

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL II - MORFOLOGIE MICROSCOPICĂ**

POPA P. AURA



TEZĂ DE DOCTORAT -REZUMAT-

**CONTRIBUȚII LA EVALUAREA UNOR FACTORI DE
PROGNOSTIC CLASICI ȘI MODERNI ÎN CARCINOAMELE
COLORECTALE**

Conducător Științific
PROF. UNIV. DR. DEMA ALIS LILIANA CARMEN

**Timișoara
2020**

CUPRINS

Lista lucrărilor publicate	VI
Lista abrevierilor.....	VII
Indexul figurilor.....	IX
Indexul tabelelor.....	XI
Mulțumiri	XIII
INTRODUCERE.....	XV
 PARTEA GENERALĂ	 1
1. Particularități clinico-epidemiologice și etiopatogenice ale cancerului colorectal	 1
1.1. Definiția cancerului colorectal	1
1.2. Epidemiologia cancerului colorectal.....	1
1.3. Etiopatogeneza cancerului colorectal	2
1.3.1. Factori de risc în CCR	3
1.3.2. Factori protectori în CCR	7
1.3.3. Patogeneza CCR.....	8
2. Aspecte macroscopice și microscopice în carcinoamele colorectale	10
2.1. Aspecte macroscopice	10
2.2. Subtipurile histologice.....	11
2.2.1. Adenocarcinomul NOS (Not Otherwise Specified)	11
2.2.2. Adenocarcinomul mucinos.....	11
2.2.3. Carcinomul cu celule „în inel cu pecete”	12
2.2.4. Carcinomul medular.....	12
2.2.5. Adenocarcinomul serat	12
2.2.6. Adenocarcinomul micropapilar.....	12
2.2.7. Adenocarcinomul adenoma-like.....	13
2.2.8. Carcinomul scuamos și adenoscuamos.....	13
2.2.9. Carcinoamele cu componentă sarcomatoidă	13
2.2.10. Carcinomul nediferențiat.....	14
2.3. Gradul de diferențiere al tumorii	14
2.4. Stadializarea TNM.....	15
2.4.1. Parametrul T	15
2.4.2. Parametrul N	17
2.4.3. Parametrul M.....	17
3. Factori de prognostic în cancerul colorectal	18
3.1. Stadiul TNM al bolii	18
3.1.1. Extensia tumorală (pT)	19
3.1.2. Statusul limfonodurilor regionali (pN)	20
3.1.3. Prezența metastazelor la distanță (M).....	20
3.1.4. Depozitele tumorale.....	21
3.1.5. Micrometastazele limfonodale	21
3.2. Tipul histologic	22
3.3. Gradul histologic.....	23
3.4. Invazia limfo-vasculară	24
3.5. Invazia perineurală	25

3.6. Tumor budding (TB) și poorly differentiated clusters (PDCs)	25
3.7. Configurația frontului de invazie a tumorii	28
3.8. Răspunsul imun.....	28
3.9. Reacția desmoplazică	30
3.10. Statusul marginilor de rezecție chirurgicală	30
3.11. Tumora reziduală	32
3.12. Regresia tumorii după terapia neoadjuvantă	32
3.13. Necroza tumorală	33
3.14. Densitatea microvasculară intratumorală.....	33
3.15. Nivelul antigenului carcinoembrionic (CEA)	33
3.16. Simptomatologia, obstrucția și perforația	34
3.17. Localizarea tumorilor, sexul și vârsta pacienților.....	34
3.18. Markerii moleculari	36
3.19. Instabilitatea microsatelitară	37
 PARTEA SPECIALĂ	 38
MOTIVAȚIA ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI DOCTORAL	38
1. Evaluarea parametrilor demografici și clinico-morfologici din perspectiva conturării profilului pacienților/tumorilor maligne colorectale din zona de vest a României.....	40
1.1. Scopul studiului	40
1.2. Materialul de studiu și metodele de lucru	40
1.3. Rezultate	43
1.3.1. Evaluarea distribuției pe ani și a principalelor caracteristici demografice și clinico-morfologice ale CCR	43
1.3.2. Evaluarea principalelor caracteristici demografice și clinico- morfologice ale cazurilor cu tumori sincrone colorectale	48
1.3.3. Analiza principalilor parametri clinico-morfologici în CCR, subtipul convențional (adenocarcinom NOS).....	52
1.3.4. Analiza principalilor parametri clinico-morfologici în adenocarcinoamele mucinoase colorectale	61
1.4. Discuții	66
1.5. Concluzii.....	71
2. Contribuții la evaluarea unor factori de prognostic noi în carcinoamele colorectale	73
2.1. Evaluarea unor parametri morfologici suplimentari în CCR	73
2.1.1. Scopul și motivația studiului.....	73
2.1.2. Materialul de studiu și metodele de lucru	74
2.1.3. Rezultate	76
2.1.4. Discuții.....	81
2.1.5. Concluzii	85
2.2. Contribuții la evaluarea tumor budding (TB) ÎN CCR	86
2.2.1. Scopul și motivația studiului.....	86
2.2.2. Materialul de lucru și metodele de studiu	87
2.2.3. Rezultate	90
2.2.4. Discuții.....	97
2.2.5. Concluzii.....	105

2.3. Contribuții la evaluarea poorly differentiated clusters (PDCs) în CCR.....	
2.3.1. Scopul și motivația studiului.....	106
2.3.2. Materialul de lucru și metodele de studiu	107
2.3.3. Rezultate	108
2.3.4. Discuții.....	110
2.3.5. Concluzii.....	114
CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PROPRII	115
BIBLIOGRAFIE	120
ANEXE	I

Cuvinte cheie: cancer colorectal, evaluare, factori prognostici, tumor budding (TB), poorly differentiated clusters (PDCs), patologie digitală.

INTRODUCERE

CCR rămâne, în continuare, o problemă de sănătate publică. Acesta se situează pe primul loc între cancerele din sfera gazo-intestinală (1)(2) și reprezintă, în general, a doua cauza de deces prin cancer (3). Incidența CCR este în creștere la ambele sexe, la bărbați reprezintă al treilea cel mai frecvent tip de cancer, după cancerul bronhopulmonar și cel de prostată, iar la femei se situează pe locul al doilea, după cancerul mamar (3)(4).

În unele țări dezvoltate, prin reducerea acțiunii unor factori de risc, implementarea programelor de screening, îmbunătățirea tehnicilor imagistice și chirurgicale s-a înregistrat o scădere a incidenței CCR și a mortalității prin această boală (5). Cu toate acestea, în Australia și în Statele Unite ale Americii (SUA), din motive necunoscute, ratele de incidență a CCR la adulții tineri, sub 50 de ani, sunt în creștere (5)(6). În țările cu mai puține resurse, CCR prezintă rate crescute ale incidenței și mortalității (7)(8).

Conform statisticilor Globocan pentru România, în anul 2018, incidența CCR a fost de 13.3% (11.076 cazuri noi), fiind al doilea cancer ca incidență atât la bărbați, cât și la femei și al treilea ca mortalitate pentru ambele sexe (8). La noi în țară, din cauza simptomatologiei tardive, pacienții se prezintă la medic cel mai adesea în stadii avansate ale bolii (8)(9). Diagnosticarea bolii în stadiu avansat este în strânsă relație cu statusul socio-economic scăzut, accesul limitat la servicii medicale complexe de diagnostic și tratament, cu lipsa de informare și lipsa educației pentru sănătate a unor pacienți. O altă cauză a diagnosticului CCR în faze tardive o reprezintă lipsa programelor de screening la nivelul populației și al indivizilor cu risc ridicat, prin care s-ar detecta și elimina leziunile precursore și/sau cancerul în stadii incipiente.

