bronhoscopie flexibilă convențională. Randamentul diagnostic al ROSE în NSCLC a fost calculat cu ajutorul tabelor de contingență, folosind diagnosticul histopatologic ca standard de aur. ROSE a

demonstrat o sensibilitate înaltă de 92,18%, o specificitate de 75%, o valoare predictivă pozitivă de 93,65% și o valoare predictivă negativă de 70,58%. La aproximativ un sfert din lotul de pacienți s-a realizat testarea pentru detecția de mutații genetice (EGFR, ALK, PD-L1). Testările nu au putut fi realizate pe întreg lotul de pacienți deoarece acestea au început în instituția noastră doar în august 2018 pentru specișenele de EBUS. Toate probele care au necesitat testare pentru mutații EGFR și translocații ALK au fost adecvate pentru testare. La doi dintre pacienții (9,09%) cu adenocarcinom s-au detectat mutații ale EGFR, și anume substituția L858R și deleția E746-A770del. Frecvența mutației a fost ușor mai scăzută decât cea raportată în studii asemănătoare. Evaluarea expresiei PD-L1 pe specișenele mici obținute prin EBUS la pacienții din acest lot de studiu a fost realizată cu succes în 91,66% din cazurile care au fost supuse testării. Limitările studiului de față ar putea fi numărul redus de pacienți care au fost testați molecular.

Concluzia acestui studiu este că EBUS-TBNA e o metodă valoroasă în diagnosticul și stadializarea cancerului pulmonar, iar utilizarea ROSE potențează această valoare prin obținerea unui feedback în timpul investigației, a unui diagnostic preliminar rapid și ajută la asigurarea obținerii unei probe calitative pentru testarea moleculară a NSCLC. Acest studiu este printre primel care raportează eficiența testării mutațiilor genetice pe specișenele mici obținute prin EBUS-TBNA la pacienții cu cancer non-microcelular din România.

## **Studiul 2. Evaluarea nivelului de expresie miARN la nivel tisular în cancerul pulmonar non-microcelular la bărbați – identificarea semnăturii moleculare specifice prin microarray**

miARN-urile sunt o clasă de molecule ARN necodificatoare care au roluri esențiale în reglarea posttranscripțională a expresiei genelor în aproape toate procesele biologice, inclusiv în proliferarea, diferențierea și apoptoza celulară. Tehnologia microarray este o platformă de încredere pentru explorarea biologică, permițând evaluarea semnăturilor de gene codificatoare sau necodificatoare. Datele din literatură arată faptul că există diferențe de expresie ale miARN-urilor între genul masculin și cel feminin, atât în condiții fiziologice, cât și patologice.

Scopul acestui studiu este de a explora expresia specifică în funcție de sex într-o cohortă de pacienți de gen masculin cu NSCLC, având în vedere incidența și mortalitatea mai ridicată la acest gen. O mai bună înțelegere a dereglării expresiei miARN-urilor în funcție de gen poate oferi o perspectivă esențială în patogeneza cancerului. De asemenea, aceasta poate identifica noi abordări în stratificarea pacienților pentru a obține un răspuns mai bun la terapiile existente.

Acest studiu se concentrează pe pattern-urile de expresie globală a miARN-urilor evaluate prin microarray la pacienți de genul masculin cu NSCLC în eșantioane perechi (8 eșantioane perechi recoltate de la pacienți de gen masculin cu NSCLC, 4 adenocarcinoame și 4 carcinoame scuamoase, stadializate IB până la IIIA – cohorta UMPH). S-au evaluat de asemenea nivelurile de expresie ale miARN pentru pacienții cu NCLC din TCGA, observându-se diferențe semnificative pentru NSCLC între bărbați și femei. Pentru a analiza implicarea acestor miARN-uri în procese metabolice și tumorale importante am realizat o hartă termografică. S-a realizat semnătura comună a celor două cohorte de pacienți care constă în opt miARN-uri supraexprimate și nouă miARN-uri subexprimate. S-a realizat o analiză cu ajutorul DIANA miRpath (v3.0) pentru semnătura formată din miARN-uri alterate comune pentru pacienții de sex masculin cu NSCLC a relevat alterări importante în căile de semnalizare precum calea de semnalizare TP53, calea adeziunii focale, semnalizarea PI3K-AKT, semnalizarea Hippo, calea TGF-beta și a joncțiunii de aderență. Un aspect important este reprezentat de țintele miARN-urilor selectate din căile NSCLC, care au fost evidențiate cu ajutorul căilor de semnalizare KEGG prin DIANA-miRPath v3.0. Această abordare are un rol important în dezvoltarea de noi terapii țintite. MiR-21, miR-34a-5p, miR-30a-3p, miR-143-3p, și miR-145-5p pot fi considerate cele mai bune candidate datorită

