



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“CAROL DAVILA” din BUCUREȘTI



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL MEDICINĂ

***MODIFICĂRI HISTOPATOLOGICE ȘI MOLECULARE ÎN TUMORI DE
COLON ÎN STADII AVANSATE – STUDIU RETROSPECTIV***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. ARDELEANU CARMEN

Student-doctorand:

PETROV (CĂS. ILIE-PETROV) ANDREEA-CORINA

2024

Strada Dionisie Lupu nr. 37 București, Sector 2, 020021 România, Cod fiscal: 4192910

Cont: RO57TREZ70220F330500XXXX, Banca: TREZORERIE sect. 2

+40.21 318.0719; +40.21 318.0721; +40.21 318.0722

www.umfcd.ro

CUPRINS

Introducere.....	1
I. Stadiul actual al cunoașterii.....	3
1. Evaluarea Histopatologică a Cancerului de Colon.....	3
1.1. Biomarkerii Convenționali.....	3
1.1.1. Stadializarea TNM.....	3
1.1.2. Subtipul Histologic și Gradul de Diferențiere Tumorală.....	4
1.1.3. Invazia Perineurală, Limfovaculară și Budding-ul Tumoral.....	5
1.2. Noii Biomarkeri de Prognostic și Predicție.....	6
1.2.1. Eterogenitatea Tumorală.....	6
1.2.2. Frontul de Invazie Tumorală și Stroma Tumorală.....	7
1.2.3. Inflamația Indusă de Tumoră și Limfocitele Infiltrante Tumoral.....	8
2. Evaluarea Moleculară a Cancerului de Colon.....	9
2.1. Biomarkerii Convenționali Moleculari.....	9
2.2. CDX2 ca Biomarker Nou de Prognostic.....	10
II. Contribuții personale.....	11
3. Ipoteza de Lucru și Obiectivele Generale.....	11
4. Metodologia Generală a Cercetării.....	12
4.1. Criterii de Includere și Excludere. Material și Metode.....	12
4.2. Analiza Biomarkerilor Noi.....	13
5. Studiul 1: Corelații între Biomarkerii Convenționali și cei Noi.....	14
5.1. Introducere. Material și Metode.....	14
5.2. Rezultate și Discuții.....	15
6. Studiul 2: Corelații între Biomarkerii și Evoluția Bolii.....	17
6.1. Introducere. Material și Metode.....	17
6.2. Rezultate și Discuții.....	18
7. Concluzii și Contribuții Personale.....	20
Bibliografie selectivă.....	21
Lista lucrărilor publicate.....	31

Lista cu abrevieri

HP – Histopatologie

MSI (Microsatellite Instability) – Instabilitate microsatelitară

CMS (Consensus Molecular Subtypes) – Consensul Subtipurilor Moleculare

MT – Micromediu tumoral

IHC – Imunohistochimie

TNM (Tumor-Node-Metastasis) – Tumoră-Noduli-Metastaze

AJCC (American Joint Committee on Cancer) – Comitetul Unit American de Cancer

UICC (Union for International Cancer Control) – Uniunea Internațională Împotriva Cancerului

ESMO (European Society of Medical Oncology) – Societatea Europeană de Oncologie Medicală

NCCN (National Comprehensive Cancer Network) – Rețeaua Națională Comprehensivă de Cancer

ADK – Adenocarcinom

NOS (Not Otherwise Specified) – Nespecificat

WHO (World Health Organization) – Organizația Mondială a Sănătății

CAP (College of American Pathologists) – Colegiul American al Patologilor

H&E – Hematoxilină și eozină

FIT – Front de invazie tumorală

IPN – Invazie perineurală

ILV – Invazie limfovasculară

OS (Overall Survival Rate) – Rata de supraviețuire generală

IVEM – Invazie venoasă extramurală

IVIM – Invazie venoasă intramurală

BT – Budding tumoral

TEM – Tranziție epitelio-mezenchimală

BIT – Budding intra-tumoral

CST – Celule stem tumorale

CTNS – Celule tumorale non-stem

PDC (Poorly Differentiated Clusters) – Clustere tumorale slab diferențiate

CAFs (Cancer Associated Fibroblasts) – Fibroblaste asociate tumorii

ME – Matricea extracelulară

STR (Stroma/Tumor Ratio) – Procentul de stromă raportat la procentul total de tumoră

TAMs (Tumor-Associated Macrophages) – Macrofage asociate tumorii

TANs (Tumor-Associated Neutrophils) – Neutrofile asociate tumorii

TILs (Tumor-Infiltrating Lymphocytes) – Limfocite infiltrante tumorale

NK – Natural Killers

TIEs (Tumor-Infiltrating Eosinophils) – Eozinofile infiltrante tumorale

PFS (Progression-Free Survival) – Rata de supraviețuire fără progresie de boală

MMR – Mismatch-Repair System

MSI-H (High Microsatellite Instability) – Instabilitate microsatelitară ridicată

dMMR (deficient MMR system) – Sistem MMR ineficient

pMMR (proficient MMR system) – Sistem MMR eficient

MSS (Microsatellite Stability) – Stabilitate microsatelitară

GTP (Guanosine-5'-triphosphate) - Guanosină-5'-trifosfat

FFIP – Fixat în Formol și Inclus în Parafină

Introducere

Cancerul de colon reprezintă o problemă majoră de sănătate globală, fiind al patrulea cel mai frecvent tip de cancer și a cincea cauză principală de deces prin cancer conform GLOBOCAN 2022, cu o prevalență semnificativ mai mare în Asia (46.6%) și Europa (30%) comparativ cu Africa (sub 5%), afectând într-o proporție mai mare bărbații decât femeile, iar incidența este considerabil mai mare în țările cu venituri mari decât în cele cu venituri mici [1–3]. Conform datelor GLOBOCAN 2022, în Europa, cancerul de colon reprezintă al doilea cel mai frecvent tip de cancer, constituind 12% din totalul cazurilor, cu cea mai mare incidență în Danemarca și cea mai ridicată mortalitate în Ungaria; în România, are o frecvență de 12.9%, fiind mai prevalent la bărbați (14.1%) față de femei (11.6%) și reprezintă a treia cauză principală de deces, după cancerul pulmonar și cel de sân [4–7]. Aceste date evidențiază variații semnificative în incidența și mortalitatea cancerului de colon, influențate de factori geografici, de gen și socio-economici, astfel că în țările cu venituri mari, incidența crescută este asociată cu stilul de viață și diagnosticarea precoce, iar mortalitatea redusă este datorată tratamentelor eficiente, în timp ce în țările cu venituri mici, incidența este mai scăzută, dar mortalitatea este mai mare din cauza accesului limitat la diagnostic și tratament; în Europa, diferențele între țări precum Danemarca și Ungaria reflectă variații în sistemele de sănătate, programele de screening și practicile medicale, subliniind importanța programelor de screening și a accesului la tratamente adecvate pentru reducerea impactului cancerului de colon la nivel global.

În ultimii 10 – 15 ani, progresele în înțelegerea modificărilor histopatologice (HP) și moleculare ale cancerului de colon au elucidat o parte din mecanismele genetice și epigenetice ale carcinogenezei, facilitând dezvoltarea unor tratamente personalizate și precise, care vizează biomarkeri moleculari precum mutațiile BRAF, KRAS și NRAS și instabilitatea microsatelitară (MSI), prin utilizarea terapiilor inovatoare (e.g., anticorpi anti-VEGF, anti-EGFR și imunoterapia) pentru a stopa progresia tumorală [8–13]. Integrarea constatărilor HP și moleculare a îmbunătățit semnificativ înțelegerea subtipurilor de cancer de colon, exemplificată prin clasificarea Consensului Subtipurilor Moleculare (CMS), utilizată actualmente în cercetare, oferind o perspectivă comprehensivă asupra eterogenității tumorale și facilitând identificarea unor noi biomarkeri de prognostic și predicție terapeutică [10,12,14,15]. Cercetările recente au evidențiat prevalența eterogenității tumorale și conceptul de eterogenitate spațială ca biomarkeri HP esențiali de evaluat în cancerul de colon, relevând variabilitatea anomaliilor genetice și distribuția neuniformă a acestora reflectată morfologic, cu implicații clinice majore asupra evoluției bolii și a răspunsului terapeutic [14–17]. În plus,

studiile recente au subliniat rolul crucial al micromediului tumoral (MT) în progresia cancerului de colon, iar înțelegerea interacțiunilor complexe dintre celulele tumorale și componentele acestuia (stromă și rețeaua de celule imune) a deschis noi perspective pentru ghidarea deciziilor terapeutice (e.g., imunoterapia) și dezvoltarea de terapii țintite [18,19]. În contextul noutăților științifice privind biomarkerii moleculari pentru cancerul de colon, proteina CDX2 s-a dovedit a fi un factor de prognostic promițător, suplinind deficitul actual de biomarkeri specifici, având în vedere că gena BRAF este singurul biomarker molecular de prognostic independent validat și recomandat de ghidurile internaționale [12,20]. Studiile indică rolul crucial al genei CDX2 în supresia tumorală, iar deleția sa este asociată cu un comportament tumoral agresiv; în plus, variabilitatea expresiei sale imunohistochimice (IHC) intra-tumorale, datorată interacțiunilor cu MT, subliniază importanța evaluării acesteia în contextul eterogenității tumorale [12,20–23].

Motivația cercetării cancerului de colon se bazează pe importanța sa majoră pentru sănătatea publică și pe necesitatea abordărilor inovative în evaluarea moleculară și HP, integrând domenii precum Oncologia, Chirurgia, Anatomia Patologică, Genetica și Biologia Moleculară pentru a reflecta complexitatea acestei boli. În contextul sistemului medical românesc, identificarea de biomarkeri HP și moleculari accesibili și cost-eficienți este esențială pentru optimizarea managementului oncologic al acestui tip de cancer. Actualitatea cercetării este evidențiată de progresele recente în înțelegerea mecanismelor genetice și moleculare ale cancerului de colon, facilitând descoperirea de biomarkeri noi și dezvoltarea de strategii terapeutice personalizate. Noutatea temei de cercetare constă în integrarea descoperirilor recente privind eterogenitatea tumorală în contextul variabilității genetice și epigenetice, și identificarea unor noi biomarkeri, având ca scop avansarea oncologiei de precizie. Acest studiu urmărește evaluarea modificărilor HP și moleculare în cancerul de colon avansat, evidențiind insuficiența biomarkerilor convenționali actuali și investigând noi biomarkeri HP și moleculari recent propuși și în curs de validare pentru îmbunătățirea evaluării prognosticului și ghidării deciziilor terapeutice. Studiul a utilizat o abordare retrospectivă și multifacțată, combinând analiza descriptivă și inferențială a datelor clinico-patologice cu evaluarea HP și IHC a probelor de țesut tumoral din 97 de cazuri de cancer de colon avansat. Rezultatele au evidențiat corelații semnificative între biomarkerii convenționali și cei noi, precum și între aceștia din urmă și parametrii de follow-up oncologic, subliniind importanța lor în predicția prognosticului bolii. Dezvoltarea unui model inovativ de predicție, integrând atât biomarkerii convenționali, cât și pe cei noi, a îmbunătățit acuratețea prognosticului pentru cancerul de colon avansat.

