

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

***Leziuni neoplazice epiteliale colorectale polipoide
și non-polipoide***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. COSTACHE MARIANA

Student-doctorand:

FLOREA MARIA-ALEXANDRA

2025

Cuprinsul tezei de doctorat

I. PARTEA GENERALĂ	13
1. Leziuni epiteliale neoplazice precursorale ale carcinomului colorectal.....	14
1.1. Diagnostic endoscopic	14
1.2. Date epidemiologice	16
1.3. Factori de risc.....	16
1.4. Leziuni serate colonice	17
1.4.1. Leziunile sesile serate	18
1.4.2. Adenomul serat tradițional.....	23
1.4.3. Polipii hiperplazici colorectali	26
1.4.4. Adenomul serat, neclasificat	26
1.4.5. Sindromul polipozei serate	27
1.5. Adenoamele convenționale colorectale	27
2. Polipii malignizați.....	32
2.1. Diagnosticul endoscopic al polipilor malignizați	32
2.2. Evaluarea histopatologică a polipilor malignizați	33
2.3. Factori de risc pentru metastazarea limfoganglionară sau recidivă locală.....	33
2.3.1. Gradul de diferențiere al tumorii.....	33
2.3.2. Adâncimea invaziei submucozale	34
2.3.3. Invazia limfatică și vasculară	34
2.3.4. „Budding-ul tumoral”	35
2.3.5. Marginea de rezecție	35
2.4. Managementul polipilor malignizați.....	35
2.5. Pseudoinvazia.....	36
2.6. Rolul screeningului în prevenirea și diagnosticarea precoce a cancerului colorectal.....	37
II. CONTRIBUȚII PERSONALE	38
3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale	39
4. Metodologia generală a cercetării	41
4.1. Selectarea cazurilor	41

4.2. Tehnica de laborator.....	41
4.2.1. Procesarea țesutului și protocolul de colorare hematoxilină-eozină.....	41
4.2.2. Protocolul de colorare imunohistochimică.....	42
4.3. Evaluarea microscopică a probelor biologice	45
4.3.1. Microscopia optică.....	45
4.3.2. Microscopia bazată pe excitația cu doi fotoni	45
4.4. Prelucrarea datelor și analiza statistică.....	45
5. Profilul histopatologic și imunohistochimic ale leziunilor sesile serate colonice	
(Studiul I)	46
5.1. Introducere.....	46
5.2. Pacienți și metode	46
5.3. Rezultate	48
5.4. Discuții	64
6. Evaluarea polipilor malignizați colorectali – rolul microscopiei bazată pe excitația	
cu doi fotoni în diagnosticul invaziei tumorale (Studiul II).....	73
6.1. Introducere.....	73
6.2. Material și metode	74
6.2.1. Tehnici de microscopie	75
6.2.2. Analiza automată a imaginilor	75
6.2.3. Analiza statistică	77
6.3. Rezultate	77
6.4. Discuții	89
7. Particularități morfologice ale adenoamelor convenționale colorectale	
(Studiul III).....	95
7.1. Introducere.....	95
7.2. Materiale și metodă	95
7.3. Rezultate	96
7.4. Discuții	108
8. Concluzii și contribuții personale.....	114
Bibliografie.....	117

I. PARTEA GENERALĂ – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Cancerul colorectal (CCR) este una dintre **principalele cauze de morbiditate și mortalitate** asociate cu cancerul la nivel global, aflându-se pe locul trei ca incidență, cu o tendință de creștere continuă [1]. În **România**, în anul 2022, conform datelor Globocan, 13541 de noi cazuri de carcinom colorectal au fost diagnosticate, poziționând această tumoră pe **primul loc ca incidență** și pe **locul doi ca mortalitate**. Majoritatea adenocarcinoamelor colonice iau naștere din leziuni precursore [2], fie adenoame colonice convenționale, fie leziuni serate, ceea ce subliniază importanța depistării și tratamentului precoce pentru a preveni evoluția acestora către forme maligne. CCR este o boală complexă, care se dezvoltă prin acumularea progresivă de modificări genetice și epigenetice, fiind una dintre tumorile maligne cu cea mai mare încărcătură mutațională [3]. **Screeningul pentru cancer colorectal** este esențial pentru detectarea timpurie a leziunilor premaligne.

1. Leziuni epiteliale neoplazice precursore ale carcinomului colorectal

Conform Clasificării Organizației Mondiale a Sănătății (WHO) a tumorilor sistemului digestiv, Ediția 2019, **leziunile sesile colorectale** includ: *polipii hiperplazici*, subtipul microvezicular și bogat în celule caliciforme, *leziunile sesile serate (SSL)* cu și fără displazie, *adenomul serat tradițional (TSA)* și *adenomul serat, neclasificat* [4].

Majoritatea SSL sunt localizate în **colonul drept**, sunt plate sau ușor supradenivelate, depășind 5 mm, au magini imprecis delimitate, suprafața palidă, acoperită adeseori de mucină. Aspectul pediculat, creșterea nodulară sau excavarea centrală a SSL, de obicei sunt indicatori ai displaziei [5]. Doar 17% din **leziunile sesile serate cu displazie (SSLD)** sau din leziunile malignizate prezintă creștere protuberantă. Aproximativ jumătate dintre polipii displazici sau malignizați sunt ≤ 10 mm. Caracteristica morfologică obligatorie pentru diagnosticul SSL, conform clasificării WHO 2019, este prezența a cel puțin unei **dilatații criptice bazale inechivocă**. SSL se caracterizează printr-un aspect festonat al criptelor intestinale, ce interesează întreaga lungime a acestora, dilatări bazale, creștere orizontală, de-a lungul muscularis mucosae, cripte cu forme neobișnuite (litera T întoarsă, formă de cizmă sau de ancoră).

Prevalența SSLD raportată variază considerabil, având valori cuprinse între 3,7% și 42,9%, cu o medie generală de 13,9%. Prevalența scăzută a SSLD nu indică faptul că malignizarea acestor leziuni este rară, ci mai curând reflectă o fereastră relativ scurtă de detectare a acestei stări intermediare în comparație cu SSL sau cu adenoamele convenționale [6]. Pai et al. au descris patru patternuri de displazie în SSLD: adenomatoasă, serată, cu deviere minimă și nespecificată [7]. În cadrul aceleiași leziuni, în majoritatea cazurilor, sunt prezente mai multe patternuri de displazie, motiv pentru care SSL au un aspect heterogen. Majoritatea SSL cu displazie nespecificată și a celor cu displazie cu deviere minimă prezintă pierderea expresiei MLH1 (aproximativ 75% din SSLD), reflectând hipermetilarea MLH1. În cazul în care se ridică suspiciunea unei displazii cu deviere minimă, recomandarea este de a evalua imunohistochimic expresia MLH1 [7]. În celelalte două forme de displazie expresia MLH1 este conservată în majoritatea cazurilor.

