
REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Rolul biomarkerilor în prognosticul oncologic al cancerului de vezică urinară

Doctorand: **Daniel-Vasile DULF**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Tudor-Eliade CIULEANU**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	3
1. Cancerul de vezică urinară: o problemă de sănătate publică și o provocare clinică	5
1.1 Epidemiologie	5
1.2 Etiologie și factori de risc în cancerul vezicii urinare	6
1.3 Carcinogeneza urotelială: un proces multistadial	7
1.4 Căi moleculare distincte în dezvoltarea tumorală	8
2. Abordarea clinică: diagnostic, stadializare și principii terapeutice	15
2.1 Tabloul clinic și evaluarea inițială	15
2.2 Paradigma de diagnostic și stadializare	16
2.2.1 Diagnosticul endoscopic și histopatologic	16
2.2.2 Stadializarea imagistică locală și la distanță	17
2.3. Decodarea microambientului tumoral: rolul regulatorilor moleculari	17
2.4. Frontierele terapeutice în boala metastatică	18
2.4.1. De la chimioterapie la revoluția imuno-oncologică	18
2.4.2. Nevoia de biomarkeri predictivi și rolul microambientului tumoral	19
3. Factori prognostici în cancerul vezical	21

3.1. Evaluarea preoperatorie a biologiei agresive: biomarkeri sistemici și compoziționali	24
3.1.2. Axa Inflamație-Imunitate: De la NLR/PLR la mecanisme moleculare	24
3.1.3. Statusul nutrițional și sarcopenia: indicatori ai catabolismului sistemic și ai cașexiei neoplazice	25
3.2. Factori intraoperatorii și patologici: o fereastră către comportamentul tumoral și calitatea terapeutică	27
3.2.1. Calitatea actului chirurgical: dezbateră încă nerezolvată a limfadenectomiei extinse	27
3.2.2. Caracteristici histopatologice cu valoare prognostică independentă: LVI, marginile chirurgicale și histologiile variante	28
3.2.3 Marginile chirurgicale pozitive	29
3.3. Răspunsul la terapia neoadjuvantă: cel mai puternic biomarker in vivo	30
3.3.1. Valoarea prognostică fundamentală a răspunsului patologic complet	30
3.3.2. Predictorii moleculari ai chimiosensibilității: rolul mutațiilor în genele DDR	31
3.3.3 Era Biomarkerilor moleculari: către o stratificare multi-omică a riscului	32
3.3.4. Biopsia lichidă și ADN-ul tumoral circulant (ctDNA): detectarea bolii minime reziduale și ghidarea terapiei adjuvante	34
3.3.5. De la nomograme clinico-patologice la modele predictive bazate pe inteligență artificială și radiomică	35
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	38
4. Ipoteză de lucru. Obiective	40

5. Metodologie generală	44
5.1 Studiile de cohortă retrospective	44
5.2 Sinteza cantitativă a dovezilor științifice: revizuri sistematice și meta-analize	46
5.3 Analiza statistică și Modelarea predictivă	46
6. Studiul 1. Invazia limfovasculară ca factor pronostic independent în cancerul vezical tratat prin cistectomie radicală	48
6.1. Introducere	48
6.3. Material și metodă	48
6.4. Rezultate	50
6.5. Discuții	54
6.6. Concluzii	57
7. Studiul 2. Valoarea prognostică a invaziei limfovasculare în cancerul de vezică urinară: o meta-analiză comprehensivă a peste 60.000 de pacienți	58
7.1. Introducere	58
7.2. Material și metodă	59
7.3. Rezultate	60
7.4. Discuții	62
7.5. Concluzii	64
8. Studiul 3. Cancerul de prostată descoperit incidental în cadrul cistectomiei radicale pentru cancer vezical: incidență, caracteristici patologice și impact clinic într-o cohortă extinsă din România	66
8.1. Introducere	66
8.2. Material și metodă	67
8.3. Rezultate	68

8.4. Discuții	71
8.5. Concluzii	74
9. Studiul 4. Stratificarea riscului la pacienții cu cancer vezical supuși cistectomiei radicale: dezvoltarea și validarea unei nomograme predictive bazate pe factori perioperatorii	76
9.1. Introducere	76
9.2. Material și metodă	77
9.3. Rezultate	78
9.4. Discuții	83
9.5. Concluzii	85
10. Studiul 5. Rezultatele clinice ale imunoterapiei în carcinomul urotelial metastatic: o analiză a eficacității și toxicității căilor terapeutice standard din România	88
10.1. Introducere	88
10.2. Material și metodă	89
10.3. Rezultate	89
10.4. Discuții	93
10.5. Concluzii	96
11. Studiul 6. Axa miARN-imunitate în cancerul vezical: o analiză sistematică a dovezilor pentru o nouă eră a imunoterapiei de precizie	98
11.1. Introducere	98
11.2. Material și metodă	99
11.3. Rezultate	100
11.4. Discuții	105
11.5. Concluzii	108

12. Studiul 7. Identificarea miARN-125b-5p ca potențial biomarker predictiv pentru răspunsul la imunoterapie în carcinomul urotelial metastatic: un studiu translational	110
12.1. Introducere	110
12.2. Material și metodă	110
12.3. Rezultate	111
12.4. Discuții	113
12.5. Concluzii	115
13. Discuții generale	118
14. Concluzii generale	120
15. Originalitatea și contribuțiile inovative ale cercetării doctorale	122
REFERINȚE	124

Cuvinte cheie: Carcinom urotelial, Cistectomie radicală, Invazie limfovasculară, Nomogramă, Imunoterapie, microARN

LISTA DE PUBLICAȚII

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. Dulf DV, Burnar AL, Dulf PL, Matei DR, Hendea RM, Andraș I, Grecea M, Bungărdean C, De Leo A, Ciuleanu TE, Crișan N, Coadă CA. Lymphovascular Invasion Is a Predictor of Clinical Outcomes in Bladder Cancer Patients Treated with Radical Cystectomy. J Clin Med. 2025 Jul 18;14(14):5120. doi: 10.3390/jcm14145120. PMID: 40725814; PMCID: PMC12295869. (studiu cuprins in Capitolul 7)