numărului mare de gene țintite. Aceste molecule sunt conectate direct și indirect cu un număr important de gene care sunt corelate cu supraviețuirea globală, gene precum TGFB1, p38 MAPK, THEMIS, și SMAD2.

În concluzie, acest studiu demonstrează rolul central al miARN-urilor în patogeneza NSCLC la pacienții de sex masculin. Limitările acestui studiu care utilizează tehnologia microarray sunt numărul redus de probe procesate și dimensiunile reduse ale probelor de țesut obținute prin biopsie bronșică. Deși numărul cazurilor a fost redus în acest studiu de microarray, am obținut o listă reprezentativă de miARN-uri cu expresie modificată în probele de cancer pulmonar care vor putea fi utilizate ca puncte de intervenție terapeutică sau biomarkeri diagnostici

### **Studiul 3. Evaluarea nivelului de expresie miRNA la nivel tisular în cancerul pulmonar non-microcelular la bărbați – validarea semnăturii moleculare specifice**

În studiul 2 al acestei teze am identificat moleculele cheie de miARN care pot forma o semnătură moleculară specifică la pacienții de sex masculin diagnosticați cu NSCLC, precum și o parte a căilor de semnalizare în care sunt implicate. Studiul 3 conține validarea expresiei semnăturii miARN folosind qRT-PCR, urmată apoi de o validare la nivel plasmatic prin ELISA a țintelor identificate, și anume EGFR, IGF-IR și TGFβ1. Identificarea interacțiunilor miARN-mARN este fundamentală în descoperirea rețelelor de reglementare influențate de miARN-uri și a schimbărilor pe care le produc în cancerul pulmonar.

miARN-urile cu expresie modificată au fost validate cu ajutorul qRT-PCR în probe de țesut și plasmă recoltate de la pacienți cu NSCLC. Am integrat rezultatele de expresie a miARN-urilor în software-ul Ingenuity Pathway Analysis (IPA), care a fost utilizat pentru identificarea mecanismelor de reglementare și a genelor țintă implicate. Luând în considerare genele țintă identificate, am selectat proteinele EGFR, IGF-IR și TGFβ1 pentru validare la nivelul plasmă prin metoda ELISA. Abordarea noastră de validare a implicat utilizarea qRT-PCR și ELISA, două tehnici accesibile în laboratoare, crescând astfel potențialul de integrare a descoperirilor în practica clinică.

O cohortă formată din 64 de pacienți cu NSCLC a fost realizată pentru validarea prin qRT-PCR a miARN-urilor la nivel tisular. O validare adițională pentru miARN-urile selectate a fost realizată la nivel plasmatic într-o cohortă parțial comună formată din 19 pacienți. S-a realizat de asemenea o validare ELISA a nivelurilor de expresie a EGFR, IGF-IR și TGFβ1, detectându-se niveluri scăzute ale concentrației în probele de ser pentru EGFR la pacienții din lotul de studiu comparativ cu lotul martor. Nu au existat modificări semnificative statistice pentru IGF-IR și TGFβ1. Nivelurile de expresie ale miARN-urilor din probele de plasmă au fost comparate cu nivelurile de expresie regăsite în plasma a 37 subiecți sănătoși. Selecția miARN-urilor pentru validare a fost bazată pe semnificația statistică a datelor de microarray și luând în considerare semnătura comună cu datele din TCGA. Astfel, a fost selectat un reprezentant din familia miR-34, miR-34c-5p și miR-183-5p.