Unul dintre evenimentele timpurii în dezvoltarea SSL este mutația genei BRAF, prezentă în aproximativ 90% dintre cazuri [4]. BRAF este o proto-oncogenă implicată în geneză a diferite tipuri de cancer, inclusiv melanom, cancer tiroidian și CCR. Mutația **BRAF V600E** este cea mai frecventă și determină activarea aberantă a căii de semnalizare MAPK, conducând la proliferare celulară necontrolată. Mutația BRAF se asociază frecvent cu hipermetilarea insulelor CpG (CIMP-H), ceea ce duce la inactivarea genelor supresoare tumorale, precum MLH1. *Pierderea MLH1* favorizează tranziția de la SSL la SSLD și ulterior la **CCR cu instabilitate microsatelitară (MSI)**, prin acumularea rapidă de mutații. Calea Wnt este activată în aproximativ 25% din SSLD, prin mutații în RNF43, APC sau ZNRF3. Aceste leziuni duc la **CCR BRAF-mutant, stabil microsatelitar (MSS)** și pot asocia mutații TP53. Expresia nucleară a beta-cateninei confirmă implicarea căii Wnt.

Cele două tipuri de CCR care se formează pe calea neoplaziei serate, din SSL, au caracteristici diferite în ceea ce privește micromediul imun, răspunsul la tratament, dar și prognosticul. CCR MSI este caracterizat printr-un micromediu tumoral imun activ, răspunde la tratamentul cu inhibitori „check-point” și tinde să aibă un prognostic favorabil, în timp ce CCR MSS se prezintă de obicei într-un stadiu avansat, este mai slab diferențiat, rezistent la tratamentul cu inhibitori „check-point”, prezintă potențial metastazant crescut și un prognostic rezervat.

TSA este un polip serat cu risc de malignizare, mult mai rar întâlnit, reprezentând aproximativ 2% din totalul polipilor colorectali și 1-7% din polipii serați. Cel mai adesea TSA este localizat la nivel recto-sigmoidian, are creștere protuberantă, este pediculat și poate avea un aspect asemănător conului de pin. Rareori poate fi întâlnit în colonul drept, în special tipul plat [8]. Trăsăturile distinctive ale TSA sunt: epiteliu columnar, cu nuclei alungiți, penicilați, cu cromatină fin dispersată și citoplasmă eozinofilă; serarea, cu formare de fante epiteliale, ce reamintesc de aspectul mucoasei intestinului subțire și criptele ectopice, mici cripte anormale, orizontale, ce nu sunt ancorate la muscularis mucosae. Cel puțin două dintre cele trei caracteristici amintite mai sus trebuie să fie prezente pentru un diagnostic de TSA, dintre care cel puțin una să se regăsească pe 50% din suprafața polipului [9]. Primele două sunt considerate a avea specificitate mai mare.

Majoritatea TSA au creștere tipică exofitică, protuberantă și o arhitectură vilooasă complexă. Au fost descrise însă și variante morfologice particulare: TSA plat, TSA filiform și TSA bogat în mucină. Varianta plată nu prezintă aspectul vilos, protuberant, caracteristic TSA și nici cripte ectopice, însă modificările citoplasmatică și nucleare, precum și patternul distinct al serării ajută la diagnosticul diferențial cu o SSL. Frecvent se formează dintr-o leziune precursoră (HP sau SSL). Varianta filiformă a TSA prezintă structuri vilooase mai alungite comparativ cu varianta clasică, cu important edem stromal la vârful vilozitar. TSA bogat în mucină este definit de prezența unui aspect mucinos pe mai mult de 50% din suprafața polipului.

Modificările citologice caracteristice celulelor neoplazice ale TSA să nu fie considerate displazice, ci mai curând modificări senescente [4]. Displazia, atunci când apare, este de tip intestinal, similară celei întâlnite în adenoamele convenționale sau serată, iar trecerea către zona displazică este bruscă. Majoritatea TSA prezintă mutații BRAF (în formele proximale) sau KRAS (în cele distale). Ambele tipuri de mutații pot induce hipermetilare CpG, însă expresia MLH1 este conservată, iar CCR rezultat este MSS.

Polipii hiperplazici colorectali sunt considerați în majoritatea cazurilor benigni, însă rareori aceștia pot servi ca precursori pentru alți polipi serați, care ulterior ar putea evolua spre cancer [10]. Majoritatea HP sunt polipi diminutivi (< 5 mm), aproximativ 70% dintre aceștia fiind localizați la nivelul colonului distal și al rectului. Apar sub forma unei elevări mucozale discrete. Până la 80% din HPMV asociază mutația genei BRAF, iar jumătate din HP GCR

mutație KRAS. Aspectul festonat interesează două treimi superioare din lungimea criptei, este discret în cazul HP GCR și nu sunt prezente dilatații bazale ale criptelor intestinale.

Categorie introdusă în WHO 2019, **adenomul serat, neclasificat**, include polipi cu arhitectură serată și displazie care nu corespund complet criteriilor pentru SSL sau TSA. Unele adenoame tubulo-viloase cu festonare epitelială au fost denumite adenoame serate tubulo-viloase și au profilul molecular intermediar între TSA și adenoamele convenționale. Diagnosticul diferențial cu TSA poate fi dificil, mai ales în formele cu displazie extinsă.

Sindromul polipozei serate este cea mai frecventă polipoză colonică, cu risc crescut de CCR, afectând ambele sexe, diagnosticată adesea în decada a șasea de viață. Este frecvent subdiagnosticat, întrucât se bazează pe un număr cumulativ de polipi serați diagnosticați de-a lungul vieții (≥ 5 leziuni serate localizate proximal de rect, ≥ 5 mm, dintre care două ≥ 10 mm sau 20 de leziuni serate, cu orice dimensiune, răspândite în întreg colonul, dintre care cel puțin cinci să fie localizate proximal de rect). Etiologia este parțial cunoscută, cu posibile contribuții genetice (ex. RNF43, MUTYH, GREM1). Rudele de gradul 1 au un risc de 5 ori mai mare de CCR față de populația generală.

