

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"VICTOR BABEȘ" DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL II: MORFOLOGIE MICROSCOPICA**

TOMA ALINA CRISTINA



TEZA DE DOCTORAT

**ELEMENTE DE PROGNOSTIC DIN MICROMEDIUL
TUMORAL LA PACIENTELE CU CANCER MAMAR:
CORELAȚIA CU PROFILUL MOLECULAR**

– R E Z U M A T –

Conducător științific
PROF. UNIV. DR. ANCA MARIA CÎMPEAN

**Timișoara
2023**

INTRODUCERE

Cancerul mamar (BC) este privit drept un grup heterogen de afecțiuni datorită comportamentului lor clinic și imagistic, a prognosticului și răspunsului inconsecvent la agenții terapeutici, precum și a factorilor de risc diferiți și multipli și a gamei largi de subtipuri moleculare.

La nivel mondial, în anul 2020, s-au înregistrat 2,3 milioane de cazuri noi de cancer de sân la femei (11,7%) și 685000 (6,9%) de decese datorate acestui tip de cancer, situându-se astfel pe locul 1, atât ca incidență, cât și ca mortalitate prin cancer la femei [2]. BC se află în fruntea frecvenței la nivelul populației feminine și în Europa, cu 531086 de femei diagnosticate în 2020 cu BC, însumând 12,1% din totalul cazurile noi de cancer. Mortalitatea este de asemenea ridicată, în aceeași perioadă, înregistrându-se 141.765 de decese provocate de BC, reprezentând 7,3% din totalul deceselor cauzate de cancer în Europa. În România, 12085 de cazuri noi diagnosticate și 3918 decese din cauza acestui neoplasm au fost raportate în anul 2020. În țara noastră, BC este o problemă majoră de sănătate publică deoarece un procent semnificativ de cazuri noi sunt diagnosticate într-un stadiu avansat al bolii, iar lipsa unui program de screening al populației joacă aici cel mai important rol. Studiile arată o scădere constantă a deceselor cauzate de BC în Europa, cu excepția Poloniei și României, care nu beneficiază de un program de screening bine organizat.

O provocarea a cercetărilor contemporane este legată de rezistența la terapie a BC, iar micromediul tumoral (TME) prin activitatea unor celule imune, endoteliale sau mezenchimale poate interveni în medierea răspunsului terapeutic și în educarea celulelor tumorale pentru a dobândi rezistență la tratament.

Interesul pentru imunoterapie este în creștere în cancerul de sân, devenind cel mai promițător tratament, la fel ca și în alte localizări, dar țintele sale celulare și tisulare sunt heterogene și controversate. Răspunsul la imunoterapie este variabil și heterogen chiar și în cadrul aceleiași clase moleculare, ceea ce indică faptul că la nivelul grupei moleculare există subtipuri moleculare. Stroma tumorală este foarte rar analizată prin evaluare histopatologică convențională inițială, neglijându-se în mod specific structurile implicate în inițierea răspunsului imun antitumoral.

Inițierea răspunsului imun local este strict dependent de rețeaua vasculară, iar interacțiunea dintre structurile celulare cu rol imun și rețeaua vasculară este vag

descrișă în stroma tumorală mamară. Reteaua vasculară stromală și mai precis, structura, densitatea și procesele de normalizare, nu sunt pe deplin studiate în raport cu imunoterapia, dat fiind faptul că aceasta se administrează predominant intravenos.

Obiectivele lucrării de față au fost în număr de 5: (1) Identificarea componentelor stromale care suferă modificări în diferitele subtipuri moleculare de BC; (2) Caracterizarea structurilor limfoide terțiare (TLSs) din stroma tumorală, precum și interacțiunile acestor structuri cu rol imun cu celelalte componente stromale; (3) Posibilul impact al TLSs asupra componentelor celulare și vasculare ale stromei tumorale a BC; (4) Interacțiunea fibroblastelor CD34+/SMA+ dependentă de subtipurile moleculare de BC; (5) Dezvoltarea unui model experimental care permite evaluarea cantitativă a interacțiunilor celulă-celulă și celulă-medicament într-un micromediu tumoral realist fiziologic.