1. Evaluarea Histopatologică a Cancerului de Colon

1.1. Biomarkerii Convenționali

1.1.1. Stadializarea TNM

Sistemul de stadializare patologică TNM, elaborat de AJCC și UICC în 1950, reprezintă un cadru standardizat și fiabil pentru evaluarea extinderii cancerului de colon, esențial pentru predicția prognosticului și stabilirea tratamentului [9,14,24–26]. A 8-a ediție a Manualului de Stadializare AJCC/UICC din 2017, alături de ghidurile ESMO și NCCN, oferă date actualizate despre invazia tumorală, implicarea nodulilor limfatici și prezența metastazelor, orientând deciziile terapeutice și de monitorizare [9,26–29].

Stadiul pT din sistemul TNM evaluează gradul de invazie tumorală în cancerul de colon, variind de la pT1 (invadarea submucoasei) la pT4b (invadarea organelor adiacente), cu prognostic variabil, de la favorabil la nefavorabil, în funcție de profunzimea invaziei [26–29]. Ediția a 8-a a manualului AJCC-TNM întâmpină provocări în distingerea între stadiile pT3 și pT4a, sugerând necesitatea subdivizării pT3 pentru a îmbunătăți acuratețea prognosticului și tratamentului [9,30,31]. Stadiul pN din sistemul TNM indică implicarea nodulilor limfatici regionali, variind de la pN1 (1 – 3 noduli pozitivi) la pN2 (4 sau mai mulți noduli pozitivi), cu subdiviziuni bazate pe prezența de metastaze sau depozite tumorale în nodulii limfatici [26]. Conform ghidurilor ESMO și NCCN curente, pN1a, pN1b și pN1c au un prognostic mai favorabil, în timp ce pN2a și pN2b sunt asociate cu un prognostic nefavorabil [27–29]. Provocările acestei stadializări includ identificarea corectă a micrometastazelor, care au un impact prognostic negativ semnificativ și necesită utilizarea IHC pentru detectare [9,29]. Stadiul pM din sistemul TNM evaluează metastazele la distanță, unde pM1a indică metastaze la un singur organ, pM1b metastaze multiple la organe diferite, și pM1c metastaze peritoneale, cu prognostic variind de la favorabil la nefavorabil, conform ghidurilor ESMO și NCCN [26,28,29].

Integrarea biologiei moleculare în evaluarea cancerului de colon, complementară stadializării TNM, a îmbunătățit precizia predicției prognosticului și a facilitat dezvoltarea de strategii terapeutice personalizate [9,24,30–32]. Totuși, sistemul TNM actual prezintă limitări în capturarea adecvată a variabilității biologice a tumorilor și în practicile de evaluare HP, evidențiind necesitatea unor actualizări continue pentru a reflecta mai fidel complexitatea cancerului de colon și a îmbunătăți managementul clinic al pacienților [9,30,31].

1.1.2. Subtipul Histologic și Gradul de Diferențiere Tumorală

Cancerul de colon se manifestă predominant sub forma adenocarcinoamelor (ADK), cu ADK-ul convențional, nespecificat (NOS), reprezentând 90 – 95% din cazuri și fiind caracterizat prin glande mari și celule cu nuclei ovoidali și numeroase figuri mitotice [33–35]. Conform clasificării WHO din 2019, *subtipurile histologice* comune includ ADK-ul mucinos, care constituie aprox. 10% din cazuri și răspunde slab la tratament în stadiile metastatice, și ADK-ul serrat, care constituie 10 – 15% din cazuri și este frecvent localizat în colonul drept [33–36].

Subtipurile histologice rare de cancer de colon includ ADK micropapilare și adenomatoase, carcinoamele cu celule în „inel cu pecete”, adenoscuamoase, sarcomatoide și nediferențiate NOS, fiecare având caracteristici distincte și un prognostic variabil [35]. ADK micropapilar și carcinomul cu celule în „inel cu pecete” sunt subtipuri cu comportament agresiv, diagnosticate frecvent în stadii avansate și asociate cu un prognostic nefavorabil [33,35].

Gradul de diferențiere tumorală, utilizat ca biomarker HP încă din anii 1920 și clasificat în trei trepte (bine, moderat și slab diferențiat), are o valoare prognostică semnificativă independentă de stadiul bolii, deși, conform clasificării CAP, este un marker de categoria 2A cu relevanță clinică limitată, deciziile terapeutice bazându-se în principal pe stadializarea TNM [14,37–40]. Gradul de diferențiere al tumorilor colonice, reflectând nivelul de „maturare” glandulară, este un indicator numeric al malignității bazat pe diferențele microscopice față de celulele normale, clasificând tumorile în bine diferențiate (G1), moderat diferențiate (G2) și slab diferențiate (G3), fiecare având un prognostic diferit [14,38,41]. Conform ghidului WHO din 2019, gradarea cancerului de colon a fost îmbunătățită, clasificându-l în tumori de grad scăzut (G1 și G2) și tumori de grad înalt (G3), recomandând totodată ca această gradare să fie realizată pe piesele de rezecție chirurgicală, cu evaluarea separată a frontului de invazie tumorală (FIT) [14,35].

Pentru o evaluare precisă a gradului de diferențiere în cancerul de colon, este esențial să se ia în considerare eterogenitatea tumorală, în special cea spațială [14]. Evaluarea separată a gradului de diferențiere între centrul tumorii și FIT, conform ghidului WHO actual, permite o stratificare mai exactă a pacienților și furnizează informații prognostice suplimentare, complementare stadializării TNM, contribuind astfel la optimizarea managementului oncologic în cancerul de colon [14,35].

1.1.3. Invazia Perineurală, Limfovaculară și Budding-ul Tumoral

Invazia perineurală (IPN) și limfovaculară (ILV) sunt biomarkeri HP esențiali pentru evaluarea prognosticului în cancerul de colon, indicând un comportament tumoral agresiv și un prognostic nefavorabil, independent de stadiul bolii, conform ghidurilor curente [9,10,26,39]. IPN în cancerul de colon, definită prin prezența celulelor tumorale în contact direct cu fasciculele nervoase, este asociată cu un fenotip tumoral agresiv și este frecvent întâlnită în stadiile avansate, facilitând diseminarea regională și având o incidență variabilă între 9% și 42%, conform studiului realizat de Dawson et al. [9,10,26,35,39]. Tumorile localizate în segmentele retroperitoneale prezintă o incidență mai mare a IPN, iar prezența acesteia este frecvent corelată cu ILV și metastazele ganglionare, sugerând necesitatea chimioterapiei [9,39]. ILV, care se referă la pătrunderea celulelor tumorale în vasele sanguine și limfatice, este un factor de prognostic independent asociat cu o rată crescută de recurență locală și o supraviețuire globală (OS) redusă [10,26]. Conform ghidurilor actuale, se recomandă evaluarea separată a invaziei limfatice și a invaziei venoase extramurale (IVEM) și intramurale (IVIM), cu IVEM fiind un predictor puternic pentru prognostic nefavorabil, dar dificil de evaluat histopatologic, deși tehnicile de colorație pentru elastină au îmbunătățit sensibilitatea detectării [9,26,32,35]. Evaluarea preoperatorie imagistică prin rezonanță magnetică este singura modalitate fiabilă pentru detectarea invaziei vasculare, în special a IVEM [32].

Budding-ul tumoral (BT), caracterizat prin prezența celulelor izolate sau a grupurilor mici de celule neoplazice (≤ 4 celule de-diferențiate) în FIT, este facilitat de tranziția epiteliomezenchimală (TEM), care permite celulelor maligne să se detașeze și să migreze, contribuind la ILV, IPN și la diseminarea la distanță [10,14,32,42,43]. BT este un marker de prognostic independent recunoscut de ghidurile curente și integrat în evaluarea standard a cancerului de colon, raportarea sa fiind standardizată în 2016 cu un sistem de scorificare pe trei nivele pentru stratificarea riscului de metastazare, evaluarea realizându-se prin examinarea a cel puțin 10 câmpuri microscopice în FIT, însă metodele de diagnostic necesită standardizare suplimentară datorită variabilității concordanței între observatori [9,27,29,33,35,43,44]. BT este un biomarker semnificativ de agresivitate, asociat cu tumori G3 cu FIT „ofensiv”, facilitând IPN și ILV și corelându-se cu un risc crescut de diseminare limfatică și dezvoltarea de tumori stenozante [10,14,32,44]. În plus, budding-ul intra-tumoral (BIT), prezent în aproximativ 17 – 20% din cazuri, este asociat cu un FIT agresiv, iar includerea evaluării BIT în evaluarea HP a cancerului de colon este susținută de studii recente datorită impactului său semnificativ asupra supraviețuirii pacienților [14,32,44].

1.2. Noii Biomarkeri de Prognostic și Predicție

1.2.1. Eterogenitatea Tumorală

În ultimele două decenii, cercetările asupra eterogenității tumorale, în special în cazul cancerului de colon, au evidențiat complexitatea moleculară și progresia onco-genetică gradualistă a acestuia, subliniind rolul modificărilor genetice și epigenetice în procesele de creștere, diferențiere și apoptoză celulară, conferindu-le celulelor tumorale un avantaj de supraviețuire [14,16,42,45–47]. Progresele în tehnologiile de secvențiere a ADN-ului au contestat modelul evoluției liniare a cancerului și au arătat că tumorile colonice prezintă o eterogenitate moleculară, influențată atât de factori genetici, epigenetici cât și non-genetici, cum ar fi stilul de viață și microbiomul intestinal, reflectând o evoluție policlonală dinamică [15–17,42,45,47]. În acest context de evoluție policlonală dinamică, au fost descrise trei modele care explică originea și implicațiile eterogenității tumorale [16]. Primul model se concentrează pe prezența a două tipuri de celule în tumoră: celule stem tumorale (CST), capabile să inițieze și să susțină carcinogeneza, și celule tumorale non-stem (CTNS), care nu contribuie direct la dezvoltarea cancerului [16]. Al doilea model sugerează o dezvoltare a tumorii prin acumularea treptată de mutații genetice într-o singură celulă dominantă, rezultând în grupuri de clone ce evoluează fie prin competiție de supraviețuire, fie printr-un mecanism cooperativ cunoscut sub numele de „evoluție ramificată” [16,42,47]. Al treilea model, „Big Bang”, propune că tumora acumulează rapid un număr mare de mutații genetice, stabilind complexitatea și comportamentul tumoral de la început fără o clonă dominantă specifică [15,16,46]. Fiecare model influențează eterogenitatea tumorală afectând rezistența la tratament și ratele de supraviețuire [17,42]. În contextul cancerului de colon, se conturează două forme esențiale de eterogenitate, cea inter-tumorală și cea intra-tumorală [17,45]. *Eterogenitatea inter-tumorală*, caracterizată de diverse profiluri genetice, trăsături HP tumorale și comportamente clinice, a condus la dezvoltarea unei noi clasificări moleculare (CMS) care împarte tumorile în patru categorii distincte, bazate pe mecanismele moleculare implicate și caracteristicile clinico-patologice, influențând prognosticul și răspunsul la tratament [8,15,17,23,45,46]. Cancerul de colon prezintă o *eterogenitate intra-tumorală* semnificativă, influențată de factori genetici, epigenetici și non-genetici, care determină o diversificare morfologică (e.g., eterogenitatea diferențierii tumorale) și prezența unor populații de clone distincte [15,17,45,46]. În plus, conceptul de *eterogenitate spațială*, care examinează distribuția populațiilor clonale în diferite regiuni ale tumorii, este esențial pentru a înțelege comportamentul tumorii atât în situl primar, cât și în cel metastatic [15,17,45].

