
REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Analiza biomarkerilor serici și a micromediului tumoral în cancerul colorectal

Doctorand: **Giorgiana AMARINEI (FĂGĂRĂȘAN)**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. George DINDELEGAN**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	5
1. Cancerul colorectal.....	7
1.1.Epidemiologie.....	8
1.2.Etiologie.....	9
1.3.Metode de diagnostic și stadializare.....	12
1.4.Principii de tratament.....	14
2. Biomarkerii serici inflamatori în cancerul colorectal.....	19
2.1. Proteina C reactivă.....	20
2.2. Albumina.....	21
3. Micromediul tumoral în cancerul colorectal.....	22
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	27
4. Scop și obiective.....	29
5. Metodologie generală.....	29
6. Studiul 1. Valoarea preoperatorie a raportului proteină C reactivă/albumină ca biomarker prognostic la pacienții cu cancer de colon.....	31
6.1. Introducere.....	31
6.2. Obiective.....	32
6.3. Material și metodă.....	32
6.4. Rezultate.....	34
6.5. Discuții.....	40

6.6. Concluzii.....	42
7. Studiul 2. Impactul infiltratului tumoral limfocitar cu limfocite B și T în funcție de situsul tumoral: o hartă a imunofenotipării în cancerul de colon.....	43
7.1. Introducere.....	43
7.2. Obiective.....	45
7.3. Material și metodă.....	45
7.4. Rezultate.....	51
7.5. Discuții.....	60
7.6. Concluzii.....	64
8. Studiul 3. Rolul infiltratului tumoral limfocitar B în micromediul tumoral al pacienților cu cancer colorectal: un review sistematic al evoluției peisajului imunitar.....	65
8.1. Introducere.....	65
8.2. Obiective.....	66
8.3. Material și metodă.....	67
8.4. Rezultate.....	69
8.5. Discuții.....	90
8.6. Concluzii.....	92
9. Concluzii generale.....	95
10. Originalitatea și contribuțiile inovative ale cercetării doctorale.....	97
REFERINȚE.....	99
Cuvinte cheie: cancer colorectal, albumină, proteină C reactivă, TILs, TIBLs	

LISTA DE PUBLICAȚII

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. Făgărășan G, Seicean R, Bințișan V, Făgărășan V, Caziuc A, Andraș D, Chira L, Dindelegan G. The Value of Preoperative C-Reactive Protein to Albumin Ratio as a Prognostic Biomarker in Colon Cancer Patients. *Medicina (Kaunas)*. 2024 Jun 27;60(7):1054. doi: 10.3390/medicina60071054. PMID: 39064483; PMCID: PMC11278571. *ISI Q1 Factor de impact JCR₂₀₂₄ – 2.8 (studiu cuprins în capitolul 6)*.
2. Făgărășan G, Gheban BA, Făgărășan V, Crișan D, Telecan T, Bințișan VV, Seicean RI, Caziuc A, Dindelegan GC. B and T Tumor-Infiltrating Lymphocyte Subtypes According to Subsite: A Colon Cancer Immunophenotyping Map. *Biomedicines*. 2025 Nov 23;13(12):2856. doi: 10.3390/biomedicines13122856. PMID: 41462871; PMCID: PMC12730879. *ISI Q1 Factor de impact JCR₂₀₂₅ – 4.05 (studiu cuprins în capitolul 7)*.
3. Făgărășan G, Făgărășan V, Bințișan VV, Dindelegan GC. The Role of Tumor-Infiltrating B Lymphocytes in Colorectal Cancer Patients: A Systematic Review of Immune Landscape Evolution. *Cancers (Basel)*. 2025 Sep 13;17(18):2996. doi: 10.3390/cancers17182996. PMID: 41008839; PMCID: PMC12468775. *ISI Q1 Factor de impact JCR₂₀₂₅ – 4.4 (studiu cuprins în capitolul 8)*.

INTRODUCERE

Cancerul colorectal (CCR) este o boală heterogenă, cu patogeneză complexă și cu mortalitate crescută în stadiile avansate, în ciuda progreselor terapeutice. Managementul cancerului colorectal implică strategii distincte, de la chirurgie radicală la radiochimioterapie, chimioterapie și terapii neoadjuvante totale, în funcție de stadializare și caracteristicile tumorale. Rolul biomarkerilor serici și tisulari devine esențial pentru stratificarea riscului și personalizarea tratamentului. Inflamația și răspunsul imun au o contribuție majoră în tumorigeneză, iar studiul proteinelor inflamatorii și al celulelor imune T și B infiltrate tumoral (TILs, TIBLs) poate oferi informații prognostice importante. Lucrarea de față investighează atât biomarkerii serici de inflamație, cât și subpopulații de TILs și TIBLs din micromediul tumoral (TME). Scopul tezei este identificarea unor noi ținte moleculare care să permită adaptarea tratamentului oncologic și stabilirea unei atitudini terapeutice individualizate.

Rezultatele cercetării doctorale au fost diseminate sub formă de prezentări orale, de tip e-poster în cadrul Zilelor Universității de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”-ZUMF 2025). Studiile incluse în proiectul de cercetare au fost publicate în reviste de specialitate indexate ISI în quartila 1 (Medicina, Biomedicines și Cancers).