MOTIVAȚIE

Direcția de cercetare a acestui studiu s-a bazat pe rapoartele foarte vagi descrise în literatura de specialitate despre impactul TLSs asupra subtipurilor moleculare de BC, dar și despre interacțiunea dintre TLSs și vasele de sânge din stroma tumorală. Practic, în studiul de față ne-am propus să studiem interacțiunea dintre TLSs și vasele de sânge din stroma tumorală (imature-CD34+/SMA-, versus mature-CD34+/SMA+) pentru a identifica dacă interacțiunea este dependentă de subtipul molecular de BC și poate avea repercusiuni asupra invaziei limfovaskulare (LVI) și perineurale (Pnl) și a recurenței bolii.

Prognosticul acestei boli, care afectează predominant femeile, este influențat de recurența bolii, de determinările secundare și de rezistența la agenți antineoplazici. Fibroblastele asociate cancerului (CAFs) sunt cele mai numeroase componente ale micromediului tumoral al BC și cele care influențează evenimentele descrise (diseminarea secundară, rezistența la terapie și recurența).

În BC, deși CAFs sunt studiate intens, cuantificarea acestora pe preparate imunocolorate și determinarea modului în care acestea se raportează la criteriile clinice și patologice este încă dificilă astăzi. În studiul de față, am folosit analiza digitală a imaginii (DIA), în plus față de IHC, pentru a compara CAFs CD34 și SMA pozitive în subgrupurile moleculare de BC. Am vrut să vedem dacă prezența TLSs,

structurile vasculare stromale, invazia, recurența, dar și vârsta pacientului și rata de supraviețuire sunt legate de constatările DIA, și au fost.

Am considerat de asemenea necesară realizarea unei părți experimentale pentru studiul micromediului tumoral al BC. Am ales modelul experimental microfluidic deoarece permite studierea interrelației reciproce dintre dezvoltarea tumorii și microvascularizație evitând utilizarea animalelor și lipsa diferențelor dintre specii. Scopul studiului a fost acela de a dezvolta și caracteriza un model de țesut 3D care folosește o platformă microfluidică cu două compartimente perfuzată cu cip pentru a vizualiza și cuantifica interacțiunile celulelor celulelor stem mezenchimale derivate din măduva osoasă (BM-MSC) și MCF-7 în timp real.

MATERIALE ȘI METODE

Un total de 53 de cazuri din cele 150 incluse în studiu au prezentat date clinico-patologice preoperatorii și post-intervenționale, având un profil clinic, histopatologic și terapeutic complet util în scopul studiului. Parametrii clinic-patologici și terapeutici selectați au fost vârsta, statusul menopausal, subtipul molecular de BC, gradul tumorii (G), indicele de prognostic Nottingham (NPI), indicele de masă corporală (IMC), invazia limfovasculară/perineurală și recurenței bolii.

Fragmentele de țesut au fost fixate timp de 24-48h, în formol tamponat 10%, apoi au fost supuse prelucrării primare. După îndepărtarea excesului de fixator, care s-a făcut prin spălarea cu apă curentă, fragmentele au fost înglobate în parafină. Această procedură implică următoarele etape: deshidratare, clarificare și procedura standard de încorporare a parafinei. Blocurile de parafină rezultate au fost orientate pentru a fi secționate la 3 microni folosind microtomul. Lamelele obținute au fost deparafinate și colorate.