1.2.2. Frontul de Invazie Tumorală și Stroma Tumorală

Zona cunoscută sub denumirea de „*frontul de invazie tumorală*” (FIT) este esențială pentru înțelegerea interacțiunilor complexe dintre tumora colonică și gazdă, influențând decisiv progresia cancerului prin procese de invazie locală și diseminare metastatică [32,43]. Caracterizată de relații fizico-funcționale între celulele tumorale și MT, FIT oferă informații cruciale privind riscul de recidivă și ratele de supraviețuire, facilitând dezvoltarea strategiilor terapeutice personalizate [35,43,48]. FIT este un biomarker de prognostic important în cancerul de colon, deoarece variațiile în „arhitectura” zonală și gradul de diferențiere influențează invazia și agresivitatea tumorală [43,49]. Evaluarea diferențierii în FIT permite o înțelegere mai completă a dinamicii tumorale și identificarea pacienților cu risc crescut, care ar putea beneficia de tratamente adjuvante mai agresive [15,48,49]. PDC, descrise în ediția a 5-a a ghidului WHO și folosite ca markeri ai FIT, sunt compuse din cinci sau mai multe celule tumorale și se consideră că evoluează din BT, având o morfologie similară și fiind asociate cu procesul de TEM [32,35,49]. PDC au fost recent integrate în evaluarea HP a cancerului de colon și sunt recunoscute ca biomarkeri de prognostic mai fiabili decât BT [48,49]. Recunoașterea și evaluarea detaliată a FIT, un biomarker de prognostic fiabil ce evidențiază interacțiunile dinamice între celulele tumorale, MT și gazdă, sunt esențiale în diagnosticul și managementul cancerului de colon, oferind anatomo-patologilor o estimare precisă a comportamentului tumoral și sprijinind personalizarea strategiilor terapeutice [9,15,43,48,50].

MT în cancerul de colon, compus din celule imune, fibroblaste, vase de sânge și matrice extracelulară (ME), joacă un rol crucial în progresia tumorală prin interacțiunea sa dinamică cu celulele tumorale [51,52]. Un element cheie al MT este *stroma*, predominant formată din fibroblaste asociate cancerului (CAFs) și elemente ale ME. CAFs, prin contribuția lor structurală și secreția de factori pro-angiogenici și pro-proliferativi, facilitează metastazarea prin procesul de TEM [18,51–56]. Caracteristicile stromei tumorale din FIT influențează semnificativ prognosticul și răspunsul terapeutic, motiv pentru care evaluarea HP a raportului stromă/tumoră (STR) și a tipologiei stromei este esențială pentru prezicerea acestor factori în cancerul de colon [18,51,53,54,56]. Un STR crescut și o stromă desmoplazică bogată în CAFs sunt asociate cu un prognostic nefavorabil și rezistență la tratament, iar tipurile de stromă intermediară și imatură, caracterizate prin collagen „cicatricial” și ME mixoidă, indică o agresivitate tumorală sporită [53,54,56]. În concluzie, STR și tipologia stromei funcționează ca biomarkeri bidirecționali, impactând decisiv atât prognosticul, cât și eficacitatea terapeutică [18,53,54].

1.2.3. Inflamația Indusă de Tumoră și Limfocitele Infiltrante Tumoral

Inflamația indusă de tumorile colonice implică răspunsuri imune pro-tumorale, prin deteriorarea barierei intestinale și activarea căilor NF- κ B și STAT3, și anti-tumorale, prin calea IFN- γ și citokinele pro-inflamatorii care recrutează celule efectoare pentru distrugerea celulelor tumorale [57–59]. MT modulează echilibrul dintre aceste tipuri de inflamație prin citokine și chemokine, influențând progresia sau regresia tumorii, astfel încât o înțelegere detaliată a funcțiilor celulelor imune implicate este crucială pentru evaluarea prognosticului și optimizarea strategiilor terapeutice în cancerul de colon [57,59].

Macrofagele asociate tumorii (TAMs) sunt corelate cu un prognostic nefavorabil în cancerul de colon, deoarece predominanța macrofagelor M2, care favorizează creșterea tumorală, angiogeneza și suprimarea imunității adaptative, este asociată cu o agresivitate tumorală accentuată, în contrast cu macrofagele M1 care sunt implicate în apărarea gazdei și activitatea anti-tumorală [57–61]. *Neutrofilele asociate tumorii (TANs)* în cancerul de colon au un rol ambivalent în MT, cu fenotipul N1-TANs având efecte anti-tumorale prin secreția de substanțe citotoxice, în timp ce N2-TANs promovează proliferarea tumorală prin diverse mecanisme, polarizarea lor fiind determinată de citokinele și chemokinele din MT, și influențată de semnalizarea TGF- β și interferonul- β [58–60,62,63]. *Limfocitele infiltrante tumorale (TILs)* au, de asemenea, un rol ambivalent în răspunsul imun, unde limfocitele B pot avea atât efecte anti-tumorale prin activarea celulelor T helper CD4⁺ și T citotoxice CD8⁺, cât și pro-tumorale prin menținerea unui MT inflamator, în timp ce limfocitele T și NK variază în funcție de subtip și stadiul bolii, abundența acestora fiind asociată cu un prognostic mai bun datorită supravegherii imune eficiente [63–65]. Eozinofilele infiltrante tumorale (TIEs), frecvent observate în tumorile de colon, manifestă efecte anti-tumorale semnificative prin distrugerea directă a celulelor tumorale și modularea activității altor celule imune, fiind recrutate în MT prin chemokina CCL11/eotaxina-1 și având un efect anti-tumoral mediat de semnalizarea IFN- γ , independent de celulele T citotoxice CD8⁺ [66].

Celulele imune din micromediul cancerului de colon joacă un rol crucial în evoluția bolii, dar evaluarea lor nu este încă inclusă în ghidurile clinice actuale, neexistând încă o metodologie standardizată pentru evaluarea acestora. Analiza detaliată a fenotipurilor și interacțiunilor celulelor imune poate îmbunătăți predicția prognosticului și permite dezvoltarea unor tratamente personalizate [57–59,63,64,66,67]. Studiile arată că prezența unui infiltrat inflamator tumoral extins, dominat de celule anti-tumorale, crește semnificativ ratele de OS și de progresie fără boală (PFS) [65].

2. Evaluarea Moleculară a Cancerului de Colon

2.1. Biomarkerii Convenționali Moleculari

Integrarea biologiei moleculare în managementul oncologic al cancerului de colon a evidențiat biomarkeri esențiali cu rol prognostic și predictiv [10,23,68,69]. Ghidurile curente ESMO și NCCN recomandă evaluarea sistemului DNA-Mismatch Repair (MMR), instabilității microsatelitare (MSI), mutațiilor genelor RAS și statusului mutațional al genei BRAF pentru a furniza informații critice despre prognostic și răspunsul terapeutic [10,23,27–29,68,69].

Sistemul MMR, compus din complexe proteice heterodimerice MLH1-PMS2 și MSH2-MSH6, corectează erorile de replicare a ADN-ului în microsateliți cromozomiali, prevenind consecvențele și asigurând resinteza corectă a ADN-ului [23,70,71]. Inactivarea unei gene esențiale a acestui sistem, prin mutații germinale sau modificări epigenetice, determină deficiența MMR și duce la instabilitate microsatelitară înaltă (MSI-H), care este implicată în inițierea cancerului de colon [23,70]. Studiile curente arată că fenotipul dMMR/MSI-H este asociat cu un prognostic favorabil în cancerul de colon sporadic, datorită unui răspuns imun anti-tumoral robust, și este legat de sindromul Lynch în cazurile ereditare [23,70–73]. Tumorile cu sistem MMR eficient (pMMR) și stabilitate microsatelitară (MSS) au un prognostic nefavorabil din cauza lipsei infiltratului imun protector [23,72,73]. Conform ghidurilor internaționale oncologice, evaluarea MMR/MSI în stadiile II și III este esențială pentru deciziile de chimioterapie adjuvantă, iar în stadiul IV pentru determinarea beneficiului imunoterapiei [27–29,70,73,74].

Proteinele codate de *oncogenele RAS (KRAS, NRAS)* sunt GTP-aze care reglează calea de semnalizare MAPK, iar mutațiile punctiforme în aceste gene sunt frecvent întâlnite în cancerul de colon [10,23,70,74,75]. Aceste mutații provoacă o creștere celulară necontrolată, conducând la formarea de tumori voluminoase și permițând, de asemenea, celulelor maligne să prolifereze în concentrații scăzute de glucoză [10]. Mutațiile RAS sunt biomarkeri predictivi esențiali pentru rezistența la tratamentul anti-EGFR, influențând negativ ratele OS și PFS, iar ghidurile recomandă genotiparea acestor mutații în stadiul metastatic [23,70,76–78]. În carcinogeneza colonică, o altă mutație somatică importantă, de tip missense, este cea din *gena BRAF*, care codifică proteinele RAF din calea MAPK și în aprox. 90% din cazuri, această mutație apare în exonul 15, codonul 600 (mutația BRAF V600E) [10,23,74,78,79]. Această mutație constituie un biomarker de prognostic negativ în stadiile avansate de cancer de colon, cu o rată medie OS sub 12 luni [23,28,29,69,76,77,80].

2.2. CDX2 ca Biomarker Nou de Prognostic

CDX2 joacă un rol crucial în menținerea homeostaziei celulare a tractului intestinal adult, controlând genele implicate în diferențierea, proliferarea, adeziunea celulară, ciclul celular și apoptoza, fiind activată de căile de semnalizare Wnt/ β -catenină, MAPK, HNF și GATA și inhibată de factorii de transcripție SOX2 și SOX9 [12,21–23,81–83]. CDX2 acționează ca un supresor tumoral prin inhibarea căii Wnt/ β -catenină și menține integritatea barierei intestinale, iar absența sa duce la anomalii majore în structura și funcția intestinală [12,21,23,81–83]. În cancerul de colon, pierderea expresiei CDX2, adesea datorată modificărilor epigenetice, determină pierderea diferențierii epitelului intestinal, secreția anormală de mucină și proliferarea celulară necontrolată, contribuind la un micromediu pro-tumoral [83–85].