Validarea prin qRT-PCR la nivel plasmatic a fost efectuată pentru miR-34c-5p. S-a observat un nivel de expresie crescut ale miR-34c-5p crescut în probele de plasmă ale pacienților cu cancer comparativ cu subiecții sănătoși ( $p=0.004$  și  $AUC = 0,8467$ ). Limitările acestui studiu se datorează numărului redus de probe utilizate pentru etapa de cuantificare în plasmă a miR-34-5p.

În concluzie, identificarea de semnături formate din miARN-uri, urmată de validarea expresiei acestor semnături reprezintă o contribuție fundamentală pentru optimizarea diagnosticului și terapiei prin înțelegerea dinamicii proceselor de la nivel tumoral și dezvoltarea de terapii țintă. Validarea în plasmă a expresiei miR-34c-5p poate aduce valoare suplimentară în utilizarea acestui marker circulant la bărbații cu NSCLC. Numărul redus de probe reprezintă limita principală a acestui studiu, fiind astfel necesare cercetări suplimentare înainte de introducerea semnăturii moleculare în practica clinică.

---

PhD THESIS SUMMARY

# Optimizing the diagnosis in lung cancer

PhD student **Antonia Haranguş**

---

PhD Supervisor Prof.dr. **Ioana Neagoe**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA



# TABEL OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	17
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	
<b>1. Lung cancer epidemiology</b>	21
1.1. Incidence. Mortality. Survival.	21
1.2. Risk factors	21
1.2.1. Smoking and lung cancer	21
1.2.2. Air pollutants	22
1.3. Future perspectives	22
<b>2. The morphological and molecular profile of lung cancer</b>	23
2.1. The histological classification of lung cancer	23
2.2. The molecular profile of lung cancer	24
2.2.1. Non-small cell lung cancer	24
2.2.1.1. Lung adenocarcinoma	25
2.2.1.2. Squamous lung carcinoma	28
2.2.2. Small cell lung cancer	30
2.2.3. miRNAs role in the development and progression of lung cancer	30
2.2.4. Circulating miRNAs and lung cancer	34
<b>3. Endoscopic methods for the diagnosis of lung cancer</b>	35
3.1. Flexible bronchoscopy	35
3.2. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration	36
3.2.1. Technical aspects	37
3.2.2. Rapid on-site cytology	37
3.2.3. The molecular diagnosis with EBUS-TBNA	37
<b>4. Diagnosing lung cancer with liquid biopsy</b>	38
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. Objectives</b>	43
<b>2. Study 1 – Optimizing lung cancer diagnosis with EBUS-TBNA</b>	45
2.1. Introduction	45
2.2. Aim	46
2.3. Materials and methods	46
2.4. Results	48
2.5. Discussions	53
2.6. Conclusions	55
<b>3. Study 2. Evaluating the miRNA tissue expression for male non-small cell lung cancer – identification of the specific molecular signature using microarray datasets</b>	57
3.1. Introduction	57
3.2. Aim	58
3.3. Materials and methods	59
3.4. Results	61

3.5. Discussions	70
3.6. Conclusions	71
<b>4. Study 3. Evaluating the miRNA tissue expression for male non-small cell lung cancer – validation of the specific molecular signature</b>	73
4.1. Introduction	73
4.2. Aim	74
4.3. Materials and methods	75
4.4. Results	77
4.5. Discussions	79
4.6. Conclusions	81
<b>5. General discussions</b>	83
<b>6. General conclusions</b>	85
<b>7. The originality and innovative contributions of the thesis</b>	87
<b>REFERENCES</b>	89

Key words: lung cancer, EBUS-TBNA, microRNA, microarray

# INTRODUCTION

Lung cancer still represents a global issue due to its high mortality, mainly caused by a late diagnosis and limited therapeutic possibilities. The latency of the onset of symptoms in this type of cancer, the limited access to diagnostic techniques and the variable diagnostic yield of some of them, influence the survival of patients.