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CCR reprezintă a treia neoplazie ca frecvență la nivel mondial și a doua cauză majoră de mortalitate oncologică. Deși opțiunile terapeutice au evoluat considerabil, rata deceselor rămâne importantă, în special în formele avansate ale bolii. Tumorigeneza în CCR este multifactorială, fiind rezultatul interacțiunii dintre predispoziția genetică și factorii externi precum alimentația sau stilul de viață. Transformarea malignă apare prin acumularea treptată a modificărilor genetice și epigenetice, fiind susținută în principal de instabilitatea cromozomială și de cea microsatelitară.

Având în vedere particularitățile anatomice, embriologice, structurale, genetice, moleculare, imunologice, etiologice și diferențele în metodele de diagnostic și tratament, neoplasmul rectal și cel colonic necesită abordări terapeutice distincte. Managementul chirurgical și oncologic al cancerului rectal este deosebit de complex, dată fiind diversitatea strategiilor terapeutice aplicabile. În ceea ce privește cancerul de colon non-metastatic, intervenția chirurgicală radicală clasică sau minim invazivă, rămâne opțiunea terapeutică principală, fiind completată de tratament adjuvant în situațiile în care caracteristicile anatomo-patologice o impun, pentru eradicarea celulelor tumorale reziduale. Direcțiile actuale de cercetare urmăresc perfecționarea tehnicilor chirurgicale și îmbunătățirea algoritmilor de selecție a pacienților, utilizând date clinice și patologice pentru o stratificare mai precisă a riscului și pentru individualizarea strategiilor terapeutice.

Identificarea biomarkerilor serici dar și a celor tisulari de tipul infiltratului tumoral imun joacă actualmente un rol esențial în stratificarea pacienților în funcție de risc și în orientarea către cele mai adecvate strategii terapeutice. Astfel, eforturi masive de a descoperi noi ținte moleculare capabile să direcționeze conduita terapeutică sunt semnificative. Literatura recentă sugerează că markerii serici ai inflamației sistemice, cum sunt proteinele de fază acută, reprezintă o categorie suplimentară de biomarkeri cu relevanță prognostică în multiple tipuri de neoplazii, inclusiv în tumorile colorectale. Pe de altă parte, micromediul tumoral imun, parte din multiversul TME în CCR cuprinde o serie de tipuri celulare imune care părăsesc torentul sangvin migrând adiacent țesutului tumorii și în interrelație cu celulele tumorale, dintre care menționăm limfocitele T, B, macrofagele, dendrocitele, neutrofilele. Valoarea prognostică și predictivă a subtipurilor de limfocite B și T de la nivelul micromediului tumoral este în continuă cercetare, iar în contextual unei caracterizări imuno-moleculare acurate a CCR, aceste subtipuri limfocitare ar putea deveni ținte moleculare în tratamentele imunoterapice.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Studiul 1: Valoarea preoperatorie a raportului proteină C reactivă/albumină ca biomarker prognostic la pacienții cu cancer de colon

Scop / Obiective: Principalul scop al studiului nostru a fost evaluarea semnificației prognostice a raportului preoperator proteină C reactivă/albumină în cancerul de colon și investigarea corelațiilor acestui raport cu factorii de agresivitate tumorală. Al doilea scop al studiului a fost compararea acurateții raportului proteină C reactivă cu alți biomarkeri de prognostic propuși și studiați deja în literatură, cum ar fi scorul Naples.

Material și metode: Studiul a fost unul observațional, longitudinal, prospectiv, incluzând pacienți diagnosticați cu cancer de colon și tratați chirurgical, curativ între ianuarie 2021 și decembrie 2023. Preoperator au fost recoltate probe sangvine pentru determinarea albuminei, proteinei C reactive și altor biomarkeri necesari calculării raportului proteină C reactivă/albumină (CAR) și scorului Naples. Pacienții au fost monitorizați postoperator prin analize, investigații imagistice și markeri tumorală, evaluându-se supraviețuirea globală și cea fără recidivă. Analizele statistice au fost efectuate folosind curbe ROC, testul Chi-pătrat, t-test și metoda Kaplan–Meier.

Rezultate: 110 pacienți au îndeplinit criteriile de includere și au fost analizați. Valoarea prag optimă a raportului proteină C reactivă/albumină (CAR), determinată prin analiza ROC, a fost 0.4927, pe baza acestora pacienții fiind împărțiți în două grupe: CAR scăzut (82 pacienți) și CAR crescut (28 pacienți). Un CAR preoperator crescut s-a asociat semnificativ statistic cu factori de agresivitate tumorală, precum volumul tumoral mai mare, stadiile T și N avansate, numărul crescut de ganglioni limfatici pozitivi, gradul scăzut de diferențiere tumorală și prezența mai frecventă a depozitelor tumorale în subseroasă, mezenter și țesutul pericolic nonperitonizat. S-a observat o corelație puternică între un CAR crescut și un scor Naples ridicat. Deși pacienții cu CAR crescut au prezentat caracteristici tumorale mai agresive, nu au existat diferențe semnificative statistic între cele două grupe în ceea ce privește supraviețuirea globală sau supraviețuirea fără recidivă la 1 și 2 ani.

Concluzii: Nivelurile serice de proteină C reactivă și albumină sunt ușor decelabile în practica clinică curentă fiind biomarkeri cost eficienți, aspecte care pot contribui la utilizarea raportului proteină C reactivă/albumină, în scop prognostic, la pacienții cu cancer de colon. Un nivel ridicat CAR este asociat cu factori de agresivitate tumorală, însă studii multicentrice sunt necesare pentru a valida rolul prognostic al raportului propus în cadrul studiului nostru.