Identificarea factorilor prognostici, care oferă o viziune asupra severității bolii, reprezintă o preocupare majoră în domeniul cercetării oncologice în zilele noastre. Stadiul TNM (Tumor, Node, Metastasis), apreciat după sistemul recomandat de The American Joint Committee on Cancer/ The Union for International Cancer Control (AJCC/UICC), reprezintă cel mai important factor prognostic în CCR, ghidând opțiunile terapeutice în practica clinică (1). Această clasificare sintetizează datele privind extensia locală a tumorii (T), statusul limfonodulilor regionali (N) și prezența metastazelor la distanță (M) (10). Totuși, valoarea acestui parametru este discutabilă, având în vedere existența unor studii care demonstrează o variabilitate apreciabilă a evoluției clinice pentru pacienții cu CCR în același stadiu al bolii (11). În plus, unele cazuri cu CCR de stadiu I/II evoluează agresiv, în timp ce o proporție de pacienți cu CCR de stadiu III au o evoluție favorabilă (12). Prin urmare, decelarea unor factori care să îmbunătățească selecția pacienților cu CCR, în vederea unei terapii adecvate, cu evitarea supra- sau subtratării unor cazuri, reprezintă o necesitate.

În acest context, la nivel mondial există o preocupare intensă pentru identificarea, validarea și implementarea unor parametri noi care să permită anticiparea evoluției pacienților cu CCR și predicția răspunsului la terapie.

MOTIVAȚIA ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI DOCTORAL

Am realizat acest studiu doctoral având în vedere că factorii prognostici și predictivi identificați până în prezent nu oferă date suficiente pentru stratificarea acurată a pacienților cu CCR în grupe de risc cu tratament adaptat. Am pornit de la premisa că prin interpretarea histopatologică mai complexă și completă a biopsiilor și pieselor chirurgicale se pot identifica noi parametri/markeri care să prezică riscul de recidivă sau de evoluția agresivă a bolii. Prin urmare, mi-am propus să analizez, pe lângă factorii clasici de prognostic, o serie de parametri morfologici mai puțin cunoscuți și/sau raportați, unii descoperiți mai recent în CCR.

În lumina celor prezentate, **motivația** realizării studiului doctoral a fost *îmbunătățirea managementului terapeutic* al pacienților cu CCR.

Scopul tezei de doctorat a fost *evaluarea factorilor de prognostic, clasici și moderni în CCR*.

Pentru atingerea scopului, ne-am propus următoarele **obiective principale**:

- conturarea unui profil al pacienților cu CCR, respectiv al tumorilor acestora, diagnosticate într-un centru de referință din zona de vest a țării;
- evaluarea unor factori morfologici de prognostic noi, care ar putea îmbunătăți managementul terapeutic al pacienților cu CCR, prin utilizarea unor metode ieftine, ușor aplicabile în practica zilnică în laboratoarele de anatomie patologică.

În mod concret, pentru îndeplinirea obiectivelor studiului doctoral, am realizat următoarele categorii de analize:

1. **Analiza datelor demografice și evaluarea parametrilor clinico-morfologici clasici în CCR**, printr-un studiu retrospectiv întins pe o perioadă de 10 ani, care a cuprins cazurile de CCR diagnosticate pe piese de rezecție chirurgicală în Spitalul Clinic Județean de Urgență „Pius Brînzeu” din Timișoara (SCJUPBT).

2. **Evaluarea unor parametri morfologici noi în CCR**, în vederea aprecierii semnificației prognostice a acestora:

- **evaluarea unor parametri morfologici** clasici (ulcerația și necroza tumorală, stadiul TNM AJCC al bolii, PNI) **suplimentari** față de cei uzuali și a unor parametri morfologici moderni (TILs, configurația frontului de invazie a tumorii) în CCR;
- **evaluarea TB** prin două categorii de analize:
 - evaluarea TB cu scopul standardizării metodei de evaluare, verificării variabilității interobservator și a aplicabilității metodei în practica zilnică, pe un lot de cazuri de CCR operate robotic, pe lame scanate, colorate HE și IHC;
 - evaluarea TB în CCR, pentru determinarea semnificației prognostice a acestui nou parametru și a comparării sistemului de gradare bazat pe cuantificarea TB (GBd – Buds Grade) cu sistemul de gradare histologic clasic (gradul OMS);
- **evaluarea PDCs** din perspectiva aprecierii semnificației prognostice a acestui nou parametru și a comparării sistemului de gradare bazat pe cuantificarea PDCs (PDCs-G) cu sistemul de gradare histologic clasic (gradul OMS).

Teza de doctorat este formată dintr-o **parte generală** și una **specială**, dedicată contribuțiilor personale. În partea generală a tezei, structurată pe trei capitole, am prezentat date despre stadiul actual al cunoașterii în CCR, în urma analizei a numeroase surse bibliografice de referință în acest domeniu.

În **primul capitol al părții generale** am abordat particularitățile clinico-epidemiologice, etio-patogenice și am subliniat importanța factorilor de risc în CCR. Studiile epidemiologice relevă faptul că incidența CCR, per ansamblu, este mai mare la bărbați (6). S-a arătat că CCR cu debut la vârstă precoce este de stadiu avansat și are caracteristici patologice adverse care se asociază cu risc de morbiditate prematură și deces (13)(14). Riscul de CCR este mai mare după vârsta de 40 de ani, dublându-se cu fiecare decadă după 50-55 de ani și continuând să crească exponențial (15). Mecanismele de bază și factorii de risc pentru apariția acestor leziuni nu sunt pe deplin înțeleși, justificându-se cercetări suplimentare în acest sens. Există studii epidemiologice care sugerează că această boală ar rezulta în urma acțiunii complexe a unor factori de risc (mecanisme epigenetice) cu substratul genetic (16), dar majoritatea CCR sunt sporadice și nu familiale (17). Riscul de apariție a CCR la persoane fără istoric personal/familial de CCR și cu vârsta peste 50 de ani este 5-6%. Acesta crește până la 20% atunci când există rude de gradul I și/sau al II-lea cu CCR și ajunge la 80-100% în sindroamele ereditare (18). Polipoza colonică familială (*Familial Adenomatous Polyposis* - FAP) și sindromul Lynch - cancer colorectal ereditar nonpolipozic (*Hereditary nonpolyposis colorectal cancer* - HNPCC) sunt cele mai frecvente dintre sindroamele cu transmitere familială, dar împreună aceste două afecțiuni reprezintă doar aproximativ 3-5% dintre cauzele de CCR (19). Transformarea neoplazică ce urmează modelul convențional al carcinogenezei, așa-numita secvență adenom-carcinom, recunoște adenomul tubular, vilos sau tubulo-vilos ca leziune precursoră (20). La nivel molecular, sunt descrise două mecanisme de carcinogeneză: instabilitatea cromozomială (CIN) - în 85% din cazuri, instabilitatea microsatelitară (MSI) - în 15% din cazuri (21). Spre deosebire de calea

convențională de transformare adenom-carcinom, a fost documentată, în ultimii zece ani, o cale alternativă (calea serată), prin identificarea adenoamelor/polipilor serați ca leziuni precursor (22).