Endoscopic diagnostic methods, considered minimally invasive techniques, such as flexible bronchoscopy with endobronchial biopsy, are often the optimal choice for obtaining biopsy samples in eligible patients, namely patients with endobronchial expression of the tumor. Until the introduction of EBUS-TBNA in clinical practice, patients without endobronchial tumor expression, with tumors that are tangential to the bronchial tree or with mediastinal and/or hilar lymph nodes were diagnosed by surgical methods, that are more invasive and have greater procedure-related risks. The development of new therapies, such as immunotherapy or targeted therapy with tyrosine kinase inhibitors, has created the need to obtain adequate biopsy samples to reach a complete morphological and molecular diagnosis as fast as possible. Thus, there is a need for further studies to increase the confidence in the ability of EBUS-TBNA to reach an adequate diagnosis in lung cancer patients. The first part of this paper aims to demonstrate the value of this investigation as well as the contribution of on-site cytology to the morphological and molecular diagnosis of lung cancer.

Permanent technological advances in the field of lung cancer genomics and personalized oncology therapies continually increase the need to study the molecular landscape of this pathology with the discovery of new tissue and circulating biomarkers. Microarray technology can detect the expression of thousands of genes at the same time using microscope slides containing thousands of known ribonucleic acid sequences. In addition to protein-coding genes, a great part of the genome is noncoding. Understanding the contribution of noncoding molecules to lung cancer initiation, development, and extension may lead to important breakthroughs in patient diagnosis, therapy, and prognosis. One of the most significant subtypes of this part of the genome is represented by miRNAs, with essential roles in carcinogenesis, roles such as cell proliferation, differentiation and apoptosis. Discovering the processes influenced by miRNAs and the signaling pathways in which they are involved is of interest in the further development of personalized therapies. The last two parts of this thesis aim to evaluate the expression patterns of miRNAs and the specific mechanisms in which they are involved in male patients with non-small cell lung cancer. For this, paired samples of tumor tissue and adjacent normal tissue collected by flexible bronchoscopy with endobronchial biopsy, as well as plasma samples collected from NSCLC patients, were used. The data obtained by the microarray technique were included in an analysis that also integrated the public data from TCGA (the Cancer Genome Atlas), thus obtaining a common signature consisting of miRNAs with altered expression. This could contribute to personalized therapy of male NSCLC patients in the future by highlighting specific sex-related differences. Functional analysis of the obtained data and identification of target genes may shed light on the interactions occurring at the level of signaling pathways in male NSCLC and the detection of new therapeutic targets. The objective of the last part of the thesis was qRT-PCR validation in tissue samples of miR-183-3p and miR-34c-5p from the common molecular signature, as well as validation of miR-34-5p in plasma. These experiments aimed to evaluate the future utility of the chosen miRNAs as tissue biomarkers, and of miR-34-5p as a plasma biomarker.

The aim of the present thesis is to optimize diagnosis in bronchopulmonary cancer both at the clinical and paraclinical levels, with the final goal of contributing to increasing the survival of patients diagnosed with this pathology.

# PERSONAL CONTRIBUTION

The impact that lung cancer has on cancer mortality and the low survival rate of patients diagnosed in advanced stages, determines the permanent need to develop new ways to improve diagnosis in this pathology. This can be done at the level of the multiple stages of the diagnosis.

## Study 1 – Optimizing lung cancer diagnosis with EBUS-TBNA

EBUS-TBNA is a minimally invasive method that combines direct airway visualization of airways with ultrasound-guided transbronchial aspiration from hilar and mediastinal lymph nodes or extraluminal tumors that are in direct contact with the airway lumen. The main advantage of the method lies in the possibility of diagnosing and staging the mediastinum with a single investigation. Recent studies to demonstrate the utility of molecular testing on tissue specimens obtained by EBUS-TBNA in lung cancer patients have been of small dimensions and have not been accompanied by rapid on-site cytology (ROSE) in every case. The impact of using ROSE for increasing EBUS yield of diagnosis is contradictory.

