

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

***ECOUL DEZVOLTĂRII UNOR NOI METODE DE APRECIERE
A SUPRAVIEȚUIRII PACIENȚILOR CU CANCER COLO-
RECTAL***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

Prof. Univ. Dr. GINGHINĂ OCTAV

Student-doctorand:

Dr. ZAMFIR MARIUS - COSMIN

Motto:

Per aspera ad astra!

(Pe căi anevoioase către stele,
Seneca, Hercule furios)

Mulțumiri

Primul gând de recunoștință se îndreaptă către coordonatorul meu de doctorat, domnul Prof. Univ. Dr. Octav Ginghină, pentru rigoarea științifică, răbdarea și exigența care au dat direcție acestui demers. Îndrumarea constantă, observațiile fine și încrederea acordată au transformat fiecare etapă a cercetării într-un proces de învățare autentică, asemeni dictonului din sportul de echipă: *contează mai mult coechipierul pe care-l ai în spate, decât adversarul din față!*

Mulțumesc, de asemenea, membrilor comisiei de îndrumare și tuturor cadrelor didactice care, prin expertiza și deschiderea lor, au contribuit la formarea mea profesională și la conturarea acestui proiect, în mod deosebit echipei de cercetători în frunte cu doamna Conf. Habil. Dr. Bianca Gălățeanu din cadrul Universității București.

Un rol esențial l-au avut colegii și colaboratorii mei, alături de care am împărtășit idei, îndoieli și reușite, dar și răbdării, a căror încredere a dat sens muncii mele.

În plan personal sunt profund recunoscător familiei pentru sprijinul necondiționat, înțelegerea și echilibrul oferit în momentele dificile.

Această realizare aparține, în egală măsură, celor care m-au impulsionat să pornesc pe acest drum și mi-au fost alături de la *A* la *Z*.

Cuprins

Introducere	10
I. Partea Generală	13
1. Anatomia chirurgicală, fiziologia și patologia colorectală oncologică	13
1.1. Anatomia chirurgicală	13
1.1.1. Embriologia colonului și a rectului	13
1.1.2. Anatomia colonului	14
1.1.3. Anatomia rectului	14
1.1.4. Histologia colonului și a rectului	15
1.1.5. Vascularizația colonului și a rectului	16
1.1.6. Inervația colonului și a rectului	18
1.2. Fiziologia colonului	18
1.3. Patologia colorectală oncologică	19
1.3.1. Tipuri de cancere	22
1.3.2. Tehnici chirurgicale	23
2. Metode de diagnostic în cancerul colorectal	24
2.1. Colonoscopia	24
2.2. Rectoscopia	25
2.3. Confirmarea histopatologică	26
2.3.1. Adenocarcinomul colorectal	26
2.3.2. Carcinomul mucinos	26
2.3.3. Carcinomul cu celule în inel cu pecete	27
2.3.4. Gradul de diferențiere tumorală	27
2.4. Stadializarea imagistică în cancerul colorectal	28
2.4.1. Tomografia computerizată (CT)	29
2.4.2. Rezonanța magnetică (RMN)	30
2.4.3. Tomografia cu emisie de pozitroni combinată cu CT (PET-CT)	31
3. Rolul <i>biopsiei lichide</i> în cancerul colorectal	31
3.1. Standardizarea profilării moleculare în cancerul colorectal	33
3.2. Celule tumorale circulante (CTCs)	36
3.2.1. Caracteristicile CTCs și strategii de detecție	36
3.2.2. ADN-ul liber circulant (cfDNAs)	39
3.2.3. ARN-uri circulante (cfRNAs)	41
II. Contribuții Personale	43
4. Scopul și obiectivele studiului	43

5. Metodele generale ale cercetării	44
5.1. Descriere generală	44
5.1.1. Consimțământ informat și aprobare etică	44
5.1.2. Limitele studiilor	45
5.2. Protocolul de cercetare – studiul privind identificarea ganglionară	46
5.3. Protocolul de cercetare – biopsia lichidă	50
5.3.1. Cohorta de pacienți	50
5.3.2. Izolarea materialului genetic	50
5.3.3. Analiza NGS.....	51
5.4. Protocolul de cercetare – analiza micromediului tumoral	53
5.4.1. Cohorta de pacienți	53
5.4.2. Procesarea probelor pre-analiză	53
5.4.3. Analiza prin citometrie în flux.....	53
5.5. Caracteristici studiate ale lotului de pacienți.....	57
5.5.1. Variabile clinice și tumorale	57
5.5.2. Tratamentul neoadjuvant și adjuvant	57
5.5.3. Proceduri chirurgicale	57
5.5.4. Examinarea anatomopatologică a pieselor	64
5.6. Analiza statistică	68
5.6.1. Analiza statistică pentru identificarea ganglionară	68
5.6.2. Analiza statistică pentru biopsia lichidă	68
5.6.3. Analiza statistică pentru investigarea micromediului tumoral	69
6. Completarea biopsiei tisulare cu analiza NGS cfNA derivată din plasmă ca biopsie lichidă pentru modularea terapiei în timp real la pacienții cu cancer colorectal	69
6.1. Introducere	69
6.2. Materiale și Metode	71
6.2.1. Cohorta de pacienți	71
6.2.2. Dezvoltarea unui protocol de biopsie lichidă	72
6.2.3. Analiza datelor	74
6.3. Rezultate și Discuții	74
6.3.1. Caracteristicile grupului de pacienți cu CCR.....	74
6.3.2. Analiza comparativă a mutațiilor din țesutul tumoral și biopsia lichidă	75
6.4. Concluzii	82
7. Randamentul ganglionilor limfatici în cancerul colorectal: dincolo de „regula celor 12”	83

7.1. Introducere.....	83
7.2. Materiale și metode	85
7.3. Rezultate și discuții	89
7.3.1. Statusul ganglionar și raportul ganglionar (LNR)	97
7.3.2. Influența abordului chirurgical asupra randamentului ganglionar	97
7.3.3. Interpretarea randamentului ganglionar și indicatori prognostici alternativi .	97
7.3.4. Implicații clinice și limitările „regulii celor 12”	98
7.4. Concluzii	99
8. Optimizarea unui protocol de citometrie în flux pentru detecția receptorilor de puncte de control imun în micromediul tumoral al cancerului colorectal	100
8.1. Introducere.....	100
8.2. Compoziția micromediului tumoral în cancerul colorectal	100
8.2.1. Infiltratul limfocitar	103
8.2.2. Macrofagele asociate tumorilor (TAMs)	104
8.2.3. Neutrofilele asociate tumorilor (TANs)	105
8.2.4. Fibroblastele asociate tumorilor (CAFs).....	105
8.2.5. Celulele stem asociate tumorilor (CSCs)	105
8.3. Molecule de control imun.....	107
8.4. Metode de investigare a micromediului tumoral	107
8.5. Materiale și Metode	108
8.5.1. Probe de țesut și aprobarea comisiei de etică	108
8.5.2. Procesarea probelor	108
8.5.3. Marcarea celulelor și caracterizarea lor prin citometrie în flux	109
8.5.4. Analiza micromediului tumoral	110
8.5.5. Analiza datelor	112
8.6. Rezultate și Discuții	113
8.6.1.Descrierea grupului de pacienți	113
8.6.2. Expresia receptorilor PD-1/CTLA-4.....	114
8.7. Concluzii	118
9. Concluzii și perspective.....	119
9.1. Concluzii	120
9.2. Perspective	121
Bibliografie.....	122