Studiu 2. Impactul infiltratului tumoral limfocitar cu limfocite B și T în funcție de situsul tumoral: o hartă a imunofenotipării în cancerul de colon

Scop / Obiective: Scopul studiului nostru a fost de a determina expresia unor subtipuri ale TIBLs (CD73+) și ale TILs (CD3+ și CD8+) în micromediul tumoral imun al pacienților cu cancer colic, stabilind densitățile acestor subpopulații la nivelul țesutului tumoral precum și valoarea prognostică a acestora, în funcție de localizarea tumorii primare la nivelul colonului drept, respectiv stâng. De asemenea am cercetat și posibile corelații ale

acestor subtipuri cu factori de agresivitate tumorali clasici. Am considerat faptul că o înțelegere mai profundă a răspunsurilor variabile ale sistemului imunitar în funcție de localizarea tumorii ar putea duce la dezvoltarea unor terapii imunomodulatoare inovative și mai precise.

Material și metode: Am efectuat un studiu observațional longitudinal, retrospectiv pe o serie de pacienți cu cancer de colon în perioada Ianuarie 2022- Decembrie 2024. Am înregistrat date legate de localizarea tumorii primare, vârstă, sex, pTNM, numărul de limfoganglioni excizați, numărul de ganglioni pozitivi, invazia limfatică, venoasă și perineurală, scorul de înmugurire tumorală, prezența celulelor mucinoase și gradul tumoral. Pentru evaluarea morfofopatologică s-au efectuat secțiuni tisulare din blocuri de parafină, în vederea colorației imunohistochemice pentru detectarea markerilor imuni CD3, CD8 și CD73. Pentru scanarea lamelor colorate și achiziția imaginilor s-a utilizat scannerul 3D HISTECH Panoramic, iar pentru analiza morfometrică s-a utilizat software-ul QuPath. S-a calculat de asemenea Immunoscore-ul tumoral. Analizele statistice au fost efectuate folosind curbe ROC, testul Fisher, testul Mann-Whitney U, testul Pearson, precum și metoda Kaplan-Meier și modele de regresie Cox.

Rezultate: 100 de pacienți au fost incluși în analiza finală. Limfocitele CD3+ au fost cele mai abundente exprimate dintre limfocite. Per global, TILs au fost cu densitate mai crescută la nivelul tumorilor de colon drept. Analiza multivariată a corelațiilor între densitatea TILs CD3+ și factorii de agresivitate tumorali în funcție de localizarea tumorală (colon drept versus colon stâng) a demonstrat asociere semnificativă statistic cu stadiul T și invazia perineurală pentru tumorile colice stângi, respectiv între densitatea limfocitelor CD3+ și gradul de diferențiere tumorală pentru tumorile colice drepte. Valoarea prag optimă a fost 15,4 pentru limfocitele CD3+, 7,05 pentru CD8+ și 9,7 pentru CD73+. Pe baza valorilor de cut-off obținute, 61,2% dintre pacienți cu tumori de colon drept au avut densități crescute de limfocite CD3+, în timp ce 58,8% dintre pacienții cu tumori de colon stâng au avut densități scăzute ale limfocitelor CD3+. Analiza statistică a demonstrat o asociere semnificativă între densități crescute ale limfocitelor T CD3+ și tumorile colice drepte. Nu a fost observată o asociere semnificativă statistic între valorile CD8+ și localizarea tumorală. 60,41% dintre pacienții cu tumori colice drept au demonstrat densități crescute ale limfocitelor B CD73+, în timp ce 61,53% dintre pacienții cu tumori colice stângi au avut densități scăzute ale limfocitelor B CD73+. Analiza corelației între celulele CD3+ și factorii de agresivitate histopatologici tumorali în funcție de localizarea tumorală a demonstrat asociere semnificativă statistic între stadiul N ridicat și densități scăzute ale limfocitelor CD3+ la pacienții cu tumori colice stângi și respectiv invazie perineurală crescută și densitate scăzută a limfocitelor CD3+ pentru pacienții cu tumori colice stângi. Mai mult decât atât, o densitate scăzută a limfocitelor CD8+ a fost asociată cu un stadiu tumoral T mai crescut la pacienții cu cancer colic stâng.

Concluzii: Acest studiu demonstrează că diferite subpopulații celulare imune își pot schimba gradual caracteristicile în diferite segmente colice afectate tumoral. Rezultatele noastre indică faptul că localizarea tumorii primare este un factor important de luat în considerare în contextul evaluării TILS și TIBLs la pacienții cu cancer colic. Diferențele dintre micromedii pot reflecta variații ale răspunsului la imunoterapie, subliniind complexitatea interacțiunilor dintre componenta tumorală și infiltratul imun, precum și necesitatea tot mai evidentă a unei abordări terapeutice individualizate, bazate pe caracteristicile specifice ale fiecărui caz.

Studiul 3. Rolul infiltratului tumoral limfocitar B în micromediul tumoral al pacienților cu cancer colorectal: un review sistematic al evoluției peisajului imunitar

Scop / Obiective: Acest review sistematic și-a propus să identifice și să evalueze studiile referitoare la tipurile și funcțiile TIBLs în CCR. Studiul nostru s-a concentrat nu doar asupra rolului limfocitelor B în TME, ci și asupra prezenței și funcției acestora în cadrul structurilor limfoide terțiare (TLS), care reprezintă un compartiment specializat al microambientului tumoral. Acest studiu și-a propus să clarifice interacțiunile precise dintre TIBL și componentele celulare adiacente din TME, precum și să evalueze semnificația lor prognostică și predictivă.