2. Dulf DV, Burnar AL, Dulf PL, Matei DR, Hendea RM, Andraș I, Grecea M, Bungărdean C, De Leo A, Ciuleanu TE, Crișan N, Coadă CA. Lymphovascular Invasion Is a Predictor of Clinical Outcomes in Bladder Cancer Patients Treated with Radical Cystectomy. *J Clin Med.* 2025 Jul 18;14(14):5120. doi: 10.3390/jcm14145120. PMID: 40725814; PMCID: PMC12295869. (studiu cuprins in Capitolul 10)
3. Dulf DV, Ravegnini G, Giorgi FM, Burnar AL, Gorini F, De Leo A, Luțichievici H, Oprea L, Todiruş C, Ciuleanu TE, Coadă CA. The miRNA-Immune Axis in Bladder Cancer: Systematic Evidence for a New Era of Immunotherapy Precision . *Frontiers in Immunology.* (acceptat pentru publicare). (studiu cuprins in Capitolul 11)

INTRODUCERE

Importanța temei acestei teze de doctorat derivă dintr-o nevoie medicală critică neacoperită: identificarea unor instrumente prognostice mai precise și personalizate pentru cancerul vezical, o boală caracterizată printr-o heterogenitate biologică și clinică remarcabilă. În ciuda progreselor recente în terapiile sistemice, supraviețuirea pacienților rămâne profund variabilă, iar modelele tradiționale de stratificare a riscului, bazate pe stadializarea TNM, nu reușesc să surprindă complexitatea biologică a tumorilor. Această lucrare și-a propus să depășească aceste limite printr-o abordare integrată a factorilor perioperatorii, histopatologici și moleculari, generând dovezi solide asupra rolului invaziei limfovaskulare, asupra valorii biomarkerilor biologici și asupra impactului terapiilor moderne în practica reală. Relevanța și actualitatea temei sunt confirmate și prin diseminarea rezultatelor în cadrul unor conferințe naționale și internaționale de prestigiu și prin publicarea articolelor științifice în reviste indexate, ceea ce reflectă atât originalitatea contribuției, cât și valoarea sa pentru comunitatea științifică și pentru practica oncologică curentă

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Secțiunea analizează fundamentele biologice, clinice și prognostice ale cancerului de vezică urinară (CVU), subliniind complexitatea bolii și evoluția paradigmelor de management, de la modelele tradiționale la abordările medicinei de precizie.

O Problemă de Sănătate Publică și o Provocare Biologică. CVU reprezintă o problemă majoră de sănătate la nivel global, fiind a noua cea mai frecventă neoplazie conform datelor GLOBOCAN 2022. Boala prezintă o predominanță masculină (raport 4:1), iar etiologia sa este complexă. Fumatul este principalul factor de risc, responsabil pentru peste 50% din cazuri, alături de expuneri profesionale și factori de mediu. Carcinogeneza urotelială este un proces multistadial, iar recurența frecventă a bolii non-musculo-invazive este explicată prin conceptul de „câmp de cancerizare”, unde întregul urotelium este alterat molecular. Dezvoltarea tumorală urmează două căi moleculare distincte și mutual exclusive. Calea Papilară (FGFR3/TERT-dependență): caracteristică pentru majoritatea tumorilor non-musculo-invazive (NMIBC). Aceste tumori sunt genomice stabile, având o rată mare de recurență, dar un risc redus de progresie. Calea

Invazivă (TP53/RB1-dependentă): stă la baza carcinomului in situ și a majorității cazurilor de cancer vezical musculo-invaziv (MIBC). Inactivarea acestor gene supresoare duce la instabilitate genomică masivă și un comportament biologic agresiv. Genomul CVU este deosebit de haotic, având una dintre cele mai mari rate de mutații, adesea cauzată de semnătura mutațională a enzimelor APOBEC. Acest proces, alături de modificări epigenetice precum metilarea aberantă a ADN-ului, alimentează evoluția tumorală.

Abordarea Clinică: De la Simptom la Terapii Moderne. Tabloul clinic este dominat de hematuria macroscopică nedureroasă, iar diagnosticul de certitudine se bazează pe cistoscopie și examenul histopatologic al țesutului obținut prin rezecție transuretrală (TURBT). Stadializarea corectă a bolii musculo-invazive (MIBC) este esențială și se realizează prin imagistică avansată (CT și RMN multiparametric cu scor VI-RADS). În boala metastatică, paradigma terapeutică a fost revoluționată. S-a trecut de la dependența exclusivă de chimioterapia pe bază de platină la o nouă eră definită de imunoterapia cu inhibitori de punct de control imun (ICI) și, mai recent, de combinațiile dintre ICI și conjugate anticorp-medicament (ADC), care au devenit noul standard de îngrijire în prima linie. Cu toate acestea, răspunsul la aceste terapii este variabil, subliniind nevoia critică de biomarkeri predictivi robuști pentru a selecta pacienții care beneficiază cel mai mult de tratament.