Adenoamele convenționale reprezintă majoritatea leziunilor precanceroase asociate cu CCR, fiind caracterizate printr-o proliferare clonală displazică a epiteliului intestinal, asociate cu instabilitate cromozomială (CIN). Sunt frecvent localizate în colonul distal, mai ales în sigmoid și rect, majoritatea fiind polipoide, sub 10 mm, cu o culoare mai închisă decât mucoasa înconjurătoare. Histologic, din punct de vedere arhitectural sunt clasificate în tubulare, tubulo-viloase și viloase, iar displazia este evaluată ca low-grade (LGD) sau high-grade (HGD).

CIN, principala cale de progresie tumorală, este inițiată prin mutația genei APC, urmată de KRAS și ulterior TP53, favorizând proliferarea celulară prin activarea căilor Wnt și MAPK. Mutațiile SMAD4, PTEN, PIK3CA, NTRK pot fi implicate secundar. 30% până la 50% din CCR sporadice, cu hipermetilarea promotorului MLH1 iau naștere din adenoame convenționale, KRAS mutante [4].

Adenoamele avansate sunt definite prin dimensiuni ≥ 10 mm, arhitectură viloasă și/sau displazie de grad înalt și reprezintă leziuni cu risc crescut de transformare malignă. Sunt adesea sincrone sau metacrone și necesită monitorizare atentă.

2. Polipii malignizați

Polipii malignizați sunt **forme incipiente de CCR**, corespund stadiului TNM **pT1** și se caracterizează prin invazia în submucoasă, fără interesarea muscularis propria. Prevalența polipilor malignizați în cadrul programelor de screening este de până la 12%. Riscul de malignizare este foarte redus în cazul polipilor diminutivi și crește odată cu creșterea în dimensiuni a leziunii. Cele mai multe adenoame malignizate sunt localizate la nivelul colonului stâng și rectului. Clasificările NICE, Kudo sau JNET sunt instrumente valide pentru evaluarea invaziei submucozale în polipii colorectali.

Majoritatea sunt **adenocarcinoame NOS**, dar pot exista și subtipuri rare. Gradarea se face în funcție de diferențierea glandulară (grad scăzut vs. înalt). Factorii de risc pentru metastazarea sau recidiva locală includ: tumori slab diferențiate, invazia submucozală profundă (Sm3 sau Haggitt4), invazia limfatică sau vasculară, „budding”-ul tumoral și marginea de rezecție pozitivă, la sub 1 mm de tumoră. Decizia de a interveni chirurgical într-un caz de polip malignizat trebuie luată de o echipă multidisciplinară, după analizarea tuturor aspectelor clinico-patologice. În absența factorilor de risc înalt, rezecția endoscopică este considerată curativă, cu monitorizare endoscopică începând cu 3–6 luni după îndepărtarea polipului.

Pseudoinvazia este frecvent întâlnită la polipii pediculați mari din colonul sigmoid, supuși unei traume mecanice și constă în migrarea glandelor displazice în submucoasă, fără a avea un caracter infiltrativ. Prezența laminei propria în jurul glandelor displazice, cu atipii similare celor de la nivelul mucoasei, depozitele de hemosiderină și lacuri de mucină la nivelul submucoasei sunt caracteristici identificate în cazul pseudoinvaziei.

Screeningul previne CCR prin identificarea și îndepărtarea leziunilor precursore, contribuind semnificativ la reducerea mortalității și incidenței bolii, cu până la 50% [12]. În România, programul ROCCAS a fost inițiat în 2019 și a vizat populația cu vârsta între 50 și 74 de ani, fără factori de risc crescut, fiind implementat în patru regiuni ca proiect pilot. Programul a înregistrat o rată ridicată de acceptare pentru testul FIT și pentru colonoscopie, demonstrând fezabilitatea unei extinderi la nivel național. Scopul principal al ROCCAS a fost dezvoltarea unei infrastructuri solide pentru implementarea continuă și eficientă a screeningului, un demers esențial într-o țară în care CCR rămâne una dintre principalele cauze de mortalitate oncologică.

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Una dintre ipotezele de cercetare este că microscopia bazată pe excitația cu doi fotoni, comparativ cu microscopia optică convențională, permite o analiză superioară a depozitelor de colagen din reacția desmoplazică în polipii malignizați. Această tehnologie poate oferi informații privind interacțiunea tumorii cu matricea extracelulară și poate facilita diferențierea între invazia reală și pseudoinvazie, aspect esențial în managementul post-polipectomie al pacientului.

O altă ipoteză de lucru este aceea că SSL prezintă un comportament biologic și evolutiv diferit față de adenoamele convenționale, studiul imunohistochimic al acestor leziuni urmărind identificarea unor markeri care să prezică comportamentul diferit al acestor leziuni, inclusiv riscul de malignizare. Cea de-a treia ipoteză de lucru este aceea că prezența celulelor Paneth în adenoamele colonice ar putea fi asociată cu caracteristici histologice sugestive pentru un risc crescut de progresie către adenocarcinom, prin susținerea unei nișe celulare care favorizează proliferarea.

Obiectivele generale includ caracterizarea demografică și histologică a polipilor malignizați, a SSL și a adenoamelor convenționale, analiza riscului de malignizare, identificarea markerilor predictivi prin imunohistochimie și evaluarea mediului imun tumoral în SSL, dar și compararea metodelor avansate de microscopie cu cele convenționale pentru un diagnostic mai precis.

4. Metodologia generală a cercetării

Studiile au fost efectuate cu avizul Comisiei de Etică a Spitalului Universitar de Urgență Militar Central “Dr. Carol Davila” din București cât și a Comisiei de Etică a Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale „Victor Babeș” (INCD „Victor Babeș”) din București. Toate etapele cercetării s-au desfășurat cu respectarea normelor etice. Informațiile au fost extrase din dosarele electronice ale pacienților, incluzând date demografice, istoricul medical și caracteristicile endoscopice ale leziunilor identificate.

Probele biologice au fost procesate clasic în laborator, fixate în formol, deshidratate și incluse în parafină, apoi colorate cu hematoxină-eozină. Pentru studiile imunohistochimice, s-a utilizat o paletă largă de anticorpi (MLH1, p53, CD44, CD3, CD8, MUC2, MUC5AC, MUC6, Ki-67, Cromogranină și p63), cu procesare automată pe sisteme Dako și Ventana. Protocolul a inclus deparafinarea, pretratarea lamelor, incubarea cu anticorpi primari, detecția, contracolorarea și montarea finală.