Pentru stabilirea diagnosticului histopatologic, lamele au fost colorate cu hematoxilină-eozină (HE), iar colorarea a fost efectuată automat folosind Leica Autostainer XL (Leica Biosystem Newcastle Ltd, Balliol Business Park West, Benton Lane, New Castle Upon Tyne NE12 EW, United Kingdom). Pentru montarea lamelor colorate, a fost folosit Leica CV Mount automat (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne NE12 EW, United Kingdom), proces urmat de selectarea colorațiilor imunohistochimice. Imunohistochimia (IHC) a fost efectuată folosind automatul Leica Bond-Max (Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK). Demascarea a fost efectuată folosind Novocastra Bond Epitope Retrieval Solution 1

și 2, soluții cu pH6 și 9. Peroxidaza endogenă a fost blocată cu peroxid de hidrogen 3%, timp de 5 minute. Acest pas a fost urmat de incubarea cu anticorpi primari monoclonali prediluți de la Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK timp de 30 de minute (ER, PR, KI-67, HER, CD 34 și SMA). Sistemele de vizualizare precum Bond Polymer Refine Detection System DAB și Bond Polymer Refine Red Detection System au fost următorii pași pentru finalizarea procedurii imunohistochimice. Lamele colorate cu hematoxină și eozină și IHC au fost scanate utilizând microscopul Grundium OCUS 20 (Grundium, Tampere, Finlanda) și arhivate ca svf format din Case Center Slide Library (3DHistech, Budapesta, Ungaria). Din această bibliotecă digitală, lamele scanate au fost încărcate pe QuPath, o platformă open-source pentru analiză de bioimagini a preparatelor microscopice, unde au fost examinate folosind software-ul integrat și suplimentele sale, cum ar fi Fiji și Analiza Vasculară pentru o evaluare precisă a vaselor de sânge tumorale stromale. TLSs au fost cuantificate pe specimene colorate cu hematoxină și eozină, procedeu urmat de imunocolorare dublă CD34/actină musculară netedă (SMA) pentru evaluarea maturării vaselor de sânge stromale. Analiza statistică a legat microscopia de recurență, LVI și PnI.

Dubla imunocolorare pentru CD34 și α SMA a arătat modele diferite de distribuție a CAFs în țesuturile normale și în cancerul mamar. Imunocolorare cu CD34 singur pe preparate suplimentare a cuantificat stroma tumorală CD34_CAFs. În timpul scorării automate, software-ul QuPath ne-a furnizat numărul de celule, procentul de celule stromale pozitive și negative, atât scorul de densitate, cât și scorul de intensitate separat, dar și un scor stromal combinat (SS, similar cu scorul Allred, care combină intensitatea și densitatea CAFs stromale pozitive detectate). De asemenea, un scor H a fost inclus în evaluarea finală efectuată prin analiza QuPath. În studiul de față au fost utilizate intensitatea CAFs stromală pozitivă (S_SMA_I și, respectiv, S_CD34_I), densitatea (S_SMA_D și respectiv S_CD34_D), SS (CD34_SS și SMA_SS) și scorul H (CD34_H-Score și SMA_H-Score).

Datele analizei imaginilor digitale (DIA) privind densitatea, intensitatea, scorul stromal și scorul H al CAFs au fost corelate cu parametrii clinico-patologici. Software-ul JAMOV pentru dispozitivele macOS a fost folosit pentru analiza statistică.

REZULTATE

Structurile limfoide terțiare și vasele de sânge stromale au un impact semnificativ și heterogen asupra recidivei, invaziei limfovaskulare și perineurale printre subtipurile moleculare de canceru mamar

TLS au fost detectate în 54,71% din totalul cazurilor. În subgrupul TLS pozitiv, distribuția cazurilor în funcție de tipul molecular de BC a fost următoarea: 24,13% dintre cazuri au fost de tip LA, 27,58% au fost de tip LB, 10,34% au fost de tip LB-HER2 și 37,93% au fost de tip TNBC. Subgrupul TLS negativ a inclus 8,33% tip LA, 45,83% tip LB, 16,67% tip LB-HER2, 12,5% tip HER2 și 16,66% tip TNBC. Numărul de TLS a variat între unu și trei per caz. Au fost detectate două tipuri de TLS legate de țesutul adipos: între stroma tumorală și țesutul adipos și între zona celulelor tumorale și țesutul adipos din jur. Acest tip de TLS a fost foarte vascularizat. Morfologia și fenotipul vaselor intra-TLS au fost foarte sugestive pentru un proces angiogenic activ. Cel mai probabil, acest lucru se datorează capacității duble a țesutului adipos de a induce atât inflamația (cu dezvoltarea TLS) cât și angiogeneza (certificată în studiul nostru prin prezența intra-TLS a vaselor de sânge imature CD34+/SMA- și mature CD34+/SMA+, cu un morfologie particulară și heterogenă foarte sugestivă pentru un proces angiogenic activ). Un proces angiogenic ridicat poate fi un factor favorizant al metastazelor.