The aim of the present study was to evaluate how EBUS-TBNA can optimize the diagnosis of lung cancer. Given the conflicting reports on the efficiency and contribution of ROSE, we calculated the diagnostic yield of this method in the diagnosis of lung cancer compared to histopathological diagnosis. Finally, we evaluated the feasibility of molecular testing (EGFR, ALK, PD-L1) on the tissue specimens obtained by EBUS-TBNA using ROSE.

We conducted a retrospective study on a group of 100 patients from the “Leon Daniello” Pneumology Clinic, Cluj-Napoca, who underwent EBUS-TBNA. The procedure was performed by an experienced bronchologist, under general anesthesia and was accompanied by ROSE, in patients who presented, on imaging, a lung tumor with mediastinal and/or hilar lymph nodes. The main fragment obtained by TBNA was embedded in paraffin and the block examined by the pathologist. The mutational profile (EGFR, ALK, PD-L1) on the small specimens obtained by TBNA was further analyzed, depending on the histopathological result.

69 male and 31 female patients were included in the study. Most lymph nodes punctured were found in node station 7 (subcarinal), station 4R (right inferior paratracheal) and 10R (right hilar). On average, 4 punctures were performed per ganglion. A definite diagnosis of malignancy could be made on-site in 80% of cases. The most frequently identified pathology was adenocarcinoma in 34% of cases, and in 34% of patients, the cytologist was able to specify the existence of malignant cells, without being able to characterize them. The increased proportion of adenocarcinoma diagnosed by EBUS-TBNA can be correlated with the fact that this histopathological type has a predominantly peripheral location in the lung parenchyma, being less often diagnosed by conventional flexible bronchoscopy. The diagnostic yield of ROSE in NSCLC was calculated using contingency tables, using histopathological diagnosis as the gold standard. ROSE demonstrated a high sensitivity of 92.18%, a specificity of 75%, a positive predictive value of 93.65%, and a negative predictive value of 70.58%. About a quarter of the group of patients was tested for the detection of genetic mutations (EGFR, ALK, PD-L1). Testing could not be performed on the entire cohort of patients because it was only started in our institution in August 2018 for EBUS specimens. All samples that required testing for EGFR mutations and ALK translocations were eligible for testing. Two of the patients (9.09%) with adenocarcinoma had EGFR mutations, namely the L858R substitution and the E746-A770del deletion. The mutation frequency was slightly lower than that reported in similar studies. Evaluation of PD-L1 expression on small specimens obtained by EBUS from patients in this study group was successfully performed in 91.66% of the cases that were tested. The limitations of the present study could be the small number of patients who were molecularly tested.

The conclusion of this study is that EBUS-TBNA is a valuable method in the diagnosis and staging of lung cancer, and the use of ROSE enhances this value by obtaining feedback during investigation, a rapid

preliminary diagnosis, and helps to ensure obtaining a quality sample for molecular testing of NSCLC . This study is among the first to report the effectiveness of genetic mutation testing on small specimens obtained by EBUS-TBNA in patients with non-small cell cancer in Romania.

## **Study 2. Evaluating the miRNA tissue expression for male non-small cell lung cancer – identification of the specific molecular signature using microarray datasets**

miRNAs are a class of non-coding RNA molecules that have essential roles in the post-transcriptional regulation of gene expression in almost all biological processes, including cell proliferation, differentiation and apoptosis. Microarray technology is a reliable platform for biological exploration, allowing the evaluation of coding or non-coding gene signatures. Data from the literature show that there are differences in the expression of miRNAs between the male and female genders, both in physiological and pathological conditions.

The aim of this study is to explore sex-specific expression in a cohort of male NSCLC patients, given the higher incidence and mortality in this gender. A better understanding of gender-specific dysregulation of miRNAs expression may provide essential insight into cancer pathogenesis. It may also identify new approaches in stratifying patients to achieve a better response to existing therapies.