Expresia proteinei CDX2 este frecvent alterată în cancerul de colon (10 – 30% din cazuri) și este recunoscută de numeroși cercetători drept un biomarker de prognostic independent semnificativ [21,23,81]. Expresia negativă a CDX2 este corelată cu stadii TNM avansate, datorită rolului său esențial în controlul ciclului celular și reglarea căii de semnalizare Wnt/ β -catenină, a cărei perturbare duce la proliferarea și migrarea celulară favorizând invazia și metastazarea [12,20,21,23,81,86–89]. Tumorile cu expresie negativă a CDX2 sunt frecvent de tip G3, localizate în colonul drept și sunt asociate cu calea serrată și mutația BRAF V600E [12,20,81,83,86,88,89]. ILV este, de asemenea, mai frecventă în tumorile cu expresie negativă a CDX2, datorită perturbării genelor implicate în adeziunea celulară, care sunt reglate în mod normal de CDX2 [21,86,89]. În cele din urmă, pierderea expresiei CDX2 este frecvent observată în subtipurile histologice agresive de cancer de colon, precum adenocarcinoamele mucinoase și carcinoamele cu celule „în inel cu pecete”, datorită rolului său crucial în reglarea producției de mucină [23,84].

Pierderea expresiei CDX2, care este strâns legată de activarea TEM și amplificarea căilor TGF- β și WNT/ β -catenină, sporește capacitățile migratorii și invazive ale celulelor tumorale colonice, facilitând migrarea acestora sub formă BT sau PDC [23,87,89,90]. Între MT și expresia proteinei CDX2 există o comunicare bidirecțională care influențează progresia tumorală [12,83]. De asemenea, pierderea expresiei CDX2 este asociată cu un nivel ridicat de TAMs și cu statusul dMMR/MSI-H, dar are o semnificație prognostică negativă doar în tumorile cu fenotip pMMR/MSS [12,89,91]. Numeroase studii au demonstrat că expresia negativă a CDX2 este asociată cu un prognostic negativ în cancerul de colon, datorită asocierii acesteia cu o serie de parametrii patologici și moleculari nefavorabili [23].

3. Ipoteza de Lucru și Obiectivele Generale

Cancerul de colon reprezintă o patologie extrem de eterogenă, atât din punct de vedere molecular, cât și morfologic, aspecte care complică atât diagnosticarea, cât și tratamentul acestei boli. Cercetările recente din ultimul deceniu au evidențiat limitările panelului convențional de biomarkeri HP și moleculari în prezicerea precisă a prognosticului pacienților, subliniind necesitatea identificării și integrării unor biomarkeri suplimentari pentru a oferi o înțelegere mai profundă și completă a comportamentului tumoral.

Ipoteza de lucru a acestui studiu sugerează că integrarea noilor biomarkeri HP și moleculari va permite o evaluare mai precisă a comportamentului tumoral în cancerul de colon, facilitând o stratificare mai eficientă a riscului și ghidând deciziile terapeutice, cu impact semnificativ asupra prognosticului pacienților, prin corelarea acestora cu biomarkerii convenționali și parametrii de follow-up oncologic, precum și prin identificarea unor modele de predicție mai fiabile.

Primul obiectiv al acestui studiu este de a evalua o serie de biomarkeri HP și moleculari noi, aflați în prezent în curs de cercetare și validare internațională, și de a analiza interacțiunile lor, precum și relația cu parametrii demografici, clinici și cu biomarkerii HP și moleculari convenționali. Biomarkerii HP noi sunt reprezentați de eterogenitatea diferențierii tumorale, stroma tumorală, infiltratul imun tumoral general, TILs, pattern-urile de diferențiere tumorală din FIT și PDC, iar biomarkerul molecular nou analizat în acest studiu este expresia IHC a proteinei CDX2 la nivel tumoral, în FIT și în BT, în contextul eterogenității intra-tumorale și a celei spațiale.

Al doilea obiectiv va examina corelația biomarkerilor, atât convenționali cât și noi, cu prognosticul pacientului, analizând relația dintre fiecare biomarker și parametrii de follow-up oncologic (progresia de boală, tipul de progresie – prin metastază / recidivă și rata PFS).

Al treilea și ultimul obiectiv al acestui studiu este de a crea două modele de predicție: primul utilizând biomarkeri convenționali și al doilea integrând atât biomarkeri convenționali, cât și cei noi, cu scopul de a efectua o analiză comparativă a acestora în raport cu prognosticul participanților incluși în studiu. Acest demers are ca scop evaluarea potențialului noilor biomarkeri de a îmbunătăți semnificativ acuratețea predicției prognosticului atunci când sunt integrați în panelul convențional, deschizând astfel noi perspective privind optimizarea managementului oncologic al pacienților cu cancer de colon.

4. Metodologia Generală a Cercetării

4.1. Criterii de Includere și Excludere. Material și Metode

Criteriile de includere ale acestui studiu au fost atent elaborate pentru a asigura integritatea și comparabilitatea rezultatelor. Au fost incluse cazuri de cancer de colon supuse unei intervenții chirurgicale electivă pentru excizia tumorii primare, fără evaluări IHC anterioare ale expresiei CDX2, și doar cazuri cu date medicale complete și probe tisulare de calitate. Nu au fost impuse restricții demografice, pentru a asigura o reprezentativitate extinsă a rezultatelor. Studiul s-a concentrat pe biomarkerii moleculari KRAS și MMR/MSI, excluzând gena BRAF din cauza accesibilității reduse. De asemenea, studiul a inclus doar pacienți netratați oncologic preoperator, pentru a menține condiția tumorală neafectată. Nu în ultimul rând, studiul s-a axat pe tumorile pT3 și pT4, pentru a reflecta cu acuratețe relațiile clinico-patologice și moleculare în tumorile agresive.

Criteriile de excludere au fost stabilite pentru a asigura un grup de studiu omogen, eliminând cazurile cu tumori rectale datorită diferențelor semnificative față de tumorile colonice în protocoalele terapeutice și comportamentul biologic. Radioterapia preoperatorie, frecvent utilizată în cancerul rectal, poate modifica starea tumorilor și influența rezultatele. De asemenea, au fost excluse cazurile cu tumori metacrone sau sincrone, pentru a evalua impactul direct al biomarkerilor asupra tumorilor primare de colon. În plus, au fost eliminate cazurile cu istoric de predispoziție genetică pentru cancer, focalizând studiul doar pe cancerul de colon sporadic, pentru a evita influențele genetice care ar putea distorsiona rezultatele.

Material și Metode: Acest studiu retrospectiv, aprobat de Comisia de Etică a Spitalului Clinic Colțea din București (protocol 34 / 14.12.2023), a analizat 97 de cazuri de cancer de colon avansat, selectate conform criteriilor prestabilite. Datele medicale au fost colectate anonim din arhivele departamentelor de Oncologie, Chirurgie și Anatomie Patologică ale spitalului, incluzând parametri demografici, clinici, histopatologici, moleculari și de follow-up oncologic. Probele patologice (97 de lamele H&E și blocuri de țesut FFIP) au fost recuperate din departamentul de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Colțea. Analiza lamelor H&E și procesarea blocurilor FFIP în vederea obținerii lamelor colorate IHC-CDX2 s-a desfășurat în cadrul laboratorului OncoTeam Diagnostic din București. Datele obținute în acest studiu au fost introduse într-o bază de date folosind programul Microsoft® Excel® 2021 MSO (versiunea 2404 Build 16.0.17531.20152) și au fost analizate statistic (descriptiv și inferențial) cu ajutorul programelor Minitab® (versiunea 22.1) și OpenEpi (versiunea 3.01).

4.2. Analiza Biomarkerilor Noi

Evaluarea diferențierii celulare în contextul eterogenității intra-tumorale și spațiale a fost realizată prin analizarea semi-cantitativă a distribuției gradelor de diferențiere (G1, G2, G3) în centrul tumorii și la nivelul FIT, cuantificând procentajul fiecărei regiuni în raport cu suprafața totală a tumorii. Pe baza acestor analize, au fost identificate patru categorii distincte, recurente, de diferențiere eterogenă: categoria A – tumoră cu regiuni G1 și G2, categoria B – tumoră omogenă de tip G2, categoria 3 – tumoră cu regiuni G2 și G3 și categoria D – tumoră „mozaicată” cu regiuni G1, G2 și G3. *Evaluarea FIT* a relevat patru pattern-uri distincte de distribuție a gradelor de diferențiere, denumite F1 (G1 și G2), F2 (G2 și G3), F3 (G2 omogen), și F4 (G3 omogen). *Compoziția și cantitatea stromei tumorale* au fost evaluate riguros și semi-cantitativ conform criteriilor sistemului Glasgow Microenvironment Score (GMS), analizându-se procentul total de stromă raportat la volumul total de tumoră (STR) și clasificând stroma în funcție de procentajele de stromă matură și imatură. Pe baza acestor evaluări, au fost identificate cazuri cu stromă omogenă (100% stromă matură) și stromă eterogenă (amestec de stromă imatură și matură). *Inflamația asociată tumorii* a fost evaluată printr-o analiză semi-cantitativă a procentului total de infiltrat imun utilizând scorul Klintrup-Mäkinen adaptat (componentă a scorului GMS). *Analiza semi-cantitativă a TILs* a fost efectuată prin estimarea procentului total de limfocite din infiltratul imun total prezent în tumora de colon. Pentru a verifica dacă inflamația tumorală este strict asociată tumorii, evaluarea a inclus o *analiză observațională a suprainfecției bacteriene* și o *analiză semi-cantitativă a necrozei tumorale*, clasificată în patru scoruri (0 – 3) bazate pe extensia necrozei. *Scorul PDC* a fost analizat semi-cantitativ, similar modului de evaluare a scorului BT (scor validat internațional).

Având în vedere absența unei metode standardizate pentru evaluarea IHC a expresiei CDX2, s-a efectuat un studiu asociat acestei lucrări de cercetare care a presupus dezvoltarea unui nou sistem de scor IHC pentru expresia proteinei CDX2, evaluând semi-cantitativ intensitatea expresiei pe un eșantion de 43 de tumori de colon avansate [92]. Analiza a identificat trei categorii distincte de expresie IHC eterogenă a proteinei CDX2 și a demonstrat o asociere semnificativă între aceste categorii și scorurile BT, precum și categoriile de diferențiere tumorală: prima categorie cu expresie puternică și moderată, a doua cu expresie negativă și moderată, iar a treia cu expresie "mozaicată" (puternică, moderată și negativă). Analiza expresiei CDX2 a fost extinsă în cadrul acestui studiu atât la nivelul FIT (șase pattern-uri denumite CDF), cât și la nivelul BT (expresie pozitivă, mozaicată și negativă), printr-o analiză observațională a pattern-urilor de expresie IHC a proteinei CDX2.

5. Studiul 1: Corelații între Biomarkerii Convenționali și cei Noi

5.1. Introducere. Material și Metode.

Ipoteza centrală a acestui studiu afirmă că noii biomarkeri HP și moleculari, precum categoriile de diferențiere tumorală, STR, tipurile de stromă, scorul K-M, TILs, prezența suprainfecției bacteriene, scorul de necroză tumorală, pattern-urile de diferențiere tumorală din FIT, scorul PDC, categoriile de expresie IHC a proteinei CDX2 la nivel tumoral, precum și expresia proteinei CDX2 din FIT și BT, prezintă o corelație semnificativă atât cu biomarkerii HP convenționali (subtipul histologic, gradul de diferențiere tumorală, scorul BT, ILV și IPN), cât și cu cei moleculari convenționali (KRAS, MMR/MSI). Această corelație conduce la generarea unor tipare morfologice specifice, capabile să influențeze comportamentul tumoral în cancerul de colon avansat. În plus, studiul sugerează existența unei interrelații semnificative între biomarkeri noi.