Lucrări științifice publicate

Articole ISI publicate ca autor principal în timpul stagiului doctoral

1. **M. Zamfir**, A.B. Văcărașu, M. Mardare, I.N. Bondoc, A.I. Pușcașu, T. Antoniu, F. Ultimeșcu, F. Grama, L. Șerbănescu, G. Papuc, N. Iordache, M.B. Maciuceanu-Zarnescu, T.I. Năstăsescu, D.I. Stanciu, A. Hudîță, B. Gălățeanu, O. Ginghină, *Lymph Node Yield in Colorectal Cancer: Beyond The "Rule Of 12"*, **Farmacia**, 2026, 74(1):70-77, doi: 10.31925/farmacia.2026.1.7 – IF = 1.3 (2025) (pag.93-110)
2. **M. Zamfir**, A.I. Pușcașu, A. Hudîță, B. Gălățeanu, L. Buburuzan, A.M. Iroftei, C. Busuioc, M. Mardare, A. Filippi, G.T.A. Burcea-Dragomiroiu, M. Tănase, F. Grama, N. Iordache, O. Ginghină, B.C. Tănase, *Complementing NGS Tissue Biopsy with Plasma Derived cfNAs Analysis as a Liquid Biopsy for Real-Time Therapy Modulation in Colorectal Cancer Patients*, **Farmacia**, 2025, 73(4):963-970, doi: 10.31925/farmacia.2025.4.16– IF = 1.3 (2025) (pag.79-92)
3. **M. Zamfir**, A. Hudîță, M. Mardare, I.N. Bondoc, A.B. Văcărașu, B.C. Tănase, G.T.A. Burcea-Dragomiroiu, M. Lițescu, T. Voiosu, B. Gălățeanu, C. Lambert, O. Ginghină, *Optimization of a Flow Cytometry Protocol for PD-1/CTLA-4 Immune Checkpoints Receptors Detection in Colorectal Cancer Tumour Microenvironment*, **Farmacia**, 2023, 71(2):367-374, doi: 10.31925/farmacia.2023.2.17 – IF = 1.4 (2023) (pag.111-129)

Co-autor articole ISI publicate în timpul stagiului doctoral

1. F. Ultimeșcu, C. Ardeleanu, O. Ginghină, M. Mardare, **M. Zamfir**, A.I. Pușcașu, I.N. Bondoc, A.B. Văcărașu, T. Antoniu, A. Hudîță, B. Gălățeanu, L. Galeș, E. Șerban, H.D. Liscu, A.I. Ionescu, M. Ceaușu, M.V. Olinca, *From Static to Dynamic: Adaptive Molecular Subtyping in Treated Breast Cancers-Evidence from Single-Center Retrospective Cohort Study*, **Cancers MDPI**, 2026, 28(4): 657, doi:10.3390/cancers18040657 – IF = 4.4 (2025)
2. B. Gălățeanu, O. Ginghină, A. Hudîță, R.S. Tudorache, **M. Zamfir**, M. Mardare, C. Lambert, M. Birligea, C. Diaconu, C. Popp, G.T.A. Burcea-Dragomiroiu, A. Voiosu, T. Voiosu, *RFA-Induced Alterations in the Expression of PD-1 And CTLA-4 in the Tumour Microenvironment PCCA: Results from an Exploratory Study*, **Farmacia**, 2024, 72(3): 565-573, doi: 10.31925/farmacia.2024.3.10 – IF = 1.3 (2024)

Co-autor articole ISI publicate înaintea stagiului doctoral

1. O. Ginghină, A. Hudiță, **M. Zamfir**, A. Spânu, M. Mardare, I.N. Bondoc, L. Buburuzan, S.E. Georgescu, M. Costache, C. Negrei, C. Nițpir, B. Gălățeanu, *Liquid Biopsy and Artificial Intelligence as Tools to Detect Signatures of Colorectal Malignancies: A Modern Approach in Patient's Stratification*, **Frontiers in Oncology**, 2022, 12: 856575, doi: 10.3389/fonc.2022.856575 – IF = 4.7 (2022)

Co-autor articole BDI publicate în timpul stagiului doctoral

1. A. Văcărașu, R. Iosifescu, **M. Zamfir**, M. Mardare, I. Bondoc, C. Călin, L. Ali, B. Gălățeanu, T. K. Nikolouzakakis, M. Tolia, O. Ginghină, *A rare case of a Primary Malignant Anorectal Melanoma*, **Public Health and Toxicology**, 2023, 3(1):1 <https://doi.org/10.18332/pht/159114>
2. I. Bondoc, **M. Zamfir**, M. Mardare, A. Văcărașu, A. Burlacu, L. Ali, A. Hudiță, B. Gălățeanu, O. Ginghină, G. Georgiadis, C. Mamoulakis, *Ulcerative Colitis Complicated with Fournier's Gangrene: A Case Report*, **Public Health and Toxicology**, 2023, 3(1): 3, <https://doi.org/10.18332/pht/159116>
3. C. Simeanu, R. Iosifescu, **M. Zamfir**, C. Călin, M. Mardare, A. Văcărașu, I. Bondoc, N. Iordache, D.N. Păduraru, O. Ginghină, *The Surprise Behind an Emergency Appendectomy*, **Romanian Journal of Emergency Surgery**, 2022, Vol.4, No.2, 127-131, <http://www.rojes.org/index.php/rojes/article/view/58>
4. D. Cernov, I. Bondoc, **M. Zamfir**, A. Văcărașu, M. Mardare, I. Niță, I. Luca, G. Niță, O. Ginghină, *Massive Ascites and Inconclusive Peritoneal Carcinomatosis-like Tumors as the Presenting Sign for Intraductal Prostate Carcinoma. A Case Report*, **Journal of Surgical Sciences**, 2022, Vol. 9, No. 4, 147-151, <https://journalofsurgicalsciences.com/index.php/jss/article/view/621>
5. A. Văcărașu, R. Iosifescu, **M. Zamfir**, M. Mardare, I. Bondoc, C. Călin, R. Muțescu, L. Ali, M. Vitan, O. Ginghină, *Cystic Trophoblastic Tumor in Retroperitoneal Metastatic Testicular Cancer After Chemotherapy - Case Report*, **Journal of Surgical Sciences**, 2022, 9(3): 103-107, <https://journalofsurgicalsciences.com/index.php/jss/article/view/619>
6. R. Mirica, C. Ungureanu, A. Vacarasu, D. Ciotirla, R. Iosifescu, **M. Zamfir**, A. Mirica, N. Iordache, O. Ginghină, *Spontaneous hematomas, the new surgical challenge of COVID*

patients? Hematomas in COVID patients, Medical Science and Discovery, **2022**, 9(5): <http://dx.doi.org/10.36472/msd.v9i5.718>

Participări la conferințe internaționale

1. Andrei Vacarasu, Radu Mirica, **Marius Zamfir**, Bianca Galateanu, Irina Bondoc, *Impact of SARS COV 2 pandemic on the evolution of colorectal cancer patients*, 33rd IASGO World Congress, Istanbul, **2022**

Participări la conferințe naționale

1. **M. Zamfir**, A. Văcărașu, Mara Mardare, Irina Bondoc, Alina, Th. Antoniu, Elisaveta Cibotari, Flavia Ultimeșcu, Geanina Papuc, F. Grama, O. Ginghină, *Evaluating lymph node yield in colorectal cancer: is the “rule of 12” enough?* The 14th National Congress of Coloproctology, **2026**, Mamaia

2. A. Văcărașu, **M. Zamfir**, Mara Mardare, Pușcașu-Năstase Alina-Ioana, Bondoc Irina, Papuc Geanina, T. Voiosu, B. Mateescu, O. Ginghină *The Role of Total Colectomy: Balancing Traditionism and Innovation in Surgery* CNC 2024

3. **M. Zamfir**, *Current strategies in synchronous colorectal cancer*, Conferința Zilele Medicale și Științifice ale Institutului Oncologic București, **2024**

Contribuții cărți publicate

Capitolul „Cancerul Colorectal”, Dr. Georgia-Luiza Șerbănescu, **Dr. Marius Zamfir**

Curs de Oncologie Clinica pentru Studentii Anului IV, coordonator Conf. Dr. Laurenția Nicoleta Galeș, Editura Universitară „Carol Davila“, București, 2026

