

Școala doctorală în domeniul Științe medicale

Cu titlu de manuscris

C.Z.U: 618.19-006.6-091.8-07-037(043.2)

CARPENCO Ecaterina

**MODIFICĂRI ALE STROMEI ÎN SUBTIPURILE
MOLECULARE DE CANCER MAMAR**

311.02 - ANATOMIE PATOLOGICĂ

Teză de doctor în științe medicale

Chișinău, 2023

Teza a fost elaborată la Catedra de histologie, citologie și embriologie a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” în colaborare cu Departamentul de Morfologie Microscopică/Histologie, Centrul de Cercetare în Angiogeneză al Universității de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” din Timișoara, România.

Conducător științific

Șaptefrați Lilian, dr. hab. șt. med., prof. univ. _____

Conducător prin cotutelă

Raica Marius, dr., prof. univ., _____

UMF „Victor Babeș”, Timișoara, România

Membrii comisiei de îndrumare:

Onea Emilian, dr. șt. biol., conf. univ. _____

Fulga Veaceslav, dr. hab. șt. med., conf. univ. _____

David Valeriu, dr. șt. med., conf. univ. _____

Susținerea va avea loc la 20.09.2023 la ora 14:00 în incinta USMF „Nicolae Testemițanu”, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, biroul nr. 205, în ședința Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat, aprobată prin decizia Consiliului Științific al Consorțiului din 25.05.23 (*proces verbal nr.9*).

Componența Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat:

Președinte:

Rîvneac Victor, dr. hab. șt. med., prof. univ., _____

USMF „Nicolae Testemițanu”

Membrii:

Pretula Ruslan, dr. șt. med., conf. univ., _____

USMF „Nicolae Testemițanu” (**secretar**)

Șaptefrați Lilian, dr. hab. șt. med., prof. univ., _____

USMF „Nicolae Testemițanu”

Raica Marius, dr., prof. univ., _____

UMF „Victor Babeș”, Timișoara, România

Referenți oficiali:

Ceașu Raluca-Amalia, dr., conf. univ., _____

UMF „Victor Babeș”, Timișoara, România

Fulga Veaceslav, dr. hab. șt. med., conf. univ. (comisia de îndrumare) _____

Petrovici Vergil, dr. șt. med., cerc. șt., _____

Institutul Mamei și Copilului _____

Autor

Carpenco Ecaterina _____

CUPRINS

CUPRINS	3
LISTA ABREVIERILOR.....	5
INTRODUCERE	7
1. STROMA TUMORALĂ ÎN DIVERSE VARIANTE MOLECULARE DE CARCINOAME MAMARE.....	12
1.1. Etiologia cancerului mamar	12
1.2. Histologia glandei mamare	13
1.3. Clasificarea histopatologică a carcinoamelor mamare	14
1.4. Profilul molecular al glandei mamare în normă	16
1.5. Clasificarea moleculară a carcinoamelor mamare	19
1.6. Structura stromei din tumorile mamare	22
1.7. Angiogeneza și limfangiogeneza în carcinoamele mamare.....	34
2. MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE	40
2.1. Design-ul studiului, caracteristica lotului de cercetare	40
2.2. Metoda histologică.....	40
2.3. Metoda imunohistochimică.....	40
2.4. Metode de cuantificare	42
2.5. Analiza statistică	45
3. MODIFICĂRI CANTITATIVE ȘI CALITATIVE ALE ELEMENTELOR STROMALE ÎN DIVERSE SUBTIPURI MOLECULARE DE CARCINOAME MAMARE	46
3.1. Profilul histopatologic al tumorilor incluse în studiu	46
3.2. Profilul molecular al tumorilor incluse în studiu	51
3.3. Macrofage CD68 pozitive în carcinoamele mamare	54
3.4. Mastocite triptază pozitive în carcinoamele mamare.....	60
3.5. Celule dendritice S100 pozitive în carcinoamele mamare.....	68
3.6. Vase sangvine CD34 pozitive în carcinoamele mamare.....	75
3.7. Vasele limfatice D2-40 pozitive în carcinoamele mamare	79
3.8. Interrelații statistice dintre vasele sangvine, limfatice și elementele celulare incluse în studiu în dependență de subtipul molecular al tumorii	84
4. EVALUAREA MODIFICĂRILOR STROMALE ÎN VARIANTELE MOLECULARE DE CANCER MAMAR	86
CONCLUZII GENERALE.....	98
RECOMANDĂRI.....	99
BIBLIOGRAFIE	100

