

„Microbiomul intratumoral și imunitatea locală în cancerul colorectal: medierea răspunsului la terapia specifică”

Codul subprogramului: 100101

Cancerul colorectal (CCR) reprezintă una dintre cele mai frecvente și letale tumori la nivel global, cu impact major asupra sănătății publice. Perturbările microbiomului intestinal sunt factori esențiali în dezvoltarea și progresia CCR, iar interesul recent se concentrează asupra comunităților microbiene intratumorale. Studiul acestora este însă limitat de abundența redusă a bacteriilor și de interferența ADN-ului gazdei, precum și de riscul de contaminare. Două tipuri principale de artefacte afectează acuratețea analizelor: ADN contaminant provenit din medii de prelevare, consumabile și reactivi, și contaminarea încrucișată între probe sau cicluri de secvențiere. Aceste provocări subliniază necesitatea unor metode riguroase de decontaminare și control experimental pentru validarea rolului microbiomului intratumoral în oncogeneză.

Imunitatea intratumorală, reflectată prin limfocitele infiltrante tumorale (TIL), constituie un alt determinant major al evoluției cancerului colorectal și al răspunsului la imunoterapie. Nivelurile crescute de TIL, în special infiltrarea CD8⁺, sunt asociate cu prognostic favorabil, deși influențate de localizarea tumorii și de expresia PD-L1. În cadrul studiului, a fost implementat un protocol strict de recoltare și procesare pentru minimizarea contaminării, incluzând controale pentru decontaminări bioinformatică și proceduri chirurgicale sterile. Au fost colectate probe de la 17 pacienți (tumoră, NAT și blank), manipulate ulterior într-un mediu protejat cu decontaminare chimică și UV, pentru a asigura integritatea analizelor microbiomului intratumoral și a infiltratului imun.

Cohorta din anul de studiu 2025 a inclus 17 pacienți cu cancer colorectal (10 bărbați, 7 femei, vârste 35–75 ani, medie ~62), toți cu statut metastatic M0. Tumorile au fost distribuite uniform între colonul drept și stâng, cu localizări variate (cec, colon ascendent, transvers, sigmoid și rect). Histologic, adenocarcinomul colorectal a predominat (11 cazuri), urmat de adenocarcinom mucinos (6 cazuri), cu grade G2 (10 pacienți) și G3 (7 pacienți). Stadiul tumoral primar a fost dominat de T3, iar stadiile clinice au indicat forme avansate locale sau regionale. Opt pacienți au beneficiat de chimioterapie adjuvantă, cel mai frecvent Oxaliplatin + Capecitabină.

Analiza infiltratului imun tumoral a evidențiat heterogenitate semnificativă: celulele B mature au variat între 4–50% (medie ~20%), celulele NK au fost rare (0–3%, medie ~1%), iar subseturile T au prezentat diferențe marcate (CD4+CD8⁻: 27–80%, medie ~50%; CD4⁻CD8⁺: 6–41%, medie ~25%). Raportul CD4/CD8 a variat între 0.7–6.6 (medie ~2.2), indicând predominanța subsetului CD4⁺ în tumori. În probele NAT, infiltratul imun a avut compoziție distinctă, cu proporții mai mari de celule B (8–48%, medie ~22%), valori similare pentru NK (1–2%, medie ~1.5%) și un raport CD4/CD8 semnificativ mai scăzut (0.2–1.7, medie ~0.9). Aceste date confirmă diferențe sistematice între micromediul tumoral și cel tisular normal, relevante pentru înțelegerea interacțiunii dintre imunitatea locală și oncogeneză.

Pentru evaluarea relației dintre TIL și eficiența terapiei, am analizat raportul CD4/CD8 în funcție de răspunsul clinic. În cohorta de 17 pacienți, datele disponibile indică o medie a raportului CD4/CD8 de ~1.7 la pacienții cu răspuns pozitiv și ~1.23 la cei fără modificări. Tendința sugerează că un raport CD4/CD8 mai ridicat ar putea fi asociat cu un răspuns terapeutic favorabil. Totuși, dimensiunea redusă a cohorții nu permite concluzii statistice, motiv pentru care continuăm înrolarea pacienților și recoltarea probelor biologice.

The intratumoral microbiome and local immunity in colorectal cancer: mediation of response to the specific therapy”

Subprogram code: 100101

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common and lethal tumors worldwide, with a major impact on public health. Disruptions of the intestinal microbiome are key factors in CRC development and progression, and recent interest has focused on intratumoral microbial communities. However, their study is limited by the low abundance of bacteria, host DNA interference, and the risk of contamination. Two main types of artifacts affect the accuracy of analyses: contaminant DNA originating from sampling environments, consumables, and reagents, and cross-contamination between samples or sequencing cycles. These challenges highlight the need for rigorous decontamination methods and experimental controls to validate the role of the intratumoral microbiome in oncogenesis.

Intratumoral immunity, reflected by tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), represents another major determinant of colorectal cancer progression and response to immunotherapy. Increased levels of TIL, particularly CD8⁺ infiltration, are associated with favorable prognosis, although influenced by tumor location and PD-L1 expression. In this study, a strict protocol for sample collection and processing was implemented to minimize contamination, including bioinformatic decontamination controls and sterile surgical procedures. Samples from 17 patients (tumor, NAT, and blank) were collected and subsequently handled in a protected environment with chemical and UV decontamination to ensure the integrity of intratumoral microbiome and immune infiltrate analyses.

The 2025 study cohort included 17 patients with colorectal cancer (10 men, 7 women, aged 35–75 years, mean ~62), all with metastatic status M0. Tumors were evenly distributed between the right and left colon, with varied locations (cecum, ascending colon, transverse colon, sigmoid colon, and rectum). Histologically, colorectal adenocarcinoma predominated (11 cases), followed by mucinous adenocarcinoma (6 cases), with grades G2 (10 patients) and G3 (7 patients). The primary tumor stage was dominated by T3, while clinical stages indicated locally or regionally advanced disease. Eight patients received adjuvant chemotherapy, most commonly Oxaliplatin + Capecitabine.

Analysis of the tumor immune infiltrate revealed significant heterogeneity: mature B cells ranged from 4–50% (mean ~20%), NK cells were rare (0–3%, mean ~1%), and T-cell subsets showed marked differences (CD4⁺CD8⁻: 27–80%, mean ~50%; CD4⁻CD8⁺: 6–41%, mean ~25%). The CD4/CD8 ratio varied between 0.7–6.6 (mean ~2.2), indicating a predominance of the CD4⁺ subset in tumors. In NAT samples, the immune infiltrate displayed a distinct composition, with higher proportions of mature B cells (8–48%, mean ~22%), similar NK values (1–2%, mean ~1.5%), and a significantly lower CD4/CD8 ratio (0.2–1.7, mean ~0.9). These findings confirm systematic differences between the tumor microenvironment and normal adjacent tissue, relevant for understanding the interaction between local immunity and oncogenesis.

To evaluate the relationship between tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) and therapy efficacy, we analyzed the CD4/CD8 ratio in relation to clinical response. In the cohort of 17 patients, available data indicate a mean CD4/CD8 ratio of ~1.7 in patients with a positive response and ~1.23 in those without changes. This trend suggests that a higher CD4/CD8 ratio in the tumor

infiltrate may be associated with a more favorable therapeutic outcome. However, the small cohort size does not allow statistically significant conclusions, and patient enrollment and biological sample collection are ongoing.