Listă de abrevieri

- APC** – *Antigen-presenting cells* (celule prezentatoare de antigen)
- BRAF** –Proto-oncogen B-Raf, kinază serin/treonin
- BSA** – *Bovine Serum Albumin* (albumină serică bovină)
- CAF(s)** – *Cancer-associated fibroblasts* (fibroblaste asociate cancerului)
- CD** – Cluster de diferențiere
- cfDNA/ctDNA** – *Cell-free DNA* (ADN liber circulant)
- cfNA** – *Cell-free nucleic acids* (acizi nucleici liberi circulanți)
- CH** – Hematopoieză clonală
- CI** – *Confidence interval* (interval de încredere)
- CIMP** – *CpG Island Methylator Phenotype* (Fenotip metilator al insulelor CpG)
- CRC** – Cancer colorectal
- CRT** – Chemoradioterapie
- CSCs** – *Cancer stem cells* (celule stem tumorale)
- CT** – Centrul tumoral
- CTLA-4** – *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (Proteină asociată limfocitelor T citotoxice 4)
- CTCs** – Celule tumorale circulante
- ECM** – *Extracellular matrix* (Matrice extracelulară)
- EGFR** – *Epidermal growth factor receptor* (Factorul de creștere epidermal)
- FFPE** – *Formalin-fixed paraffin-embedded* (Țesut fixat în formol și inclus în parafină)
- FOLFOX** – 5-Fluorouracil, Leucovorin, Oxaliplatin
- H&E** – Hematoxylină & eozină
- IHC** – Imunohistochimie
- ICIs** – *Immune checkpoint inhibitors* (Inhibitori ai punctelor de control imun)
- IL** – Interleukină
- IM** – *Invasive margin* (margine invazivă)
- KRAS** – *Kirsten rat sarcoma viral oncogene* (Oncogenul viral sarcom Rat Kirsten)
- LNR** – *Lymph node ratio* (Raportul ganglionilor limfatici)
- MACS** – *Magnetic Activated Cell Sorting* (Sortare celulară activată magnetic)
- MAP2K1** – Mitogen-activated protein kinase kinase 1

MINEN – *Mixed neuroendocrine neoplasm* (Neoplasm mixt neuroendocrin)

MMR – *Mismatch repair* (Reparare a erorilor de împerechere)

MRD – *Minimal residual disease* (Boala minimă reziduală)

MSI – *Microsatellite instability* (Instabilitate microsatelitară)

MSI-H – *Microsatellite instability-high* (Instabilitate microsatelitară înaltă)

NGS – *Next-generation sequencing* (Secvențiere de nouă generație)

NK cells – Celule *Natural killer*

NRAS – *Neuroblastoma RAS viral oncogene* (Oncogenul viral sarcom neuroblastom)

PBS – *Phosphate-buffered saline* (Tampon fosfat salin)

PCR – *Polymerase chain reaction* (Reacție de polimerizare în lanț)

PD-1 – *Programmed cell death protein 1* (Proteină 1 de moarte celulară programată)

PD-L1/2 – *Programmed death-ligand 1/2* (Ligandul 1/2 al proteinei pentru moarte celulară programată)

PI3K – Fosfatidilinozitol-3-kinază

PIK3CA – Subunitatea catalitică alfa a fosfatidilinozitol-3-kinazei

ROS1 – Proto-oncogenă ROS1

SSC – *Side scatter* (lumina dispersată)

SNVs – *Single-nucleotide variants* (Variante mononucleotidice)

STAT – *Signal transducer and activator of transcription* (Transductor de semnal și activator al transcripției)

TAMs – *Tumor-associated macrophages* (Macrofage asociate tumorilor)

TANs – *Tumor-associated neutrophils* (Neutrofile asociate tumorilor)

TGF-β – *Transforming growth factor beta* (Factor de creștere transformant beta)

TILs – *Tumor-infiltrating lymphocytes* (Limfocite infiltrante tumorale)

TME – *Tumor microenvironment* (Micromediu tumoral)

TNM – Sistem internațional de stadializare: *Tumor* (tumoră), *Node* (nodul limfatic), *Metastasis* (metastază)

TP53 – gena care codifică pentru proteina p53 (Gardianul genomului)

VEGF – *Vascular endothelial growth factor* (Factorul de creștere endotelial vascular)

Introducere

Cancerul colorectal reprezintă, în prezent, una dintre principalele cauze de morbiditate și mortalitate la nivel global, situându-se constant în topul neoplaziilor ca incidență și mortalitate. În ultimele decenii, evoluția rapidă a cunoștințelor în domeniul biologiei tumorale, al tehnicilor de diagnostic și al strategiilor terapeutice a schimbat profund modul în care această patologie este înțeleasă și abordată. Cu toate acestea, în ciuda progreselor remarcabile, supraviețuirea pacienților rămâne inegală, fiind influențată de o multitudine de factori biologici, clinici și terapeutici insuficient integrați în modelele actuale de evaluare prognostică.(1)

Motivația alegerii temei acestei lucrări derivă din necesitatea unei înțelegeri mai nuanțate a factorilor care influențează supraviețuirea în cancerul colorectal, dincolo de parametrii clasici de stadializare. În practica clinică curentă, există frecvent discrepanțe între stadiul bolii și evoluția reală a pacienților, sugerând existența unor mecanisme biologice subtile, insuficient explorate. Această observație a condus la interesul pentru dezvoltarea și integrarea unor metode moderne de evaluare – precum analiza randamentului ganglionar, biopsia lichidă și caracterizarea micromediului tumoral – capabile să ofere o imagine mai fidelă a comportamentului tumoral.(2)

Importanța și actualitatea temei sunt susținute de tranziția medicinei oncologice către un model de medicină personalizată, în care deciziile terapeutice sunt ghidate nu doar de caracteristicile anatomopatologice, ci și de profilul molecular și imunologic al tumorii. Noutatea lucrării constă în abordarea integrativă a unor parametri aparent diferiți – chirurgicali, moleculari și imunologici – și evaluarea impactului lor cumulativ asupra supraviețuirii. Această perspectivă multidimensională reflectă tendințele actuale ale cercetării internaționale, unde accentul se deplasează de la evaluarea statică a bolii către o înțelegere dinamică a interacțiunii tumoră–gazdă.(3-5)

Tema se înscrie în mod direct în preocupările comunității științifice internaționale, unde numeroase studii investighează rolul biopsiei lichide în monitorizarea bolii, semnificația parametrilor limfoganglionari în stadializare și importanța micromediului tumoral în determinarea răspunsului terapeutic. La nivel național și instituțional, această direcție de cercetare este susținută de activitatea colectivului în cadrul căruia s-au dezvoltat protocoale moderne de ana-

liză moleculară și imunologică, precum și studii clinice axate pe optimizarea managementului pacienților cu cancer colorectal.

Ipoteza de cercetare a acestei lucrări pornește de la premisa că integrarea unor biomarkeri multipli – incluzând parametri ai randamentului ganglionar, date obținute prin biopsie lichidă și caracteristici ale micromediului tumoral – poate conduce la o evaluare prognostică superioară modelelor convenționale, permițând o stratificare mai precisă a pacienților și o adaptare mai adecvată a tratamentului.(5-9)

Scopul prezentei cercetări este evaluarea impactului unor metode moderne de caracterizare tumorală asupra aprecierii prognosticului și supraviețuirii pacienților cu cancer colorectal, în vederea optimizării stratificării terapeutice și a individualizării managementului oncologic.

Obiective generale:

- Dezvoltarea unor instrumente prin care se obiectivează și confirmă intervenția chirurgicală radicală, cu identificarea unor elemente obiective ce pot aprecia prognosticul și modula tratamentul.
- Identificarea unor factori biologici cu potențial predictiv și prognostic care pot contribui la optimizarea strategiilor terapeutice personalizate.
- Analiza biomarkerilor circulanți identificați prin biopsie lichidă și evaluarea potențialului lor de utilizare pentru monitorizarea evoluției bolii și a răspunsului la tratament la pacienții cu cancer colorectal.
- Caracterizarea componentelor micromediului tumoral și evaluarea influenței acestora asupra progresiei tumorale și prognosticului oncologic.

Obiective specifice:

- Evaluarea influenței unor parametri clinico-patologici relevanți (precum statusul ganglionar, profilul molecular tumoral sau caracteristicile histologice) asupra prognosticului pacienților.
- Analiza corelațiilor dintre biomarkerii detectați prin biopsie lichidă și stadiul bolii, răspunsul terapeutic, recurența și supraviețuirea globală.
- Caracterizarea infiltratului imun tumoral și a expresiei moleculelor de control imun în micromediul tumoral al cancerului colorectal.