Anexa 1. Interrelații dintre conținutul vaselor sangvine, limfatice și a elementelor celulare incluse în studiu, analiza cazurilor <i>per total</i>.....	113
Anexa 2. Interrelații dintre conținutul vaselor sangvine, limfatice și a elementelor celulare incluse în studiu, subtipul luminal A	115
Anexa 3. Interrelații dintre conținutul vaselor sangvine, limfatice și a elementelor celulare incluse în studiu, subtipul luminal B.....	117
Anexa 4. Interrelații dintre conținutul vaselor sangvine, limfatice și a elementelor celulare incluse în studiu, subtipul HER2+	118
Anexa 5. Interrelații dintre conținutul vaselor sangvine, limfatice și a elementelor celulare incluse în studiu, subtipul triplu-negativ.....	119
Anexa 6. Densitatea mastocitelor ca factor predictiv și de prognostic în evoluția subtipurilor moleculare de carcinom mamar. Certificat de inovator.	120
Anexa 7. Act de implementare: Densitatea mastocitelor ca factor predictiv și de prognostic în evoluția subtipurilor moleculare de carcinom mamar.	121
INFORMAȚII PRIVIND VALORIFICAREA REZULTATELOR CERCETĂRII.....	122
CURRICULUM VITAE	126

LISTA ABREVIERILOR

Ang	angiopoietin
APC	antigen presenting cell
AR	androgen receptor
BM	basement membrane
BRCA1, 2	breast related cancer antigen 1, 2
BrdU	bromodeoxyuridine
CAF	cancer associated fibroblast
CCR	chemokine receptor
CD4, 10, 26	cluster of differentiation 4, 10, 26
CI	confidence interval
CK	citokeratin
COX-2	cyclooxygenase 2
CRTH2	chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells
CSF1	colony stimulating factor 1
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4
CXCR	chemokine receptors
DC	dendritic cells
DCIS	ductal carcinoma <i>in situ</i>
EC	endothelial cell
ECM	extracellular matrix
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMA	epithelial membrane antigen
ER	estrogen receptor
FAP	fibroblast activation protein
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FOXP3+	forkhead box P3
GCDFP-15	gross cystic disease fluid protein 15
HE	hematoxilină - eozină
HER	human epidermal growth factor receptor
HIF	hypoxia inducible factor
HGF	hepatocyte growth factor
IFN	interferon
IHC	imunohistochimie
IL	interleukine
IQR	interquantile range – abaterea intercuantilică
it	intratumoral
LAG-3	lymphocyte-activation gene 3
LEC	lymphatic endothelial cell
LECP	precursor of lymphatic endothelial cell
LM-111	laminin-111
LOX	lysyl oxidase
LVD	lymphatic vessel density

LYVE	lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor
MC	mast cell
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MDSC	myeloid-derived suppressor cell
MFGM	milk fat globule membrane antigen
MHC	major histocompatibility complex
MMP	matrix metalloproteinase
MVD	microvessel density
NG2	neural/glial antigen 2
NOS	not otherwise specified
NST	no special type
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PD-L	programmed death-ligand
PF4	platelet factor 4
PGE2	prostaglandin E2
PIGF	placental growth factor
PR	progesterone receptor
PROX1	prospero homeobox protein 1
pt	peritumoral
ROS	reactive oxygen species
SCF	stem cell factor
SMA	smooth muscle actin
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1
TAM	tumor associated macrophage
Tbet	t-box expressed in T cells
TDLU	terminal duct-lobular unit
TGF-β	transforming growth factor beta
Th	T helper
TNF-α	tumor necrosis factor α
TNBC	triple negative breast cancer
Treg	T regulatory
TSP	thrombospondine
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța temei. Cancerul mamar este una dintre cele mai frecvente tumori maligne în lume. Conform datelor GLOBOCAN, în 2020 această tumoare a înregistrat o incidență de 11.7% (2 206 771 de cazuri noi) dintre toate cancerurile și o mortalitate de 6.9% (684 996 de decese) reprezentând prima cauză de deces la femeile cu vârsta cuprinsă între 20 și 50 de ani. O incidență mai mare se atestă în țările dezvoltate, fapt datorat diagnosticului mai precoce grație implementării *screening*-ului prin mamografie și a prevalenței unor factori de risc hormonal și reproductivi, precum: instalarea precoce a menarhei și instituirea menopauzei la o vârstă mai înaintată, prima naștere tardivă, număr mic de copii, alăptare la sân de scurtă durată, folosirea contraceptivelor orale, terapia de substituție hormonală, stil de viață nesănătos (abuz de alcool și/sau droguri, greutate corporală excesivă, lipsa activității fizice) [1, 2].