Evaluarea microscopică s-a realizat cu ajutorul microscopiei optice și, pentru unele cazuri, cu microscopia bazată pe excitația cu doi fotoni (TPFM), o tehnică avansată utilizată pentru analiza detaliată a fibrelor de collagen în leziuni cu invazie versus pseudoinvazie. Aceste imagini au oferit o perspectivă suplimentară asupra interacțiunii tumoră-matrice extracelulară.

Datele au fost centralizate în Microsoft Excel și analizate statistic cu IBM SPSS și GraphPad Prism, în funcție de tipul datelor și obiectivele fiecărui sub-studiu.

5. Profilul histopatologic și imunohistochimic al SSL colonice (Studiul I)

În acest studiu am analizat 45 de de leziuni sesile serate colonice, urmărind caracteristicile endoscopice, histopatologice și imunohistochimice, cu scopul de a identifica diferențele dintre SSL cu și fără displazie și de a înțelege mai bine riscul lor de transformare malignă. Diagnosticul a fost stabilit conform criteriilor WHO 2019, exclusiv pe piese de polipectomie, acest aspect reprezentând criteriul principal de includere în lotul de studiu.

Rezultate

Am observat o ușoară predominanță a **genului feminin** (57,78%) în lotul de pacienți incluși în studiu, cu vârste cuprinse între 37 și 80 de ani și o vârstă medie de 61,51 ani. Cea mai frecventă grupă de vârstă a fost 50–59 de ani.

Majoritatea leziunilor sesile serate (77,78%) au fost localizate în **colonul drept**, respectiv în colonul ascendent (53,33%). Dimensiunea medie a leziunilor a fost de $11,24 \pm 5,6$ mm, cu un interval între 5 mm și 25 mm. Deși nu am identificat o diferență semnificativă statistic între dimensiunea SSL cu și fără displazie, am observat că **toate leziunile ≥ 20 mm au fost displazice**, iar **50% dintre SSLD au avut dimensiuni sub 10 mm**. Asocierea dintre dimensiune și prezența displaziei este semnificativă statistic ($p = 0,721$, Test Fisher).

În timpul colonoscopiilor s-au identificat frecvent leziuni sincrone, cele mai multe fiind adenoame tubulare LGD (48,14% din pacienții cu SSL și 77,77% din cei cu SSLD), adenoame avansate (8,88%), SSL (15,55%) și TSA (2,22%).

Majoritatea SSL au fost descrise endoscopic ca fiind sesile sau plate, o singură leziune cu displazie având aspect pediculat. În 31,11% din cazuri rezecția a fost fragmentată, neputându-se aprecia integralitatea rezecției, iar în 3 dintre leziunile rezecate în bloc s-au observat margini laterale pozitive.

Dintre leziunile neoplazice incluse în studiu, 18 au prezentat displazie: 15 SSL cu LGD, două cu HGD și un adenocarcinom intramucozal (pTis). Acestea au fost împărțite în două grupe: SSL cu LGD și SSL cu HGD/adenocarcinom intramucozal. Deși există invazie limitată la mucoasă, absența vaselor limfatice în lamina proprie face ca această leziune să nu prezinte risc de metastazare limfoganglionară.

Am observat o diferență semnificativă statistic ($p < 0,001$) între vârsta medie a pacienților cu SSL ($57,48 \pm 1,77$ ani) și cei cu SSLD ($67,56 \pm 1,66$ ani). Totuși, nu au fost identificate diferențe semnificative între vârsta pacienților cu LGD și cei cu HGD ($p = 0,654$). Nu s-au observat asocieri semnificative între gen și displazie ($p = 0,712$) sau între localizarea tumorii și displazie ($p = 0,721$).

Toate leziunile au îndeplinit criteriul diagnostic de SSL, respectiv dilatarea criptică bazală inechivocă. Deși acest aspect a fost evident în majoritatea cazurilor, pentru doi polipi mici (sub 10 mm) am efectuat secțiuni suplimentare pentru a-i diferenția de polipii hiperplazici. Prezența de celule mucosecretante, de tip gastric la baza criptelor a fost observată în toate cazurile. Aspecte de herniere a criptelor au fost identificate în 13,3% din cazuri, fără a exista însă o asocieră semnificativă cu displazia sau localizarea leziunii. Un alt aspect particular a fost prezența complexelor limfoglandulare. Principalele modificări arhitecturale care au fost observate în zonele de displazie sunt: reducerea serării, ramificarea criptelor, dilatarea glandulară.

Pentru evaluarea compartimentului proliferativ al SSL, am utilizat anticorpii anti-Ki67. La leziunile fără displazie, celulele pozitive au fost localizate în treimea inferioară a criptelor, cu o distribuție discontinuă și asimetrică. În leziunile displazice, pozitivitatea a fost extinsă pe întreaga lungime a criptelor, inclusiv în epiteliul de suprafață, cu o densitate semnificativ mai mare a celulelor pozitive. În cadrul studiului, niciuna dintre leziunile SSL fără displazie nu a

prezentat reacții aberante ale proteinelor MLH1 și p53. În schimb, în leziunile displazice, 27,77% dintre acestea au avut pierderea expresiei MLH1, iar 11,11% au prezentat un pattern imunohistochimic mutant p53.

Am evaluat expresia mucinelor folosind markeri imunohistochimici specifici, precum anticorpii anti-MUC2, MUC5AC și MUC6. MUC2 și MUC5AC au fost pozitivi în toate SSL, dar în zonele cu HGD s-a observat o reducere semnificativă a expresiei mucinelor. Comparând expresia MUC2 cu MUC5AC, am constatat o variabilitate a intensității și distribuției pentru MUC5AC. MUC6 a fost exprimat în 66,66% dintre SSL, însă intensitatea sa a fost mai scăzută comparativ cu markerii MUC2 și MUC5AC. Nu am identificat diferențe în ceea ce privește expresia mucinelor între leziunile din colonul stâng și cele din colonul drept.