S-a găsit o corelație semnificativă între IMC și prezența TLS ($p=0,014$). Prezența TLS a fost corelată atât cu densitatea vaselor de sânge stromale imature IBV_CD34+/SMA- ($p=0,008$), cât și cu densitatea vaselor de sânge stromale mature MBV_CD34+/SMA+ ($p=0,003$), atunci când am aplicat o evaluare globală pentru toate subtipurile moleculare. Pentru fiecare subtip molecular de BC, a fost efectuate o analiză globală (atât pentru cazurile TLS+ cât și TLS-) și o analiză specifică care separă TLS+ de TLS- în cadrul aceluiași subtip molecular de BC.

Subgrupurile TLS negative (TLS-) din fiecare subtip molecular de BC (cu excepția subtipului molecular Luminal A) sunt asociate cu LVI și Pnl crescută și cu o rată de recurență mai ridicată. O creștere semnificativă a LVI și Pnl a fost observată pentru subgrupul HER2+/TLS- ($p < 0,001$). Subgrupul de cancer de sân triplu negativ (TNBC)/TLS- a avut cel mai mare risc de recidivă și invazie, care a fost, de asemenea, semnificativ legat de gradul tumorii. Pnl, dar nu și LVI, a influențat semnificativ recurența în subgrupul TNBC/TLS+ ($p < 0,001$). Interrelația dintre TLSs și vasele de sânge stromale a fost diferită între subtipurile moleculare BC.

Reevaluarea interacțiunilor fibroblastelor asociate cancerului mamar (CAFs) cu alte componente stromale și parametri clinico-patologici prin utilizarea imunohistochimiei și a analizei digitale a imaginii (DIA)

Analiza digitală a imaginii α SMA_CAF și CD34_CAF

S-a efectuat imunohistochimie simplă (pentru CD34) și dublă (CD34/ α SMA) pentru a identifica atât CD34_CAF, cât și α SMA_CAF. A fost realizată dublă colorare CD34/ α SMA pentru a identifica vasele de sânge imature și mature stromale și pentru cuantificarea α SMA_CAF. Este bine cunoscut faptul că evaluarea manuală atât a CAFs CD34 pozitive, cât și a CAFs α SMA-pozitive este practic imposibilă din cauza densității scăzute (pentru CD34) și a CAFs cu o densitate mare (pentru α SMA) din compartimentul stromal al BC. Folosind facilitățile platformei de analiză a bioimaginii QuPath, a fost posibilă stratificarea cazurilor în trei clase prin atribuirea unui scor de densitate de la 3 la 5, pe baza densității α SMA_CAF punctate automat. De asemenea, QuPath are o opțiune de evaluare a intensității colorării prin marcarea marginilor celulelor sau a marginilor celulare și a zonei lor citoplasmatică cu linii colorate diferit, specifice fiecărei intensități care variază de la 1 (considerat slab, marcat cu galben) la 2 (intensitate medie, marcată cu portocaliu) și 3 (cuantificată ca puternică, printr-o linie roșie în jurul celulelor pozitive). Celulele marcate cu albastru au fost clasificate drept negative pentru imunocolorare.

Scorul final numit Scor Stromal (SS) a fost calculat similar cu scorul Allred (cu opțiunea aleasă de a nu număra nucleii, doar imunoreacția citoplasmatică) prin suma intensității și densității pentru fiecare caz și a variat de la 4 la 8 în studiul actual. Un H-Score suplimentar bazat pe evaluarea intensității pixelilor a fost adăugat ca parametru. Evaluarea automată a α SMA_CAF a relevat densități și intensități diferite între subtipurile moleculare BC.