Material și metode: A fost realizată o revizuire sistematică în conformitate cu ghidurile PRISMA și înregistrată în PROSPERO, vizând literatura publicată între 2000 și 2025 referitoare la TIBL în CCR. Căutarea a inclus bazele de date PubMed, Embase și Cochrane Library. Calitatea studiilor și riscul de bias au fost apreciate independent prin instrumentul QUIPS.

Rezultate: 32 de lucrări originale au fost incluse. Subpopulațiile de celule B din microambientul tumoral colorectal au prezentat o heterogenitate fenotipică semnificativă, cu implicații pentru progresia bolii și prognostic. Plasmoblastele și celulele plasmatică au prezentat variații ale markerilor CD20, CD138 și CD73, sugerând roluri distincte în imunitatea antitumorală. Un subtip recent identificat, celulele plasmatică imature alfa au fost asociate cu metastazele hepatice, având potențial rol de biomarker de progresie. Celulele B de memorie și cele cu schimbare de clasă, abundente în TME, au exprimat CD73 ridicat și au influențat răspunsul imun local. Celulele B naive, distribuite diferit între țesutul tumoral și cel normal adiacent, au fost corelate semnificativ cu prognosticul pacienților. În ansamblu, expresia diversă a markerilor (CD20, CD19) a reflectat complexitatea rețelei celulelor B și rolurile lor variabile în evoluția CCR. Majoritatea studiilor au arătat că infiltrarea crescută a TIBL este asociată cu un prognostic favorabil în CCR. Subtipurile CD19⁺, CD20⁺, CD73⁺, celulele B naive și cele de memorie s-au corelat frecvent cu supraviețuirea prelungită, deseori în cooperare cu limfocitele T CD8⁺. Densitatea structurilor limfoide terțiare, în special a TLS-urilor

mature și intratumorale, au constituit un puternic indicator prognostic, fiind asociată cu supraviețuire îmbunătățită. Niveluri ridicate de limfocite B infiltrante (TIBL), în special CD19⁺ și CD20⁺, au fost în general asociate cu stadii TNM mai scăzute, invazie limfo-vasculară și perineurală redusă, absența metastazelor și prognostic favorabil în cancerul colorectal. Densitățile mai mari de TLS și organizarea limfocitelor B în agregate au corespuns, de asemenea, cu stadii tumorale incipiente și rezultate clinice mai bune. În contrast, expresia crescută a CD73 s-a corelat cu caracteristici adverse și prognostic nefavorabil, evidențiind heterogenitatea rolului celulelor B în TME. TLS mature au influențat pozitiv răspunsul la imunoterapie în cancerul colorectal, fiind asociate cu instabilitate ridicată a microsateleliilor și activitate proliferativă în centrele germinale. Totuși, expresia crescută a CD73 a limitat eficacitatea imunoterapiei în tumori cu deficit de MMR, indicând un rol heterogen al celulelor B în modularea răspunsului imun. Celulele B au jucat un rol central în maturarea TLS și în amplificarea răspunsului imun antitumoral local. Studiile au demonstrat că localizarea și distribuția celulelor B în cancerul colorectal influențează răspunsul imun. Celulele B s-au identificat predominant în stroma peritumorală și în TLS, cu densitate mai mare în colonul drept și rect. Acestea au interacționat cu celule T, macrofage și alte celule imune, formând clustere imune, în special în stadiile incipiente, contribuind la răspunsurile imune antitumorale. Tratamentul neoadjuvant a influențat densitatea TIBL, în general, chimioterapia neoadjuvantă scăzând densitatea celulelor B și a altor celule imune supresoare, în paralel cu creșterea densității celulelor T CD8⁺.

Concluzii: Acest review sistematic a identificat un rol prognostic favorabil al densității ridicate de TIBL la pacienții cu CCR. Variațiile în distribuția spațială a micromediului imun tumoral, precum și modificările în densitatea TIBL, influențează, de asemenea, prognosticul, evidențiind complexitatea „multiversului” celular al TME. Metodele standardizate de raportare și cuantificare a TIBL ar trebui să fie luate în considerare în studiile viitoare pentru a obține concluzii mai robuste. Integrarea metricilor spațiale și a caracterizării funcționale a celulelor B în cercetările viitoare poate permite identificarea unor biomarkeri noi, specifici țesutului, pentru a ghida mai eficient deciziile terapeutice.

CONCLUZII GENERALE

Obiectivul acestei cercetări doctorale a fost determinarea unor biomarkeri serici și tisulari cu valoare prognostică și predictivă capabili să identifice pacienții cu CCR cu risc crescut, pentru a permite optimizarea strategiilor terapeutice și implementarea unor abordări de tratament personalizate. Realizarea celor trei articole a adus contribuții semnificative la înțelegerea biomarkerilor predictivi și prognostici în CCR. Studiul raportului PCR/albumină a evidențiat importanța inflamației sistemice ca