- Investigarea relației dintre parametrii imunologici tumorali și eficiența tratamentelor sistemice, inclusiv a terapiilor țintite sau imunoterapiei.
- Integrarea datelor biologice și clinice în vederea identificării unor modele predictive pentru evoluția bolii și pentru supraviețuire.

În ansamblu, aceste obiective urmăresc construirea unui model integrat de evaluare prognostică.

Metodologia cercetării a fost concepută pentru a reflecta complexitatea fenomenelor investigate. Studiul a inclus cohorte distincte de pacienți, analizate prin metode complementare: evaluare clinică și chirurgicală, analiză histopatologică, tehnici de biologie moleculară (inclusiv secvențiere de nouă generație) și metode avansate de imunofenotipare. Abordarea statistică a permis identificarea relațiilor dintre variabile și evaluarea impactului acestora asupra supraviețuirii, într-un cadru riguros și reproductibil.(9-10)

Structura lucrării reflectă această abordare integrativă. Prima parte este dedicată fundamentelor teoretice, incluzând anatomia și fiziologia colorectală, mecanismele carcinogenezei și rolul micromediului tumoral. Partea a doua prezintă contribuțiile originale, organizate în capitole dedicate obiectivelor studiului, metodologiei, rezultatelor și interpretării acestora. Rezultatele obținute evidențiază limitele unor paradigme tradiționale, precum „regula celor 12 ganglioni”, și susțin utilitatea unor indicatori alternativi, precum raportul ganglionar. De asemenea, sunt prezentate protocoale optimizate pentru biopsia lichidă și analiza micromediului tumoral, cu potențial aplicativ în practica clinică.

Caracterul interdisciplinar al cercetării este evident prin integrarea unor domenii variate – chirurgie oncologică, anatomie patologică, biologie moleculară, imunologie și statistică medicală – fiecare contribuind la construirea unei perspective unitare asupra bolii. Această interdisciplinaritate nu reprezintă doar o abordare metodologică, ci o necesitate impusă de complexitatea cancerului colorectal.

În ceea ce privește limitele cercetării, acestea sunt legate în principal de dimensiunea cohortelor analizate și de variabilitatea biologică inerentă a tumorilor. De asemenea, implementarea pe scară largă a unor metode precum biopsia lichidă sau analiza detaliată a micromediului tumoral poate fi limitată de resursele disponibile. Cu toate acestea, rezultatele obținute deschid perspective importante pentru cercetări viitoare, orientate spre validarea acestor biomarkeri în studii multicentrice și integrarea lor în algoritmi clinici standardizați.

În concluzie, prezenta teză își propune să contribuie la redefinirea modului în care supraviețuirea pacienților cu cancer colorectal este evaluată, prin propunerea unei abordări moderne, integrate și orientate către medicina de precizie.

Partea generală a tezei este formată din 3 mari capitole și oferă fundamentul teoretic necesar înțelegerii cancerului colorectal, fiind structurată într-o manieră progresivă, de la noțiuni de bază anatomice și fiziologice până la mecanismele complexe ale carcinogenezei și metodele moderne de diagnostic- biopsia lichida în cancerul colorectal.

În prima etapă, sunt prezentate detaliat **anatomia și embriologia colonului și rectului**, evidențiindu-se particularitățile structurale relevante pentru practica chirurgicală și oncologică. Sunt descrise segmentele colonului, vascularizația arterială și venoasă, drenajul limfatic și inervația, subliniindu-se importanța acestor elemente în diseminarea tumorală și în planificarea intervențiilor chirurgicale. (11-16) De asemenea, sunt analizate diferențele embriologice dintre colonul drept și cel stâng, corelate ulterior cu particularitățile moleculare și clinice ale tumorilor. În continuare, lucrarea abordează **fiziologia colonului**, insistând asupra funcțiilor sale esențiale: absorbția apei și electroliților, secreția și motilitatea. Sunt detaliate mecanismele de transport ionic, rolul microbiotei și coordonarea neuro-hormonală a tranzitului intestinal, precum și procesele implicate în defecație. (17-20) Aceste aspecte sunt relevante pentru înțelegerea simptomatologiei și a modificărilor funcționale asociate patologiei neoplazice. Un capitol amplu este dedicat **patologiei oncologice colorectale**, fiind analizate mecanismele carcinogenezei în multiple etape. Sunt descrise principalele căi moleculare implicate — secvența adenom–carcinom, calea leziunilor serate și instabilitatea microsatelitară — evidențiindu-se heterogenitatea biologică a bolii (20-24). Se discută rolul mutațiilor genetice (APC, KRAS, TP53, BRAF), al instabilității cromozomiale și al factorilor epigenetici, precum și influența factorilor de mediu și a microbiomului intestinal. În acest context, sunt prezentate subtipurile moleculare de consens (CMS), cu implicațiile lor prognostice și terapeutice.

Lucrarea continuă cu o clasificare detaliată a **tipurilor histologice de cancer colorectal**, punând accent pe adenocarcinom și variantele sale (mucinos, cu celule în inel cu pecete, medular etc.), precum și pe alte tipuri tumorale mai rare. Sunt analizate caracteristicile morfologice și impactul acestora asupra evoluției bolii și a răspunsului terapeutic (25-28).

Un alt capitol important îl constituie **tratatamentul chirurgical**, considerat standardul de aur în formele localizate de boală. Sunt descrise principiile oncologice ale rezecției, inclusiv excizia completă a mezocolonului și limfadenectomia extinsă, precum și tehnicile moderne (laparoscopice și robotice). Se discută diferențele de abord între tumorile colonice și cele rectale, cu accent pe excizia totală a mezorectului și pe importanța marginilor de rezecție(29-31).

În final, partea generală analizează **metodele de diagnostic în cancerul colorectal**, incluzând colonoscopia ca standard de referință, rectoscopia, confirmarea histopatologică și rolul evaluării moleculare. Sunt evidențiate importanța ratei de detecție a adenoamelor, standardizarea procedurilor endoscopice și integrarea tehnologiilor moderne, precum inteligența artificială. De asemenea, este subliniat rolul analizei histopatologice și al biomarkerilor moleculari (MSI, KRAS, NRAS, BRAF) în stabilirea prognosticului și în ghidarea terapiei(32-35).

În ansamblu, partea generală construiește o imagine coerentă și complexă asupra cancerului colorectal, integrând date anatomice, fiziologice, moleculare și clinice. Această bază teoretică justifică necesitatea unei abordări moderne, multidimensionale, care depășește limitele modelelor clasice de evaluare și susține direcția cercetării din partea originală a tezei.

Partea Speciala prezinta capitolele 4-9, scopul si obiectivele, metodologia generala a cercetarii, cele 3 articole stiintifice publicate, precum si concluziile si perspectivele de viitor.

Capitolul 4 este reprezentat de Scopul si obiectivele cercetarii mentionate deja in introducere.

Capitolul 5 este reprezentat de metodologia cercetării, care a fost concepută pentru a surprinde complexitatea biologică și clinică a cancerului colorectal, printr-o abordare integrativă, multidisciplinară, care combină analiza clinică, histopatologică, moleculară și imunologică. Studiul a avut un design observațional analitic, bazat pe evaluarea unor cohorte de pacienți diagnosticați cu cancer colorectal, urmăriți în vederea identificării factorilor care influențează prognosticul și supraviețuirea.

Selecția pacienților s-a realizat pe baza unor criterii de includere și excludere bine definite, vizând obținerea unui lot omogen din punct de vedere clinic și terapeutic. Datele co-

lectate au inclus parametri demografici, caracteristici clinice, detalii legate de intervenția chirurgicală și informații privind tratamentele oncologice administrate. O componentă esențială a metodologiei a fost evaluarea radicalității chirurgicale, prin analiza parametrilor limfoganglionari, cu accent pe indicatori precum numărul total de ganglioni examinați și raportul ganglionar.