Factori Prognostici: Către o Stratificare Biologică a Riscului. Evoluția pacienților cu MIBC tratați prin cistectomie radicală este extrem de heterogenă, evidențiind limitele sistemului de stadializare pTNM. O stratificare precisă a riscului necesită integrarea unor factori perioperatorii suplimentari. Factori preoperatorii: aceștia reflectă impactul sistemic al tumorii. Markerii serici de inflamație (NLR, PLR), statusul nutrițional (sarcopenia, hipoalbuminemia) și prezența hidronefrozei sunt indicatori puternici ai unei biologii agresive și ai unui prognostic rezervat. Factori intraoperatorii și patologici: calitatea actului chirurgical, deși importantă, pare să-și fi atins limitele, trialuri randomizate recente eșuând în a demonstra beneficiul limfadenectomiei extinse (eLND). Densitatea ganglionară (LNDe), invazia limfovasculară (LVI) și marginile chirurgicale pozitive (PSM) sunt factori patologici cu valoare prognostică independentă și superioară. Era biomarkerilor moleculari: răspunsul la chimioterapia neoadjuvantă (NAC) este cel mai puternic biomarker in vivo; obținerea unui răspuns patologic complet (pCR) este asociată cu un prognostic excelent. Acest răspuns poate fi prezis de mutațiile în genele de reparare a ADN-ului (DDR). Cel mai mare avans este reprezentat de biopsia lichidă: detectarea ADN-ului tumoral circulant (ctDNA) postoperator este cel mai puternic predictor al recurenței, identificând pacienții cu boală minimă reziduală (MRD) care beneficiază de terapie adjuvantă. În concluzie, managementul modern al CVU se îndreaptă către o stratificare a riscului multi-omică, care integrează date clinice, patologice, radiomice și moleculare, cu scopul de a oferi un prognostic personalizat și de a ghida deciziile terapeutice de precizie.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Studiul 1: Invazia Limfovasculară ca Factor Prognostic Independent în Cancerul Vezical Tratată prin Cistectomie Radicală

- Scop / Obiective: Evaluarea prevalenței și a semnificației prognostice a invaziei limfovasculare (LVI) într-o cohortă de pacienți din România supuși cistectomiei radicale, investigând rolul său ca predictor independent al supraviețuirii globale.
- Material și metode: A fost o analiză de cohortă retrospectivă, unicentrică, realizată pe pacienți operați la Spitalul Clinic Municipal Cluj-Napoca între ianuarie 2012 și noiembrie 2024. S-au colectat date demografice, clinice și patologice, având ca endpoint-uri primare supraviețuirea globală (OS) și supraviețuirea fără progresie (PFS). S-au utilizat metode statistice precum analiza Kaplan-Meier și modele de regresie Cox.
- Rezultate: Din 200 de pacienți, 39% au fost LVI-pozitivi. Prezența LVI s-a asociat cu un grad histologic mai înalt și un stadiu mai avansat. În analiza Kaplan-Meier, LVI a fost un predictor puternic pentru o supraviețuire redusă (OS mediană: 13.2 luni pentru LVI+ vs. 135.03 luni pentru LVI-). În analiza multivariabilă, stadiul pT și pN au rămas singurii predictori independenți. Însă, la pacienții cu status ganglionar neevaluat (Nx), LVI a fost un factor prognostic semnificativ.
- Concluzii: LVI este un factor de prognostic negativ puternic, asociat cu o supraviețuire redusă. Deși valoarea sa independentă este atenuată în modelele complete, LVI devine un marker surogat extrem de valoros pentru stratificarea riscului la pacienții cu stadializare ganglionară incompletă (Nx).

Studiul 2: Valoarea Prognostică a Invaziei Limfovasculare în Cancerul de Vezică Urinară: O Meta-analiză Comprehensivă a Peste 60.000 de Pacienți

- Scop / Obiective: Realizarea celei mai ample meta-analize pentru a cuantifica definitiv impactul LVI asupra supraviețuirii în cancerul vezical și a oferi dovezi de cel mai înalt nivel pentru practica clinică.
- Material și metode: O revizuire sistematică și meta-analiză realizată conform ghidului PRISMA, cu protocol înregistrat. S-a efectuat o căutare exhaustivă în bazele de date PubMed, Scopus și Web of Science. Au fost incluse studii care au raportat date prognostice pentru LVI la pacienți cu cancer vezical non-metastatic. Hazard Ratios (HR) agregate au fost calculate folosind modele cu efecte aleatorii.
- Rezultate: Au fost incluse 131 de studii, totalizând 60.019 pacienți. Analiza a demonstrat o asociere puternică și consistentă între prezența LVI și un prognostic nefavorabil pentru toate endpoint-urile. Riscul a fost aproximativ dublu pentru:
 - Supraviețuirea fără boală (DFS): HR = 1.96
 - Supraviețuirea fără progresie (PFS): HR = 2.24
 - Supraviețuirea specifică de cancer (CSS): HR = 2.03
 - Supraviețuirea globală (OS): HR = 2.01
- Concluzii: Această meta-analiză demonstrează concludent că LVI este un factor de prognostic negativ, puternic și robust. Prezența sa este asociată cu o dublare a riscului de recurență, progresie sau deces. Prin urmare, pacienții LVI-pozitivi (inclusiv cei cu ganglioni negativi) constituie un subgrup cu risc înalt, la care ar trebui luate în considerare terapii sistemice adjuvante.

Studiul 3: Cancerul de Prostată Descoperit Incidental în Cadrul Cistectomiei Radicale

pentru Cancer Vezical: Incidență, Caracteristici Patologice și Impact Clinic într-o Cohortă Extinsă din România

- Scop / Obiective: Determinarea incidenței, caracterizarea patologică și evaluarea impactului clinic al cancerului de prostată incidental (iPCa) într-o cohortă de pacienți români, pentru a stabili dacă descoperirea acestuia ar trebui să influențeze managementul postoperator.
- Material și metode: O analiză de cohortă retrospectivă ce a inclus 159 de pacienți de sex masculin operați prin cistoprostatectomie radicală la Spitalul Clinic Municipal Cluj-Napoca (2012–2024). Au fost analizate date demografice, clinico-patologice (pentru ambele tumori) și de supraviețuire (analiză Kaplan-Meier).
- Rezultate: Incidența iPCa a fost de 20.13%. Pacienții cu iPCa au fost semnificativ mai în vârstă. Deși majoritatea tumorilor iPCa au fost de risc scăzut (stadiu pT2, scor Gleason 6), o proporție mare (45.16%) a prezentat invazie perineurală (PNI). Prezența iPCa nu a influențat semnificativ statistic supraviețuirea fără progresie ($p = 0.77$) sau supraviețuirea globală ($p = 0.43$).
- Concluzii: Incidența iPCa a fost de 20.1%. O contribuție originală este evidențierea unei dihotomii: tumori considerate de risc scăzut conform criteriilor clasice, dar cu o rată ridicată a PNI, sugerând că potențialul agresiv poate fi subestimat. Cu toate acestea, prezența iPCa nu a influențat supraviețuirea, care a fost determinată covârșitor de tumora vezicală.