Cel de-al doilea capitol al părții generale cuprinde date despre localizarea, manifestările clinice, aspectele macroscopice, microscopice și stadializarea CCR. Aspectele macroscopice ale CCR sunt variabile, mai frecvent întâlnită este forma ulcerativ-infiltrativă care poate interesa circumferențial lumenul intestinului, cauzând grade variabile de stenoză (până la apariția ocluziei intestinale). Din punctul de vedere al subtipului histologic de tumoră, cele mai multe cazuri de CCR (90%) sunt adenocarcinoame (ADK) și majoritatea studiilor din literatura de specialitate se referă doar la acestea (1). Prin definiție, ADK sunt tumori care invadează, prin musculara mucoasei, submucoasa. Deși majoritatea cazurilor sunt diagnosticate ca ADK NOS (ADK convențional), se pot distinge mai multe subtipuri histopatologice, cu caracteristici clinice și moleculare distincte.

Factorii de prognostic ai CCR, atât cei clasici cât și cei moderni, au fost analizați, în funcție de datele de din literatură, în al treilea capitol al părții generale. Deși parametrii care determină stadiul patologic al bolii - pTNM sunt cei mai fideli indicatori ai evoluției postoperatorii, și alți parametri clinici, histologici și/sau moleculari, independent de stadiu, pot influența prognosticul. Dintre parametrii clasici, îndelung studiați și recunoscuți putem enumera: tipul histologic al tumorii, gradul de diferențiere tumorală (G), invazia limfo-vasculară (LVI) și invazia perineurală (PNI) (1). De interes în ultima perioadă sunt și o serie de parametri care pot fi interpretați pe lame în colorația uzuală, hematoxilină-eozină (HE) și imunohistochimică (IHC), ceea ce îi face mai ușor de evaluat și mai accesibili decât markerii moleculari, dar majoritatea dintre ei au încă nevoie de validare și de standardizare pentru a fi incluși în raportul histopatologic. Dintre factorii de prognostic moderni, sunt de menționat înmugurirea tumorală - *tumor budding* (TB) (23), grupurile de celule slab diferențiate de la nivelul frontului de invazie a tumorii - *poorly differentiated clusters* (PDCs) (24), aspectul frontului de invazie a tumorii - *tumor border configuration/invasion pattern* (25), prezența infiltratului limfocitar - *tumor infiltrating lymphocytes* (TILs) (26), micrometastazele limfonodale (27), ca parametri care ar putea să completeze și chiar să înlocuiască unii factori clasici de prognostic în CCR.

1. EVALUAREA PARAMETRILOR DEMOGRAFICI ȘI CLINICO-MORFOLOGICI DIN PERSPECTIVA CONTURĂRII PROFILULUI PACIENȚILOR/TUMORILOR MALIGNNE COLORECTALE DIN ZONA DE VEST A ROMÂNIEI

Primul capitol al părții speciale a fost dedicat analizării CCR din perspectiva unor aspecte demografice și a principalilor factori clinico-morfologici, în ideea de a **contura un profil al pacienților cu CCR**, respectiv **al tumorilor acestora**, diagnosticate într-un spital de referință din zona de vest a țării, cu identificarea unor posibile particularități legate de zona geografică și de expunerea la anumiți factori de risc. În acest sens, am urmărit realizarea unei baze de date cu scopul evaluării distribuției pe ani și a principalelor caracteristici clinico-morfologice ale CCR precum și evaluarea factorilor de prognostic clasici (vârsta și sexul pacienților, localizarea tumorilor, parametrul pT, parametrul pN, parametrul pM și LVI), prin analiza multivariabilă a acestora, în funcție de tipul histologic de CCR.

Baza de date a cuprins toți pacienții cu CCR diagnosticat pe piese de rezecție chirurgicală, în perioada ianuarie 2009 – decembrie 2018, în Clinicile Chirurgicale ale Spitalului Clinic Județean de Urgență „Pius Brînzeu” din Timișoara (SCJUPBT). În zona de vest a țării, SCJUPBT reprezintă un centru medical de referință, cu adresabilitate mare, care furnizează servicii medicale la standarde ridicate în sfera oncologică digestivă. Pentru lotul de **1885 de cazuri de CCR** incluse în studiu, datele clinice au fost colectate din biletul de însoțire a materialului biopsic și din foile de observație clinică, iar parametrii histopatologici - din buletinele histopatologice din baza de date a Serviciului de Anatomie Patologică (SAP) al SCJUPBT.

Criterii de includere în studiu – toate cazurile consecutive de CCR, diagnosticate prin examenul histopatologic al pieselor de rezecție chirurgicală radicală standard, cu limfadenectomie regională.

Criteriile de excludere din lotul de studiu au fost:

- pacienți cu alte tipuri de cancer decât carcinoamele;
- pacienți cu diagnostic de CCR stabilit pe specimene de endobiopsie sau polipectomie;
- pacienți cu recidive tumorale;
- pacienți care au beneficiat de tratament radio-chimioterapic neoadjuvant.

Diagnosticul de CCR a fost stabilit în urma prelucrării histopatologice standard a pieselor de rezecție chirurgicală, în cadrul SAP al SCJUPBT.

Pentru aprecierea subtipului histologic și a gradului de diferențiere s-a utilizat clasificările OMS de încadrare și gradare a tumorilor sistemului digestiv, iar încadrarea stadială patologică s-a făcut în acord cu sistemul pTNM AJCC/UICC (edițiile în vigoare în momentul evaluării cazului) (10)(28).

Am selectat din buletinele histopatologice și am introdus în tabelul Excel următorii parametri demografici și clinico-morfologici: vârsta pacienților, sexul pacienților, anul în care a fost diagnosticat pacienta/ul, numerele corespunzătoare blocurilor de parafină, localizarea CCR, tipul histologic al tumorii, au fost documentate tumorile duble/multiple sincrone, gradul de diferențiere al tumorii, prezența metastazelor la distanță - documentate patologic (pM1); prezența/absența invaziei limfo-vasculare (LVI+/LVI-).

Parametrii colectați au fost analizați statistic utilizând programele Microsoft Excel, Graph Pad Prism v6 și IBM SPSS v20. Am utilizat testele *Student t test*, *Chi – square* sau *Fisher's exact test*, pentru a analiza corelațiile și/sau diferențele între/dintre factorii clinico-patologici. Valoarea **p** rezultată a fost considerată semnificativă statistic dacă a fost mai mică de **0.05**.

Pentru realizarea obiectivelor din teza de doctorat, am procedat în conformitate cu principiile Declarației de la Helsinki de bună practică clinică. Fiecare pacient a semnat un formular de consimțământ informat (Anexa 4 la *Normele de aplicare a Legii 104/2003*), care permite folosirea în studii medicale a produselor biologice recoltate și folosirea în scop didactic/științific a imaginilor fotografice ale țesuturilor sau organelor.