Am utilizat **anticorpii anti-CD44** pentru a analiza expresia acestei proteine în mucoasa colonică normală și în SSL și SSLD. CD44 este o glicoproteină situată pe suprafața celulei, exprimată în numeroase celule, având rol esențial în procese precum *adeziunea celulară, diferențierea, migrarea și semnalizarea* [13]. În mucoasa colonică normală, expresia CD44 a fost limitată la baza criptelor intestinale, iar în zonele serate fără displazie, pozitivitatea CD44 a fost observată în jumătatea inferioară a criptelor. Displazia a fost asociată cu **supraexprimarea proteinei CD44**. În 90% dintre cazurile de SSLD cu expresie MLH1 conservată, reacția CD44 a fost de intensitate slabă - moderată, extinsă și în jumătatea superioară a criptelor. Celulele displazice **MLH1 deficiente** au prezentat **expresie intensă a CD44**, extinsă până în suprafața mucoasei. S-a observat o corelație semnificativă între pozitivitatea CD44 și pierderea MLH1, precum și între expresia CD44 și Ki67 ($p < 0,001$, testul Fisher).

Pentru a evalua micromediul imun, am utilizat markeri CD3 și CD8, specifici limfocitelor T, esențiale în răspunsul imun antitumoral. Am identificat trei patternuri distincte de densitate a limfocitelor T intraepiteliale CD8 pozitive:

- Maxim 1-2 limfocite intraepiteliale /100 celule epiteliale în ariile de displazie cu expresie MLH1 conservată;
- Până la 10 limfocite intraepiteliale /100 celule epiteliale în ariile serate, fără displazie;
- Până la 14 limfocite intraepiteliale /100 celule epiteliale în ariile displazice, MLH1 deficiente.

Am considerat o valoare prag de 10 limfocite intraepiteliale pentru a diferenția numărul de limfocite din zonele serate non-displazice de cele displazice, cu expresie pierdută a MLH1. O

asociere semnificativă statistic a fost observată între numărul de limfocite T CD8+ intraepiteliale și displazia epitelială, cu sau fără pierderea expresiei MLH1 ($p < 0,001$, testul Fisher).

Am evaluat distribuția celulelor neuroendocrine în mucoasa colonică normală și în SSL utilizând **cromogranina**. Comparativ cu mucoasa normală adiacentă, am observat o **reducere** generală a numărului de celule neuroendocrine în SSL. În anumite zone, aceste celule au fost complet absente, iar în altele au fost prezente în număr redus, în special în regiunile cu distorsionare arhitecturală bazală.

6. Evaluarea polipilor malignizați colorectali – rolul microscopiei bazată pe excitația cu doi fotoni în diagnosticul invaziei tumorale (Studiul II)

În acest studiu am evaluat caracteristicile clinico-patologice ale polipilor malignizați și totodată, am caracterizat modificările stromale care apar în polipii malignizați printr-o tehnică complementară de imagistică optică neliniară (TPEM). Lotul de studiu a inclus 58 de pacienți, dintre care 53 au primit diagnosticul histopatologic de polip recto-colonic malignizat, iar pentru alți cinci pacienți s-a stabilit diagnosticul de polip cu pseudoinvazie. Pentru analiza imaginilor cu ajutorul TPEM am selectat un număr de 14 polipi, nouă cu diagnostic de malignitate și restul leziunilor, adenoame colonice cu aspecte de pseudoinvazie.

Acestă parte a studiului a fost realizată printr-o colaborare între Laboratorul de Anatomie Patologică al Spitalul Universitar de Urgență Militar Central „Dr. Carol Davila” din București și **Centrul de Microscopie, Microanaliză și Procesarea Informației** din cadrul Universității Naționale de Științe și Tehnologie Politehnica din București. TPEM folosește două mecanisme de contrast optic neliniar – microscopia bazată pe generarea armonicii a doua (SHG) și fluorescența generată de excitația cu doi fotoni (TPEF). Lamele au fost scanate cu un scanner Aperio LV1 IVD la 20x, iar regiunile de interes (ROIs) au fost examinate folosind un microscop confocal Leica TCS SP. Semnalele TPEF provin din regiunile care conțin eozină, iar cele SHG din fibrele de collagen.

Au fost calculați patru parametri asociați distribuției intensităților pixelilor din imaginile SHG – **Media** (Mean), **Abaterrea Standard** (Standard Deviation), **Indicele de asimetrie** (Skewness) și **Indicele de aplatizare** (Kurtosis). Pixelii din imaginea SHG care depășesc o

valoare de prag au fost numărați, oferind **raportul total al zonei de collagen** (TC-ratio), calculat ca raportul dintre acest număr și suprafața totală a imaginii. Setul de parametri derivat din **Matricea de Simultaneitate a Nivelurilor de Gri** (Gray-Level Co- Occurrence Matrix, GLCM) este foarte util pentru a descrie relațiile spațiale dintre intensitățile pixelilor dintr-o imagine: **Contrast, Omogenitate, Energie, Entropie și Corelație**. Imaginile SHG au fost utilizate pentru a evalua orientarea fibrelor de collagen prin analiza FFT (Fast Fourier Transform) cu un script personalizat scris în ImageJ. Imaginile au fost binarizate inițial și apoi au fost fitate cu o elipsă. Un index de orientare al collagenului (N) a fost calculat pe baza lungimilor axelor minore (S) și majore (L) ale elipsei: $N = 1 - S/L$ [14]. O abordare alternativă pentru a cuantifica obiectiv organizarea într-o imagine implică analiza fractală. Imaginile SHG au fost analizate după thresholding prin metoda Triangle, adică într-un format binar, utilizând un plugin ImageJ (de exemplu, Fractal box count) pentru a calcula dimensiunea fractală.

Rezultate

Toți cei 53 de polipi malignizați au fost adenoame convenționale, iar componenta malignă a fost predominant adenocarcinom NOS (94,33%) de grad scăzut (bine și moderat diferențiat). Restul cazurilor au fost reprezentate de adenocarcinom mucinos și adenocarcinom cu celule în „inel cu pecete”. Am observat o predominanță a genului masculin (64%). Vârsta pacienților a variat între 51 și 87 de ani, cu o vârstă medie de 66,5. Majoritatea pacienților se încadrează în grupa de vârstă 61-70 de ani (51%). Majoritatea polipilor malignizați au fost localizați în colonul sigmoid (52,8%), urmat de rect (22,7%), colonul ascendent (9,4%), colonul descendent (7,5%), colonul transvers și cec (câte 3,8%).

Dimensiunea polipilor malignizați variază între 8 mm și 60 mm, cu o dimensiune medie de 25,36 mm. În ceea ce privește morfologia, 22 de polipi au fost pediculați, 12 semipediculați, 10 sesili, iar informațiile despre 9 polipi nu au fost specificate. Rezecția endoscopică a fost efectuată în 48 de cazuri, iar 5 polipi sesili sau plați au fost rezecați chirurgical. S-au identificat frecvent leziuni sincrone, printre care 25 de pacienți cu adenoame avansate și 2 cu adenocarcinom concomitent.