Studiul 4: Stratificarea Riscului la Pacienții cu Cancer Vezical Supuși Cistectomiei Radicale: Dezvoltarea și Validarea unei Nomograme Predictive Bazate pe Factori Perioperatorii

- Scop / Obiective: Identificarea predictorilor perioperatorii ai supraviețuirii și dezvoltarea unei nomograme prognostice noi pentru a oferi o evaluare individualizată a riscului.
- Material și metode: O analiză retrospectivă a 121 de pacienți. S-a folosit regresia Cox pentru a identifica factorii prognostici și pentru a dezvolta o nomogramă care să estimeze supraviețuirea globală la 3 ani. Performanța nomogramei a fost evaluată prin C-index, curbe de calibrare și analiza curbei de decizie.
- Rezultate: A fost dezvoltată o nomogramă care a integrat șase variabile: sex, grad histologic, stadiul T, stadiul N, complicații intraoperatorii și recurența în primul an. Modelul a demonstrat o bună capacitate de discriminare (C-index = 0.74). A stratificat eficient pacienții în grupuri de risc scăzut și crescut, cu supraviețuiri mediane de 68 luni vs. 23 de luni ($p < 0.0001$).
- Concluzii: Prognosticul este influențat de un spectru larg de factori perioperatorii. Contribuția originală este dezvoltarea unei nomograme noi care integrează factori patologici, chirurgicali și de evoluție timpurie. Nomograma s-a dovedit un instrument promițător pentru consilierea individualizată și identificarea pacienților cu risc înalt, dar necesită validare externă.

Studiul 5: Rezultatele Clinice ale Imunoterapiei în Carcinomul Urotelial Metastatic: O Analiză a Eficacității și Toxicității Căilor Terapeutice Standard din România

- Scop / Obiective: Realizarea primei analize din practica reală a rezultatelor obținute cu imunoterapie (avelumab de menținere și pembrolizumab post-progresie) în România, pentru a stabili primele repere (benchmarks) de

eficacitate și siguranță.

- Material și metode: Analiză retrospectivă a 30 de pacienți cu carcinom urotelial metastatic (mUC) tratați între 2020 și 2025. Pacienții au fost analizați în două cohorte: Avelumab (N=12) și Pembrolizumab (N=18). S-au evaluat răspunsul tumoral, Timpul până la Eșecul Tratatamentului (TTF), supraviețuirea globală (OS) și evenimentele adverse.
- Rezultate: În cohorta Avelumab, rata de control al bolii a fost 91.7%, iar medianele TTF și OS nu au fost atinse. În cohorta Pembrolizumab, rata de răspuns a fost 16.7%, mediana TTF 10.2 luni și mediana OS 21.8 luni. Incidența evenimentelor adverse severe a fost redusă (8.3% pentru Avelumab și 11.1% pentru Pembrolizumab).
- Concluzii: Studiul stabilește primele repere naționale pentru imunoterapia în mUC. Calea cu avelumab de menținere oferă un control durabil al bolii. Calea cu pembrolizumab a rezultat într-o supraviețuire mediană de 21.8 luni. Ambele strategii au un profil de siguranță favorabil.

Studiul 6: Axa miARN-Imunitate în Cancerul Vezical: O Analiză Sistemătică a Dovezilor pentru o Nouă Eră a Imunoterapiei de Precizie

- Scop / Obiective: Realizarea unei revizuirii sistematice și a unei analize bioinformatică a datelor TCGA pentru a oferi o viziune integrată asupra axei miARN-imunitate în cancerul vezical.
- Material și metode: O revizuire sistematică a literaturii, completată de o analiză bioinformatică pe date din cohorta TCGA-BLCA pentru a investiga corelațiile dintre expresia miARN, infiltratul imun și supraviețuire.
- Rezultate: Au fost selectate 37 de studii. Analiza TCGA a relevat o rețea complexă de corelații între miARN-uri și celulele imune (ex: miR-155 a corelat pozitiv cu limfocitele T CD4⁺). Anumite miARN-uri au avut valoare prognostică: expresia crescută a miR-200c a fost asociată cu o supraviețuire mai bună, în timp ce expresia crescută a miR-125b a fost corelată cu un prognostic nefavorabil.
- Concluzii: Studiul a creat o hartă comprehensivă a interacțiunilor miARN-sistem imun și a demonstrat că semnături specifice de miARN au valoare prognostică. Cercetarea concluzionează că miARN-urile au un potențial remarcabil ca viitori biomarkeri pentru personalizarea imunoterapiei.

Studiul 7: Identificarea miARN-125b-5p ca Potențial Biomarker Predictiv pentru Răspunsul la Imunoterapie în Carcinomul Urotelial Metastatic: Un Studiu Translațional

- Scop / Obiective: Investigarea dacă expresia unor miARN-uri specifice în țesutul tumoral al pacienților cu mUC tratați cu imunoterapie se corelează cu rezultatele clinice, pentru a identifica un biomarker predictiv.
- Material și metode: Studiu translațional pe probe de țesut tumoral (FFPE) de la un subgrup de pacienți. Expresia miARN-urilor (inclusiv hsa-miR-125b-5p) a fost cuantificată prin RT-qPCR și corelată cu răspunsul la tratament și supraviețuirea.
- Rezultate: Un nivel crescut de expresie al miR-125b-5p a fost puternic asociat cu un prognostic nefavorabil. Pacienții cu expresie înaltă a miR-125b-5p au avut o supraviețuire fără progresie (PFS) semnificativ mai scurtă ($p = 0.020$).
- Concluzii: Studiul a identificat, în premieră pe o cohortă din România, miR-

125b-5p ca un potențial biomarker predictiv, cu valoare prognostică negativă, la pacienții cu mUC tratați cu imunoterapie.