Concluzii. Din perspectiva analizei distribuției pe ani la lotul de 1885 de cazuri de CCR am observat creșterea numărului de cazuri de CCR de-a lungul intervalului de timp analizat (2009-2018). CCR au fost diagnosticate mai frecvent la pacienții peste 60 de ani (69.45%), mai frecvent în decada a șaptea de viață, la ambele sexe. Carcinoamele colorectale au fost diagnosticate preponderent la sexul masculin (58.25%), iar în ceea ce privește topografia tumorilor, acestea au fost mai frecvent identificate la nivelul colonului stâng (41.44%). În funcție de tipul histologic tumoral, majoritatea CCR au fost ADK NOS sau tipul convențional (88.96%), fiind urmate de ADK mucinoase (10.54%), în timp ce subtipurile de carcinom cu celule în „inel cu pecete” și de carcinom medular au fost mai rare: 0.39%, respectiv 0.11%.

Tumorile duble sincrone colorectale au fost întâlnite în 73 de cazuri (4%), au fost localizate predominant la nivelul colonului stâng (47.94%) și diagnosticate mai frecvent la pacienții de sex masculin (65.76%). Majoritatea tumorilor sincrone au fost ADK NOS (73.97%), profund invazive în peretele intestinal (pT3-pT4) (89.04%), frecvent cu metastaze limfonodale (pN+) (58.9%) și cu invazie limfo-vasculară (LVI+) (47.95%).

În ceea ce privește analiza principalilor parametri clinico-morfologici pe lotul de 1612 cazuri de ADK NOS, am remarcat că marea majoritate a ADK NOS au fost tumori bine diferențiate (G1-G2) (86.04%), dar diagnosticate, predominant (85.11%), în stadii avansate ale invaziei tumorale în peretele intestinal (pT3-pT4). Invazia limfo-vasculară (LVI+) și metastazele limfonodale (pN+) au fost prezente în 46.71%, respectiv 49.19% dintre cazuri, în timp ce dovezi pentru prezența metastazelor la distanță (pM+) am avut doar în 5.51% dintre cazuri. La pacienții sub 60 de ani au fost identificate mai frecvent tumori la nivelul colonului stâng (41.62%), urmate de cele rectale (31.31%). Exceptând colonul stâng care a fost localizarea predilectă a tumorilor atât la femei (40.80%) cât și la bărbați (43.18%), a doua localizare în ordinea frecvenței a fost diferită, la femei - colonul drept (36.79%),

respectiv la bărbați - rectul (30.59%). Cele mai multe cazuri cu invazie tumorală incipientă în peretele intestinal (pT1-pT2) - 43.75% au fost identificate la nivelul rectului.

Adenocarcinoamele mucinoase (191 de cazuri) au fost diagnosticate preponderent la pacienții >60 de ani (73.30%), de sex masculin (55.49%), la nivelul colonului stâng (58.64%). Majoritatea tumorilor mucinoase au prezentat caracteristici morfologice cu impact advers asupra prognosticului și evoluției bolii: stadiu avansat al invaziei peretelui intestinal (pT3-pT4), pN+, LVI+.

2. CONTRIBUȚII LA EVALUAREA UNOR FACTORI DE PROGNOSTIC NOI ÎN CARCINOAMELE COLORECTALE

În al doilea capitol al părții speciale, am evaluat, pe lângă factorii clasici de prognostic, o serie de **parametri morfologici noi în CCR**, unii mai puțin cunoscuți și/sau raportați, alții caracterizați mai recent (TB și PDCs), dar promițători pentru o stratificare mai acurată a riscului pacienților cu CCR, prin utilizarea unor metode ieftine, ușor aplicabile în practica clinică.

În primul capitol al părții speciale am analizat o cohortă de 1885 de cazuri de CCR, dar având în vedere lotul mare de pacienți, nu am putut evalua unii dintre parametri histopatologici cu potențială valoare prognostică, care nu au fost raportați în buletinele histopatologice și pentru a căror analiza ar fi fost necesară reevaluarea lamelor de la fiecare caz.

2.1. Evaluarea unor parametri morfologici suplimentari în CCR

Din perspectiva evaluării unor parametri morfologici suplimentari, am interpretat pe un lot mai restrâns de pacienți, o serie de parametri clasici suplimentari (stadiul TNM AJCC al bolii, ulcerarea și necroza tumorală, PNI) și alții descriși mai recent (TILs, configurația frontului de invazie a tumorii). Am realizat un studiu retrospectiv pe un lot de 71 de cazuri de CCR, dintre care 50 de cazuri de CCR consecutive, diagnosticate și operate prin intervenție chirurgicală clasică în anul 2014 și 21 de cazuri de CCR operate robotic (robotul da Vinci Xi® Surgical System), în Clinica II Chirurgie a SCJUPBT, în perioada 07/2015 - 07/2016. Au fost incluse în studiu cazurile diagnosticate pe piese de rezecție, fiind excluse CCR tratate prin chimioterapie și/sau RT anterior intervențiilor chirurgicale. Trebuie menționat că din anul 2015 s-au efectuat în SCJUPBT intervenții chirurgicale complexe, asistate robotic, adresate în special patologiei oncologice a colonului și rectului, facilități care au permis executare operațiilor, deseori minim invazive, cu un control tehnic și o precizie ridicată. Prelucrarea fragmentelor tisulare s-a realizat în Serviciul de anatomie patologică (SAP) al SCJUPBT, dotat cu aparatură modernă, performantă, care contribuie la acuratețea diagnosticului histopatologic.

Concluzii. Cu privire la *configurația frontului de invazie a tumorii*, am observat că majoritatea cazurilor (63%) au prezentat un model de tip infiltrativ a frontului de invazie a tumorii. Frontul de invazie de tip infiltrativ s-a asociat cu parametri cu impact negativ asupra evoluției bolii precum localizarea tumorilor la nivelul colonului drept, gradul crescut de malignitate (G3-G4), invazia profundă în peretele intestinal (pT3-pT4), stadiul avansat TNM AJCC al bolii, pN+, pM+, LVI+ și PNI+. Datorită valorii sale și ușurinței în evaluare, propunem raportarea acestui parametru în buletinul histopatologic. Am obținut rezultate cu semnificație statistică în ceea ce privește asocierile dintre stadiul avansat TNM AJCC și ceilalți parametri de evoluție adversă (gradul OMS G3-G4, parametrii pT3-pT4, pN+, pM+, LVI+, PNI+, configurația de tip infiltrativ a frontului de invazie). Am remarcat asocieri importante ale PNI cu restul parametrilor cu rol negativ asupra prognosticului pacienților cu CCR. De asemenea prezența necrozei tumorale a fost unul dintre factorii de prognostic nefavorabil pentru pacienții cu CCR. În schimb, ulcerarea tumorii nu a prezentat semnificație statistică în analizele multivariabile realizate. TILs nu s-a corelat semnificativ statistic cu ceilalți parametri investigați, dar este posibil ca metoda de evaluare aleasă de noi să nu fie optimă. Evaluarea TILs reprezintă o direcție viitoare de cercetare, dar este necesară

stabilirea unei metodologii standardizate și general acceptate de cuantificare și a unor studii suplimentare care să valideze semnificația prognostică a TILs în CCR.