indicator prognostic simplu și accesibil, oferind o metodă suplimentară de stratificare a pacienților cu risc crescut. Cercetarea subtipurilor de limfocite T și B în funcție de localizarea anatomică a tumorii a demonstrat diferențele imunologice între colonul drept și cel stâng, subliniind relevanța TME în evoluția bolii și răspunsul imun local. De asemenea, investigarea rolului limfocitelor B ca factori prognostici și predictivi a adus date noi într-un domeniu dominat în principal de studii asupra limfocitelor T, evidențiind contribuția semnificativă a compartimentului B la evoluția CCR. Împreună, aceste articole oferă o abordare integrată asupra biomarkerilor inflamatori și imunologici, punând în evidență atât valoarea practică a unor markeri ușor accesibili, cât și importanța evaluării detaliate a micromediului tumoral. Ele contribuie la consolidarea cunoștințelor necesare pentru identificarea pacienților cu risc crescut și pentru dezvoltarea unor strategii terapeutice personalizate, deschizând noi perspective de cercetare în imunologia tumorilor colorectale.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE CERCETĂRII DOCTORALE

Originalitatea tezei rezidă în abordarea integrată și multidimensională a unor biomarkeri insuficient explorați în CCR. Studiul privind raportul PCR/albumină aduce o contribuție inovatoare prin evaluarea unui marker inflamator simplu, accesibil și economic, cu potențial de a îmbunătăți stratificarea prognostică a pacienților. Cercetarea dedicată subtipurilor de limfocite T și B în funcție de localizarea anatomică a tumorii reprezintă o perspectivă originală, evidențiind modul în care TME variază între colonul drept și stâng și influențează răspunsul imun local.

În plus, analiza rolului limfocitelor B ca factori prognostici în CCR aduce date noi într-un domeniu în care majoritatea studiilor sunt axate predominant pe limfocitele T, subliniind contribuția esențială a compartimentului imun B la evoluția bolii. Imunoterapia, prin utilizarea diversilor agenți terapeutici cum ar fi anticorpilor monoclonali, inhibitorii punctelor de control imun, terapiile celulare adoptive și vaccinurile anti-tumorale de nouă generație – a generat noi perspective terapeutice pentru tratamentul cancerelor colorectale avansate, cu prognostic rezervat, care dezvoltă rezistență la terapiile convenționale. Cu toate acestea, heterogenitatea intra și intertumorală contribuie la limitarea eficacității acestor tratamente. Pacienții care prezintă un fenotip tumoral similar pot manifesta răspunsuri diferite la același protocol de imunoterapie. Subtiparea moleculară, clasificările bazate pe profilul mutațional și, nu în ultimul rând, imunoscoring-ul pacienților cu cancer colorectal pot facilita o stratificare complexă și pot contribui la optimizarea răspunsului terapeutic. Împreună, aceste articole oferă o perspectivă originală asupra biomarkerilor inflamatori și imunologici, cu potențial direct de aplicare în medicina personalizată.

SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS

Analysis of serum biomarkers and the tumor microenvironment in colorectal cancer

PhD candidate: **Giorgiana AMARINEI (FĂGĂRĂȘAN)**

Doctoral supervisor: **Prof. Dr. George DINDELEGAN**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS

INTRODUCTION	1
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	5
1. Colorectal cancer.....	7
1.1.Epidemiology.....	8
1.2.Etiology.....	9
1.3.Diagnostic and staging methods.....	12
1.4.Treatment principles.....	14
2. Inflammatory serum biomarkers in colorectal cancer.....	19
2.1. C Reactive Protein.....	20
2.2. Albumin.....	21
3. Tumor microenvironment in colorectal cancer.....	22
PERSONAL CONTRIBUTION	27
4. Aim and objectives.....	29
5. General methodology.....	29
6. Study 1. The value of preoperative C-reactive protein to albumin ratio as a prognostic biomarker in colon cancer patients.....	31
6.1. Introduction.....	31
6.2. Objectives.....	32
6.3. Materials and methods.....	32
6.4. Results.....	34

6.5. Discussions.....	40
6.6. Conclusions.....	42
7. Study 2. B and T tumor-infiltrating lymphocyte subtypes according to subsite: a colon cancer immunophenotyping map.....	43
7.1. Introduction.....	43
7.2. Objectives.....	45
7.3. Materials and methods.....	45
7.4. Results.....	51
7.5. Discussions.....	60
7.6. Conclusions.....	64
8. Study 3. The role of tumor-infiltrating B lymphocytes in colorectal cancer patients: a systematic review of immune landscape evolution.....	65
8.1. Introduction.....	65
8.2. Objectives.....	66
8.3. Materials and methods.....	67
8.4. Results.....	69
8.5. Discussions.....	90
8.6. Conclusions.....	92
9. General conclusions.....	95
10. Originality and scientific contributions of the doctoral thesis.....	97
REFERENCES.....	99
Keywords: colorectal cancer, albumin, C reactive protein, TILs, TIBLs	