Cancerul mamar este o afecțiune eterogenă în ceea ce privește structura morfologică a tumorii, răspunsul terapeutic, modalitatea de metastazare la distanță și prognosticul [3]. Parametrii standard analizați, precum dimensiunile tumorii, gradul histologic, invazia vasculară și metastazele limfonodale sunt utili, dar insuficienți. Mai mult decât atât, pacientele cu parametri aparent identici pot evolua complet diferit ceea ce face imperativă necesitatea unei abordări individuale. Factorii sus-menționați au impus studierea caracteristicilor moleculare ale tumorii și au permis descoperirea subtipurilor moleculare de către Perou et al. în 2000. Aceste subtipuri au la bază diferiți factori de risc, evoluează diferit și trebuie abordate individual din punct de vedere terapeutic, iar clasificarea tumorilor în baza expresiei ER, PR și HER2 a devenit o procedură de rutină în clinică [1, 4-5].

Cu trecerea timpului s-a observat că nici clasificarea moleculară nu descrie perfect toate entitățile, motiv pentru care se impune identificarea unor noi markeri moleculari [6]. Astfel au apărut în scenă elementele stromei tumorale, care până acum erau în umbră deoarece studiul cancerului a fost axat preponderent pe celulele tumorale propriu-zise. Deși Paget a propus teoria „seminței și a solului” încă în 1889, sugerând că celulele neoplazice („semințele”) pot forma tumori doar în cazul unui micromediu favorabil („solul”), abia recent cercetătorii au început să studieze importanța stromei tumorale [7]. Modificările produse la nivelul stromei acum sunt considerate drept unul din elementele esențiale ale tumorigenezei și ale progresiei tumorale. Astfel, s-a stabilit că elementele microambianței tumorale, precum celulele imune, matricea extracelulară, pot acționa sinergic blocând imunitatea antitumorală și stimulând progresarea cancerului și metastazarea. În acest fel, elementele stromale s-au dovedit a fi factori de prognostic, iar unele dintre acestea ar putea fi țintite terapeutic [8].

În acest studiu am analizat expresia unui șir de markeri celulari din stroma tumorală în dependență de subtipul molecular al neoplasmului.

Scopul lucrării: Studiul varietăților celulare și al elementelor vasculare din stroma carcinoamelor mamare în dependență de subtipul molecular al tumorii în vederea îmbunătățirii diagnosticului morfologic și prognosticului cancerului mamar.

Obiectivele studiului:

1. Evaluarea histologică și imunohistochimică a varietăților celulare (CD68, S100, triptaza mastocitară) din stroma carcinoamelor mamare în diferite subtipuri moleculare ale tumorii.
2. Studiul particularităților rețelelor vasculare sangvină (CD34) și limfatică (D2-40) în carcinoamele mamare în funcție de subtipul molecular.
3. Analiza interrelațiilor dintre elemente celulare, vase sangvine și limfatice *versus* subtipul molecular al tumorii.
4. Elucidarea impactului diverselor elemente stromale asupra diagnosticului, prognosticului și evoluției carcinomului mamar.

Metodologia cercetării științifice. Specimenele și datele pacientelor au fost selectate din fișele histopatologice din arhiva Spitalului Clinic Județean de Urgență, Serviciul de Anatomie Patologică, Arad, România. Profilul histopatologic al tumorilor s-a realizat pe secțiuni colorate cu hematoxilină și eozină, conform procedurii standard. Ulterior, s-a realizat colorarea imunohistochimică cu scopul de a stabili profilul molecular al tumorii. Pentru studiul elementelor stromale, din materialul tisular rămas în cadrul fiecărui bloc de parafină s-au creat blocuri *microarray*. Întreaga tehnică imunohistochimică a fost realizată automat (Leica Bond-Max, Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK), aplicându-se următorii anticorpi: anti-ER, anti-PR, anti-HER2, anti-CK5/6, anti-Ki-67, anti-CD68, anti-S100, anti-triptază mastocitară, anti-D2-40 și anti-CD34. Datele au fost stocate într-o bază de date MS Excel 2010, iar ulterior analizate cu ajutorul programului SPSS. Esecurile statistice au inclus determinarea mediei, deviației standard, medianei, intervalului intercuantilic, intervalului de încredere, coeficientului de corelație al lui Spearman. Diferența dintre două grupuri de variabile s-a analizat prin aplicarea testului Mann-Whitney U. Am considerat un $p \leq 0,05$ drept statistic semnificativ. Cercetarea s-a efectuat în cadrul Catedrei de histologie, citologie și embriologie al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” și în cadrul Departamentului de Morfologie Microscopică/ Histologie, Centrul de Cercetare în Angiogenează al Universității de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” din Timișoara, România. Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” (nr. 33/ 37/ 12.02.2018).

Noutatea și originalitatea științifică a rezultatelor obținute. Pentru prima dată a fost efectuat un studiu comparativ al profilului molecular al carcinoamelor mamare *versus* elemente celulare (macrofage, mastocite, celule dendritice) și vasculare (sangvine și limfatice) din stroma tumorală. În premieră a fost evaluat gradul expresiei unor markeri celulari (CD68, S100, triptaza,

CD34, D2-40) în ariile intra- și peritumorale în raport cu expresia markerilor ER, PR și HER2. Au fost descrise modificările cantitative și calitative ale componentelor celulare și vasculare din stroma tumorală în subtipurile luminale și non-luminale.