CONCLUZII GENERALE

- Invazia limfovasculară reprezintă un marker robust al agresivității biologice în cancerul vezical. Deși valoarea sa prognostică independentă este atenuată în prezența unei stadializări patologice complete, aceasta devine un instrument esențial și un surrogat de risc înalt în managementul pacienților cu status limfoganglionar neevaluat (Nx), o situație frecvent întâlnită în practica clinică.
- Stratificarea riscului la pacienții supuși cistectomiei radicale este superioară atunci când se bazează pe un model multifactorial, în detrimentul analizei unor factori izolați. Nomograma dezvoltată în cadrul acestei teze, care integrează factori patologici, chirurgicali și de evoluție postoperatorie timpurie, s-a dovedit eficientă în a distinge pacienții cu prognostic favorabil de cei cu risc crescut de mortalitate în cohorta studiată.
- Descoperirea incidentală a cancerului de prostată în piesa de cistoprostatectomie, deși frecventă, nu influențează în mod independent și semnificativ supraviețuirea pacienților. Prognosticul acestora rămâne dictat în mod covârșitor de caracteristicile tumorii vezicale primare.
- În contextul practicii clinice din România, căile terapeutice moderne bazate pe imunoterapie (avelumab de întreținere și pembrolizumab în linia a doua) pentru carcinomul urotelial metastatic sunt eficiente și sigure, iar rezultatele de supraviețuire obținute în studiul de față constituie primele repere (benchmarks) naționale pentru aceste tratamente.
- La nivel molecular, microARN-urile joacă un rol fundamental în modularea microambientului imun al cancerului vezical. Această cercetare a stabilit o rețea comprehensivă de corelații între miARN-uri specifice și infiltrarea cu celule imune și a validat, pe o cohortă extinsă, valoarea prognostică a unor semnături distincte de miARN.

Acest demers de cercetare a culminat cu identificarea, în premieră pe o cohortă de pacienți din România, a miR-125b-5p ca un potențial biomarker predictiv pentru un răspuns nefavorabil la imunoterapie. Această constatare deschide calea către dezvoltarea unor teste moleculare capabile să ghideze personalizarea tratamentului în carcinomul urotelial metastatic.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE CERCETĂRII DOCTORALE

Demersul acestei teze aduce contribuții originale la înțelegerea și managementul cancerului vezical, urmărind un fir roșu de la factori clinici la biomarkeri moleculari. În boala localizată, cercetarea a demonstrat valoarea invaziei limfovaskulare ca marker prognostic și a propus o nomogramă perioperatorie inovatoare, care integrează factori patologici, chirurgicali și postoperatorii. În boala avansată, teza a oferit primele date din practica reală românească privind eficacitatea și siguranța imunoterapiei (Avelumab, Pembrolizumab), stabilind repere critice pentru evaluarea și aplicarea acestor terapii. Componenta moleculară a integrat date bioinformatică într-o hartă a axei miARN-sistem imun, iar studiul translațional pilot a identificat miR-125b-5p ca biomarker predictiv de răspuns la imunoterapie, deschizând calea către personalizarea tratamentului și implementarea medicinei de precizie în carcinomul urotelial metastatic.

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

The Role of Biomarkers in the Oncologic Prognosis of Bladder Cancer

Doctorand: **Daniel-Vasile DULF**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Tudor-Eliade CIULEANU**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

SUMMARY OF THE PHD THESIS

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	3
1. Cancerul de vezică urinară: o problemă de sănătate publică și o provocare clinică	5
1.1 Epidemiologie	5
1.2 Etiologie și factori de risc în cancerul vezicii urinare	6
1.3 Carcinogeneza urotelială: un proces multistadial	7
1.4 Căi moleculare distincte în dezvoltarea tumorală	8
2. Abordarea clinică: diagnostic, stadializare și principii terapeutice	15
2.1 Tabloul clinic și evaluarea inițială	15
2.2 Paradigma de diagnostic și stadializare	16
2.2.1 Diagnosticul endoscopic și histopatologic	16
2.2.2 Stadializarea imagistică locală și la distanță	17
2.3. Decodarea microambientului tumoral: rolul regulatorilor moleculari	17
2.4. Frontierele terapeutice în boala metastatică	18
2.4.1. De la chimioterapie la revoluția imuno-oncologică	18
2.4.2. Nevoia de biomarkeri predictivi și rolul microambientului tumoral	19
3. Factori prognostici în cancerul vezical	21
3.1. Evaluarea preoperatorie a biologiei agresive: biomarkeri sistemici și compoziționali	24

3.1.2. Axa Inflamație-Imunitate: De la NLR/PLR la mecanisme moleculare	24
3.1.3. Statusul nutrițional și sarcopenia: indicatori ai catabolismului sistemic și ai cașexiei neoplazice	25
3.2. Factori intraoperatorii și patologici: o fereastră către comportamentul tumoral și calitatea terapeutică	27
3.2.1. Calitatea actului chirurgical: dezbateră încă nerezolvată a limfadenectomiei extinse	27
3.2.2. Caracteristici histopatologice cu valoare prognostică independentă: LVI, marginile chirurgicale și histologiile variante	28
3.2.3 Marginile chirurgicale pozitive	29
3.3. Răspunsul la terapia neoadjuvantă: cel mai puternic biomarker in vivo	30
3.3.1. Valoarea prognostică fundamentală a răspunsului patologic complet	30
3.3.2. Predictorii moleculari ai chimiosensibilității: rolul mutațiilor în genele DDR	31
3.3.3 Era Biomarkerilor moleculari: către o stratificare multi-omică a riscului	32
3.3.4. Biopsia lichidă și ADN-ul tumoral circulant (ctDNA): detectarea bolii minime reziduale și ghidarea terapiei adjuvante	34
3.3.5. De la nomograme clinico-patologice la modele predictive bazate pe inteligență artificială și radiomică	35
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	38
4. Ipoteză de lucru. Obiective	40
5. Metodologie generală	44
5.1 Studiile de cohortă retrospective	44