Primul obiectiv al acestui studiu constă în analiza distribuției biomarkerilor HP și moleculari, atât convenționali, cât și noi, în cadrul lotului analizat constituit din 97 de cazuri de tumori de colon avansate. Totodată, se urmărește examinarea distribuției și relației acestor biomarkeri cu parametrii demografici (sex și vârstă) și clinico-patologici (stadiile oncologice, localizarea generală și specifică a tumorii, lungimea și grosimea tumorilor, precum și caracterul stenozant al acestora). *Al doilea obiectiv* vizează analiza relației dintre fiecare biomarker HP și molecular nou și biomarkerii HP și moleculari convenționali, cu scopul de a evidenția interdependențele și interacțiunile specifice dintre fenotipurile acestora. Prin această abordare, se urmărește elucidarea tiparelor morfologice care indică un anumit comportament tumoral. *Al treilea obiectiv* se concentrează pe evidențierea eterogenității spațiale intra-tumorale printr-o examinare detaliată a relației dintre morfologia regiunii centrale a tumorii și cea din FIT. Această analiză va include o evaluare a diferențierii tumorale și a expresiei IHC a proteinei CDX2 în aceste regiuni distincte. Suplimentar, va fi explorată corelația între expresia IHC a proteinei CDX2 în masa tumorală principală și în BT din FIT.

Pentru realizarea acestui studiu, au fost utilizate date obținute de la 97 de participanți, creând o bază de date comprehensivă pentru a fi analizată statistic. Primul obiectiv al studiului a fost realizat prin analiză statistică descriptivă, în timp ce al doilea și al treilea obiectiv au implicat analize statistice inferențiale (e.g., teste de corelație One-Way ANOVA, Chi-Square și Pearson în perechi) utilizând programele Minitab® și OpenEpi.

5.2. Rezultate și Discuții

Analiza descriptivă a lotului de studiu arată o distribuție echilibrată pe sexe, cu o ușoară predominanță feminină (51.55%) și o vârstă medie de 65 ani, indicând o populație preponderent vârstnică. Aproape jumătate dintre pacienți sunt în stadiul II (46.39%), majoritatea tumorilor fiind stenozante (72.16%) și de dimensiuni moderate (lungime medie de 4.94 cm, grosime medie de 1.96 cm), distribuite aproape egal între colonul drept și stâng. Tumorile sunt în mare parte ADK convenționale (67.01%), cu o prezență semnificativă a ILV (20.61%) și IPN (29.90%), și predominanța fenotipului pMMR/MSS (83.61%) și a mutațiilor KRAS (47.17%), indicând un comportament tumoral agresiv

Analiza noilor biomarkeri HP a demonstrat o eterogenitate semnificativă a diferențierii tumorale, cu categoria C (G2, G3) reprezentând 38.14% din cazuri și gradul G2 fiind cel mai prevalent în toate categoriile. FIT este predominant omogen (G2) în 52.58% din cazuri, iar stroma tumorală este în mare parte eterogenă (93.81%), cu un STR mediu de 34.12%. Scorul K-M indică inflamație minimă-ușoară (scoruri 0 și 1) în majoritatea cazurilor, cu un procent TILs mediu redus (14.88%), iar aprox. 40% din tumori prezintă necroză moderată. Scorul PDC prezintă rezultate statistice similare cu scorul BT, tumorile având o activitate proliferativă importantă. Analiza statistică evidentiază corelații statistice moderate între categoriile de diferențiere tumorală și pattern-urile din FIT ($p = 0.0001$), predominând gradele G2 și G3 în FIT. De asemenea, se constată o corelație moderată între categoriile de diferențiere B, C și D și scorul BT înalt (3) ($p = 0.000$), sugerând un comportament tumoral agresiv.

Analiza inferențială a relevat o corelație slabă între tipul de stromă și stadiile oncologice ($p = 0.025$), cu stroma omogenă prezentă exclusiv în stadiul II, și o influență semnificativă a tipului de stromă asupra lungimii tumorilor ($p = 0.033$), tumorile cu stromă eterogenă având o lungime medie mai mare. De asemenea, s-a constatat o corelație semnificativă între tipul de stromă și scorul BT ($p < 0.0000001$), tumorile cu scoruri ridicate (2 și 3) având exclusiv stromă eterogenă, și o corelație moderată cu categoriile de diferențiere ($p = 0.010$). În ceea ce privește cantitatea de stromă, procentul de STR crește progresiv de la stadiul II la stadiul IV ($p = 0.012$), fiind asociat cu tumorile stenozante ($p = 0.029$), diferențierea eterogenă G2-G3 ($p = 0.001$), subtipul histologic mucinos ($p = 0.033$), scor BT crescut ($p = 0.000$) și prezența IPN ($p = 0.014$), în contrast cu procentul mediu scăzut de STR care se corelează cu fenotipul dMMR/MSI-H ($p = 0.000$). Analiza a relevat că tumorile cu scor K-M mare (3 – inflamație moderat-puternică) tind să aibă un procent mare de STR și lungimi mai mari, iar răspunsul imun (scor K-M 2) este

influențat semnificativ de fenotipul dMMR/MSI-H. Tumorile cu infiltrat limfocitar scăzut se asociază cu IPN, în timp ce un procent crescut de TILs (> 20%) se corelează cu fenotipul dMMR/MSI-H și prezența necrozei, indicând un MT pro-inflamator. De asemenea, necroza extensivă (N3) este asociată cu inflamația puternică și suprainfecția bacteriană, iar între scorul PDC și scorul BT s-a observat o relație foarte strânsă, confirmată statistic ($p = 0.000$).

Analiza statistică a relevat că 75.26% din cazuri prezintă o expresie mozaică a CDX2 (puternică, moderată și negativă), iar 18.56% prezintă o expresie negativă și moderată. Tumorile cu expresie puternică și moderată CDX2 sunt exclusiv întâlnite în stadiul II, în timp ce tumorile cu expresie negativă și moderată se regăsesc în toate stadiile oncologice, frecvența lor crescând odată cu progresia bolii. Tumorile din Categoria 1 au predominant o expresie puternică a CDX2 (88.33%), Categoria 2 are în principal expresie negativă (63.06%), iar Categoria 3 prezintă o distribuție echilibrată între expresiile puternică (47.12%) și moderată (41.71%), cu variabilitate mare a expresiei negative (5 – 65%). Au fost analizate și pattern-urile de intensități din Categoria 3 CDX2, cu pattern-ul 3A (intensități puternice și moderate) fiind cel mai frecvent (50.68%), urmat de pattern-ul 3B, caracterizat prin dominanța expresiei moderate (34.25%), în timp ce pattern-urile 3C și 3D, dominate de expresia negativă, sunt rar întâlnite. Analiza statistică a distribuției pattern-urilor de expresie CDX2 în FIT a relevat predominanța CDF1 (expresie mozaică) și CDF3 (expresie moderată și negativă), fiecare cu o frecvență de 38.14%, sugerând un comportament tumoral agresiv. Analiza statistică a expresiei CDX2 în BT a relevat că tiparul mozaicat este cel mai prevalent (43.30%), iar expresia negativă a CDX2 este prezentă în 34.02% din cazuri, confirmând influența expresiei alterate a CDX2 asupra proliferării tumorale. Corelația între categoriile CDX2 și tipurile de expresie în BT este moderată, iar majoritatea cazurilor din categoria 3 CDX2 (74.32%) se corelează cu un scor BD3 (60.27%), indicând o activitate proliferativă accentuată. Tumorile colonice cu expresie CDX2 negativă și moderată au o lungime medie mare (6.08 cm) și prezintă o distribuție echilibrată între fenotipurile pMMR/MSS și dMMR/MSI-H, în timp ce majoritatea tumorilor din categoria 3 sunt asociate cu pMMR/MSS; de asemenea, există o asociere moderată între categoriile CDX2 și categoriile de diferențiere, indicând că expresia CDX2 variază în funcție de eterogenitatea diferențierii tumorale. Analiza statistică arată o asociere puternică între categoriile CDX2 și tipul de stromă, cu tumorile CDX2 puternic și moderat exprimat având stroma omogenă, iar cele cu CDX2 negativ și mozaicat având stroma eterogenă; tumorile CDX2 negativ și moderat exprimat au un STR mai mare, și există o asociere slabă între necroza extinsă și categoriile CDX2 negativ și mozaicat.

6. Studiul 2: Corelații între Biomarkerii și Evoluția Bolii

6.1. Introducere. Material și Metode.

Ipoteza centrală a acestui studiu este că panelul de biomarkeri HP și moleculari convenționali este insuficient pentru a prezice cu acuratețe prognosticul cancerului de colon, deoarece nu ia în considerare eterogenitatea tumorală. Propunem suplimentarea panelului convențional cu noi biomarkeri care reflectă mai bine această eterogenitate, cum ar fi categoriile de diferențiere tumorală, stroma și celulele imune asociate tumorii, pattern-urile de diferențiere din FIT, scorul PDC și expresia IHC a proteinei CDX2 (tumoral, în FIT și în BT). Integrarea acestor biomarkeri adiționali ar putea îmbunătăți semnificativ predicția prognosticului, oferind o stratificare mai precisă a riscului și ghidând deciziile terapeutice într-un mod mai eficient, contribuind astfel la personalizarea tratamentului și la îmbunătățirea supraviețuirii pacienților.

Primul obiectiv al acestui studiu constă în investigarea corelațiilor dintre biomarkerii convenționali, cei noi propuși și evoluția cancerului, pe baza datelor oncologice detaliate ale fiecărui participant inclus în studiu. Analiza va implica o evaluare a fiecărui biomarker, atât convențional, cât și nou, în relație cu parametrii de follow-up oncologic. Acești parametri includ prezența sau absența progresiei de boală, tipul de progresie (prin metastază sau recidivă locală), durata supraviețuirii fără progresie de boală (rata PFS, măsurată în zile), tipurile de metastaze și numărul acestora per pacient. *Al doilea obiectiv al acestui studiu* constă în evaluarea capacității predictive a panelului de biomarkeri HP și moleculari convenționali, comparativ cu un panel extins, care include noii biomarkeri HP și moleculari propuși. Acest demers urmărește să determine în ce măsură integrarea noilor biomarkeri poate îmbunătăți acuratețea predicției prognosticului. Prin această abordare, se deschid noi perspective în evaluarea HP și moleculară a tumorilor colonice, având potențialul de a optimiza managementul oncologic al pacienților cu cancer de colon avansat.

Din cele 97 de cazuri incluse inițial în studiu, doar 72 au fost analizate, deoarece nu toți participanții au fost înregistrați în evidențele oncologice ale centrului de unde au fost preluate cazurile. Baza de date a integrat parametrii clinici și de follow-up oncologic, rezultatele analizelor biomarkerilor convenționali și noi, fiind supusă unei analize statistice riguroase, atât descriptive, cât și inferențiale (teste de corelație și teste de regresie logistică) utilizând programele Minitab® și OpenEpi, pentru a compara capacitatea predictivă a biomarkerilor HP și moleculari convenționali și noi.