Problema științifico-aplicativă soluționată. În această lucrare a fost analizată posibilitatea existenței relației dintre expresia diferențiată a markerilor unor elemente celulare din stroma tumorală și evoluția carcinoamelor mamare de tip luminal *versus* non-luminal.

Semnificația teoretică. Evaluarea cantitativă și calitativă a elementelor stromale în carcinoamele mamare permite completarea cunoștințelor existente despre rolul stromei în evoluția și progresarea neoplaziilor mamare, cu accent asupra diferențelor între grupul luminal și non-luminal.

Valoarea aplicativă a lucrării. Lucrarea confirmă utilitatea aplicării metodelor histologice și a colorației imunohistochemice în diagnosticarea și evaluarea modificărilor stromei în neoplaziile mamare.

Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere:

1. Microambianța tumorală constituie un element esențial în structura carcinoamelor mamare, influențând creșterea și progresia acestora. Interrelațiile dintre celulele epiteliale și structurile stromale sunt complexe, stimulatorii sau inhibitorii, astfel gestionarea stromei este imperativă pentru potențarea sau încetinirea expansiunii celulelor neoplazice.
2. În carcinoamele mamare de tip luminal densitatea mastocitelor în ariile peritumorale prevalează față de cea a macrofagelor și a celulelor dendritice manifestând o corelație pozitivă statistic semnificativă. În tumorile ER+ și PR+ ariile intratumorale au prezentat o densitate mai înaltă a mastocitelor față de cele peritumorale, astfel tumorile hormonal pozitive manifestă chemoatractivitate pentru celulele triptază+, stimulând migrarea acestora.
3. Majoritatea carcinoamelor mamare hormonal independente au prezentat o densitate înaltă a macrofagelor atât în stroma intratumorală cât și în cea peritumorală. În cadrul carcinoamelor ER+ și PR+ densitatea celulelor CD68+ a înregistrat valori joase.
4. Pierderea receptorilor pentru estrogeni/ progesteron este însoțită de creșterea densității celulelor S100+ peritumorale. Pozitivitatea pentru S100 a celulelor canceroase sugerează modularea antigenică a acestora, cu transfer de proprietăți și „mimetism” sau poate fi consecința fuziunii celulei dendritice cu celula neoplazică.
5. Mastocitele sunt elementele celulare capabile să moduleze stroma carcinoamelor mamare, fiind implicate în angiogeneză și limfangiogeneză, densitatea înaltă a mastocitelor fiind însoțită și de scăderea numărului de celule dendritice și macrofage.

6. În carcinoamele mamare slab diferențiate densitatea vaselor sangvine și limfatice este mai înaltă, cu predilecție în ariile peritumorale, creând astfel condiții favorabile pentru expansiunea tumorală. Carcinoamele mamare ce expresează receptori pentru estrogeni, progesteron sau proteina HER2 nu manifestă corelație semnificativ statistică cu densitatea vasculară.

Implementarea rezultatelor științifice: Rezultatele obținute au fost implementate în activitatea didactică și științifică a Catedrei de histologie, citologie și embriologie și a Laboratorului de morfologie al USMF „Nicolae Testemițanu”.

Aprobarea rezultatelor: Rezultatele obținute și concepțiile de bază ale tezei au fost prezentate și discutate în cadrul următoarelor reuniuni științifice: Zilele Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova (Chișinău, 2019); Congresul consacrat aniversării a 75 de ani de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova (Chișinău, 2020); Conferința științifică internațională dedicată aniversării a 75 de ani de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova (Chișinău, 2020); Congresul internațional medical pentru studenți și tineri medici MedEspera (Chișinău, 2020); Conferința științifică anuală Cercetarea în biomedicină și sănătate: Calitate, excelență și performanță. Zilele Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova (Chișinău, 2021).

Rezultatele acestui studiu au fost discutate și aprobate la ședința Catedrei de histologie, citologie și embriologie a USMF „Nicolae Testemițanu” (proces verbal nr.8 din 11.04.23) și Seminarul științific de profil 311. Anatomie și morfologie; 351. Medicină interdisciplinară (proces verbal nr. 2 din 23.05.23).

Publicații la tema tezei. La tema tezei au fost publicate 9 lucrări științifice, dintre care: 1 articol în reviste internaționale indexate în SCOPUS/ PubMed; 5 articole în reviste din Registrul Național al revistelor de profil; 1 articol în materialele conferințelor științifice internaționale; materiale la conferințe naționale și internaționale – 2. Totodată au fost obținute 1 certificat de inovator și 1 act de implementare practică a rezultatelor științifice.