Au fost evaluați factorii de risc pentru metastazare și recidivă loco-regională: invazia limfo-vasculară (13,2%), componentă malignă slab diferențiată (5,67%), nivel de invazie Haggitt 4 (1,9%), margini de rezecție pozitive (9,4%) și „budding” tumoral, Bd1 (39,6%). Decizia de intervenție chirurgicală a fost luată în șase cazuri, având în vedere vârsta, starea generală de

sănătate a pacientului, inclusiv comorbiditățile, riscurile asociate, capacitatea de a suporta o intervenție chirurgicală și evoluția leziunii sau a afecțiunii. În urma intervenției, a fost identificată recidiva loco-regională într-un caz și metastaze limfoganglionare într-altul.

Pentru analiza distribuției și organizării collagenului, am ales 88 de imagini din zonele de invazie, din polipii malignizați și 65 de imagini din zonele de pseudoinvazie, cu un conținut semnificativ de collagen în imaginile SHG, obținute din imaginile având arii de $1 \times 1 \text{ mm}^2$.

Toți parametrii calculați, incluzând Media, Abaterea Standard, Indicele de asimetrie, Indicele de aplatizare, TC-ratio, Orientarea, Omogenitatea, Energia, Entropia și Contrastul au detectat diferențe statistic semnificative între imaginile SHG obținute pe polipii malignizați și polipii cu pseudoinvazie ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,0001$), cu excepția Dimensiunii fractale.

Indexul de orientare al collagenului (N) calculat indică un index mai mare în cazul polipilor malignizați, ceea ce sugerează o orientare ordonată și uniformă a fibrelor de collagen în această situație, comparativ cu pseudoinvazia.

7. Particularități morfologice ale adenoamelor convenționale colorectale (Studiul III)

Adenoamele convenționale sunt cele mai frecvente leziuni precursorale ale CCR, care pot prezenta diferite modificări morfologice, cum ar fi prezența celulelor Paneth, a celulelor clare, „în inel cu pecete” sau metaplazia scuamoasă, ce ar putea influența comportamentul clinic. Alte particularități, precum formarea de cripte ectopice și eozinofilia citoplasmatică, pot complica diferențierea lor de alte entități patologice, cum ar fi TSA. Studiul își propune să contribuie la înțelegerea diversității adenoamelor colorectale prin analiza morfologică și implicațiile clinice ale acestora.

Rezultate

Am analizat 273 de adenoame colorectale provenind de la 209 pacienți (94 femei și 115 bărbați), cu vârste între 25 și 88 de ani. Cea mai mare parte a pacienților se încadra în grupele de vârstă 61-70 ani (36,84%), urmată de 71-80 ani (27,75%) și 51-60 ani (23,44%). 7,69% dintre

adenoame au fost diagnosticate la pacienți sub 50 de ani. Majoritatea adenoamelor au fost localizate în jumătatea stângă a intestinului gros, în special în colonul sigmoid (34,07%), iar în 10,62% dintre cazuri nu au fost disponibile date privind localizarea.

Din punct de vedere endoscopic, clasificarea Paris a fost utilizată în 77,65% dintre cazuri, iar clasificările NICE, Kudo sau JNET au fost aplicate în 30,40% dintre cazuri. Conform clasificării Paris, au fost examinate 58 de polipi pediculați, 75 de polipi sesili, 60 de polipi semipediculați și 19 polipi plați.

Dimensiunea adenoamelor convenționale a variat între 2 mm și 45 mm, 73,98% dintre leziuni fiind infracentimetrice. 26,01% au fost mai mari de 10 mm, fiind considerate adenoame avansate. Arhitectura adenoamelor examinate a fost predominant tubulară în 85,35% din cazuri, urmată de tubulo-viloasă (13,92%) și viloasă (0,73%). Majoritatea adenoamelor au prezentat displazie de grad scăzut în 83,53% din cazuri, iar 12,82% au avut HGD. În 3,66% dintre cazuri, polipii au fost malignizați, cu proliferare de adenocarcinom NOS, de grad scăzut. 90% dintre polipii malignizați au avut arhitectură tubulo-viloasă sau predominant viloasă. În plus, 6,57% dintre adenoamele tubulare și 43,24% dintre cele cu arhitectură viloasă au prezentat HGD.

Celulele Paneth (CP) [15] au fost identificate în 47 de adenoame convenționale colorectale (**17,22%**). Cele mai multe adenoame conținând celule Paneth au fost localizate la nivelul colonului sigmoid (29,79%), urmate de colonul transvers (23,40%) și de colonul ascendent (17,02%). În 8,51% din cazuri localizarea leziunii nu a fost disponibilă.

61,70% din aceste adenoame au fost diagnosticate la bărbați. 18 pacienți au prezentat adenoame sincron (38,29%) și unul dintre aceștia adenocarcinom sincron. 40 de adenoame (85,10%) au prezentat LGD și cinci HGD (10,63%). Doi polipi malignizați au conținut celule Paneth (4,27%) la nivelul componentei adenomatoase. Celulele Paneth nu s-au regăsit în componenta malignă.

Am identificat un caz de **metaplazie scuamoasă** într-un adenom localizat la nivelul colonului stâng, pediculat, cu HGD. Am utilizat anticorpul anti-p63 în analiza imunohistochimică, care a avut expresie absentă în zona de metaplazie scuamoasă. De asemenea, un pacient în vârstă de 64 de ani, a fost diagnosticat cu adenom tubulo-vilos, cu HGD, prezentând o arie de **metaplazie cu celule clare**. Două adenoame examinate au prezentat o predominanță a **celulelor goblet**, localizate la nivelul colonului stâng, având dimensiunea medie de 34 mm și fiind caracterizate prin LGD. Cripte ectopice au fost identificate în 45 de

cazuri (16,48%) și au fost asociate cu dimensiuni ≥ 10 mm sau cu componentă vilooasă. O altă modificare observată a fost eozinofilia citoplasmatică, care, alături de cripte ectopice, este caracteristică adenoamelor tradiționale serate. Aceasta a fost identificată în 7,69% dintre cazurile studiate.