Analiza histopatologică a constituit o etapă centrală, furnizând informații detaliate despre tipul tumoral, gradul de diferențiere, invazia limfovasculară și perineurală, precum și statusul marginilor de rezecție. Aceste date au fost completate de investigații de biologie moleculară, incluzând tehnici moderne precum secvențierea de nouă generație, utilizate pentru identificarea mutațiilor relevante și a profilului molecular tumoral.

Un element inovator al metodologiei a fost integrarea biopsiei lichide, prin analiza biomarkerilor circulanți, cu scopul evaluării dinamice a bolii. Această abordare a permis corelarea datelor moleculare cu evoluția clinică, răspunsul la tratament și riscul de recurență. În paralel, a fost realizată caracterizarea micromediului tumoral, prin metode de imunofenotipare, pentru evaluarea infiltratului imun și a expresiei moleculelor implicate în reglarea răspunsului imun.

Prelucrarea datelor s-a realizat prin metode statistice adecvate, care au permis identificarea corelațiilor dintre variabile și determinarea impactului acestora asupra supraviețuirii globale și fără boală. Analizele au inclus atât metode descriptive, cât și inferențiale, fiind utilizate modele predictive pentru integrarea datelor clinice și biologice într-un cadru coerent.

Capitolul 6: Completarea biopsiei tisulare cu analiza NGS cfDNA derivate din plasma ca biopsie lichida pentru modularea terapiei in timp real la pacientii cu cancer colorectal

Studiul investighează rolul biopsiei lichide în cancerul colorectal (CCR), propunând-o ca metodă complementară biopsiei tisulare pentru caracterizarea moleculară și pentru adaptarea terapiei în timp real. În contextul actual al medicinei de precizie, deciziile terapeutice sunt ghidate de profilul molecular tumoral, însă biopsia clasică prezintă limitări importante, precum caracterul invaziv, dificultatea repetării și incapacitatea de a reflecta hetero-

genitatea tumorală. Biopsia lichidă, bazată pe analiza acizilor nucleici circulanți (cfDNA), oferă o alternativă minim invazivă, capabilă să surprindă dinamic evoluția bolii și să identifice mutații relevante pentru prognostic și tratament(36,37).

Metodologia a inclus o cohortă inițială de 50 de pacienți cu suspiciune de CCR, dintre care 17 pacienți cu adenocarcinom confirmat au fost incluși în analiza finală. Pentru fiecare pacient au fost analizate atât probe tumorale (prin NGS pe ADN genomic din țesut), cât și probe de sânge periferic (prin NGS pe cfDNA). Au fost investigate mutații în gene implicate în carcinogeneza colorectală, precum TP53, KRAS, PIK3CA, BRAF și altele. Analiza bioinformatică și statistică a permis compararea profilului mutațional între țesut și plasmă și evaluarea corelațiilor dintre parametrii moleculari și caracteristicile clinic(38).

Rezultatele au evidențiat că biopsia lichidă poate detecta un număr semnificativ de mutații tumorale, cu o rată de detecție de 38,7%. Cele mai frecvente mutații identificate atât în țesut, cât și în plasmă au fost TP53 și KRAS, confirmând concordanța cu datele din literatură. De asemenea, s-a observat o corelație semnificativă între frecvența alelică a mutațiilor din țesut și cea din plasmă, deși valorile plasmatice au fost mai reduse. Un aspect important este faptul că anumite mutații au fost detectate exclusiv în plasmă, sugerând existența heterogenității tumorale sau a unor leziuni secundare nedetectate prin biopsia tisulară.

Un rezultat esențial al studiului este asocierea dintre rata de detecție a mutațiilor în plasmă și gradul de invazie tumorală (T). Nu au fost identificate mutații în cazurile cu tumori limitate (T2), în timp ce ratele de detecție au crescut semnificativ în stadiile avansate (T4), indicând faptul că încărcătura tumorală circulantă este proporțională cu extensia bolii. Acest aspect confirmă valoarea biopsiei lichide ca instrument de monitorizare și evaluare a progresiei tumorale.

Din punct de vedere clinic, identificarea mutațiilor relevante are implicații directe asupra terapiei. De exemplu, mutațiile KRAS și BRAF influențează răspunsul la terapiile anti-EGFR, iar mutațiile PIK3CA sau FBXW7 pot avea valoare prognostică și pot deschide perspective pentru terapii țintite. De asemenea, detectarea unor mutații rare (IDH1, MAP2K1) sugerează potențiale direcții viitoare de cercetare și tratament. Totuși, studiul subliniază și lim-

itările biopsiei lichide, inclusiv posibilitatea detectării unor mutații provenite din hematopoieza clonală, care pot introduce erori de interpretare.(39)

În concluzie, biopsia lichidă reprezintă un instrument promițător în managementul cancerului colorectal, oferind informații complementare biopsiei tisulare și facilitând o abordare personalizată a tratamentului. Capacitatea sa de a reflecta heterogenitatea tumorală și de a monitoriza în timp real evoluția bolii o transformă într-o metodă valoroasă pentru prognostic, selecția terapiei și detectarea precoce a rezistenței terapeutice. Integrarea acestei tehnologii în practica clinică poate contribui semnificativ la optimizarea rezultatelor oncologice și la îmbunătățirea supraviețuirii pacienților.

Capitolul 7: Randamentul ganglionilor limfatici în cancerul colorectal: dincolo de „regula celor 12”

Studiul analizează rolul randamentului ganglionar în stadializarea și prognosticul cancerului colorectal, pornind de la premisa că statusul ganglionar (N) reprezintă unul dintre cei mai importanți factori determinanți ai supraviețuirii. Deși pragul de minimum 12 ganglioni limfatici examinați este consacrat ca standard de calitate, acesta este influențat de numeroși factori clinici și biologici, ceea ce limitează valoarea sa universală. În acest context, sunt investigate atât utilitatea acestui prag, cât și rolul unor indicatori alternativi, precum raportul ganglionar (LNR), în îmbunătățirea stratificării prognostice(40).

Metodologia constă într-un studiu observațional retrospectiv realizat pe un lot de 86 de pacienți operați pentru cancer colorectal. Au fost analizate date clinice, chirurgicale și histopatologice, incluzând numărul total de ganglioni examinați, numărul de ganglioni pozitivi, tipul intervenției și stadializarea TNM. Recoltarea ganglionară a fost clasificată ca adecvată (≥ 12 ganglioni) sau extinsă (≥ 18 ganglioni), iar pentru cazurile cu afectare ganglionară s-a calculat LNR. Analiza statistică a inclus metode descriptive și inferențiale, precum și modele de regresie logistică pentru identificarea factorilor asociați cu atingerea pragului de calitate(41).

Rezultatele arată că numărul median de ganglioni examinați a fost 12, cu o rată de conformitate de 52,3% pentru pragul standard și de 31,4% pentru recoltarea extinsă. Afectarea ganglionară a fost prezentă la 25,6% dintre pacienți. S-au evidențiat diferențe semnificative în funcție de localizarea tumorală: colonul drept a avut cel mai mare randament ganglionar și cea

mai mare rată de conformitate, în timp ce rectul a prezentat valori semnificativ mai reduse. Aceste diferențe reflectă particularități anatomice și impactul tratamentului neoadjuvant, mai ales în cancerul rectal. În schimb, tipul abordului chirurgical nu a influențat semnificativ randamentul ganglionar, sugerând că acesta depinde mai degrabă de calitatea rezecției și a examinării anatomopatologice.

Analiza LNR a evidențiat o distribuție heterogenă, cu un procent de 14% dintre pacienți în categoria de risc înalt ($LNR \geq 0,20$). Acest indicator s-a dovedit util mai ales în situațiile cu un număr redus de ganglioni examinați, unde poate completa informația oferită de stadializarea clasică. Totuși, interpretarea sa trebuie realizată în contextul randamentului total, deoarece valorile pot fi distorsionate în cazul unui număr mic de ganglioni analizați.