LIST OF PUBLICATIONS

Articles published *in extenso* during the doctoral research

1. Făgărășan G, Seicean R, Bințișan V, Făgărășan V, Caziuc A, Andraș D, Chira L, Dindelegan G. The Value of Preoperative C-Reactive Protein to Albumin Ratio as a Prognostic Biomarker in Colon Cancer Patients. *Medicina* (Kaunas). 2024 Jun 27;60(7):1054. doi: 10.3390/medicina60071054. PMID: 39064483; PMCID: PMC11278571. *ISI Q1 Impact factor JCR₂₀₂₄ – 2.8 (study included in chapter 6)*.
2. Făgărășan G, Gheban BA, Făgărășan V, Crișan D, Telecan T, Bințișan VV, Seicean RI, Caziuc A, Dindelegan GC. B and T Tumor-Infiltrating Lymphocyte Subtypes According to Subsite: A Colon Cancer Immunophenotyping Map. *Biomedicines*. 2025 Nov 23;13(12):2856. doi: 10.3390/biomedicines13122856. PMID: 41462871; PMCID: PMC12730879. *ISI Q1 Impact factor JCR₂₀₂₅ – 4.05 (study included in chapter 7)*.
3. Făgărășan G, Făgărășan V, Bințișan VV, Dindelegan GC. The Role of Tumor-Infiltrating B Lymphocytes in Colorectal Cancer Patients: A Systematic Review of Immune Landscape Evolution. *Cancers* (Basel). 2025 Sep 13;17(18):2996. doi: 10.3390/cancers17182996. PMID: 41008839; PMCID: PMC12468775. *ISI Q1 Impact factor JCR_{2025i} – 4.4 (study included in chapter 8)*.

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is a heterogeneous disease with a complex pathogenesis and high mortality in advanced stages, despite therapeutic advances. The management of colorectal cancer involves distinct strategies, ranging from radical surgery to radiochemotherapy, chemotherapy, and total neoadjuvant therapy, depending on disease stage and tumor characteristics. The role of serum and tissue biomarkers is becoming essential for risk stratification and treatment personalization. Inflammation and immune response play a major role in tumorigenesis, and the study of inflammatory proteins and tumor-infiltrating immune cells—T and B cells (TILs, TIBLs)—can provide important prognostic information.

The present work investigates both serum inflammatory biomarkers and subpopulations of TILs and TIBLs within the tumor microenvironment (TME). The aim of the thesis is to identify new molecular targets that would enable the adaptation of oncologic treatment and the establishment of an individualized therapeutic approach. The results of the doctoral research were disseminated through oral presentations and e-poster presentations at the “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy Days (ZUMF 2025). The studies included in the research project were published in ISI-indexed specialty journals in quartile 1 (*Medicina*, *Biomedicines*, and *Cancers*).

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

CRC represents the third most frequent neoplasm worldwide and the second leading cause of cancer-related mortality. Although therapeutic options have evolved considerably, the death rate remains significant, particularly in advanced stages of the disease. Tumorigenesis in CRC is multifactorial, resulting from the interaction between genetic predisposition and external factors such as diet or lifestyle. Malignant transformation occurs through the gradual accumulation of genetic and epigenetic alterations, mainly driven by chromosomal instability and microsatellite instability. Considering the anatomical, embryological, structural, genetic, molecular, immunological, and etiological particularities, as well as the differences in diagnostic and treatment methods, rectal and colonic neoplasms require distinct therapeutic approaches. The surgical and oncologic management of rectal cancer is particularly complex due to the diversity of applicable therapeutic strategies. Regarding non-metastatic colon cancer, classical or minimally invasive radical surgery remains the main therapeutic option, supplemented by adjuvant treatment when anatomopathological characteristics suggest, in order to eradicate residual tumor cells. Current research directions focus on refining surgical techniques and improving patient selection algorithms, using clinical and pathological data to achieve more precise risk stratification and to individualize therapeutic strategies.

The identification of serum biomarkers, as well as tissue biomarkers such as tumor immune infiltrates, currently plays an essential role in patient risk stratification and in guiding the selection of the most appropriate therapeutic strategies. Consequently, extensive efforts are being made to discover new molecular targets capable of directing therapeutic decision-making. Recent literature suggests that serum markers of systemic inflammation, such as acute-phase proteins, represent an additional category of biomarkers with prognostic relevance in multiple types of neoplasms, including colorectal tumors.

On the other hand, the immune tumor microenvironment, as part of the TME multiverse in CRC, includes a variety of immune cell types that leave the bloodstream and migrate adjacent to tumor tissue, interacting with tumor cells. These include T and B lymphocytes, macrophages, dendritic cells, and neutrophils. The prognostic and predictive value of B- and T-lymphocyte subtypes within the tumor microenvironment is under continuous investigation, and within the context of accurate immuno-molecular characterization of CRC, these lymphocyte subtypes may become molecular targets in immunotherapeutic treatments.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

Study 1: The Value of Preoperative C-Reactive Protein to Albumin Ratio as a Prognostic Biomarker in Colon Cancer Patients

Background and Objectives: The primary aim of our study was to evaluate the prognostic significance of the preoperative C-reactive protein/albumin ratio in colon cancer and to investigate the correlations of this ratio with tumor aggressiveness factors. The secondary aim of the study was to compare the accuracy of the C-reactive protein/albumin ratio with other prognostic biomarkers that have already been proposed and studied in the literature, such as the Naples score.

Materials and methods: The study was observational, longitudinal, and prospective, including patients diagnosed with colon cancer who underwent curative surgical treatment between January 2021 and December 2023. Preoperatively, blood samples were collected to determine albumin, C-reactive protein, and other biomarkers required for calculating the C-reactive protein/albumin ratio (CAR) and the Naples score. Patients were monitored postoperatively through laboratory tests, imaging investigations, and tumor markers, with overall survival and disease-free survival being assessed. Statistical analyses were performed using ROC curves, the Chi-square test, the t-test, and the Kaplan–Meier method.