Sumarul compartimentelor tezei. Lucrarea cuprinde lista abrevierilor, introducere, 4 capitole, concluzii generale și recomandări practice. Bibliografia cuprinde 209 surse, fiind urmată de 7 anexe, declarația privind asumarea răspunderii, CV-ul autorului. În introducere au fost descrise actualitatea și importanța problemei abordate în teză, scopul, obiectivele, metodologia generală de cercetare, noutatea științifică, importanța teoretică și valoarea aplicativă a lucrării, aprobarea rezultatelor studiului.

Capitolul 1. Stroma tumorală în diverse variante moleculare de carcinoame mamare.

În acest capitol au fost elucidată factorii etiologici în dezvoltarea carcinoamelor mamare, histologia și profilul molecular al glandei mamare atât în normă cât și în transformarea malignă. De asemenea a fost analizat rolul elementelor stromale (celulare și vasculare) în declanșarea și susținerea procesului neoplazic, controversile legate de relațiile stromo-parenchimotoase și posibilitatea țintirii terapeutice.

Capitolul 2. Material și metode de cercetare. Acest capitol a fost dedicat design-ului studiului; s-a descris lotul de cercetare, metodele de identificare a elementelor structurale stromale precum și modul în care am efectuat analiza statistică a datelor obținute.

Capitolul 3. Modificări cantitative și calitative ale elementelor stromale în diverse subtipuri moleculare de carcinoame mamare. În cadrul acestui capitol a fost efectuată o caracteristică imunohistochimică amplă a stromei din carcinoamele mamare în funcție de subtipul molecular cu descrierea expresiei diferiților markeri ai componentelor mediului tumoral. De asemenea, au fost evaluate interrelațiile dintre componenta celulară și cea vasculară în dependență de profilul molecular al carcinomului mamar.

Capitolul 4. Evaluarea modificărilor stromale în variantele moleculare de cancer mamar. Datele obținute au fost comparate cu cele expuse în literatura de specialitate. Totodată am efectuat o sinteză a rezultatelor obținute și am confruntat diverse elemente structurale ale stromei tumorale, în special a celor cu funcții antagoniste și controversate.

Cuvinte-cheie: ER, PR, HER2, subtipuri moleculare, microambianță, stroma intratumorală, stroma peritumorală

1. STROMA TUMORALĂ ÎN DIVERSE VARIANTE MOLECULARE DE CARCINOAME MAMARE

Cancerul glandei mamare reprezintă cea mai frecventă formă de neoplazii la femei, constituind o problemă majoră cu impact global, înregistrând-o morbiditate și mortalitate înaltă [2, 9, 10]. Conform datelor GLOBOCAN, în 2020 în lume s-au înregistrat circa 2.3 milioane de cazuri noi de cancer mamar, dintre care aproape o jumătate (1 026 171 de cazuri, 45.4%) pe continentul asiatic și cca un sfert în Europa (531 086 de cazuri, 23.5%). Către anul 2050 se prognozează o incidență de aproximativ de 3.2 milioane de cazuri noi anual [10].

Potrivit datelor statistice, în Republica Moldova cancerul glandei mamare ocupă primul loc în structura morbidității printre tumorile maligne la femei. Conform datelor prezentate de Cancer Registrul al IMSP Institutul Oncologic, incidența tumorilor maligne mamare este în continuă creștere (figura 1). Astfel, în 2020 s-a înregistrat practic o dublare a incidenței cancerului mamar comparativ cu anul 2005 [9, 11, 12].

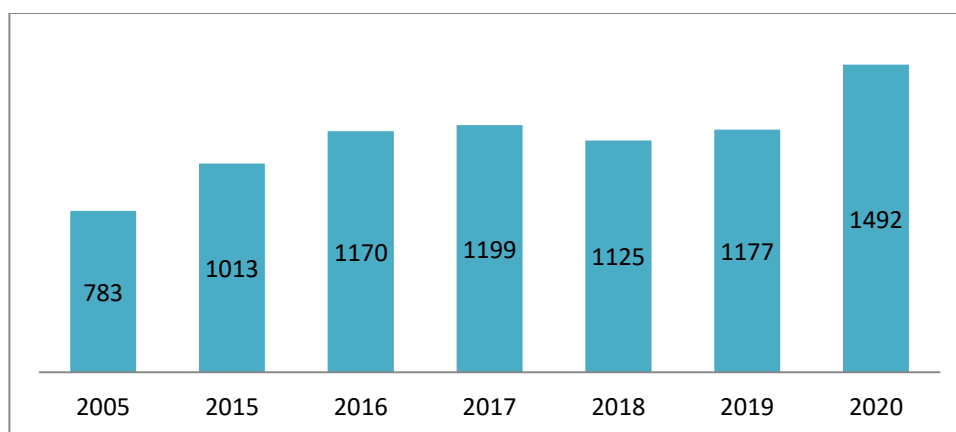


Figura 1. Incidența cancerului mamar în Moldova, 2005-2020, la 10000 locuitori [9, 11, 12].