CAFs CD 34 pozitive au fost evaluate separat pe preparate imunocolorate doar cu CD34. Parametrii CD34_CAF DIA au fost mai mici în comparație cu cei similari pentru α SMA_CAF. Densitatea CD34_CAF a variat între 2 și 4. Un procent de 88,7% din cazuri au avut un scor de intensitate de 2. CD34_SS a variat între 3 și 6, cu 94,33% dintre cazuri având un CD34_SS de 4 și 5. Analiza imaginii CD34_CAF efectuată cu QuPath a arătat că, în ciuda densității lor extrem de scăzute în interiorul stromei tumorale, ele se pot cuantifica și au un impact clinic și prognostic specific pentru unele subtipuri moleculare BC.

Impactul DIA asupra evaluării CD34/ α SMA_CAF stromale în legătură cu subtipurile moleculare de BC și cu parametrii clinico-patologici

LA_BC (Luminal A): densitatea stromală CD34_CAF (S_CD34_D) a scăzut semnificativ pentru compartimentul stromal LA, în timp ce densitatea α SMA_CAF (S_SMA_D) a crescut în timpul transformării maligne ($p = 0,049$). Vârsta pacienților a avut un impact semnificativ asupra α SMA_SS, fiind invers, dar semnificativ corelată cu aceasta ($p = 0,014$). α SMA_SS a avut o influență semnificativă, directă asupra prezenței TLS în stroma tumorală din subtipul LA_BC ($p = 0,018$). Dar una dintre cele mai interesante descoperiri legate de subtipul LA_BC a fost corelația semnificativă directă dintre S_CD34_D ($p = 0,013$) și CD34_H-Score ($p = 0,022$). O rată scăzută de supraviețuire a fost corelată cu S_CD34_D scăzut pentru LA_BC.

LB_BC (Luminal B): a fost observată o corelație directă între vârstă și α SMA_SS pentru subtipul LB_BC ($p = 0,020$). Acesta este singurul subtip molecular de BC în care G2 este influențat direct de α SMA_SS ($p = 0,036$). TLS și vasele de sânge imature ale stromei tumorale (IBV_CD34+/ α SMA-) au fost influențate de α SMA_SS. Această observație a fost certificată printr-o corelație inversă între α SMA_SS ($p = 0,009$), α SMA_H-Score ($p = 0,005$) și TLS pentru LB_BC. α SMA_CAF par să afecteze sau să oprească dezvoltarea vaselor de sânge tumorale stromale imature.

HER2_BC: HER2_BC este printre subtipurile moleculare BC cu cea mai mică valoare a expresiei CD34 în celulele stromale tumorale. Densitatea CD34_CAF și scorul CD34_H au scăzut odată cu creșterea în vârstă ($p < 0,001$ pentru ambele). Lipsa vaselor stromale IBV_CD34+/ α SMA- a fost corelată semnificativ cu densitatea CD34_CAF scăzută ($p < 0,001$) și scor CD34_H scăzut ($p < 0,001$). Interesant, cazurile HER2_BC fără vase tumorale stromale imature nu au avut LVI ($p < 0,001$), Pnl ($p < 0,001$) sau recurență ($p < 0,001$). LB-HER2_BC: densitatea stromală a LB-HER2 IBV_CD34+/ α SMA- a fost puternic influențată de CD34_CAF, dar, pentru acest subtip, toți cei trei parametrii DIA (S_CD34_D, CD34_SS și CD34-H-Score) au fost puternic și direct corelați cu densitatea IBV_CDS34+ ($p < 0,001$). CD34_CAF pot fi componente celulare stromale tumorale cu potențial de tranziție mezenchimato-endotelială urmată de o comutare angiogenică. Contrar, am raportat aici că S_ α SMA_D a fost corelat direct cu densitatea vasului stromal MBV_CD34+/ α SMA+ ($p = 0,043$). O rată ridicată de supraviețuire a fost corelată semnificativ cu S_ α SMA_D ridicat în stroma tumorală ($p = 0,012$).