8. Concluzii și contribuții personale

Obiectivul prezentei teze de doctorat este studierea principalilor precursori ai CCR, respectiv adenoamele convenționale și SSL, pentru a înțelege mai bine comportamentul acestor leziuni neoplazice. Rezultatele obținute au confirmat constatările existente în literatura de specialitate și, în același timp, au adus în prim-plan elemente de noutate. Studiile efectuate s-au concentrat pe trei direcții majore de cercetare.

Studiul I a fost dedicat evaluării SSL colorectale. Principalele concluzii au fost:

- ✓ 50% din SSLD au avut dimensiuni cuprinse între 5 și 9 mm, subliniind necesitatea unei evaluări clinice și endoscopice riguroase;
- ✓ toate leziunile cu dimensiuni ≥ 20 mm au prezentat displazie, dovedindu-se o corelație semnificativă statistic între dimensiunea leziunii și displazie;
- ✓ Deși vârsta medie a pacienților cu SSL fără displazie este cu aproximativ 10 ani mai mică decât cea a pacienților cu leziuni displazice, nu a fost observată o diferență semnificativă statistic între vârsta medie la momentul diagnosticării LGD și a HGD, aspect ce susține faptul că evoluția este una rapidă în momentul în care aceste leziuni se dezvoltă;
- ✓ în prezența displaziei, o trăsătură comună a tuturor SSL examinate a fost reducerea semnificativă a serării epiteliale, motiv pentru care este importantă examinarea cu atenție a periferiei leziunii;
- ✓ o proporție semnificativă (27,77%) din SSLD a prezentat pierderea expresiei MLH1, subliniind rolul MSI în calea serată a carcinogenezei;
- ✓ 11,11% din SSLD, cu LGD și HGD au prezentat un pattern imunohistochimic mutant al p53, ridicând întrebarea dacă mutația TP53 nu ar putea fi un eveniment mai timpuriu în SSLD comparativ cu adenoamele conventionale;

- ✓ Reducerea expresiei MUC2 și MUC5 în zonele de HGD / adenocarcinom intramucozal sugerează o pierdere a mecanismului de protecție naturală a mucoaselor conferit de mucine, favorizând progresia leziunii spre malignitate;
- ✓ SSLD cu MSI prezintă caracteristici imunologice distincte, demonstrând infiltrarea limfocitară intraepitelială cu limfocite T CD8+ citotoxice, în regiunile de displazie MLH1-deficiente;
- ✓ CD44, un biomarker al celulelor stem tumorale, a fost supraexprimat în toate cazurile, iar expresia a fost mai intensă în zonele MLH1-deficiente comparativ cu cele ce prezintă expresie conservată pentru MLH1.

În ciuda limitărilor studiului, legate de numărul redus de cazuri, am obținut câteva rezultate semnificative, care vor servi drept fundament pentru o cercetare ulterioară. Este primul studiu care ridică problema unei posibile asocieri între supraexpresia CD44 și pierderea funcției MLH1, ce ar putea explica o evoluție mai rapidă a acestor leziuni către malignitate.

În **studiul II** am analizat principalele caracteristici clinico-demografice ale polipilor malignizați, care s-au dovedit din punct de vedere histopatologic a fi adenoame convenționale. În majoritatea cazurilor, componenta malignă a fost reprezentată de adenocarcinom NOS, dar am întâlnit și variante mai rare de adenocarcinom, precum cel mucinos sau carcinomul cu celule „în inel cu pecete”. Polipii malignizați au fost diagnosticați mai frecvent la nivelul colonului stâng, în special în rândul bărbaților, iar vârsta medie la momentul diagnosticării a fost de 66,58 de ani. Am evaluat factorii de risc pentru metastazarea locoregională și recidiva locoregională.

Pentru a diferenția pseudoinvasia de invazia din polipii malignizați am utilizat o tehnică specială de microscopie, bazată pe excitația cu doi fotoni, cu ajutorul căreia am realizat o analiză cantitativă și calitativă a colagenului intra și peritumoral. Această tehnică a fost utilizată anterior pentru evaluarea modificărilor stromale întâlnite în tumori epiteliale maligne (cancer tiroidian, cutanat, mamar, gastric, pancreatic, CCR), însă pentru prima dată cu scopul diferențierii dintre pseudoinvasie și invazie în polipii malignizați, oferind o perspectivă unică, superioară microscopiei optice asupra arhitecturii tumorale și a comportamentului stromal în formele incipiente de CCR.

Pentru toți parametrii calculați (Media, Abaterea standard, Indicele de asimetrie, Indicele de aplatizare, TC-ratio, Contrast, Omogenitate, Energie, Entropie și Corelație) am observat

diferențe semnificative statistic între imaginile SHG obținute pe polipii malignizați și polipii cu pseudoinvazie, cu excepția dimensiunii fractale.

Rezultatele obținute ar putea deschide noi perspective pentru integrarea tehnologiilor de învățare automată și învățare profundă în diagnosticarea CCR, în combinație cu tehnica avansată de TPEM. Această abordare ar putea îmbunătăți semnificativ acuratețea diagnosticului.

În cadrul **studiului III**, am evaluat adenoamele convenționale colorectale din perspectiva clinico-demografică și morfologică. Unul dintre rezultatele semnificative a fost identificarea unui procent important de adenoame colonice diagnosticate la pacienți cu vârsta sub 50 de ani (7,69%). Aceasta ridică întrebarea dacă vârsta recomandată pentru începerea screeningului pentru CCR ar trebui să fie revizuită, având în vedere faptul că aceste adenoame pot apărea și în rândul pacienților tineri. Majoritatea adenoamelor sunt localizate în colonul distal, iar dimensiunea acestora tinde să crească pe măsură ce dezvoltă HGD sau ajung să devină maligne. Totuși, în cele două loturi studiate (studiu II și III) am întâlnit doi polipi malignizați care aveau diametre sub 10 mm, ceea ce subliniază importanța unei evaluări atente a polipilor mici. Această constatare demonstrează că dimensiunea nu este întotdeauna un indicator suficient al riscului de malignizare și că și polipii mici pot prezenta un potențial malign. Am examinat adenoamele pentru a observa prezența CP, celulelor clare, celulelor goblet, a metaplaziei scuamoase, criptelor ectopice și eozinofiliei citoplasmatică și pentru a evalua posibilele corelații între aceste trăsături și caracteristicile clinico-demografice ale pacienților. Metaplazia cu celule clare și cea scuamoasă au fost întâlnite izolat, la pacienți cu HGD. Datorită numărului redus de cazuri raportate de metaplazie cu celule clare în adenoame, semnificația acestei modificări nu este pe deplin înțeleasă. De asemenea, criptele ectopice și metaplazia eozinofilă au fost întâlnite frecvent în cadrul adenoamelor convenționale examinate, cu caracter focal. Criptele ectopice au fost asociate cu adenoamele de peste 10 mm, cu o arhitectură tubulo-viloasă. CP au fost frecvent identificate (17,22%), în special în adenoamele din colonul sigmoid, cu LGD, la bărbați și la pacienți cu adenoame sincron, în 38,29% din cazuri. Acestea au lipsit în componenta malignă, sugerând astfel implicarea CP mai curând în etapele inițiale ale procesului de carcinogeneză.