5.2 Sinteza cantitativă a dovezilor științifice: revizuri sistematice și meta-analize	46
5.3 Analiza statistică și Modelarea predictivă	46
6. Studiul 1. Invazia limfovasculară ca factor pronostic independent în cancerul vezical tratat prin cistectomie radicală	48
6.1. Introducere	48
6.3. Material și metodă	48
6.4. Rezultate	50
6.5. Discuții	54
6.6. Concluzii	57
7. Studiul 2. Valoarea prognostică a invaziei limfovasculare în cancerul de vezică urinară: o meta-analiză comprehensivă a peste 60.000 de pacienți	58
7.1. Introducere	58
7.2. Material și metodă	59
7.3. Rezultate	60
7.4. Discuții	62
7.5. Concluzii	64
8. Studiul 3. Cancerul de prostată descoperit incidental în cadrul cistectomiei radicale pentru cancer vezical: incidență, caracteristici patologice și impact clinic într-o cohortă extinsă din România	66
8.1. Introducere	66
8.2. Material și metodă	67
8.3. Rezultate	68
8.4. Discuții	71
8.5. Concluzii	74

9. Studiul 4. Stratificarea riscului la pacienții cu cancer vezical supuși cistectomiei radicale: dezvoltarea și validarea unei nomograme predictive bazate pe factori perioperatorii	76
9.1. Introducere	76
9.2. Material și metodă	77
9.3. Rezultate	78
9.4. Discuții	83
9.5. Concluzii	85
10. Studiul 5. Rezultatele clinice ale imunoterapiei în carcinomul urotelial metastatic: o analiză a eficacității și toxicității căilor terapeutice standard din România	88
10.1. Introducere	88
10.2. Material și metodă	89
10.3. Rezultate	89
10.4. Discuții	93
10.5. Concluzii	96
11. Studiul 6. Axa miARN-imunitate în cancerul vezical: o analiză sistematică a dovezilor pentru o nouă eră a imunoterapiei de precizie	98
11.1. Introducere	98
11.2. Material și metodă	99
11.3. Rezultate	100
11.4. Discuții	105
11.5. Concluzii	108
12. Studiul 7. Identificarea miARN-125b-5p ca potențial biomarker predictiv pentru răspunsul la imunoterapie în carcinomul urotelial metastatic: un studiu translational	110

12.1. Introducere	110
12.2. Material și metodă	110
12.3. Rezultate	111
12.4. Discuții	113
12.5. Concluzii	115
13. Discuții generale	118
14. Concluzii generale	120
15. Originalitatea și contribuțiile inovative ale cercetării doctorale	122
REFERINȚE	124

Keywords: Urothelial carcinoma, Radical cystectomy, Lymphovascular invasion, Nomogram, Immunotherapy, microRNA.

PUBLICATIONS LIST

Published full-text articles resulting from doctoral research

1. Dulf DV, Burnar AL, Dulf PL, Matei DR, Hendea RM, Andraș I, Grecea M, Bungărdean C, De Leo A, Ciuleanu TE, Crișan N, Coada CA. Lymphovascular Invasion Is a Predictor of Clinical Outcomes in Bladder Cancer Patients Treated with Radical Cystectomy. *J Clin Med.* 2025 Jul 18;14(14):5120. doi: 10.3390/jcm14145120. PMID: 40725814; PMCID: PMC12295869. (studiu cuprins in Capitolul 7)
2. Dulf DV, Burnar AL, Dulf PL, Matei DR, Hendea RM, Andraș I, Grecea M, Bungărdean C, De Leo A, Ciuleanu TE, Crișan N, Coada CA. Lymphovascular Invasion Is a Predictor of Clinical Outcomes in Bladder Cancer Patients Treated with Radical Cystectomy. *J Clin Med.* 2025 Jul 18;14(14):5120. doi: 10.3390/jcm14145120. PMID: 40725814; PMCID: PMC12295869. (studiu cuprins in Capitolul 10)
3. Dulf DV, Ravegnini G, Giorgi FM, Burnar AL, Gorini F, De Leo A, Luțichievici H, Opreța

L, Todiruş C, Ciuleanu TE, Coadă CA. The miRNA-Immune Axis in Bladder Cancer: Systematic Evidence for a New Era of Immunotherapy Precision . *Frontiers in Immunology*. (acceptat pentru publicare). (studiu cuprins in Capitolul 11)

INTRODUCTION

The importance of this PhD thesis topic stems from a critical unmet medical need: the identification of more precise and personalized prognostic tools for bladder cancer, a disease characterized by remarkable biological and clinical heterogeneity. Despite recent advances in systemic therapies, patient survival remains profoundly variable, and traditional risk stratification models, based on TNM staging, fail to capture the biological complexity of the tumors. This work aimed to overcome these limitations through an integrated approach to perioperative, histopathological, and molecular factors, generating solid evidence on the role of lymphovascular invasion, the value of biological biomarkers, and the impact of modern therapies in real-world practice. The relevance and timeliness of the topic are also confirmed by the dissemination of the results at prestigious national and international conferences and by the publication of scientific articles in indexed journals, which reflects both the originality of the contribution and its value for the scientific community and for current oncological practice.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

This section analyzes the biological, clinical, and prognostic foundations of bladder cancer (BCa), highlighting the complexity of the disease and the evolution of management paradigms, from traditional models to precision medicine approaches.