Results: A total of 110 patients met the inclusion criteria and were analyzed. The optimal cutoff value of the C-reactive protein/albumin ratio (CAR), determined by ROC analysis, was 0.4927; based on this value, patients were divided into two groups: low CAR (82 patients) and high CAR (28 patients). An elevated preoperative CAR was statistically associated with tumor aggressiveness factors, such as larger tumor volume, advanced T and N stages, a higher number of positive lymph nodes, poor tumor differentiation, and a more frequent presence of tumor deposits in the subserosa, mesentery, and non-peritonealized pericolic tissue. A strong correlation was observed between elevated CAR and a high Naples score.

Although patients with high CAR exhibited more aggressive tumor characteristics, no statistically significant differences were found between the two groups regarding overall survival or disease-free survival at 1 and 2 years.

Conclusions: Serum levels of C-reactive protein and albumin are easily measurable in routine clinical practice and represent cost-effective biomarkers, which may contribute to the use of the C-reactive protein/albumin ratio for prognostic purposes in patients with colon cancer. A high CAR level is associated with tumor aggressiveness factors, however, multicenter studies are required to validate the prognostic role of the ratio proposed in our study.

Study 2. B and T Tumor-Infiltrating Lymphocyte Subtypes According to Subsite: A Colon Cancer Immunophenotyping Map.

Background and Objectives: The aim of our study was to determine the expression of certain TIBL subtypes (CD73+) and TIL subtypes (CD3+ and CD8+) within the immune tumor microenvironment of patients with colon cancer, by establishing the densities of these subpopulations in tumor tissue as well as their prognostic value, according to the location of the primary tumor in the right versus the left colon. We also investigated possible correlations between these subtypes and tumor aggressiveness factors. We considered that a deeper understanding of the variable immune system responses depending on tumor location could lead to the development of innovative, targeted, and more precise immunomodulatory therapies.

Materials and methods: We conducted a longitudinal, retrospective, observational study on a series of patients with colon cancer between January 2022 and December 2024. Data regarding the location of the primary tumor, age, sex, pTNM stage, number of excised lymph nodes, number of positive lymph nodes, lymphatic, venous, and perineural invasion, tumor budding score, presence of mucinous cells, and tumor grade were recorded. For morphopathological evaluation, tissue sections were obtained from paraffin blocks for immunohistochemical staining to detect the immune markers CD3, CD8, and CD73. The stained slides were scanned and images acquired using the 3D HISTECH Panoramic scanner, and morphometric analysis was performed using QuPath software. The tumor Immunoscore was also calculated. Statistical analyses were performed using ROC curves, Fisher's test, the Mann-Whitney U test, Pearson's test, as well as the Kaplan-Meier method and Cox regression models.

Results: A total of 100 patients were included in the final analysis. CD3+ lymphocytes were the most abundantly expressed among the lymphocytes. Overall, TILs showed higher density in right-sided colon tumors. Multivariate analysis of the correlations between CD3+ TIL density and tumor aggressiveness factors, according to tumor location (right versus left colon), demonstrated a statistically significant association with T stage and perineural invasion for left-sided colon tumors, and between CD3+ lymphocyte density and tumor differentiation grade for right-sided colon tumors. The optimal cutoff values were 15.4 for CD3+ lymphocytes, 7.05 for CD8+, and 9.7 for CD73+. Based on these cutoff values, 61.2% of patients with right-sided colon tumors had high CD3+ lymphocyte densities, while 58.8% of patients with left-sided colon tumors had low CD3+ lymphocyte densities.

Statistical analysis demonstrated a significant association between increased CD3+ T lymphocyte densities and right-sided colon tumors. No statistically significant association was observed between CD8+ values and tumor location. Among patients with right-sided colon tumors, 60.41% exhibited high CD73+ B lymphocyte densities,

while 61.53% of patients with left-sided colon tumors had low CD73+ B lymphocyte densities. Correlation analysis between CD3+ cells and histopathological tumor aggressiveness factors, according to tumor location, showed a statistically significant association between high N stage and low CD3+ lymphocyte density in patients with left-sided colon tumors, and between increased perineural invasion and low CD3+ lymphocyte density in patients with left-sided colon tumors. Furthermore, low CD8+ lymphocyte density was associated with higher T stage in patients with left-sided colon cancer.

Conclusions: This study demonstrates that different immune cell subpopulations can gradually change their characteristics in various colon segments affected by tumors. Our results indicate that the location of the primary tumor is an important factor to consider when evaluating TILs and TIBLs in patients with colon cancer. Differences between the microenvironments may reflect variations in response to immunotherapy, highlighting the complexity of interactions between the tumor component and the immune infiltrate, as well as the increasing need for an individualized therapeutic approach based on the specific characteristics of each case.

Study 3. The Role of Tumor-Infiltrating B Lymphocytes in Colorectal Cancer Patients: A Systematic Review of Immune Landscape Evolution

Background and Objectives: This systematic review aimed to identify and evaluate studies related to the types and functions of TIBLs in CRC. Our study focused not only on the role of B lymphocytes in the TME but also on their presence and function within tertiary lymphoid structures (TLS), which represent a specialized compartment of the tumor microenvironment. This study sought to clarify the precise interactions between TIBLs and adjacent cellular components within the TME, as well as to assess their prognostic and predictive significance.

Materials and methods: A systematic review was conducted in accordance with PRISMA guidelines and registered in PROSPERO, covering the literature published between 2000 and 2025 on TIBLs in CRC. The search included PubMed, Embase, and Cochrane Library databases. Study quality and risk of bias were independently assessed using the QUIPS tool.