TNBC_BC: valorile indicelui prognostic Nottingham (NPI) și G par să fie CD34_CAF dependente în TNBC_BC ($p = 0,024$). Pnl și recurența au fost de asemenea dependente de prezența CD34_CAF, corelându-se cu toți cei trei parametri ($p = 0,009$ pentru S_CD34_D; $p = 0,032$ pentru CD34_SS; și $p = 0,002$ pentru CD34_H-Score), în timp ce LVI a avut o corelație semnificativă doar cu CD34_SS.

Validarea celulelor stem mezenchimale (MSC) și a celulelor canceroase de sân MCF-7 Co-cultură pe un model bazat pe cip microfluidic perfuzat 3D

Material și metode

Celulele MCF-7 au fost însămânțate în camera tumorii, în timp ce BM-MSC-urile au fost injectate în canalele microvasculare ale cipurilor SynTumor. Mediul de cultură BM-MSC a fost perfuzat continuu în compartimentele microvasculare, fără adăugarea de alți factori de creștere, cipurile fiind păstrate în incubator.

Dispozitivul microfluidic a fost examinat microscopic săptămânal timp de patru săptămâni. Imunofluorescența VE și E-cadherină a validat diferențierea BM-MSC și formarea tumorii celulare MCF-7.

Rezultate

MCF-7 și BM-MSC s-au schimbat continuu. Filopodia BM-MSC a interacționat cu celulele învecinate pentru a căptuși canalele microvasculare. BM-MSC-urile s-au diferențiat heterogen de-a lungul rețelei de canale microvasculare, devenind mai rapide în apropierea intersecțiilor de microcanale datorită fluxului de perfuzie diferit.

În ultimele etape, celulele care au căptușit canalele microvasculare au exprimat VE-cadherina și au format un strat asemănător unui endoteliu în interiorul microcanalului. Celulele MCF-7 au crescut constant ca agregate sferoidale, iar ulterior au crescut ca o zonă compactă de celule tumorale E-cadherin pozitive în interiorul compartimentului tumoral. Rezultatele au fost în cele din urmă comparate cu cultura celulară 2D.

Concluzii

În studiul de față, a fost validat primul model de co-cultură 3D al MCF-7 și BM-MSC în platforma microfluidică. Sub perfuzie continuă, am demonstrat că BM-MSC-urile au capacitatea de a se diferenția în celule endoteliale și, de asemenea, că celulele MCF-7 de a migra de la tumoră la compartimentul vascular. Acest model poate fi validat în continuare pentru alte teste ca cele farmacologice prin utilizarea chimioterapicelor sau a altor medicamente ca terapii țintite.