Bladder cancer (BCa) is a major global health problem, ranking ninth worldwide according to GLOBOCAN 2022. It is more common in men (4:1 ratio) and has a complex etiology, with smoking responsible for over half of cases, alongside occupational and environmental exposures. Urothelial carcinogenesis is a multistage process, with frequent recurrences of non-muscle-invasive tumors explained by "field cancerization," where the entire urothelium is molecularly altered. Tumor development follows two distinct pathways: the Papillary Pathway (FGFR3/TERT-dependent), typical for non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC), with high recurrence but low progression risk, and the Invasive Pathway (TP53/RB1-dependent), responsible for carcinoma in situ and most muscle-invasive bladder cancers (MIBC), marked by genomic instability and aggressive behavior. BCa has one of the highest mutation rates, often linked to APOBEC signatures, with additional influence from epigenetic changes such as aberrant DNA methylation. Clinically, BCa usually presents with painless visible hematuria, diagnosis relies on cystoscopy and TURBT, and staging of MIBC uses CT and multiparametric MRI with VI-RADS scoring. In metastatic disease, treatment has shifted from platinum chemotherapy to immunotherapy with checkpoint inhibitors, and more recently to

combinations with antibody-drug conjugates (ADCs), though responses remain variable, underlining the need for predictive biomarkers. Prognosis after radical cystectomy in MIBC is highly heterogeneous, making pTNM staging insufficient and requiring integration of perioperative factors. Preoperative indicators include inflammation markers (NLR, PLR), nutritional status (sarcopenia, hypoalbuminemia), and hydronephrosis. Pathological prognostic factors include lymph node density, lymphovascular invasion, and positive surgical margins. The strongest predictive tool remains response to neoadjuvant chemotherapy, with complete pathological response linked to favorable outcomes and DDR gene mutations predicting sensitivity. Liquid biopsy represents the most promising advance, with ctDNA detection identifying minimal residual disease and guiding adjuvant therapy. Overall, modern BCa management is moving toward integrated multi-omic risk stratification, combining clinical, pathological, radiomic, and molecular data to personalize prognosis and treatment decisions.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

Study 1: Lymphovascular Invasion as an Independent Prognostic Factor in Bladder Cancer Treated with Radical Cystectomy

The objective was to evaluate the prevalence and prognostic significance of lymphovascular invasion (LVI) in a cohort of Romanian patients undergoing radical cystectomy. The study investigated its role as an independent predictor of overall survival. It was a retrospective, single-center cohort analysis of patients operated on at the Cluj-Napoca Municipal Clinical Hospital between January 2012 and November 2024. Demographic, clinical, and pathological data were collected, with primary endpoints being overall survival (OS) and progression-free survival (PFS). Statistical methods such as Kaplan-Meier analysis and Cox regression models were used. Of 200 patients, 39% were LVI-positive. The presence of LVI was associated with a higher histological grade and a more advanced stage. In the Kaplan-Meier analysis, LVI was a strong predictor of reduced survival (median OS: 13.2 months for LVI+ vs. 135.03 months for LVI-). In the multivariate analysis, pT and pN stage remained the only independent predictors. However, in patients with unevaluated lymph node status (Nx), LVI was a significant prognostic factor. LVI is a strong negative prognostic factor, associated with reduced survival. Although its independent value is diminished in complete models, LVI becomes an extremely valuable surrogate marker for risk stratification in patients with incomplete lymph node staging (Nx).

Study 2: The Prognostic Value of Lymphovascular Invasion in Bladder Cancer: A Comprehensive Meta-analysis of Over 60,000 Patients

The objective was to conduct the largest meta-analysis to definitively quantify the impact of LVI on survival in bladder cancer. It aimed to provide the highest level of evidence for clinical practice. A systematic review and meta-analysis was conducted according to PRISMA guidelines, with a registered protocol. An exhaustive search was performed in the PubMed, Scopus, and Web of Science databases. Studies that reported prognostic data for LVI in patients with non-metastatic bladder cancer were included.

Pooled Hazard Ratios (HR) were calculated using random-effects models. 131 studies were included, totaling 60,019 patients. The analysis demonstrated a strong and consistent association between the presence of LVI and a poor prognosis for all endpoints. The risk was approximately doubled for: Disease-Free Survival (DFS): HR = 1.96, Progression-Free Survival (PFS): HR = 2.24, Cancer-Specific Survival (CSS): HR = 2.03, and Overall Survival (OS): HR = 2.01. This meta-analysis conclusively demonstrates that LVI is a strong and robust negative prognostic factor. Its presence is associated with a doubling of the risk of recurrence, progression, or death. Therefore, LVI-positive patients (including those with negative lymph nodes) constitute a high-risk subgroup where adjuvant systemic therapies should be considered.

Study 3: Incidentally Discovered Prostate Cancer during Radical Cystectomy for Bladder Cancer: Incidence, Pathological Features, and Clinical Impact in a Large Romanian Cohort

The objective was to determine the incidence, pathological characterization, and clinical impact of incidental prostate cancer (iPCa) in a cohort of Romanian patients. This was to establish if its discovery should influence postoperative management. A retrospective cohort analysis included 159 male patients who underwent radical cystoprostatectomy at the Cluj-Napoca Municipal Clinical Hospital (2012–2024). Demographic, clinico-pathological (for both tumors), and survival data were analyzed (Kaplan-Meier analysis). The incidence of iPCa was 20.13%. Patients with iPCa were significantly older. Although most iPCa tumors were low-risk (pT2 stage, Gleason score 6), a large proportion (45.16%) showed perineural invasion (PNI). The presence of iPCa did not statistically significantly influence progression-free survival ($p = 0.77$) or overall survival ($p = 0.43$). The incidence of iPCa was 20.1%. An original contribution is the highlighting of a dichotomy: tumors considered low-risk by classic criteria but with a high rate of PNI, suggesting their aggressive potential may be underestimated. However, the presence of iPCa did not influence survival, which was overwhelmingly determined by the bladder tumor.

Study 4: Risk Stratification for Bladder Cancer Patients Undergoing Radical Cystectomy: Development and Validation of a Predictive Nomogram Based on Perioperative Factors

The objective was to identify perioperative predictors of survival and develop a new prognostic nomogram for an individualized risk assessment. This was a retrospective analysis of 121 patients. Cox regression was used to identify prognostic factors and to develop a nomogram to estimate 3-year overall survival. The nomogram's performance was evaluated by C-index, calibration curves, and decision curve analysis. A nomogram was developed that integrated six variables: sex, histological grade, T stage, N stage, intraoperative complications, and recurrence within the first year. The model demonstrated good discrimination ability (C-index = 0.74). It effectively stratified patients into low- and high-risk groups, with median survivals of 68 months vs. 23 months ($p < 0.0001$). The prognosis is influenced by a wide spectrum of perioperative factors. The original contribution is the development of a new nomogram that integrates pathological, surgical, and early evolution factors. The nomogram proved to be a promising tool for individualized counseling and identifying high-risk patients, but it requires external validation.