Discuțiile confirmă faptul că randamentul ganglionar reprezintă un indicator compozit, care reflectă atât calitatea actului chirurgical, cât și rigoarea evaluării histopatologice. Datele din literatură susțin o abordare mai flexibilă a pragului de 12 ganglioni, cu valori țintă adaptate în funcție de localizare, stadiu și context terapeutic. În plus, introducerea LNR poate îmbunătăți semnificativ stratificarea prognostică, în special în stadiile avansate sau în situațiile cu risc de substadializare(42-45).

În concluzie, studiul susține menținerea pragului de 12 ganglioni ca standard minim de calitate, dar evidențiază limitele acestuia și necesitatea unei interpretări nuanțate. Integrarea unor parametri suplimentari, precum LNR, permite o evaluare mai precisă a riscului oncologic și poate contribui la optimizarea deciziilor terapeutice în cancerul colorectal.

Capitolul 8: OPTIMIZAREA UNUI PROTOCOL DE CITOMETRIE ÎN FLUX PENTRU DETECȚIA RECEPTORILOR DE PUNCTE DE CONTROL IMUN PD-1/CTLA-4 ÎN MICROMEDIUL TUMORAL AL CANCERULUI COLORECTAL

Studiul abordează caracterizarea micromediului tumoral (tumor microenvironment – TME) în cancerul colorectal prin optimizarea unui protocol de citometrie în flux pentru detecția receptorilor de puncte de control imun PD-1 și CTLA-4. În contextul actual al medicinei personalizate, în care heterogenitatea tumorală influențează decisiv răspunsul terapeutic, analiza detaliată a interacțiunilor dintre celulele tumorale și sistemul imun devine esențială. TME-ul este alcătuit dintr-o rețea complexă de celule, incluzând limfocite infiltrante tumorale

(TILs), macrofage și neutrofile asociate tumorii, care contribuie atât la controlul tumoral, cât și la evadarea imună(46).

Lucrarea pornește de la rolul esențial al moleculelor PD-1 și CTLA-4 în reglarea răspunsului imun. Acestea sunt exprimate pe limfocitele T și acționează ca mecanisme inhibitorii, fiind exploatare de celulele tumorale pentru a evita distrugerea imună. În acest context, inhibitorii punctelor de control imun au revoluționat tratamentul oncologic, însă eficiența lor depinde de profilul imunologic al tumorii, ceea ce justifică necesitatea unor metode precise de caracterizare a TME.

Metodologia a inclus recoltarea de țesut tumoral proaspăt de la 7 pacienți cu cancer colorectal supuși intervenției chirurgicale. Probele au fost procesate prin disociere enzimatică și mecanică pentru obținerea unei suspensii de celule unice, urmată de marcarea acestora cu un panel de anticorpi specifici și analiza prin citometrie în flux. Strategia de analiză a permis identificarea populațiilor celulare relevante (celule tumorale EpCam+, limfocite T CD3+, sub-seturi CD4+ și CD8+) și evaluarea expresiei PD-1 și CTLA-4 la nivelul acestora(47).

Rezultatele au evidențiat prezența populațiilor celulare caracteristice TME, cu un procent mediu de aproximativ 12,2% celule tumorale EpCam+ și 6,8% limfocite T infiltrante. Dintre acestea, o proporție semnificativă a exprimat receptori de checkpoint: aproximativ 3,4% pentru PD-1 și 2% pentru CTLA-4 la nivelul celulelor T. Un aspect important este identificarea expresiei acestor receptori nu doar pe celulele imune, ci și pe celulele tumorale, sugerând un rol intrinsec al acestor molecule în biologia tumorală. Aceste observații susțin ipoteza conform căreia tumorile pot utiliza mecanisme multiple de evadare imună, nu doar prin inhibarea limfocitelor, ci și prin exprimarea directă a moleculelor de checkpoint.

Analiza confirmă utilitatea citometriei în flux ca metodă robustă și reproductibilă pentru caracterizarea TME, oferind informații cantitative și calitative despre compoziția celulară și profilul molecular al tumorii. În plus, metoda permite identificarea simultană a mai multor subpopulații celulare, ceea ce reprezintă un avantaj major față de tehnicile tradiționale(48-50).

În concluzie, studiul demonstrează că optimizarea unui protocol de citometrie în flux permite o caracterizare detaliată a micromediului tumoral în cancerul colorectal, evidențiind

expresia PD-1 și CTLA-4 pe diferite populații celulare. Aceste date au implicații directe în selecția pacienților pentru imunoterapie și în dezvoltarea strategiilor terapeutice personalizate. Integrarea acestei abordări în practica clinică poate contribui la o mai bună înțelegere a mecanismelor de evadare imună și la optimizarea tratamentului oncologic.

9.1. Concluzii

Prezenta teză demonstrează că integrarea unor metode moderne de caracterizare tumorală, analiza randamentului ganglionar, profilarea moleculară prin biopsie lichidă și caracterizarea micromediului tumoral, permite o evaluare mai precisă a prognosticului și o optimizare a managementului pacienților cu cancer colorectal.

Rezultatele obținute evidențiază faptul că randamentul ganglionar rămâne un element esențial în stadializarea cancerului colorectal, însă pragul clasic de 12 ganglioni limfatici trebuie interpretat în context clinic. Localizarea tumorală, tratamentul neoadjuvant și particularitățile anatomopatologice influențează semnificativ numărul ganglionilor examinați. Integrarea raportului ganglionar (LNR) oferă informații prognostice suplimentare, în special în situațiile cu recoltare suboptimală, contribuind la o stratificare mai corectă a riscului și la evitarea substadializării.

Biopsia lichidă s-a dovedit a fi un instrument complementar valoros pentru caracterizarea moleculară a cancerului colorectal. Detectarea mutațiilor în plasmă, în concordanță cu profilul tumoral, confirmă utilitatea acestei metode în reflectarea heterogenității tumorale. Corelația dintre rata de detecție și dimensiunea sau invazivitatea tumorii susține utilizarea biopsiei lichide pentru monitorizarea bolii și evaluarea încărcăturii tumorale, cu potențial în detectarea precoce a progresiei sau a rezistenței la tratament.

Caracterizarea micromediului tumoral prin citometrie în flux a evidențiat complexitatea interacțiunilor imunologice și relevanța expresiei moleculelor de control imun, precum PD-1 și CTLA-4. Rezultatele obținute demonstrează fezabilitatea utilizării acestei metode pentru analiza rapidă și cantitativă a populațiilor celulare tumorale și imune, oferind o perspectivă funcțională asupra statusului imun tumoral.

Metodele moderne investigate în prezenta teză contribuie la redefinirea modului de evaluare a prognosticului și de management al pacientului cu cancer colorectal, prin depășirea limitărilor abordărilor convenționale. Analiza extinsă a ganglionilor limfatici și utilizarea raportului ganglionar permit o stadializare mai precisă și reduc riscul de subevaluare a bolii,

influențând direct indicația de tratament adjuvant. Biopsia lichidă introduce o dimensiune dinamică în caracterizarea tumorală, permițând monitorizarea în timp real a profilului molecular și identificarea modificărilor asociate progresiei sau rezistenței la tratament. În paralel, evaluarea micromediului tumoral prin citometrie în flux oferă informații rapide și cantitative despre statusul imun tumoral și expresia moleculelor de control imun, facilitând selecția pacienților pentru imunoterapie. Prin integrarea acestor metode, managementul cancerului colorectal evoluează de la o abordare statică la una dinamică și personalizată.

9.2. Perspective

Extinderea studiului privind randamentul ganglionar pe cohorte mai mari și multicentrice, cu integrarea parametrilor biologici și imunologici, ar putea permite definirea unor praguri adaptate de evaluare și ar îmbunătăți stratificarea prognostică a pacienților cu cancer colorectal.

În domeniul biopsiei lichide, direcțiile viitoare includ dezvoltarea panelurilor moleculare extinse, analiza dinamică longitudinală a probelor și integrarea acestor date în algoritmi de monitorizare a bolii minime reziduale și a răspunsului terapeutic.