2.2. Contribuții la evaluarea *tumor budding* (TB) în CCR

Deoarece metodele de evaluare a TB sunt foarte diverse, o contribuție proprie a fost încercarea de a implementa și valida o **metodă simplă de evaluare a TB**, care să fie ușor reproductibilă în practica de zi cu zi și cu variabilitate interobservator redusă. Sunt etichetate ca TB grupurile solide de 1-4 celule tumorale care nu reprezintă zone de fragmentare glandulară cauzată de infiltratul inflamator (25)(29). La *International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC)*, din 2016, s-a recomandat că TB să fie inclus în raportul histopatologic (30)(31) și s-a susținut necesitatea introducerii acestui parametru și în clasificarea TNM a CCR (32)(33).

În *prima parte a acestui studiu*, am evaluat TB pe lame scanate, colorate HE, respectiv IHC, din perspectiva verificării reproductibilității și variabilității interobservator: **studiu pilot în Timișoara (România)**. Un aspect original al acestei lucrări îl reprezintă **utilizarea patologiei digitale în evaluarea CCR**. Am evaluat TB pe lame scanate provenite de la 21 de cazuri de CCR diagnosticate anterior prin endobiopsie și operate robotic (da Vinci Xi® Surgical System) între 07/2015-07/2016, în Clinica de Chirurgie II a SCJUPBT. Am exclus pacienții care au avut tratament neoadjuvant.

Primul pas în evaluarea TB a constat în selectarea, pentru fiecare caz, prin evaluare la microscopul optic, la mărire joasă (obiectiv 10x), a lamei cu secțiunea de tumoră care conținea cel mai mare număr de TB la frontul de invazie a tumorii. Pentru determinările IHC au fost realizate secțiuni adiționale din blocurile de parafină, de 3 μm grosime, care au fost plasate pe lame silanizate pentru a preveni desprinderea lor în cursul procedeeilor de pretratare utilizate pentru demascarea antigenică. Determinările IHC au fost efectuate pe automatul de colorare Leica Bond Max din dotarea Disciplinei de Morfopatologie a UMFVBT, utilizând anticorpi anti-CK AE1/AE3 (Novocastra, ready-to-use) și sistem de detecție polimeric Novolink. Vizualizarea s-a realizat cu 3.3'-Diaminobenzidină (DAB), iar contracolorarea nucleilor cu Hematoxilină. La final, lamelele au fost montate pe lame cu ajutorul Entellanului.

Evaluarea TB s-a realizat pe **lame virtuale** după protocolul de mai jos.

Cele 21 de lame colorate HE și lamele marcate IHC (CK AE1/AE3) corespunzătoare au fost analizate de trei evaluatori după ce au fost scanate cu ajutorul scannerului de lame Leica Aperio AT2, la mărire 40x. Pentru a anonimiza lamele și a nu permite evaluatorilor să identifice cazul căruia îi aparține lama, fiecărei lame digitale i-a fost atribuit un număr consecutiv implicit, după setările scannerului. Nu a existat o etichetare directă care să lege între ele lamele digitale HE și lamele IHC corespunzătoare.

Lamele digitale rezultate au fost apoi stocate pe un server local, utilizând Leica Digital Image Hub Solo v4, un program care permite accesul la distanță, prin interfață web, la toate imaginile digitale disponibile pe server. În acest fel, evaluarea lamelor s-a putut face din orice locație cu acces la internet, fără a fi necesară instalarea unui soft de vizualizare pe computerul evaluatorului. Pe acest server au fost create conturi individuale de acces pentru cei trei evaluatori. Setul de lame (21 de lame HE și cele 21 de lame IHC corespunzătoare) de evaluat a fost replicat, fiecare dintre evaluatori a avut acces doar la setul propriu de lame scanate, asigurându-se astfel independența în evaluare și evitându-se posibila influențare a evaluatorilor.

La finalul evaluării, rezultatele au fost colectate într-o bază de date unică și a fost refăcută legătura dintre numărul lamei digitale și numărul cazului.

Pe lamele scanate s-au desenat 10 cercuri de-a lungul frontului de invazie tumorală, care au reprezentat zonele în care s-au cuantificat TB. Fiecare cerc a avut diametrul de 0.785 mm², pentru a simula zona acoperită de un obiectiv al microscopului de 20x, respectând recomandările pentru evaluare din literatură (31)(34)(35). În urma unei prime inspecții a ariilor desemnate prin încercuire, fără a număra efectiv TB, fiecare evaluator a stabilit care din cele 10 cercuri desenate reprezintă aria cu cea mai mare densitate de TB, arie care a fost desemnată *arie hotspot*. Hotspot-ul a fost primul câmp în care s-a făcut

evaluarea, procedură urmată apoi de cuantificarea celorlalte câmpuri. După centralizarea valorilor obținute, s-a realizat o medie aritmetică a TB evaluate în cele zece câmpuri, pentru fiecare caz, atât pe lamele colorate HE, cât și IHC.

Clasificarea cazurilor în raport cu media numărului de TB a fost efectuată conform unui sistem cu 3 grade de TB (GBd): tumorile cu ≤ 5 TB au fost încadrate ca G1Bd, cele cu 6–9 TB ca G2Bd, în timp ce tumorile ≥ 10 TB au fost încadrate ca G3Bd, conform modelului propus de Cho și colab. (36). Ulterior am clasificat tumorile și într-un sistem cu două grade de TB: GBd scăzut, pentru tumorile cu ≤ 9 TB și GBd crescut, pentru tumorile cu ≥ 10 TB, după modelul utilizat de Graham și colab. (37).

Pentru determinarea variabilității interobservator în evaluarea TB, a fost calculat coeficientul de corelație intraclasă (intraclass correlation coefficient - ICC) și coeficientul de concordanță (Cohen's Kappa), folosind programul de statistică IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v. 20.

În a doua parte a studiului dedicat evaluării TB am analizat lotul extins de 71 de cazuri de CCR la care am analizat anterior semnificația celorlalți parametri clinico-morfologici. Bazat pe considerentul că potrivit clasificării OMS a tumorilor sistemului digestiv din 2010, ADK mucinoase nu se gradează în funcție de procentul formării de structuri glandulare și pe absența unui consens în ceea ce privește definiția TB sau PDCs în prezența mucinei, nu am gradat cele două cazuri de ADK mucinoase cu niciunul din cele trei sisteme de gradare (gradul OMS, GBd sau PDCs-G). Prin urmare, în această a doua parte a acestui studiu, cuantificarea TB s-a realizat doar pentru cele 69 de cazuri ADK NOS, din considerentele amintite anterior.

Am realizat gradarea ADK NOS pe lame colorate HE, la microscopul optic, cuantificând prezența TB la frontul de invazie a tumorii, conform recomandărilor propuse la ITBCC în 2016 (30). După clasificarea tumorilor în funcție de GBd, am analizat comparația între noul sistem de gradare GBd bazat pe cuantificarea TB și vechiul sistem de gradare – gradul OMS. Apoi am analizat corelațiile dintre GBd (GBd cu trei clase, respectiv două clase de grad) și toți ceilalți parametri investigați pentru a determina dacă sistemul de clasificare bazat pe cuantificarea TB este un parametru prognostic promițător în evaluarea CCR.