6.2. Rezultate și Discuții

Analiza descriptivă arată că aprox. 56% dintre cazuri au prezentat progresie de boală, majoritatea prin metastaze (45.83%). Durata medie a ratei PFS a fost de aprox. 432 de zile (15 luni). Metastazele au fost cel mai frecvent localizate hepatic (41.67%) și pulmonar (21.17%), iar majoritatea cazurilor au avut o singură metastază (37%), în timp ce metastazele multiple (maxim 4) au fost rar observate (19%). Analiza indică o variație semnificativă a PFS în funcție de numărul de metastaze, pacienții cu o singură metastază având o rată PFS mai scurtă decât cei cu patru metastaze, sugerând influența numărului și locației metastazelor asupra rezultatelor clinice. Rata progresiei bolii crește semnificativ odată cu avansarea stadiului oncologic, subliniind necesitatea unor strategii terapeutice mai agresive și monitorizare riguroasă în stadiile avansate ($p = 0.001$). Analiza statistică nu a identificat corelații semnificative între progresia bolii și parametrii demografici și clinici (localizarea, dimensiunile și caracterul stenozant). În ceea ce privește biomarkerii histopatologici convenționali, s-a observat că ADK mucinoase prezintă o asocierie slabă cu progresia prin metastază ($p = 0.037$, Cramer = 0.091). Pe de altă parte, tumorile cu ILV și IPN se corelează semnificativ cu progresia de boală ($p = 0.020$, $p = 0.003$) și de asemenea, tumorile cu IPN sunt mai predispuse la metastaze ($p = 0.000$) comparativ cu cele cu ILV (p marginală = 0.061). În ceea ce privește tumorile care prezintă concomitent ILV și IPN, s-a observat o asocierie semnificativă a acestora cu progresia de boală ($p = 0.026$). În ciuda corelațiilor ante-menționate, ILV și IPN nu oferă o estimare predictivă robustă a PFS ($p = 0.070$, $p = 0.108$). Scorul BT s-a dovedit a fi cel mai puternic predictor al prognosticului, având o asocierie semnificativă cu progresia bolii ($p = 0.000$, Cramer = 0.260). În privința biomarkerilor moleculari convenționali, doar statusul MMR/MSI a demonstrat o corelație semnificativă cu progresia bolii ($p = 0.018$), pacienții cu fenotip dMMR/MSI-H având un prognostic exclusiv favorabil.

În practica clinică, tumorile colonice sunt de obicei clasificate după un singur grad de diferențiere. Analiza statistică arată că această metodă este inefficientă, neexistând o asocierie semnificativă între gradele de diferențiere atribuite și progresia bolii ($p = 0.399$). În contrast, utilizarea categoriilor de diferențiere, care reflectă eterogenitatea tumorală, s-a dovedit mult mai eficientă în prezicerea prognosticului ($p = 0.007$). În ceea ce privește MT, studiul a relevat că există o corelație semnificativă statistic între tipul de stromă și progresia de boală ($p = 0.021$), pacienții cu tumori omogene având un prognostic exclusiv favorabil. De asemenea, s-a constatat că tumorile cu un STR mare (aprox. 43%) prezintă frecvent progresie de boală ($p = 0.000$). Analiza a relevat o corelație semnificativă între tumorile cu scor K-M scăzut (0 și 1) și

progresia de boală ($p = 0.000$). De asemenea, pacienții cu un procent crescut de TILs ($> 19\%$) au un prognostic favorabil comparativ cu cei care prezintă un infiltrat limfocitar scăzut (aprox. 11%) ($p = 0.000$). Analiza statistică a biomarkerului CDX2 arată o corelație semnificativă între categoriile de expresie CDX2 și progresia bolii ($p = 0.030$), indicând că tumorile cu expresie predominant puternică sunt asociate cu un prognostic favorabil, susținut de rolul proteinei CDX2 în supresia tumorală [50]. Deși nu există o corelație semnificativă între categoriile CDX2 și rata PFS, tumorile cu expresie mozaicată prezintă o rată PFS mai mare (aprox. 468 zile) comparativ cu cele predominant negative (aprox. 291 zile). Progresia prin metastază este semnificativ asociată cu categoriile CDX2 ($p = 0.042$), tumorile cu expresie predominant negativă având cea mai mare rată de metastază (66.67%). Aceste date evidențiază potențialul categoriilor CDX2 de a identifica pacienții cu risc crescut de metastază. În privința pattern-urilor de expresie CDX2 din categoria 3, nu s-a identificat o corelație semnificativă cu progresia bolii, posibil datorită dimensiunii reduse a lotului. În contextul eterogenității spațiale intra-tumorale, analiza statistică a evidențiat o corelație puternică între pattern-urile de expresie CDX2 din FIT și progresia bolii ($p = 0.00002165$), precum și între pattern-urile de diferențiere tumorală din FIT și progresia bolii ($p = 0.00006174$). Pattern-urile de expresie CDX2 alterată (moderată și negativă) și diferențierea slabă (G2, G3) în FIT sunt asociate cu progresia bolii. De asemenea, s-a identificat o corelație puternică între pattern-urile de expresie CDX2 din BT și progresia bolii ($p = 0.000$), cu expresia mozaicată și negativă asociate cu o proliferare agresivă. Aceste rezultate subliniază importanța evaluării FIT separat de regiunea centrală a tumorii, deoarece morfologia din FIT oferă informații precise despre comportamentul tumoral.

Analiza comparativă a două modele de regresie logistică pentru predicția prognosticului arată superioritatea Modelului 2, care integrează atât biomarkeri convenționali, cât și noi. Modelul 1, bazat doar pe biomarkeri convenționali, identifică doar scorul BT ca predictor semnificativ ($p = 0.001$). În contrast, Modelul 2 evidențiază mai mulți biomarkeri cu impact predictiv semnificativ, majoritatea fiind noi, precum STR ($p = 0.000$), TILs ($p = 0.005$), categoriile de diferențiere ($p = 0.047$), pattern-urile de expresie CDX2 din BT ($p = 0.048$) și din FIT ($p = 0.054$). Performanța superioară a Modelului 2 este confirmată de un indice R-sq de 89.17% și un R-sq ajustat de 81.24% , comparativ cu valorile mai mici ale Modelului 1. Aceste rezultate subliniază capacitatea Modelului 2 de a captura complexitatea și variabilitatea factorilor care influențează progresia bolii, oferind o predicție mai precisă a prognosticului în cancerul de colon și confirmând necesitatea adăugării de noi biomarkeri pentru o predicție corectă.

7. Concluzii și Contribuții Personale

Acest studiu și-a propus să abordeze o serie de obiective de cercetare științifică cu scopul de a contribui la cunoașterea și înțelegerea aprofundată a modificărilor HP și moleculare în cancerul de colon avansat. În acest context, obiectivele au fost formulate astfel încât să permită o explorare detaliată și riguroasă a temei, utilizând metode și instrumente adecvate pentru a genera date relevante și semnificative. Analiza rezultatelor obținute a demonstrat în mod clar că obiectivele propuse au fost atinse într-o manieră substanțială.

Studiul a îndeplinit *primul obiectiv* prin evaluarea biomarkerilor noi și analiza interacțiunii acestora cu parametrii demografici, clinici și biomarkerii convenționali, demonstrând relevanța lor în prognosticul cancerului de colon avansat. *Al doilea obiectiv*, privind corelația biomarkerilor cu parametrii de follow-up oncologic, a arătat că biomarkerii noi oferă corelații semnificative superioare celor convenționali. *Al treilea obiectiv*, crearea și compararea a două modele de predicție, a evidențiat superioritatea modelului extins care include noii biomarkeri, oferind o predicție mult mai precisă a prognosticului ($R\text{-sq} = 89.17\%$, $R\text{-sq ajustat} = 81.24\%$), confirmând ipoteza că integrarea noilor biomarkeri îmbunătățește acuratețea predicției și optimizarea managementului oncologic.

Continuarea cercetării ar trebui să includă studii multicentrice robuste, cu eșantioane mai mari, pentru a valida și generaliza concluziile obținute și pentru a asigura robustețea rezultatelor și o mai bună înțelegere a variabilității inter-tumorale. Este esențială standardizarea metodologiilor pentru evaluarea și interpretarea biomarkerilor propuși, inclusiv proteina CDX2, pentru a facilita integrarea acestora în practica clinică și pentru a dezvolta tratamente personalizate și eficiente, având în vedere eficiența lor demonstrată.

Acest studiu aduce *contribuții semnificative* în practica clinică a oncologiei și anatomiei patologice prin abordarea eterogenității intra-tumorale și spațiale în evaluarea cancerului de colon. Dezvoltarea sistemelor inovative de evaluare bazate pe scoruri categorice și includerea FIT ca entitate distinctă permit o predicție mai precisă a comportamentului tumoral și a prognosticului pacientului, demonstrând o corelație mai exactă cu evoluția bolii comparativ cu metodele convenționale. Introducerea proteinei CDX2 ca biomarker molecular de prognostic independent, cost-eficient și accesibil, împreună cu modelul îmbunătățit de predicție a prognosticului, subliniază potențialul noilor biomarkeri de a optimiza managementul oncologic în cancerul de colon avansat.

Bibliografie selectivă

- [1] International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN World Cancer Fact Sheet. Lyon: 2022.
- [2] International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN World Incidence, Males and Females, Colon Cancer Fact Sheet. Lyon: 2022.
- [3] International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN High Income vs Low Income Mortality, Males and Females, Cancer Fact Sheet. Lyon: 2022.
- [4] International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN Europe Cancer Fact Sheet. Lyon: 2022.
- [5] International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN Europe Incidence and Mortality, Males and Females, Colon Cancer Fact Sheet. Lyon: 2022.
- [6] International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN Romania Cancer Fact Sheet. Lyon: 2022.
- [7] International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN Romania Mortality, Both Sexes, Cancer Fact Sheet. Lyon: 2022.
- [8] Buikhuisen JY, Torang A, Medema JP. Exploring and modelling colon cancer inter-tumour heterogeneity: opportunities and challenges. *Oncogenesis*, 9(7):66, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41389-020-00250-6>.
- [9] Dawson H, Kirsch R, Messenger D, Driman D. A review of current challenges in colorectal cancer reporting. *Arch Pathol Lab Med*, 143:869–82, 2019. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0475-RA>.
- [10] Chen K, Collins G, Wang H, Toh JWT. Pathological features and prognostication in colorectal cancer. *Curr Oncol*, 28:5356–83, 2021. <https://doi.org/10.3390/curroncol28060447>.
- [11] Testa U, Castelli G, Pelosi E. Genetic alterations of metastatic colorectal cancer. *Biomedicines*, 8:1–29, 2020. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8100414>.
- [12] Badia-Ramentol J, Gimeno-Valiente F, Dur E, Martínez-Ciarpaglini C, Linares J, Iglesias M. The prognostic potential of CDX2 in colorectal cancer: Harmonizing