Pentru componenta privind micromediul tumoral, o direcție majoră de cercetare este reprezentată de compararea expresiei moleculelor de control imun determinate prin citometrie în flux cu expresia acestora evaluată prin imunohistochimie, în vederea validării unui protocol rapid, reproductibil și eficient. Având în vedere timpul îndelungat necesar evaluării imunohistochimice, comparativ cu citometria în flux care permite obținerea rezultatelor în 24–48 de ore, această abordare ar putea avea un impact clinic direct în selecția rapidă a pacienților eligibili pentru imunoterapie.

Pe termen lung, integrarea parametrilor histopatologici, moleculari și imunologici într-un model predictiv unificat ar putea contribui la dezvoltarea unor algoritmi de medicină personalizată în cancerul colorectal, cu impact asupra supraviețuirii și calității vieții pacienților.

Prezenta teză susține tranziția de la o evaluare statică a cancerului colorectal la o abordare integrată și dinamică, bazată pe biologia tumorală. Integrarea analizei ganglionare, a biopsiei lichide și a micromediului tumoral permite o caracterizare mai precisă a bolii și o

selecție terapeutică mai adecvată. Aceste metode au potențialul de a îmbunătăți semnificativ prognosticul și managementul pacienților.

Bibliografie:

[1] Pieniãdz P, Pięt M, Paduch R. Characteristics of the Colorectal Cancer Microenvironment—Role in Cancer Progression and Therapeutic Possibilities. *Appl Sci* 2024;14:2930. <https://doi.org/10.3390/app14072930>.

[2] Li J, Chen D, Shen M. Tumor Microenvironment Shapes Colorectal Cancer Progression, Metastasis, and Treatment Responses. *Front Med* 2022;9:869010. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.869010>.

[3] Shen R, Li P, Zhang B, Feng L, Cheng S. Decoding the colorectal cancer ecosystem emphasizes the cooperative role of cancer cells, TAMs and CAFs in tumor progression. *J Transl Med* 2022;20:462. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03661-8>.

[4] Braumüller H, Mauerer B, Andris J, Berlin C, Wieder T, Kesselring R. The Cytokine Network in Colorectal Cancer: Implications for New Treatment Strategies. *Cells* 2022;12:138. <https://doi.org/10.3390/cells12010138>.

[5] Hsu MS, Leung SY. Implementing Immunoscore in colorectal cancer: lessons from cohort studies, limitations and barriers to adoption. *J Pathol Clin Res* 2026;12:e70071. <https://doi.org/10.1002/2056-4538.70071>.

[6] Chen Y, Zheng X, Wu C. The Role of the Tumor Microenvironment and Treatment Strategies in Colorectal Cancer. *Front Immunol* 2021;12:792691. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.792691>.

[7] Zheng Z, Wieder T, Mauerer B, Schäfer L, Kesselring R, Braumüller H. T Cells in Colorectal Cancer: Unravelling the Function of Different T Cell Subsets in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci* 2023;24:11673. <https://doi.org/10.3390/ijms241411673>.

[8] Nicolini A, Ferrari P. Involvement of tumor immune microenvironment metabolic reprogramming in colorectal cancer progression, immune escape, and response to immunotherapy. *Front Immunol* 2024;15:1353787. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1353787>.

- [9] Tufail M, Jiang C-H, Li N. Immune evasion in cancer: mechanisms and cutting-edge therapeutic approaches. *Signal Transduct Target Ther* 2025;10:227. <https://doi.org/10.1038/s41392-025-02280-1>.
- [10] Sun L, Su Y, Jiao A, Wang X, Zhang B. T cells in health and disease. *Signal Transduct Target Ther* 2023;8:235. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01471-y>.
- [11] Nair R, Somasundaram V, Kuriakose A, Krishn SR, Raben D, Salazar R, Nair P. Deciphering T-cell exhaustion in the tumor microenvironment: paving the way for innovative solid tumor therapies. *Front Immunol* 2025;16:1548234. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1548234>.
- [12] Tiwari A, Oravec T, Dillon LA, Italiano A, Audoly L, Fridman WH, Clifton GT. Towards a consensus definition of immune exclusion in cancer. *Front Immunol* 2023;14:1084887. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1084887>.
- [13] Hanitrarimalala V, Prgomet Z, Hedhammar M, Tassidis H, Wingren AG. In vitro 3D modeling of colorectal cancer: the pivotal role of the extracellular matrix, stroma and immune modulation. *Front Genet* 2025;16:1545017. <https://doi.org/10.3389/fgene.2025.1545017>.
- [14] Yu H, Yang R, Li M, Li D, Xu Y. The role of Treg cells in colorectal cancer and the immunotherapy targeting Treg cells. *Front Immunol* 2025;16:1574327. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1574327>.
- [15] Xia J, Xie Z, Niu G, Lu Z, Wang Z, Xing Y, Ren J, Hu Z, Hong R, Cao Z, Han S, Chu Y, Liu R, Ke C. Single-cell landscape and clinical outcomes of infiltrating B cells in colorectal cancer. *Immunology* 2023;168:135–51. <https://doi.org/10.1111/imm.13568>.
- [16] Lv J, Zhang X, Zhou M, Yan J, Chao G, Zhang S. Tertiary lymphoid structures in colorectal cancer. *Ann Med* 2024;56:2400314. <https://doi.org/10.1080/07853890.2024.2400314>.
- [17] 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* 2022;12:808964. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.808964>.
- [18] Xie Z, Xia J, Jiao M, Zhao P, Wang Z, Lin S, Xing Y, Li Y, Lu Z, Zhong Z, Miao C, Zhou P, Qian J, Wang L, Zhang D, Gu J, Chu Y, Liu R. Exosomal lncRNA HOTAIR induces

PDL1+ B cells to impede anti-tumor immunity in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2023;644:112–21. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.01.005>.

[19] Guo L, Wang C, Qiu X, Pu X, Chang P. Colorectal Cancer Immune Infiltrates: Significance in Patient Prognosis and Immunotherapeutic Efficacy. *Front Immunol* 2020;11:1052. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01052>.

[20] Corrêa LH, Corrêa R, Farinasso CM, De Sant’Ana Dourado LP, Magalhães KG. Adipocytes and Macrophages Interplay in the Orchestration of Tumor Microenvironment: New Implications in Cancer Progression. *Front Immunol* 2017;8:1129. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01129>.

[21] Zheng X, Ma Y, Bai Y, Huang T, Lv X, Deng J, Wang Z, Lian W, Tong Y, Zhang X, Yue M, Zhang Y, Li L, Peng M. Identification and validation of immunotherapy for four novel clusters of colorectal cancer based on the tumor microenvironment. *Front Immunol* 2022;13:984480. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.984480>.

[22] Gallo G, Vescio G, De Paola G, Sammarco G. Therapeutic Targets and Tumor Microenvironment in Colorectal Cancer. *J Clin Med* 2021;10:2295. <https://doi.org/10.3390/jcm10112295>.

[23] Peng C, Chen J, Wu R, Jiang H, Li J. Unraveling the complex roles of macrophages in obese adipose tissue: an overview. *Front Med* 2024;18:205–36. <https://doi.org/10.1007/s11684-023-1033-7>.

[24] Fujisaka S, Usui I, Ikutani M, Aminuddin A, Takikawa A, Tsuneyama K, Mahmood A, Goda N, Nagai Y, Takatsu K, Tobe K. Adipose tissue hypoxia induces inflammatory M1 polarity of macrophages in an HIF-1 α -dependent and HIF-1 α -independent manner in obese mice. *Diabetologia* 2013;56:1403–12. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2885-1>.

[25] Raftopoulou S, Valadez-Cosmes P, Mihalic ZN, Schicho R, Kargl J. Tumor-Mediated Neutrophil Polarization and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci* 2022;23:3218. <https://doi.org/10.3390/ijms23063218>.

[26] Que H, Fu Q, Lan T, Tian X, Wei X. Tumor-associated neutrophils and neutrophil-targeted cancer therapies. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer* 2022;1877:188762. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188762>.

[27] Zheng W, Wu J, Peng Y, Sun J, Cheng P, Huang Q. Tumor-Associated Neutrophils in Colorectal Cancer Development, Progression and Immunotherapy. *Cancers* 2022;14:4755. <https://doi.org/10.3390/cancers14194755>.