1.1. Etiologia cancerului mamar

Cu toate că știința a avansat enorm în ultimii ani, în special în ceea ce privește înțelegerea mecanismelor genetice și moleculare ce stau la baza tumorigenezei, totuși cancerul mamar rămâne prima cauză de deces la femei în majoritatea țărilor înalt dezvoltate [10, 13]. Această maladie reprezintă o entitate heterogenă, unde mai mulți factori (genetici, de mediu, socio-biologici, fiziologici) se intersectează pentru a iniția și susține o transformare neoplazică. La momentul actual sunt cunoscuți un șir de factori etiologici cărora li se incriminează rolul de inițiatori în dezvoltarea neoplasmelor mamare, dar, de remarcat, nici unul dintre ei, separat sau în combinație nu sunt suficienți pentru a explica pe deplin etiologia bolii [14]. Așadar, putem

enumera astfel de factori etiologici cum ar fi: stresul acut și cronic [9, 15-17]; traumele fizice ale glandei mamare [9]; factori reproductivi (menarhă precoce, menopauza tardivă, ciclul menstrual neregulat, avorturile, nuliparitatea, vârsta la care femeia naște primul copil) [9, 13, 18-21]; expunerea la estrogeni exogeni (utilizarea contraceptivelor orale și a terapiei de substituție hormonală) [19, 22-24]; patologii ale organelor sistemului genital (miomul uterin, endometrioza, polichistoza ovariană, procesele inflamatorii ale ovarelor) [9, 20]; lactația [9]; factorul ereditar (genele supresoare de tumori BRCA1, BRCA2 (*Breast Related Cancer Antigen 1, 2*, eng.) [9-10, 14, 25]; abuzul de alcool [9, 19]; sedentarismul și, respectiv, obezitatea [19]; alimentația [9, 26]; fumatul [9]; radiația [9, 27-28]; stări funcționale dishormonale și patologii asociate (tiroidiene, ginecologice, neurologice, hepatice) [9]. Factorii sus-menționați pot fi clasificați drept modificabili (consumul de alcool, dieta, nivelul de activitate fizică, expunerea la radiație etc.) și nemodificabili (vârsta, ereditatea, etc.). Într-un studiu realizat de Tamimi et al., s-a demonstrat că riscul atribuibil de dezvoltare pentru cancerul mamar a scăzut de la 70% până la 34.6% odată cu schimbarea factorilor modificabili într-o direcție pozitivă (alăptare mai îndelungată, practicarea sportului și menținerea unei mase corporale adecvate, alimentație sănătoasă și evitarea fumatului, consumului de alcool, etc.) [27]. Autorii de asemenea au ajuns la concluzia că în SUA factorii de risc modificabili sunt implicați în cca 1/3 din cazuri de cancer mamare, astfel subliniind că un număr considerabil de tumori ale glandei mamare ar putea fi prevenit.

1.2. Histologia glandei mamare

Glanda mamară reprezintă o trăsătură distinctivă a mamiferelor. În timpul dezvoltării embrionare, diferențierea și creșterea țesuturilor acestei glande are loc la ambele sexe și continuă după același scenariu până la maturarea sexuală. Odată cu instalarea pubertății, la bărbați, nivelul înalt de testosteron inhibă creșterea în continuare a acesteia. În același timp, glanda mamară la femei suferă o dezvoltare ulterioară sub influența estrogenilor și a progesteronului, creșterea fiind mediată de hiperplazia țesutului adipos interlobular. Canalele se extind și se ramifică în stroma țesutului conjunctiv aflat în expansiune. Proliferarea celulelor epiteliale este influențată de interacțiunile dintre epiteliu și stroma conjunctivă subiacentă, iar arhitectura ductală se stabilește până la perioada de maturitate [29].

Din punct de vedere histologic, glanda mamară reprezintă glande sudoripare apocrine tubuloalveolare modificate. La adulți, glanda mamară inactivă este constituită din 15-20 lobi separați prin septuri de țesut conjunctiv fibros lax. Acestea radiază de la mamelon și divizează glanda în numeroase structuri, cunoscute ca unități lobulare ale canalului terminal (TDLU, *Terminal Duct Lobular Units*, eng.). Fiecare TDLU este constituit din:

- **Ducturi terminale** – prezente în glanda inactivă; în timpul sarcinii și după naștere, epitelii ducturilor terminale se diferențiază în alveole secretoare;
- **Duct colector intralobular** care transportă secrețiile alveolare în ductul lactifer;
- **Stromă intralobulară** reprezentată de țesut conjunctiv fibros lax, hormono-dependent, cu puține celule adipoase, care înconjoară ducturile terminale și alveolele [29].