Concluzii. Din perspectiva evaluării TB în CCR, cu scopul standardizării metodei de evaluare, aprecierii variabilității interobservator și analizării relațiilor cu ceilalți parametri investigați, am obținut concluzii importante. Considerăm metoda de evaluare a TB pe 10 câmpuri microscopice ca o metodă fezabilă și reproductibilă. Această metodă facilitează predarea și instruirea patologilor în vederea cuantificării TB și oferă un bun acord interobservator în evaluarea TB. Numărul de TB a fost mai mare pe lamele colorate IHC și s-a asociat cu un acord interobservator mai bun, subliniind utilitatea IHC pentru acuratețea evaluării TB. Unul dintre avantajele utilizării IHC a fost și ușurința în identificarea TB de către patologii fără experiență. De asemenea, am remarcat un acord mai bun între observatori pentru clasificarea tumorilor bazată pe evaluarea TB în sistemul GBd cu două clase de grad (binar), față de sistemul GBd cu trei niveluri. TB de grad înalt este un marker care se asociază cu factorii de prognostic advers. Atât cu ajutorul sistemului binar cât și al celui cu trei clase, am obținut corelații semnificative între gradul TB și ceilalți parametri investigați, dar datorită ușurinței în evaluare și variabilității interobservator reduse, sistemul binar de gradare a TB pare a fi mai util pentru clasificarea cazurilor de CCR.

Utilizând metoda de evaluare bazată pe cuantificarea TB în aria hotspot, recomandată de ITBCC, am remarcat rezultate asemănătoare celor obținute cu ajutorul metodei de gradare bazată pe valoarea medie a TB cuantificate în 10 câmpuri microscopice. Avantajul metodei „hotspot” de evaluare a TB constă în rapiditatea cu care patologul poate evalua TB și implicit în aplicabilitatea în practica zilnică. Din analiza comparativă a sistemului de gradare GBd cu sistemul de gradare uzual - gradul OMS, am observat corelații mai semnificative ale GBd cu unii dintre parametri investigați. Astfel, gradul înalt GBd s-a asociat cu pN+, stadiul avansat TNM AJCC al bolii și cu LVI+, obținându-se în toate situațiile valori ale p de 0.0001. Analiza multivariabilă, a arătat corelații semnificative ale GBd și cu alți parametri: frontul de invazie a tumorii de tip infiltrativ (p=0.0002), PNI+ (0.0022), parametrul pM+ (p=0.034) și prezența necrozei tumorale (p=0.0347).

2.3. Contribuții la evaluarea *poorly differentiated clusters* (PDCs) în CCR

Există o variabilitate interobservator semnificativă în gradarea CCR, din cauza utilizării mai multor sisteme de clasificare și a absenței criteriilor explicite pentru încadrarea într-o anumită categorie de grad (24)(38). Gradarea OMS a CCR se bazează pe cuantificarea formării de structuri glandulare (metoda procentuală) (24)(38). Deși acest sistem este utilizat pe scară largă, este grevat de subiectivism, deoarece formarea glandelor este dificil de estimat (39). În plus, există controverse în legătură cu aria care trebuie evaluată - zona cea mai puțin diferențiată (gradul cel mai crescut) sau gradul predominant (40). De asemenea, pentru carcinomul cu celule în „inel cu pecete” sau carcinomul micropapilar, gradul tumorii, stabilit conform acestor criterii are o valoare prognostică incertă (39)(40). Mai mult, conform clasificării OMS din 2010 a tumorilor sistemului digestiv, evaluarea bazată pe diferențierea glandulară a CCR se aplică doar pentru ADK convențional/clasic/NOS, exceptând variantele speciale - ADK mucinos, carcinomul cu celule în „inel cu pecete” și carcinomul medular (41). În consecință, utilitatea acestui sistem este discutabilă.

În cadrul **studiului dedicat evaluării PDCs**, mi-am propus să evaluez un sistem nou de gradare histologică a CCR - gradul PDCs (PDCs-G), bazat pe cuantificarea grupurilor de celule slab diferențiate – *poorly differentiated clusters* (PDCs). Am analizat semnificația clinico-patologică și prognostică a PDCs-G, în comparație cu sistemul de gradare uzual (gradul OMS). Materialul de studiu a fost reprezentat de lotul de 71 de cazuri de CCR, pe care am analizat anterior corelațiile între parametrii morfologici suplimentari, dar, din cauză că nu există o definiție clară a clusterelor în ariile mucinoase, nu am interpretat cele două cazuri de ADK mucinoase, cuantificarea PDCs s-a realizat astfel doar pentru cele 69 de cazuri ADK NOS.

PDCs sunt definite ca grupuri/cuiburi solide de ≥ 5 celule tumorale, fără formare de glande (24). Am realizat gradarea ADN NOS în funcție de prezența PDCs la frontul de invazie a tumorii, pe lame colorate HE, conform metodei introdusă de Ueno și colab. în 2012 (24). În acest sens am selectat, pentru fiecare caz, blocul corespunzător secțiunii de tumoră care includea frontul de invazie, din zona cu infiltrare tumorală maximă în peretele intestinal.

Într-o primă etapă, toate lamele selectate (o lamă/caz) au fost scanate cu ajutorul scannerului de lame Leica Aperio AT2. Lamele au fost inițial examinate la mărire mică ($\times 40$), pentru a identifica zona cu cea mai mare densitate de PDCs de-a lungul frontului de invazie. Această zonă a fost considerată „hotspot” și a fost evaluată ulterior la o mărire intermediară ($200\times$), la care dimensiunea câmpului a fost de 0.785 mm^2 . În funcție de numărul PDCs identificat în zona analizată, am clasificat cazurile de CCR în 3 categorii de grad PDCs: tumorile cu < 5 PDGs au fost considerate PDCs-G1, cele cu 5-9 PDCs au fost încadrate în categoria PDCs-G2, iar cazurile cu ≥ 10 PDCs au fost considerate PDCs-G3 (42).

Ulterior am comparat cele două sisteme de gradare a CCR (gradul OMS și PDCs-G) și am analizat relația acestora cu ceilalți parametri clinico-patologici, pentru a vedea dacă noul sistem de clasificare bazat pe cuantificarea PDCs este un instrument histologic suplimentar în evaluarea CCR respectiv un nou factor prognostic promițător pentru pacienții cu CCR.

Concluzii. Am remarcat că gradul înalt PDCs-G se corelează cu parametrii clinico-morfologici asociați cu evoluția nefavorabilă a CCR, în special cu profunzimea mare a invaziei tumorale (pT3-pT4), stadiul TNM AJCC avansat al bolii, metastazele limfonodale (pN+), invazia vaselor limfatice (LVI+), invazia perineurală (PNI+) și configurația de tip infiltrativ a frontului de invazie a tumorii, cu valori mai semnificative statistic decât cele obținute prin clasificarea cazurilor cu sistemul de gradare OMS. În plus, datele noastre arată că noul sistem de clasificare a CCR, bazat pe cuantificarea PDCs (PDCs-G), reprezintă un predictor independent pentru prezența invaziei limfo-vasculare și a metastazelor limfonodale. Atât TB cât și PDCs se corelează cu aceiași factori de prognostic nefavorabil, dar având în vedere că PDCs sunt mai ușor de evaluat comparativ cu TB, pe lame colorate uzual, PDCs pare să fie un parametru mai reproductibil și mai valoros decât TB.