- biology and clinical practice. *Cancer Treat Rev*, 121:102643, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2023.102643>.
- [13] Koveitypour Z, Panahi F, Vakilian M, Peymani M, Forootan FS. Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. *Cell Biosci*, 9(1):1–14, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0361-4>.
- [14] Sagaert X, Vanstapel A, Verbeek S. Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancer: What Do We Know So Far? *Pathobiology*, 85:72–84, 2018. <https://doi.org/10.1159/000486721>.
- [15] Molinari C, Marisi G, Passardi A, Matteucci L, De Maio G, Ulivi P. Heterogeneity in colorectal cancer: A challenge for personalized medicine? *Int J Mol Sci*, 19(12):3733, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19123733>.
- [16] Blank A, Roberts DE, Dawson H, Zlobec I, Lugli A. Tumor heterogeneity in primary colorectal cancer and corresponding metastases. Does the apple fall far from the tree? *Front Med*, 5:234, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00234>.
- [17] Ramón y Cajal S, Sesé M, Capdevila C, Aasen T, De Mattos-Arruda L, Diaz-Cano SJ, et al. Clinical implications of intratumor heterogeneity: challenges and opportunities. *J Mol Med*, 98:161–77, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00109-020-01874-2>.
- [18] Colangelo T, Polcaro G, Muccillo L, D’Agostino G, Rosato V, Ziccardi P, et al. Friend or foe?: The tumour microenvironment dilemma in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1867:1–18, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.11.001>.
- [19] Chen Y, Zheng X, Wu C. The Role of the Tumor Microenvironment and Treatment Strategies in Colorectal Cancer. *Front Immunol*, 12:792691, 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.792691>.
- [20] Issac R, Masih D, Ranjan M. Primary adenocarcinoma of colon: A clinicopathological study with the prevalence and correlation of CDX2 biomarker expression. *Indian J Cancer*, 60(1):45–50, 2023. https://doi.org/10.4103/ijc.ijc_760_21.
- [21] Çalık İ, Çalık M, Özercan İH, Dağlı AF, Artaş G, Türken G, et al. Decreased CDX2 expression adversely affects the prognosis of patients with colorectal cancer. *Dicle Tıp Dergisi*, 47(1):57–65, 2020. <https://doi.org/10.5798/dicletip.706005>.

- [22] Asgari-Karchekani S, Karimian M, Mazoochi T, Taheri MA. CDX2 Protein Expression in Colorectal Cancer and Its Correlation with Clinical and Pathological Characteristics, Prognosis, and Survival Rate of Patients. *J Gastrointest Cancer*, 51(3):844–849, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12029-019-00314-w>.
- [23] **Ilie-Petrov A-C**, Cristian D-A, Diaconescu AS, Chitul A, Blajin A, Popa A, et al. Molecular Deciphering of Colorectal Cancer: Exploring Molecular Classifications and Analyzing the Interplay among Molecular Biomarkers MMR/MSI, KRAS, NRAS, BRAF and CDX2 - A Comprehensive Literature Review. *Chirurgia*, 119:136, 2024. <https://doi.org/10.21614/chirurgia.2024.v.119.i.2.p.136>.
- [24] Baniyas L, Jung I, Chiciudean R, Gurzu S. From Dukes-MAC Staging System to Molecular Classification: Evolving Concepts in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*, 23(16):9455, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23169455>.
- [25] Lea D, Haland S, Hagland HR, Soreide K. Accuracy of TNM staging in colorectal cancer: A review of current culprits, the modern role of morphology and stepping-stones for improvements in the molecular era. *Scand J Gastroenterol*, 49:1153–63, 2014. <https://doi.org/10.3109/00365521.2014.950692>.
- [26] American Joint Committee of Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual*. Eighth Edition. American College of Surgeons, Chicago, 2018.
- [27] Argilés G, Tabernero J, Labianca R, Hochhauser D, Salazar R, Iveson T, et al. Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 31:1291–305, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.06.022>.
- [28] Cervantes A, Adam R, Roselló S, Arnold D, Normanno N, Taïeb J, et al. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 34:10–32, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.10.003>.
- [29] Benson AB, Adam M, Chen Y-J, Ciombor KK, Cohen S, Deming D, et al. *NCCN Guidelines*. Version 1.2024. Colon Cancer Continue NCCN Guidelines Panel Disclosures, Plymouth Meeting, 2024.

- [30] Foersch S, Lang-Schwarz C, Eckstein M, Geppert C, Schmitt M, Konukiewitz B, et al. pT3 colorectal cancer revisited: a multicentric study on the histological depth of invasion in more than 1000 pT3 carcinomas—proposal for a new pT3a/pT3b subclassification. *Br J Cancer*, 127:1270–8, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41416-022-01889-1>.
- [31] Merkel S, Brunner M, Geppert CI, Grützmann R, Weber K, Agaimy A. Proposal of a T3 Subclassification for Colon Carcinoma. *Cancers*, 14(24):6186, 2022. <https://doi.org/10.3390/cancers14246186>.
- [32] Athanasakis E, Xenaki S, Venianaki M, Chalkiadakis G, Chrysos E. Newly recognized extratumoral features of colorectal cancer challenge the current tumor-node-metastasis staging system. *Ann Gastroenterol*, 31:525–34, 2018. <https://doi.org/10.20524/aog.2018.0284>.
- [33] Johncilla M, Yantiss RK. Histology of Colorectal Carcinoma: Proven and Purported Prognostic Factors. *Surg Pathol Clin*, 13:503–20, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.path.2020.05.008>.
- [34] Remo A, Fassan M, Vanoli A, Bonetti LR, Barresi V, Tatangelo F, et al. Morphology and molecular features of rare colorectal carcinoma histotypes. *Cancers*, 11(7):1036, 2019. <https://doi.org/10.3390/cancers11071036>.
- [35] Nagtegaal ID, Arends MJ, Odze RD. *WHO Classification of Tumors*. 5th Edition. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2019.
- [36] Lee C-T, Huang Y-C, Hung L-Y, Chow N-H, Su P-F, Ho C-L, et al. Serrated adenocarcinoma morphology in colorectal mucinous adenocarcinoma is associated with improved patient survival. *Oncotarget*, 8(21):35165–35175, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16820>.
- [37] Zlobec I, Dawson HE, Blank A, Bokhorst JM, Berger MD, Nagtegaal ID, et al. Are tumour grade and tumour budding equivalent in colorectal cancer? A retrospective analysis of 771 patients. *Eur J Cancer*, 130:139–45, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2020.02.007>.
- [38] Ueno H, Ishiguro M, Nakatani E, Ishikawa T, Uetake H, Matsui S, et al. Optimal Criteria for G3 (Poorly Differentiated) Stage II Colon Cancer Prospective Validation in a

- Randomized Controlled Study (SACURA Trial). *Am J Surg Pathol*, 44(12):1740–1750, 2020. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001570>.
- [39] Chen K, Wang H, Collins G, Hollands E, Law IYJ, Toh JWT. Current Perspectives on the Importance of Pathological Features in Prognostication and Guidance of Adjuvant Chemotherapy in Colon Cancer. *Current Oncology*, 29:1370–89, 2022. <https://doi.org/10.3390/curroncol29030116>.
- [40] Ueno H, Hase K, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Tanaka M, Miyake O, et al. Site-specific Tumor Grading System in Colorectal Cancer Multicenter Pathologic Review of the Value of Quantifying Poorly Differentiated Clusters. *Am J Surg Pathol*, 38(2):197–204, 2014. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000137>.
- [41] Johncilla M, Chen Z, Sweeney J, Yantiss RK. Tumor Grade Is Prognostically Relevant Among Mismatch Repair Deficient Colorectal Carcinomas. *Am J Surg Pathol*, 42(12):1686–1692, 2018. <https://doi.org/10.1097/PAS.00000000000001161>.
- [42] Neelakantan D, Drasin DJ, Ford HL. Intratumoral heterogeneity: Clonal cooperation in epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis. *Cell Adh Migr*, 9:265–76, 2015. <https://doi.org/10.4161/19336918.2014.972761>.
- [43] Gerashchenko TS, Novikov NM, Krakhmal NV, Zolotaryova SY, Zavyalova MV, Cherdyntseva NV, et al. Markers of cancer cell invasion: Are they good enough? *J Clin Med*, 8(8):1092, 2019. <https://doi.org/10.3390/jcm8081092>.
- [44] Cho SJ, Kakar S. Tumor budding in colorectal carcinoma: Translating a morphologic score into clinically meaningful results. *Arch Pathol Lab Med*, 142(8):952–957, 2018. <https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0082-RA>.
- [45] Punt CJA, Koopman M, Vermeulen L. From tumour heterogeneity to advances in precision treatment of colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 14:235–46, 2017. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.171>.
- [46] Büttner J, Jöhrens K, Klauschen F, Hummel M, Lenze D, Saeger W, et al. Intratumoral morphological heterogeneity can be an indicator of genetic heterogeneity in colorectal cancer. *Exp Mol Pathol*, 104:76–81, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2018.01.007>.

- [47] Chan DKH, Buczacki SJA. Tumour heterogeneity and evolutionary dynamics in colorectal cancer. *Oncogenesis*, 10:53, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41389-021-00342-x>.
- [48] Riffet M, Dupont B, Faisant M, Cerasuolo D, Menahem B, Alves A, et al. New histoprognostic factors to consider for the staging of colon cancers: tumor deposits, invasive tumor infiltration and high-grade budding. *Int J Mol Sci*, 24(4):3573, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24043573>.
- [49] Konishi T, Shimada Y, Lee LH, Cavalcanti MS, Hsu M, Smith JJ, et al. Poorly differentiated clusters predict colon cancer recurrence: An in-depth comparative analysis of invasive-front prognostic markers. *Am J Surg Pathol*, 42(6):705–714, 2018. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001059>.
- [50] Wu L, Yan J, Bai Y, Chen F, Xu J, Zou X, et al. Spatially-resolved transcriptomics analyses of invasive fronts in solid tumors. *bioRxiv*, 10(21):465335, 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.10.21.465135>.
- [51] Sandberg TP, Stuart MPME, Oosting J, Tollenaar RAEM, Sier CFM, Mesker WE. Increased expression of cancer-associated fibroblast markers at the invasive front and its association with tumor-stroma ratio in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 19(1):284, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5462-2>.
- [52] Sullivan L, Pacheco RR, Kmeid M, Chen A, Lee H. Tumor Stroma Ratio and Its Significance in Locally Advanced Colorectal Cancer. *Curr Oncol*, 29:3232–41, 2022. <https://doi.org/10.3390/curroncol29050263>.
- [53] Gao J, Shen Z, Deng Z, Mei L. Impact of Tumor–Stroma Ratio on the Prognosis of Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Front Oncol*, 11:738080, 2021. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.738080>.
- [54] Flam J, Gugić D, Benšić M, Tomić S, Rajc J. High tumor stroma proportion is a worse prognostic factor in colorectal cancer. *Acta Clin Croat*, 56:73–9, 2017. <https://doi.org/10.20471/acc.2017.56.01.11>.
- [55] Najafi M, Mortezaee K, Majidpoor J. Stromal reprogramming: A target for tumor therapy. *Life Sci*, 239:117049, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117049>.