Căile conductoare lactifere sunt căptușite de celule epiteliale luminale cu activitate secretorie, înconjurate de un strat de celule mioepiteliale cu proprietăți contractile, care facilitează lactația [30]. În glanda inactivă, componenta glandulară este rară și este formată preponderent din elemente ductale. În timpul ciclului menstrual, sânul suferă modificări ciclice. La începutul fazei foliculare, ducturile terminale apar sub formă de corzi formate din celule epiteliale cubice, lumenul ducturilor fiind îngust sau absent. În timpul fazei luteale însă, celulele epiteliale cresc în înălțime, iar în ducturi apare un lumen mai larg pe măsură ce se acumulează componente secretorii. Urmează o involuție bruscă și apoptoză în ultimele zile ale ciclului menstrual. În menopauză, se determină atrofia glandei mamare, atât la nivel glandular, cât și cel stromal. În absența efectului stimulator generat de hormonii ovarieni ai foliculilor evolutivi, celulele secretoare ale TDLU degenerază, creându-se un model histologic care seamănă cu cel al sânului masculin. Țesutul conjunctiv manifestă, de asemenea, modificări degenerative, marcate printr-o scădere a numărului de fibroblaste, care inevitabil induce o scădere cantitativă de fibre de colagen și fibre elastice [29].

1.3. Clasificarea histopatologică a carcinoamelor mamare

Din punct de vedere istoric, sistemele de clasificare a cancerului de sân s-au bazat pe evaluarea histopatologică. Mai recent, expresia ER, PR și supraexpresia și/sau amplificarea HER2 au fost incluse pentru a rafina clasificarea și prezicerea prognosticului, precum și a potențialului răspuns la tratamentul hormonal [31].

Neoplasmele mamare pot origina din orice component celular al glandei, manifestând astfel variate trăsături morfologice, profiluri IHC, fiecare având o evoluție clinică diferită. Cea mai frecventă leziune malignă descrisă este adenocarcinomul mamar (95% din cazuri), mai rar întâlnindu-se sarcoamele și limfoamele [32]. Adenocarcinoamele se clasifică în ductale sau lobulare, deși s-a demonstrat că ambele entități își iau originea la nivelul TDLU. Modificările displazice care nu depășesc limitele membranei bazale a epitelului sunt clasate drept **carcinoame *in situ***, iar acele care invadează stroma sunt **carcinoame invazive** [32].

Carcinomul ductal invaziv de tip NST (fără tip histologic special) (*No Specific Type*, eng.), cunoscut anterior drept carcinom ductal invaziv NOS (*No Otherwise Specified*, eng.) este diagnosticat în 45%-75% din cazuri. Din punct de vedere morfologic poate prezenta o gamă

foarte largă de modificări structurale care nu depind de mărimea focarului tumoral, gradul de diferențiere tumorală și raportul parenchimului față de stromă. Evoluția clinică este absolut imprezvizibilă. Celulele maligne pot fi solitare, dispersate în stromă, sau aranjate în cordoane, cuiburi, arii compacte solide; din punct de vedere citopatologic pot manifesta diferite grade de poli- și pleiomorfism, au nucleoli pronunțați cu un indice mitotic crescut, inclusiv cu figuri mitotice atipice. În 60% din cazuri se pot observa focare de necroză și calcificare [32]. Diagnosticul de carcinom invaziv de tip NST este unul de excludere, atunci când o tumoră nu îndeplinește criteriile pentru un subtip histologic special [31].

Tipurile speciale de carcinom ductal invaziv se stabilesc în baza unor criterii precum: tip de celule (carcinom apocrin), cantitatea și localizarea veziculelor secretorii (carcinom mucinos), trăsături arhitecturale (carcinom papilar, tubular, micropapilar), profil IHC (carcinom neuroendocrin) [32]. Aceste tipuri specifice de tumori prezintă, de asemenea, particularități clinice, epidemiologice și moleculare [33].

Carcinomul lobular invaziv constituie 5%-15% dintre tumorile invazive, fiind al doilea tip histopatologic de neoplasm mamar ca frecvență. Se întâlnește mai des la femeile peste 50 de ani. Deoarece majoritatea sunt ER pozitive, în grupa de risc sunt în special femeile cu menarhă timpurie, menopauză tardivă, vârstă înaintată la nașterea primului copil. Poate fi diagnosticat în baza unui *pattern* specific al celulelor: lipsa coeziunii și aranjament liniar [32, 34].