CONTRIBUȚII PROPRII

Valoarea studiului doctoral rezidă în numărul mare de cazuri de CCR, analizate în prima parte a cercetării. Am realizat un studiu retrospectiv, întins pe o perioadă de 10 ani (2009-2018), în cadrul căruia am realizat o **bază de date vastă** care a inclus parametrii selectați din buletinele histopatologice și din fișele de însoțire a materialului biopsic de la un lot de **1885 de cazuri de CCR**. Această bază de date, extrem de cuprinzătoare, poate contribui, dacă va fi continuată, la completarea Registrului Regional de Cancer pentru zona de Vest a țării, implicit a Registrului Național de Cancer, în vederea alinierii la standardele și recomandările IARC a OMS (The International Agency for Research on Cancer of the World Health Organization). Pe baza datelor colectate putem contura un profil al pacientului/tumorii colorectale a acestuia, care să ofere informații utile pentru elaborarea unui program regional sau național de control al cancerului și pentru implementarea programelor de screening pentru CCR. Mai mult, am evaluat numeroși parametrii clinico-morfologici, unii clasici, alții mai noi, raportați inconstant sau care nu sunt încă incluși în ghidurile și protocoalele dedicate evaluării CCR. Prin urmare, această bază de date poate constitui punctul de plecare pentru creionarea unor direcții și studii ulterioare în cercetarea CCR.

Originalitatea lucrării mele constă în analiza unor cazuri de CCR operate robotic și în evaluarea TB pe lame scanate. Datorită aparaturii moderne din dotarea secțiilor chirurgicale din SCJUPBT, am avut oportunitatea de a studia un lot de 21 de **cazuri de CCR operate robotic**. De asemenea, prin prelucrarea fragmentelor tisulare în laboratorul SAP din SCJUPBT care este dotat cu aparatură performantă, am beneficiat de analiza cazurilor de CCR pe lame colorate cu HE și IHC la standarde excelente de calitate. Cu ajutorul scannerului de lame Leica Aperio AT2, din dotarea Disciplinei de Morfopatologie a UMFVBT, am avut posibilitatea de a analiza o serie de parametrii pe lame scanate. Astfel, un aspect original al acestei lucrări îl reprezintă **utilizarea patologiei digitale** care, după cunoștințele noastre, a fost puțin utilizată în studiul CCR la noi în țară. În contextul actual, al pandemiei COVID-19, am avut oportunitatea de a prelua imagini fotografice de interes de pe lame scanate, de la domiciliu. În plus, prin utilizarea microscopiei virtuale a fost posibilă reducerea variabilității interobservator și standardizarea evaluării și cuantificării parametrilor investigați.

Deoarece TB reprezintă un factor prognostic promițător în CCR, dar metodele de evaluare sunt foarte diverse, o **contribuție proprie** a fost încercarea de a **implementa și valida o metodă simplă de evaluare a TB**, care să fie ușor reproductibilă în practica de zi cu zi și cu variabilitate interobservator redusă. Din această perspectivă, am încercat, pentru prima dată la noi în țară, după știința noastră, să punem la punct o metodă de cuantificare a TB. Am selectat un lot de cazuri de CCR operate robotic pe care am ales să evaluăm TB în zece câmpuri microscopice, conform recomandărilor din literatură, din momentul demarării studiului. Această metodă facilitează instruirea patologilor în cuantificarea TB și oferă un bun acord interobservator, dovedindu-se a fi o metodă fezabilă și reproductibilă. Metoda de evaluare a TB pe 10 câmpuri microscopice poate reprezenta un prim pas pentru standardizarea evaluării TB în laboratoarele de patologie în care lamele pot fi scanate. În plus, conform recomandărilor ITBCC din 2016, am ales să cuantificăm TB, pentru a valida semnificația prognostică a acestui parametru, pe un lot mai mare de pacienți, dar evaluând la microscopul optic o singură arie (hotspot), la frontul de invazie a tumorii, unul dintre avantajele constând în ușurința în evaluare. Datorită aplicabilității și reducerii variabilității interobservator, demonstrată de rezultatele noastre, sistemul GBd binar ar fi de preferat/recomandat în evaluarea CCR. Propunem ca acest sistem de gradare a TB cu două clase de grad (cu stabilirea unui cut-off de 10 TB), să fie implementat pentru raportarea de rutină a TB, cu precizarea categoriei de grad (GBd) și a numărului specific de TB în raportul patologic.

O altă **contribuție proprie** o reprezintă **evaluarea PDCs pentru prima dată la noi în țară**, după cunoștințele noastre. Nici la nivel global nu sunt multe studii care au comparat direct PDCs cu gradul histologic convențional al tumorii, dar există unele dovezi că PDCs-G

realizează o distribuție mai uniformă a cazurilor de CCR între cele trei clase de grad și ar fi un factor prognostic mai robust decât gradul OMS în CCR.

Având în vedere relația dintre PDCs și TB (care este deja inclus în mai multe ghiduri internaționale pentru raportarea CCR), pledăm pentru includerea în raportul histopatologic atât a TB cât și PDCs. Dacă rezultatele noastre vor fi confirmate și de alte studii, TB și PDCs ar trebui incluși printre factorii de prognostic din clasificarea TNM. În plus, patologia digitală ar putea fi aplicată pentru îmbunătățirea standardizării și precizia evaluării TB și PDCs.

În consecință, TB și PDCs reprezintă parametri care trebuie cunoscuți, iar patologul trebuie să fie familiarizat cu metodele de identificare, cuantificare și raportare a acestora, deoarece standardizarea acestor evaluări va conduce la implementarea acestor noi factori de prognostic și predictivi în diagnosticul curent al CCR. De asemenea, TB și PDCs ar trebui să fie luate în considerare în cadrul întrunirilor multidisciplinare pentru a ajuta la luarea deciziilor terapeutice în practica clinică.

Tema aleasă reprezintă un subiect de actualitate științifică, îmbunătățirea managementului terapeutic al CCR fiind în centrul preocupărilor științifice naționale și internaționale.

O parte din studiul doctoral s-a concretizat prin publicarea a două articole originale în reviste de specialitate și prezentarea și publicarea unor rezumate la manifestări științifice cu participare internațională.

Lucrarea de față se încadrează, prin subiectul abordat, în direcțiile de cercetare ale UMFVBT și în temele de interes ale colectivului de cercetare de la Disciplina de Morfopatologie din cadrul UMFVBT, disciplină în cadrul căreia mi-am desfășurat întreaga activitate de cercetare din studiul doctoral.