Study 5: Clinical Outcomes of Immunotherapy in Metastatic Urothelial Carcinoma: An Analysis of Efficacy and Toxicity of Standard Therapeutic Pathways in Romania

The objective was to conduct the first real-world analysis of outcomes with immunotherapy (avelumab maintenance and post-progression pembrolizumab) in Romania. It aimed to establish the first benchmarks for efficacy and safety. This was a retrospective analysis of 30 patients with metastatic urothelial carcinoma (mUC) treated between 2020 and 2025. Patients were analyzed in two cohorts: Avelumab (N=12) and Pembrolizumab (N=18). Tumor response, Time to Treatment Failure (TTF), overall survival (OS), and adverse events were evaluated. In the Avelumab cohort, the disease control rate was 91.7%, and the median TTF and OS were not reached. In the Pembrolizumab cohort, the response rate was 16.7%, with a median TTF of 10.2 months and a median OS of 21.8 months. The incidence of severe adverse events was low (8.3% for Avelumab and 11.1% for Pembrolizumab). The study establishes the first national benchmarks for immunotherapy in mUC. The avelumab maintenance pathway offers durable disease control. The pembrolizumab pathway resulted in a median survival of 21.8 months. Both strategies have a favorable safety profile.

Study 6: The miRNA-Immune Axis in Bladder Cancer: A Systematic Analysis of Evidence for a New Era of Precision Immunotherapy

The objective was to conduct a systematic review and a bioinformatic analysis of TCGA data to provide an integrated view of the miRNA-immune axis in bladder cancer. This involved a systematic literature review, supplemented by a bioinformatic analysis on data from the TCGA-BLCA cohort to investigate correlations between miRNA expression, immune infiltrate, and survival. 37 studies were selected. The TCGA analysis revealed a complex network of correlations between miRNAs and immune cells (e.g., miR-155 correlated positively with CD4⁺ T cells). Certain miRNAs had prognostic value: increased expression of miR-200c was associated with better survival, while increased expression of miR-125b was correlated with a poor prognosis. The study created a comprehensive map of miRNA-immune system interactions and demonstrated that specific miRNA signatures have prognostic value. The research concludes that miRNAs have remarkable potential as future biomarkers for personalizing immunotherapy.

Study 7: Identification of miR-125b-5p as a Potential Predictive Biomarker for Immunotherapy Response in Metastatic Urothelial Carcinoma: A Translational Study

The objective was to investigate if the expression of specific miRNAs in the tumor tissue of mUC patients treated with immunotherapy correlates with clinical outcomes, to identify a predictive biomarker. This was a translational study on tumor tissue samples (FFPE) from a subgroup of patients. The expression of miRNAs (including hsa-miR-125b-5p) was quantified by RT-qPCR and correlated with treatment response and survival. A high expression level of miR-125b-5p was strongly associated with a poor prognosis. Patients with high miR-125b-5p expression had a significantly shorter progression-free survival (PFS) ($p = 0.020$). For the first time in a Romanian cohort, the study identified miR-125b-5p as a potential predictive biomarker with negative prognostic value in mUC patients treated with immunotherapy.

GENERAL CONCLUSIONS

- Lymphovascular invasion represents a robust marker of biological aggressiveness in bladder cancer. Although its independent prognostic value is diminished in the presence of complete pathological staging, it becomes an essential tool and a high-risk surrogate in the management of patients with unevaluated lymph node status (Nx), a situation frequently encountered in clinical practice.
- Risk stratification for patients undergoing radical cystectomy is superior when based on a multifactorial model, rather than on the analysis of isolated factors. The nomogram developed within this thesis, which integrates pathological, surgical, and early postoperative evolution factors, proved effective in distinguishing patients with a favorable prognosis from those with a high risk of mortality in the studied cohort.
- The incidental discovery of prostate cancer in the cystoprostatectomy specimen, although frequent, does not independently and significantly influence patient survival. Their prognosis remains overwhelmingly dictated by the characteristics of the primary bladder tumor.
- In the context of Romanian clinical practice, modern therapeutic pathways based on immunotherapy (avelumab maintenance and second-line pembrolizumab) for metastatic urothelial carcinoma are effective and safe. The survival results obtained in this study constitute the first national benchmarks for these treatments.
- At the molecular level, microRNAs play a fundamental role in modulating the immune microenvironment of bladder cancer. This research established a comprehensive network of correlations between specific miRNAs and immune cell infiltration and validated, in a large cohort, the prognostic value of distinct miRNA signatures.
- This research endeavor culminated in the first-time identification in a Romanian patient cohort of miR-125b-5p as a potential predictive biomarker for an unfavorable response to immunotherapy. This finding opens the way for the development of molecular tests capable of guiding the personalization of treatment in metastatic urothelial carcinoma.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE DOCTORAL RESEARCH

The endeavor of this thesis brings original contributions to the understanding and management of bladder cancer, following a common thread from clinical factors to molecular biomarkers. For localized disease, the research demonstrated the value of lymphovascular invasion as a prognostic marker and proposed an innovative perioperative nomogram that integrates pathological, surgical, and postoperative factors. For advanced disease, the thesis provided the first real-world data from Romania on the efficacy and safety of immunotherapy (Avelumab, Pembrolizumab),

establishing critical benchmarks for the evaluation and application of these therapies. The molecular component integrated bioinformatic data into a map of the miRNA-immune system axis, and the pilot translational study identified miR-125b-5p as a predictive biomarker of response to immunotherapy, paving the way towards treatment personalization and the implementation of precision medicine in metastatic urothelial carcinoma.