This study focuses on the global miRNA expression patterns assessed by microarray in male NSCLC patients in paired samples (8 paired samples collected from male NSCLC patients, 4 adenocarcinomas and 4 squamous carcinomas, staged IB to IIIA – UMPH cohort). miRNA expression levels for NSCLC patients from TCGA were also assessed, with significant differences observed for male and female NSCLC. The involvement of these miRNAs in important metabolic and tumor processes is showed with the help of a heat map. We report a common signature of the two patient cohorts consisting of eight overexpressed miRNAs and nine underexpressed miRNAs. An analysis using DIANA miRpath (v3.0) for the signature of altered miRNAs common to male NSCLC patients revealed important alterations in signaling pathways such as TP53 signaling pathway, focal adhesion pathway, PI3K- AKT, Hippo signaling, the TGF-beta pathway, and the adherens junction. An important aspect is one concerning the targets of miRNAs selected from NSCLC pathways, which were highlighted using KEGG signaling pathways by DIANA-miRPath v3.0. This approach has an important role in the development of new targeted therapies. MiR-21, miR-34a-5p miR-30a-3p, miR-143-3p, and miR-145-5p can be considered the best candidates due to the large number of target genes. These molecules are connected directly and indirectly with an important number of genes that are correlated with overall survival, genes such as TGFB1, p38 MAPK, THEMIS, and SMAD2.

In conclusion, this study demonstrates the central role of miRNAs in the pathogenesis of NSCLC in male patients. The limitations of this study that used the microarray technology are the small number of samples processed and the small sizes of the tissue samples obtained by endobronchial biopsy. Although the number of cases was small in this microarray study, we obtained a representative list of miRNAs with altered expression in lung cancer samples that may be used as therapeutic intervention points or diagnostic biomarkers.

### **Study 3. Evaluating the miRNA tissue expression for male non-small cell lung cancer – validation of the specific molecular signature**

In study 2 of this thesis we identified the key miRNA molecules that can form a specific molecular signature in male patients diagnosed with NSCLC, as well as part of the signaling pathways in which they are involved. Study 3 contains validation of miRNA signature expression using qRT-PCR, followed by plasma ELISA validation of the identified targets, namely EGFR, IGF-IR and TGF $\beta$ 1. The identification of miRNA-mRNA interactions is fundamental in discovering the regulatory networks influenced by miRNAs and the changes they produce in lung cancer.

Altered expression miRNAs were validated by qRT-PCR in tissue and plasma samples collected from NSCLC patients. We integrated the miRNA expression results into Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software, which was used to identify the regulatory mechanisms and target genes involved. Considering the identified target genes, we selected EGFR, IGF-IR and TGF $\beta$ 1 proteins for plasma validation by ELISA method. Our validation approach involved the use of qRT-PCR and ELISA, two techniques accessible in laboratories, thus increasing the potential for integrating the findings into clinical practice.

A cohort of 64 NSCLC patients was used for qRT-PCR validation of tissue-level miRNAs. An additional validation for selected miRNAs was performed at the plasma level in a cohort of 19 patients. An ELISA validation of the expression levels of EGFR, IGF-IR and TGF $\beta$ 1 was also performed, detecting low concentration levels in the serum samples for EGFR in patients in the study group compared to the control group. There were no statistically significant changes for IGF-IR and TGF $\beta$ 1. The expression levels of miRNAs in the plasma samples were compared with the expression levels found in the plasma of 37 healthy subjects. The selection of miRNAs for validation was based on the statistical significance of the microarray data and considering the common signature with the data from TCGA. Thus, a representative from the miR-34, miR-34c-5p and miR-183-5p family was selected. Validation by qRT-PCR at the plasma level was performed for miR-34c-5p.

In conclusion, the identification of signatures formed by miRNAs, followed by the validation of the expression of these signatures, represents a fundamental contribution to the optimization of diagnosis and therapy by understanding the dynamics of processes at the tumor level and the development of target therapies. Validation of miR-34c-5p expression in plasma may add value to the use of this circulating marker in men with NSCLC. The small number of samples is the main limitation of this study, thus further research is needed before introducing the molecular signature into clinical practice.