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

1. TLSs au arătat o heterogenitate în ceea ce privește localizarea, forma și vascularizația. TLSs identificate în stroma adipoasă sunt mari și foarte vascularizate, iar vasele sunt căptușite de celule endoteliale înalte, fiind sugestive pentru un proces angiogenic activ. Țesutul adipos induce dezvoltarea TLSs, dar și angiogeneză certificată prin prezența vaselor de sânge mature și imature, iar acest proces angiogenic poate fi un factor favorabil pentru metastazare. Mai mult, prezența TLSs a fost influențată de IMC, identificându-se o corelație între acestea și IMC ($p=0,014$).
2. Studiul TLSs în formele moleculare de BC a relevat diferențe semnificative între subgrupurile TLS+ și TLS- în cadrul aceluiași subtip molecular de BC, cu un impact semnificativ asupra recurenței BC, LVI și Pnl.
3. Subtipul molecular LA al BC a prezentat cea mai mare densitate de IMBV_CD34+/αSMA- în rândul femeilor supraponderale și obeze, iar această corelație a fost semnificativă statistic ($p=0,029$). Prin urmare, formarea de noi vase de sânge la nivel stromal este promovată de țesutul adipos în timpul progresiei subtipului molecular LA de BC, care este independent de prezența TLS. În subgrupul TLS+ LA, a fost identificată o corelație semnificativă statistic între IMC și IMBV_CD34+/αSMA- ($p=0,015$).
4. Subtipul molecular LB de BC a prezentat o proporție mare de TLS. Pacienții tineri cu TLS+ au prezentat o densitate mai mare a vaselor stromale IMBV_CD34+/αSMA- ($p=0,017$) comparativ cu pacienții vârstnici. Lipsa TLS în acest subtip molecular de BC a indus la pacienții vârstnici o Pnl mai ridicată ($p=0,0024$), corelat cu starea postmenopauză ($p=0,019$) și cu invazia limfovaculară ($p=0,019$). Rata de recurență a bolii a fost dependentă de NPI ($p=0,008$) și de gradul tumorii ($p=0,024$), Pnl și LVI neavând niciun rol în acest proces.
5. În subgrupul TLS- _LB-HER2+, recurența BC s-a corelat atât cu Pnl ($p < 0,001$) cât și cu LVI ($p < 0,001$). Grupul TLS- a arătat, de asemenea, o corelație semnificativă a NPI cu statutul de menopauză ($p=0,038$). Prezența TLS nu a fost asociată cu recurența, nici cu Pnl și LVI.

6. Subgrupul HER2+ de BC a fost caracterizat prin absența TLS, care a favorizat dezvoltarea IMBV_CD34+/αSMA-, constatare susținută și de corelația inversă dintre IMBV_CD34+/αSMA- și PnI ($p < 0,001$), LVI ($p < 0,001$) și recurență ($p < 0,001$). Vârsta redusă s-a corelat cu recurența ($p < 0,001$) și a fost puternic corelată cu LVI ($p < 0,001$) și PnI ($p < 0,001$).
7. Subtipul molecular TNBC a prezentat cel mai mare procent de cazuri TLS+. Pentru subgrupul TLS+_TNBC, recurența bolii s-a corelat puternic cu PnI ($p < 0,001$), dar nu cu LVI ($p = 0,104$). PnI este influențată de densitatea MBV_CD34+/αSMA+ printr-o corelație inversă ($p = 0,026$). Cu alte cuvinte, maturarea vaselor de sânge din stroma tumorală însoțită de o creștere a densității lor a indus PnI scăzută. Subgrupul TLS-_TNBC a fost singurul caracterizat printr-o corelație puternică între LVI și G ($p < 0,001$). O interrelație puternică, similară, a fost observată între recurența la gradul tumorii ($p < 0,001$) și invazia limfovasculară ($p < 0,001$) și invazia perineurală ($p < 0,001$), dar nu și cu NPI.
8. Invazia, metastazarea, recurența bolii și supraviețuirea sunt influențate diferit de CD34_CAFs și αSMA_CAFs în subtipurile moleculare de BC prin interrelația lor cu alte componente stromale, fiind influențate de vârstă, starea menopauzei, gradul tumorii și NPI.
9. În subtipurile agresive de BC (HER2 și TNBC), CD34_CAFs au un impact semnificativ asupra LVI, PnI, NPI, G, recurență și supraviețuire, iar CD34_CAFs ar trebui să fie obligatorii pentru evaluare împreună cu αSMA_CAFs prin utilizarea unui software DIA special, deoarece pot influența parametri clinico-patologici importanți dependenți de subtipurile moleculare de BC.
10. Prognosticul pacienților cu BC și urmărirea pe termen lung a pacienților cu această neoplazie poate fi influențată de evaluarea DIA a stromei tumorale.
11. În studiul actual, primul model de co-cultură BM-MSCs/MCF-7 a fost stabilit folosind un dispozitiv microfluidic perfuzat cu două compartimente care poate servi ca platformă experimentală pentru testarea medicamentelor antitumorale/anti-angiogenice.