- [56] Ueno H, Kanemitsu Y, Sekine S, Ishiguro M, Ito E, Hashiguchi Y, et al. Desmoplastic pattern at the tumor front defines poor-prognosis subtypes of colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*, 41(11):1506–1512, 2017. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000946>.
- [57] Schmitt M, Greten FR. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nat Rev Immunol*, 21:653–67, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00534-x>.
- [58] Zheng W, Wu J, Peng Y, Sun J, Cheng P, Huang Q. Tumor-Associated Neutrophils in Colorectal Cancer Development, Progression and Immunotherapy. *Cancers*, 14(19):4755, 2022. <https://doi.org/10.3390/cancers14194755>.
- [59] Wang K, Karin M. Tumor-Elicited Inflammation and Colorectal Cancer. *Adv Cancer Res*, 128: 173–96, 2015. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2015.04.014>.
- [60] Mizuno R, Kawada K, Itatani Y, Ogawa R, Kiyasu Y, Sakai Y. The role of tumor-associated neutrophils in colorectal cancer. *Int J Mol Sci*, 20(3):529, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20030529>.
- [61] Inagaki K, Kunisho S, Takigawa H, Yuge R, Oka S, Tanaka S, et al. Role of tumor-associated macrophages at the invasive front in human colorectal cancer progression. *Cancer Sci*, 112:2692–704, 2021. <https://doi.org/10.1111/cas.14940>.
- [62] Wikberg ML, Ling A, Li X, Öberg Å, Edin S, Palmqvist R. Neutrophil infiltration is a favorable prognostic factor in early stages of colon cancer. *Hum Pathol*, 68:193–202, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.08.028>.
- [63] Jakubowska K, Koda M, Grudzińska M, Kisielewski W, Lomperta K, Famulski W. Neutrophil infiltration combined with necrosis in the primary tumor is a useful prognostic indicator for three-year disease-free survival time in patients with colorectal cancer. *Oncol Lett*, 23(6):199, 2022. <https://doi.org/10.3892/ol.2022.13320>.
- [64] Berntsson J, Nodin B, Eberhard J, Micke P, Jirström K. Prognostic impact of tumour-infiltrating B cells and plasma cells in colorectal cancer. *Int J Cancer*, 139:1129–39, 2016. <https://doi.org/10.1002/ijc.30138>.
- [65] Bai Z, Zhou Y, Ye Z, Xiong J, Lan H, Wang F. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Colorectal Cancer: The Fundamental Indication and Application on Immunotherapy. *Front Immunol*, 12:808964, 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.808964>.

- [66] Reichman H, Itan M, Rozenberg P, Yarmolovski T, Brazowski E, Varol C, et al. Activated eosinophils exert antitumorogenic activities in colorectal cancer. *Cancer Immunol Res*, 7:388–400, 2019. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0494>.
- [67] Ye L, Zhang T, Kang Z, Guo G, Sun Y, Lin K, et al. Tumor-infiltrating immune cells act as a marker for prognosis in colorectal cancer. *Front Immunol*, 10:2368, 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02368>.
- [68] Ahluwalia P, Ballur K, Leeman T, Vashisht A, Singh H, Omar N, et al. Incorporating Novel Technologies in Precision Oncology for Colorectal Cancer: Advancing Personalized Medicine. *Cancers*, 16(3):480, 2024. <https://doi.org/10.3390/cancers16030480>.
- [69] Koulis C, Yap R, Engel R, Jardé T, Wilkins S, Solon G, et al. Personalized Medicine—Current and Emerging Predictive and Prognostic Biomarkers in Colorectal Cancer. *Cancers*, 12(4):812, 2020. <https://doi.org/10.3390/cancers12040812>.
- [70] Baraibar I, Ros J, Mulet N, Salvà F, Argilés G, Martini G, et al. Incorporating traditional and emerging biomarkers in the clinical management of metastatic colorectal cancer: an update. *Expert Rev Mol Diagn*, 23:231–41, 2023. <https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1782194>.
- [71] Li K, Luo H, Huang L, Luo H, Zhu X. Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. *Cancer Cell Int*, 20:16, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-1091-8>.
- [72] Nojadeh JN, Sharif SB, Sakhinia E. Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI J*, 17:159–168, 2018. <https://doi.org/10.17179/excli2017-948>.
- [73] Toh JWT, Phan K, Reza F, Chapuis P, Spring KJ. Rate of dissemination and prognosis in early and advanced stage colorectal cancer based on microsatellite instability status: systematic review and meta-analysis. *Int J Colorectal Dis*, 36:1573–96, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00384-021-03874-1>.
- [74] Afrăsânie VA, Marinca MV, Alexa-Stratulat T, Gafton B, Păduraru M, Adavidoaiei AM, et al. KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and microsatellite instability in metastatic colorectal cancer - practical implications for the clinician. *Radiol Oncol*, 53(3):265–74, 2019. <https://doi.org/10.2478/raon-2019-0033>.

- [75] Maffei V, Nicolè L, Cappelleso R. RAS, Cellular Plasticity, and Tumor Budding in Colorectal Cancer. *Front Oncol*, 9:1255, 2019. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01255>.
- [76] Koncina E, Haan S, Rauh S, Letellier E. Prognostic and Predictive Molecular Biomarkers for Colorectal Cancer: Updates and Challenges. *Cancers*, 12:1–25, 2020. <https://doi.org/10.3390/cancers12020319>.
- [77] Chung C. Predictive and prognostic biomarkers with therapeutic targets in colorectal cancer: A 2021 update on current development, evidence, and recommendation. *J Oncol Pharm Pract*, 28:10781552211005525, 2021. <https://doi.org/10.1177/10781552211005525>.
- [78] Bellio H, Fumet JD, Ghiringhelli F. Targeting BRAF and RAS in Colorectal Cancer. *Cancers*, 13(9):2201, 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13092201>.
- [79] Caputo F, Santini C, Bardasi C, Cerma K, Casadei-Gardini A, Spallanzani A, et al. BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Clinical and Molecular Insights. *Int J Mol Sci*, 20(21):5369, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20215369>.
- [80] Molina-Cerrillo J, San Román M, Pozas J, Alonso-Gordoa T, Pozas M, Conde E, et al. BRAF Mutated Colorectal Cancer: New Treatment Approaches. *Cancers*, 12(6):1571, 2020. <https://doi.org/10.3390/cancers12061571>.
- [81] Bae JM, Lee TH, Cho NY, Kim TY, Kang GH. Loss of CDX2 expression is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol*, 21:1457–67, 2015. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i5.1457>.
- [82] Tomasello G, Barni S, Turati L, Ghidini M, Pezzica E, Passalacqua R, et al. Association of CDX2 Expression With Survival in Early Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Colorectal Cancer*, 17:97–103, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2018.02.001>.
- [83] Balbinot C, Armant O, Elarouci N, Marisa L, Martin E, de Clara E, et al. The Cdx2 homeobox gene suppresses intestinal tumorigenesis through non-cell-autonomous mechanisms. *J Exp Med*, 215:911–26, 2018. <https://doi.org/10.1084/jem.20170934>.

- [84] Gan GL, Liu J, Chen WJ, Ye QQ, Xu Y, Wu HT, et al. The Diverse Roles of the Mucin Gene Cluster Located on Chromosome 11p15.5 in Colorectal Cancer. *Front Cell Dev Biol*, 8:514, 2020. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00514>.
- [85] Singh MP, Rai S, Pandey A, Singh NK, Srivastava S. Molecular subtypes of colorectal cancer: An emerging therapeutic opportunity for personalized medicine. *Genes Dis*, 8:133–45, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.10.013>.
- [86] El-Refaey HA, Bedeer AE, Shoeir HT, Ghoraba HM. Histopathological and Immunohistochemical Study of the Prognostic Significance of Cox2 and CDX2 Expression in the Available Cases of Colorectal Carcinoma. *Med J Cairo Univ*, 87:71–80, 2019. <https://doi.org/10.21608/mjcu.2019.52323>.
- [87] Tóth C, Sükösd F, Valicsek E, Herpel E, Schirmacher P, Tizslavicz L. Loss of CDX2 gene expression is associated with DNA repair proteins and is a crucial member of the Wnt signaling pathway in liver metastasis of colorectal cancer. *Oncol Lett*, 15(3):3586–3593, 2018. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.7756>.
- [88] Slik K, Turkki R, Carpén O, Kurki S, Korkeila E, Sundström J, et al. CDX2 loss with microsatellite stable phenotype predicts poor clinical outcome in stage II colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 43(11):1473–1482, 2019. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001356>.
- [89] Olsen J, Espersen MLM, Jess P, Kirkeby LT, Troelsen JT. The clinical perspectives of CDX2 expression in colorectal cancer: a qualitative systematic review. *Surg Oncol*, 23:167–76, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2014.07.003>.
- [90] Hansen TF, Kjær-Frifeldt S, Eriksen AC, Lindebjerg J, Jensen LH, Sørensen FB, et al. Prognostic impact of CDX2 in stage II colon cancer: results from two nationwide cohorts. *Br J Cancer*, 119:1367–73, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0285-5>.
- [91] Chewchuk S, Jahan S, Lohnes D. Cdx2 regulates immune cell infiltration in the intestine. *Sci Rep*, 11:1–12, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95412-w>.
- [92] **Ilie-Petrov A-C**, Cristian D-A, Grama FA, Chitul A, Blajin A, Popa A, et al. Evaluation of the Immunohistochemical Scoring System of CDX2 Expression as a Prognostic Biomarker in Colon Cancer. *Diagnostics*, 14:1023, 2024. <https://doi.org/10.3390/diagnostics14101023>.

Lista lucrărilor publicate

- 1) **Ilie-Petrov, A.-C.**, Cristian, D.-A., Grama, F.A., Chitul, A., Blajin, A., Popa, A., Mandi, D.-M., Welt, L., Bara, M.A., Vrîncianu, R., și Ardeleanu, C.M. „Evaluation of the Immunohistochemical Scoring System of CDX2 Expression as a Prognostic Biomarker in Colon Cancer”. *Diagnostics*. 2024; Vol. 14, no. 10: 1023. Revistă indexată ISI, cu factor de impact 3.6. <https://doi.org/10.3390/diagnostics14101023> (articol original de cercetare realizat din capitolul 2).
- 2) **Ilie-Petrov, A.-C.**, Cristian, D.-A., Diaconescu, A.S., Chitul, A., Blajin, A., Popa, A., Mandi, D.-M., Negreanu, R., Vieru, C., Vrîncianu, R., și Ardeleanu, C.M. „Molecular Deciphering of Colorectal Cancer: Exploring Molecular Classifications and Analyzing the Interplay among Molecular Biomarkers MMR/MSI, KRAS, NRAS, BRAF and CDX2 - A Comprehensive Literature Review”. *Chirurgia*. 2024; , Vol. 119, no. 2: 136–155. Revistă indexată ISI, cu factor de impact 0.6. <https://doi.org/10.21614/chirurgia.2024.v.119.i.2.p.136> (review de literatură realizat din capitolul 2).