BIBLIOGRAFIE

1. Odze RD, Nagtegaal ID, Arends M, Salto-Tellez M. Colorectal Adenocarcinoma: Tumours of the Colon and Rectum. In: *World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System*. 5th Ed., Volume 1, IARC Press: WHO Classification of Tumours Editorial Board (eds); Lyon, France. 2019:177-187.
2. Safiri S, Sepanlou SG, Ikuta KS, Bisignano C, Salimzadeh H, Delavari A, et al. The global, regional, and national burden of colorectal cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2019 Dec 1;4(12):913-33.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424.
4. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019 Apr 15;144(8):1941-53.
5. Edwards BK, Ward E, Kohler BA, Ehemann C, Zauber AG, Anderson RN, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer*. 2010 Feb 1;116(3):544-73.
6. Young JP, Win AK, Rosty C, Flight I, Roder D, Young GP, et al. Rising incidence of early-onset colorectal cancer in Australia over two decades: Report and review. *JGH Open*. 2015 Jan;30(1):6-13.
7. Arnold M, Karim-Kos HE, Coebergh JW, Byrnes G, Antilla A, Ferlay J, et al. Recent trends in incidence of five common cancers in 26 European countries since 1988: Analysis of the European Cancer Observatory. *Eur J Cancer*. 2015 Jun 1;51(9):1164-87.
8. International Agency for Research on Cancer. Global cancer observatory. World Health Organization. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/642-romania-fact-sheets.pdf>. Accessed. 2019 Nov;19
9. Cucu AM. Raport Național privind starea de sănătate a populației României - 2018. Institutul Național de Sănătate Publică, București, 2019. Available from: <https://insp.gov.ro/sites/cnepss/wp-content/uploads/2014/11/SSPR-2018-final-2-1.pdf>. Accessed. 2020 Jun; 02.
10. Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al (eds.), *AJCC Cancer Staging Manual*, 8th ed. New York: Springer. 2017:251–274.
11. Maguire A, Sheahan K. Controversies in the pathological assessment of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(29):9850–61.
12. Märkl B, Wilhelms N, Anthuber M, Schenkirsch G, Schlimok G, Oruzio D. Circulating cytokeratin-positive cells and tumor budding in colorectal cancer. *World J Clin Oncol*. 2016 Dec;7(6):433-40.
13. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global cancer incidence and mortality rates and trends-an update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016 Jan 1;25(1):16-27.
14. Araghi M, Soerjomataram I, Bardot A, Ferlay J, Cabasag CJ, Morrison DS, et al. Changes in colorectal cancer incidence in seven high-income countries: a population-based study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2019 Jul 1;4(7):511-8.
15. Pilleron S, Sarfati D, Janssen-Heijnen M, Vignat J, Ferlay J, Bray F, et al. Global cancer incidence in older adults, 2012 and 2035: a population-based study. *Int J Cancer*. 2019 Jan 1;144(1):49-58.
16. Müller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2016 Aug 1;469(2):125-34.
17. López PJ, Albero JS, Rodríguez-Montes JA. Primary and Secondary Prevention of Colorectal Cancer. *Clin Med Insights Gastroenterol*. 2014 Dec 1;2014:33-46.
18. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RG, Barzi A, et al. Colorectal cancer facts and figures 2017–2019. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(3):177-93.
19. Pearlman R, Frankel WL, Swanson B, Zhao W, Yilmaz A, Miller K, et al. Prevalence and spectrum of germline cancer susceptibility gene mutations among patients with early-onset colorectal cancer. *JAMA Oncol*. 2017 Apr 1;3(4):464-71.
20. Hughes LA, Simons CC, van den Brandt PA, van Engeland M, Weijenberg MP. Lifestyle, diet, and colorectal cancer risk according to (epi) genetic instability: current evidence and future directions of molecular pathological epidemiology. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2017 Dec 1;13(6):455-69.

21. Gupta R, Sinha S, Paul RN. The impact of microsatellite stability status in colorectal cancer. *Current problems in cancer*. 2018 Nov 1;42(6):548-59.
22. Pai RK, Bettington M, Srivastava A, Rosty C. An update on the morphology and molecular pathology of serrated colorectal polyps and associated carcinomas. *Modern Pathol*. 2019 Oct;32(10):1390-415.
23. Koelzer VH, Zlobec I, Berger MD, Cathomas G, Dawson H, Dirschmid K, et al. Tumor budding in colorectal cancer revisited: results of a multicenter interobserver study. *Virchows Arch*. 2015;466(5):485-93.
24. Ueno H, Kajiwara Y, Shimazaki H, Shinto E, Hashiguchi Y, Nakanishi K, et al. New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2012 Feb 1;36(2):193-201.
25. Zlobec I, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *Postgrad Med J*. 2008;84(994):403-11.
26. Shinto E, Mochizuki H, Ueno H, Matsubara O, Jass JR. A novel classification of tumour budding in colorectal cancer based on the presence of cytoplasmic pseudo-fragments around budding foci. *Histopathology*. 2005 Jul;47(1):25-31.
27. Bilchik AJ, Hoon DS, Saha S, Turner RR, Wiese D, DiNome M, et al. Prognostic impact of micrometastases in colon cancer: interim results of a prospective multicenter trial. *Ann Surg*. 2007 Oct 1;246(4):568-77.
28. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. (eds.), *AJCC Cancer Staging Handbook*, 7th edition. New York: *Springer*. 2010:173-206.
29. Dema AL, Taban S, **Jurescu A**, Gheju AR, Vaduva AO, Duta CC, et al. Paving the way to tumor budding assessment using digital pathology: a pilot study in Timisoara City (Romania). *Rom J Morphol Embryol*. 2018 Jan 1;59(3):703-13.
30. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol*. 2017 Sep 1;30(9):1299-311.
31. Bibeau F, Khellaf L, Bazille C. Recommendations for the detection of tumor budding in colorectal cancers according to the International Consensus Conference on Tumor Budding. *Colon and Rectum*. 2018 Mar 1; 12 (1): 48-49.
32. Mitrovic B, Schaeffer DF, Riddell RH, Kirsch R. Tumor budding in colorectal carcinoma: Time to take notice. *Mod Pathol*. 2012;25(10):1315-25.
33. Puppa G, Senore C, Sheahan K, Vieth M, Lugli A, Zlobec I, et al. Diagnostic reproducibility of tumour budding in colorectal cancer: a multicentre, multinational study using virtual microscopy. *Histopathology*. 2012 Oct;61(4):562-75.
34. Ueno H, Hashiguchi Y, Kajiwara Y, Shinto E, Shimazaki H, Kurihara H, et al. Proposed objective criteria for "grade 3" in early invasive colorectal cancer. *Am J Clin Pathol*. 2010 Aug;134(2):312-22.
35. Watanabe T, Itabashi M, Shimada Y, Tanaka S, Ito Y, Ajioka Y, et al. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) Guidelines 2014 for treatment of colorectal cancer. *Int J Clin Oncol*. 2015 Apr 1;20(2):207-39.
36. Cho SJ, Kakar S. Tumor budding in colorectal carcinoma: translating a morphologic score into clinically meaningful results. *Arch Pathol Lab Med*. 2018 Aug;142(8):952-7.
37. Graham R, Vierkant R, Tillmans L, Wang A, Laird P, Weisenberger D, et al. Tumor Budding in Colorectal Carcinoma: Confirmation of Prognostic Significance and Histologic Cutoff in a Population-based Cohort. *Am J Surg Pathol*. 2015 Oct;39(10):1340-6.
38. Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Ishiguro M, Kajiwara Y, Sato T, et al. Histological grading of colorectal cancer: a simple and objective method. *Ann Surg*. 2008 May;247(5):811-8.
39. Barresi V, Bonetti LR, Leni A, Caruso RA, Tuccari G. Histological grading in colorectal cancer: new insights and perspectives. *Histol Histopathol*. 2015;30(9):1059-67.
40. Chandler IP, Houlston RS. Interobserver agreement in grading of colorectal cancers-findings from a nationwide web-based survey of histopathologists. *Histopathology*. 2008 Mar;52(4):494-9.
41. Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, eds. Lyon: *IARC Press*. 2010:134-46.
42. **Jurescu A**, Văduva A, Tăban S, Gheju A, Olteanu G, Mihai I, Lăzureanu C, Cornianu M, Lazăr F, Demă A. Poorly differentiated clusters: prognostic significance in colorectal carcinomas. *Pol J Pathol*. 2019 Jan 1;70(4):235-45.