Aceste descoperiri contribuie la o mai bună înțelegere a proceselor biologice implicate în dezvoltarea CCR și pot deschide noi perspective pentru îmbunătățirea strategiilor de prevenire, diagnostic și tratament al acestei patologii. Continuarea cercetărilor în această direcție este

esențială pentru îmbunătățirea prognosticului pacienților cu CCR cât și pentru dezvoltarea unor abordări terapeutice personalizate.

Bibliografie selectivă

1. Morgan, E., Arnold, M., Gini, A., Lorenzoni, V., Cabañas, C. J., Laversanne, M., Vignat, J., Ferlay, J., Murphy, N., & Bray, F. (2023). Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: Incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut*, 72(2). <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-327736>
2. International Agency for Research on Cancer. Romania: Cancer Fact Sheet. GLOBOCAN 2022, <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/642-romania-fact-sheet.pdf>.
3. Pai, S. G., Carneiro, B. A., Chae, Y. K., Costa, R. L., Kalyan, A., Shah, H. A., Helenowski, I., Rademaker, A. W., Mahalingam, D., & Giles, F. J. (2017). Correlation of tumor mutational burden and treatment outcomes in patients with colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 8(5). <https://doi.org/10.21037/jgo.2017.06.20>
4. R.K. Pai, M.J. Makinen, O. Rosty, Serrated lesion and polyps. WHO classification of tumours of the digestive system, International Agency for Research on Cancer, Lyon (2019), pp. 163-169
5. Murakami T, Sakamoto N, Ritsuno H, et al. Distinct endoscopic characteristics of sessile serrated adenoma/polyp with and without dysplasia/carcinoma. *Gastrointest Endosc* 2017;85:590–600
6. Utsumi, T., Yamada, Y., Diaz-Meco, M. T., Moscat, J., & Nakanishi, Y. (2023). Sessile serrated lesions with dysplasia: is it possible to nip them in the bud? In *Journal of Gastroenterology* (Vol. 58, Issue 8). <https://doi.org/10.1007/s00535-023-02003-9>
7. Pai, R. K., Bettington, M., Srivastava, A., & Rosty, C. (2019). An update on the morphology and molecular pathology of serrated colorectal polyps and associated carcinomas. In *Modern Pathology* (Vol. 32, Issue 10). <https://doi.org/10.1038/s41379-019-0280-2>
8. Bettington, M. L., Walker, N. I., Rosty, C., Brown, I. S., Clouston, A. D., McKeone, D. M., Pearson, S. A., Klein, K., Leggett, B. A., & Whitehall, V. L. J. (2015). A clinicopathological and molecular analysis of 200 traditional serrated adenomas. *Modern Pathology*, 28(3). <https://doi.org/10.1038/modpathol.2014.122>

9. McCarthy, A. J., Serra, S., & Chetty, R. (2019). Traditional serrated adenoma: An overview of pathology and emphasis on molecular pathogenesis. In *BMJ Open Gastroenterology* (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.1136/bmjgast-2019-000317>
10. Jass, J. R. (2004). Hyperplastic polyps and colorectal cancer: Is there a link? In *Clinical Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 2, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/S1542-3565\(03\)00284-2](https://doi.org/10.1016/S1542-3565(03)00284-2)
11. Farchoukh, L., Kuan, S. F., Dudley, B., Brand, R., Nikiforova, M., & Pai, R. K. (2016). MLH1-deficient colorectal carcinoma with wild-type BRAF and MLH1 promoter hypermethylation harbor KRAS mutations and arise from conventional adenomas. *American Journal of Surgical Pathology*, 40(10). <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000695>
12. Zauber, A. G. (2015). The Impact of Screening on Colorectal Cancer Mortality and Incidence: Has It Really Made a Difference? In *Digestive Diseases and Sciences* (Vol. 60, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3600-5>
13. Xu, H., Niu, M., Yuan, X., Wu, K., & Liu, A. (2020). CD44 as a tumor biomarker and therapeutic target. In *Experimental Hematology and Oncology* (Vol. 9, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s40164-020-00192-0>
14. Osman, O. S., Selway, J. L., Harikumar, P. E., Stocker, C. J., Wargent, E. T., Cawthorne, M. A., Jassim, S., & Langlands, K. (2013). A novel method to assess collagen architecture in skin. *BMC Bioinformatics*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-260>
15. Quintero M, Samuelson LC, Paneth Cells: Dispensable yet Irreplaceable for the Intestinal Stem Cell Niche, *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* (2025), doi: 10.1016/j.jcmgh.2024.1014

Lista cu lucrările științifice publicate

1. **Florea MA**, Becheanu G, Niculae A, Dobre M, Costache M. Immunohistochemical insights into the pathogenesis of colonic sessile serrated lesions. *Archive of Clinical Cases*, 2025, 12(1), 22-28. (Capitolul 5, pag. 46 - 72)
<https://doi.org/10.22551/2025.46.1201.10307>
2. **Florea MA**, Eftimie LG, Glogojeanu RR, Hristu R, Stanciu GA, Costache M. Imaging of colorectal adenomas with pseudoinvasion and malignant polyps using two-photon excitation microscopy. *Front Oncol.* 2024 Jun 14;14:1394493. doi: 10.3389/fonc.2024.1394493. PMID: 38947893; PMCID: PMC11211392. (Capitolul 6, pag. 73 - 94)
<https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2024.1394493>
3. **Florea MA**, Eftimie LG, Enea D, Becheanu G, Costache M. Paneth Cells: A Comprehensive Review of Their Role, Prevalence and Molecular Mechanisms in Colorectal Neoplastic Lesions. *R. J. Mil. Med.* 2025, 128(2): 166-170. (Capitolul 7, pag. 95 - 113)
<https://doi.org/10.55453/rjmm.2025.128.2.10>