Results: A total of 32 original studies were included. B cell subpopulations within the colorectal tumor microenvironment exhibited significant phenotypic heterogeneity, with implications for disease progression and prognosis. Plasmablasts and plasma cells showed variations in CD20, CD138, and CD73 markers, suggesting distinct roles in antitumor immunity. A recently identified subtype, immature alpha plasma cells, was associated with liver metastases and may serve as a potential progression biomarker. Memory B cells and class-switched B cells, abundant in the TME, expressed high levels of CD73 and influenced the local immune response. Naive B cells, differently distributed

between tumor tissue and adjacent normal tissue, were significantly correlated with patient prognosis. Overall, the diverse expression of markers (CD20, CD19) reflected the complexity of the B cell network and their variable roles in CRC progression. Most studies showed that increased TIBL infiltration is associated with a favorable prognosis in CRC. Subtypes such as CD19⁺, CD20⁺, CD73⁺, naive B cells, and memory B cells were frequently correlated with prolonged survival, often in cooperation with CD8⁺ T lymphocytes. The density of tertiary lymphoid structures, particularly mature and intratumoral TLSs, served as a strong prognostic indicator, being associated with improved survival. High levels of tumor-infiltrating B lymphocytes (TIBLs), especially CD19⁺ and CD20⁺, were generally associated with lower TNM stages, reduced lymphovascular and perineural invasion, absence of metastases, and a favorable prognosis in colorectal cancer. Higher TLS densities and the organization of B lymphocytes into aggregates also corresponded with early tumor stages and better clinical outcomes. In contrast, high CD73 expression was correlated with adverse features and poor prognosis, highlighting the heterogeneity of B cell roles in the TME. Mature TLS positively influenced the response to immunotherapy in colorectal cancer, being associated with high microsatellite instability and proliferative activity in germinal centers. However, high CD73 expression limited the effectiveness of immunotherapy in MMR-deficient tumors, indicating a heterogeneous role of B cells in modulating the immune response. B cells played a central role in TLS maturation and in amplifying the local antitumor immune response. Studies showed that the location and distribution of B cells in colorectal cancer influence the immune response. B cells were predominantly identified in the peritumoral stroma and in TLS, with higher density in the right colon and rectum. They interacted with T cells, macrophages, and other immune cells, forming immune clusters, particularly in early stages, contributing to antitumor immune responses.

Conclusions: This systematic review identified a favorable prognostic role of high TIBL density in patients with CRC. Variations in the spatial distribution of the immune TME, as well as changes in TIBL density, also influence prognosis, highlighting the complexity of the cellular “multiverse” of the microenvironment. Standardized methods for quantifying TIBLs should be considered in future studies to obtain more robust conclusions. Integrating spatial metrics and functional characterization of B cells in future research may enable the identification of novel, tissue-specific biomarkers to more effectively guide therapeutic decisions.

GENERAL CONCLUSIONS

The objective of this research was to identify serum and tissue biomarkers with prognostic and predictive value, capable of identifying CRC patients at high risk, in order

to optimize therapeutic strategies and implement personalized treatment approaches. The study on the CRP/albumin ratio highlighted the importance of systemic inflammation as a simple and accessible prognostic indicator, providing an additional method for stratifying high-risk patients. The investigation of T and B lymphocyte subtypes according to the location of the tumor demonstrated immunological differences between the right and left colon, highlighting the relevance of the TME in disease progression and local immune response. Furthermore, the study of B lymphocytes as prognostic and predictive factors provided new data in a field primarily dominated by studies on T lymphocytes, underscoring the significant contribution of the B cell compartment to CRC progression. Together, these studies provide an integrated approach to inflammatory and immunological biomarkers, emphasizing both the practical value of easily accessible markers and the importance of detailed evaluation of the tumor microenvironment. They contribute to consolidating the knowledge necessary for identifying high-risk patients and developing personalized therapeutic strategies, opening new avenues for research in colorectal tumor immunology and clinical application.

ORIGINALITY AND SCIENTIFIC CONTRIBUTIONS OF THE DOCTORAL THESIS

The originality of the thesis lies in the integrated and multidimensional approach to biomarkers that have been insufficiently explored in CRC. The study on the CRP/albumin ratio provides an innovative contribution by evaluating a simple, accessible, and cost-effective inflammatory marker with the potential to improve prognostic stratification of patients. The research dedicated to T and B lymphocyte subtypes according to the location of the tumor represents an original perspective, highlighting how the TME varies between the right and left colon and influences the local immune response. Furthermore, the analysis of TIBLs as prognostic factors in CRC provides new data in a field where most studies predominantly focus on TILs, highlighting the contribution of the B cell immune compartment to disease progression. Immunotherapy, through the use of various therapeutic agents such as monoclonal antibodies, immune checkpoint inhibitors, adoptive cell therapies, and next-generation anti-tumor vaccines, has generated new therapeutic perspectives for the treatment of advanced colorectal cancers with poor prognosis that develop resistance to conventional therapies. However, intra- and intertumoral heterogeneity contributes to the limited efficacy of these treatments. Patients with similar tumor phenotypes may exhibit different responses to the same immunotherapy protocol. Molecular subtyping, mutation-based classifications, and immunoscore assessment in CRC patients can enable complex stratification and help optimize therapeutic response.

Together, these articles provide an original perspective on inflammatory and immunological biomarkers, with direct potential application in personalized medicine.