[28] Glaviano A, Lau HS-H, Carter LM, Lee EHC, Lam HY, Okina E, Tan DJJ, Tan W, Ang HL, Carbone D, Yee MY-H, Shanmugam MK, Huang XZ, Sethi G, Tan TZ, Lim LHK, Huang RY-J, Ungefroren H, Giovannetti E, Tang DG, Bruno TC, Luo P, Andersen MH, Qian B-Z, Ishihara J, Radisky DC, Elias S, Yadav S, Kim M, Robert C, Diana P, Schalper KA, Shi T, Merghoub T, Krebs S, Kusumbe AP, Davids MS, Brown JR, Kumar AP. Harnessing the tumor microenvironment: targeted cancer therapies through modulation of epithelial-mesenchymal transition. *J Hematol Oncol* 2025;18:6. <https://doi.org/10.1186/s13045-024-01634-6>.

[29] Li H, Zeng J, You Q, Zhang M, Shi Y, Yang X, Gu W, Liu Y, Hu N, Wang Y, Chen X, Mu J. X-ray-activated nanoscintillators integrated with tumor-associated neutrophils polarization for improved radiotherapy in metastatic colorectal cancer. *Biomaterials* 2025;316:123031. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2024.123031>.

[30] Sun S, Zhang Y, Li Y, Wei L. Crosstalk between colorectal cancer cells and cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment mediated by exosomal noncoding RNAs. *Front Immunol* 2023;14:1161628. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1161628>.

[31] Liu J, Cho YB, Hong HK, Wu S, Ebert PJ, Bray SM, Wong SS, Ting JC, Calley JN, Whittington CF, Bhagwat SV, Reinhard C, Wild R, Nam D-H, Aggarwal A, Lee WY, Peng S-B. Molecular dissection of CRC primary tumors and their matched liver metastases reveals critical role of immune microenvironment, EMT and angiogenesis in cancer metastasis. *Sci Rep* 2020;10:10725. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67842-5>.

[32] Yamamoto Y, Kasashima H, Fukui Y, Tsujio G, Yashiro M, Maeda K. The heterogeneity of cancer-associated fibroblast subpopulations: Their origins, biomarkers, and roles in the tumor microenvironment. *Cancer Sci* 2023;114:16–24. <https://doi.org/10.1111/cas.15609>.

[33] Koncina E, Nurmik M, Pozdeev VI, Gilson C, Tsenkova M, Begaj R, Stang S, Gaigneaux A, Weindorfer C, Rodriguez F, Schmoetten M, Klein E, Karta J, Atanasova VS, Grzyb K, Ullmann P, Halder R, Hengstschläger M, Graas J, Augendre V, Karapetyan YE, Kerger L, Zuegel N, Skupin A, Haan S, Meiser J, Dolznig H, Letellier E. IL1R1+ cancer-

associated fibroblasts drive tumor development and immunosuppression in colorectal cancer. *Nat Commun* 2023;14:4251. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39953-w>.

[34] Lee C-J, Jang T-Y, Jeon S-E, Yun H-J, Cho Y-H, Lim D-Y, Nam J-S. The dysadherin/MMP9 axis modifies the extracellular matrix to accelerate colorectal cancer progression. *Nat Commun* 2024;15:10422. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-54920-9>.

[35] Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De La Rosa C, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, Martinez-Avila N, Martinez-Fierro ML. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci* 2020;21:9739. <https://doi.org/10.3390/ijms21249739>.

[36] Zheng H, Liu H, Li H, Dou W, Wang J, Zhang J, Liu T, Wu Y, Liu Y, Wang X. Characterization of stem cell landscape and identification of stemness-relevant prognostic gene signature to aid immunotherapy in colorectal cancer. *Stem Cell Res Ther* 2022;13:244. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02913-0>.

[37] Cho Y-H, Ro EJ, Yoon J-S, Mizutani T, Kang D-W, Park J-C, Il Kim T, Clevers H, Choi K-Y. 5-FU promotes stemness of colorectal cancer via p53-mediated WNT/ β -catenin pathway activation. *Nat Commun* 2020;11:5321. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19173-2>.

[38] Zhao Q, Zong H, Zhu P, Su C, Tang W, Chen Z, Jin S. Crosstalk between colorectal CSCs and immune cells in tumorigenesis, and strategies for targeting colorectal CSCs. *Exp Hematol Oncol* 2024;13:6. <https://doi.org/10.1186/s40164-024-00474-x>.

[39] Brown TJ, James V. The Role of Extracellular Vesicles in the Development of a Cancer Stem Cell Microenvironment Niche and Potential Therapeutic Targets: A Systematic Review. *Cancers* 2021;13:2435. <https://doi.org/10.3390/cancers13102435>.

[40] Katsuno Y, Meyer DS, Zhang Z, Shokat KM, Akhurst RJ, Miyazono K, Derynck R. Chronic TGF- β exposure drives stabilized EMT, tumor stemness, and cancer drug resistance with vulnerability to bitopic mTOR inhibition. *Sci Signal* 2019;12:eaau8544. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aau8544>.

[41] Su S, Chen J, Yao H, Liu J, Yu S, Lao L, Wang M, Luo M, Xing Y, Chen F, Huang D, Zhao J, Yang L, Liao D, Su F, Li M, Liu Q, Song E. CD10+GPR77+ Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness. *Cell* 2018;172:841-856.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.009>.

- [42] Shang S, Yang C, Chen F, Xiang R, Zhang H, Dai S, Liu J, Lv X, Zhang C, Liu X, Zhang Q, Lu S, Song J, Yu J, Zhou J, Zhang X, Cui B, Li P, Zhu S, Zhang H, Hua F. ID1 expressing macrophages support cancer cell stemness and limit CD8⁺ T cell infiltration in colorectal cancer. *Nat Commun* 2023;14:7661. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43548-w>.
- [43] Yang L, Shi P, Zhao G, Xu J, Peng W, Zhang J, Zhang G, Wang X, Dong Z, Chen F, Cui H. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther* 2020;5:8. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0110-5>.
- [44] Saw PE, Liu Q, Wong P-P, Song E. Cancer stem cell mimicry for immune evasion and therapeutic resistance. *Cell Stem Cell* 2024;31:1101–12. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2024.06.003>.
- [45] Immunotherapy in colorectal cancer. *Adv. Cancer Res.*, vol. 151, Elsevier; 2021, p. 137–96. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2021.03.002>.
- [46] Cai L, Li Y, Tan J, Xu L, Li Y. Targeting LAG-3, TIM-3, and TIGIT for cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol* 2023;16:101. <https://doi.org/10.1186/s13045-023-01499-1>.
- [47] Li Y, Ju M, Miao Y, Zhao L, Xing L, Wei M. Advancement of ANTI-LAG -3 in cancer therapy. *FASEB J* 2023;37:e23236. <https://doi.org/10.1096/fj.202301018R>.
- [48] Yang R, Sun L, Li C-F, Wang Y-H, Yao J, Li H, Yan M, Chang W-C, Hsu J-M, Cha J-H, Hsu JL, Chou C-W, Sun X, Deng Y, Chou C-K, Yu D, Hung M-C. Galectin-9 interacts with PD-1 and TIM-3 to regulate T cell death and is a target for cancer immunotherapy. *Nat Commun* 2021;12:832. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21099-2>.
- [49] Sakuma M, Katagata M, Okayama H, Nakajima S, Saito K, Sato T, Fukai S, Tsumuraya H, Onozawa H, Sakamoto W, Saito M, Saze Z, Momma T, Mimura K, Kono K. TIM-3 Expression on Dendritic Cells in Colorectal Cancer. *Cancers* 2024;16:1888. <https://doi.org/10.3390/cancers16101888>.
- [50] Murakami D, Matsuda K, Iwamoto H, Mitani Y, Mizumoto Y, Nakamura Y, Matsuzaki I, Iwamoto R, Takahashi Y, Kojima F, Murata S, Yamaue H. Prognostic value of CD155/TIGIT expression in patients with colorectal cancer. *PLOS ONE* 2022;17:e0265908. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265908>.