Carcinomul ductal *in situ* (DCIS, *Ductal Carcinoma In Situ*, eng.) reprezintă o proliferare neoplasică a celulelor epiteliale ce nu invadează stroma înconjurătoare, caracterizată prin atipie celulară și nucleară, tendință de a se transforma într-o leziune invazivă. Transformarea nu este obligatorie și poate dura ani sau decenii. Celulele mioepiteliale pot scădea în număr. Incidența acestui tip de cancer a crescut considerabil odată cu implementarea *screening*-ului prin mamografie, care a făcut posibilă detectarea acestei leziuni la stadiile timpurii [32-33].

Carcinomul lobular *in situ* este o proliferare intralobulară, diagnosticată în 0.5-4% din cazuri. De obicei arhitectura lobulului este nemodificată și leziunea este identificată ocazional în cadrul biopsiilor unor tumori considerate benigne [32, 35]. OMS clasifică această leziune (împreună cu DCIS) drept una precanceroasă, iar riscul de transformare în carcinom lobular invaziv sau ductal invaziv în decurs de 15 ani variază între 11% și 28% [33, 35]. Conform altor date, carcinomul invaziv se dezvoltă la 25%-30% dintre pacientele observate timp de 20 de ani. Mai mult decât atât, riscul de apariție a carcinomului invaziv la pacientele cu carcinom lobular *in situ* este de cca 12 ori mai mare decât la cele fără [32].

Cel puțin 5% din carcinoamele mamare invazive nu pot fi clasificate cu certitudine drept ductale, lobulare, sau chiar ca mixte, IHC în astfel de circumstanțe poate fi utilă, E-cadherina de exemplu fiind negativă în aproape toate cazurile de carcinom lobular infiltrativ [36].

Toate carcinoamele mamare invazive, indiferent de tipul morfologic, trebuie gradate histologic, sistemul de gradare Nottingham fiind cel mai des utilizat [37]. Scorurile sunt atribuite în conformitate cu formarea structurilor tubulare (1–3 puncte, 3 fiind formarea slabă a tubului), gradul de pleomorfism nuclear (1–3 puncte cu 3 prezentând un grad ridicat de pleomorfism) și numărul de mitoze (1–3 puncte, 3 fiind un număr mare de mitoze). Scorurile sunt apoi sumate pentru a se stabili gradele 1 (scor total 3 la 5), 2 (scor 6 sau 7) sau 3 (scor 8 sau 9), unde tumorile de gradul 1 sunt cele mai diferențiate și de gradul 3 sunt cel mai slab diferențiate. Gradul tumorii este un factor de prognostic important și alături de statutul nodurilor limfatice este un instrument de luare a deciziilor clinice [31].

Clasificarea TNM este bazată pe date morfologice și paraclinice cum ar fi dimensiunea leziunii tumorale (T), implicarea nodurilor limfatice regionali și locația metastazelor distante (M) [37].

1.4. Profilul molecular al glandei mamare în normă

Trăsăturile biologice ale tumorii influențează prognosticul și tactica unui tratament adecvat pentru pacienții cu cancer mamar. Aprecierea markerilor moleculari prin IHC a devenit o procedură de rutină, care permite încadrarea neoplasmului într-un subtip molecular și ghidarea dinamică a tratamentului. Interes prezintă nu doar markerii expresați în normă sau în patologie, dar și gradul de expresie al receptorilor hormoni pentru estrogeni ER (*Estrogen Receptor*, eng.), progesteron PR (*Progesterone Receptor*, eng.), androgeni AR (*Androgen Receptor*, eng.), markerii proliferării tumorale (HER2, Ki-67), factorii implicați în angiogeneză (VEGF, CD34, etc.), limfangiogeneză (D2-40) și apoptoză (p53). Este remarcabilă utilitatea diagnosticului IHC și în diferențierea patologiilor mamare benigne față de cele maligne, de asemenea și în identificarea focarelor microinvazive. De exemplu, markerii celulelor mioepiteliale sunt de neînlocuit în diagnosticul diferențial al carcinoamelor *in situ* cu cele invazive [38].

Parenchimul glandei mamare include următoarele categorii de celule:

- Celule **luminale**, exprimă citokeratinele cu masa moleculară mică (7, 8, 18, 19), antigenul membranelor epiteliale (EMA, *Epithelial Membrane Antigen*, eng.), antigenul membranelor al globulelor de grăsime din lapte (MFGM, *Milk Fat Globule Membrane Antigen*, eng.), α -lactalbumina, ER, PR, AR;
- Celule **bazale**, exprimă citokeratinele cu masa moleculară mare (5/6, 14, 17) și receptorul factorului de creștere epidermală (EGFR, *Epidermal Growth Factor*, eng.);
- Celule **mioepiteliale**, exprimă citokeratinele 14, 17, actina de mușchi neted (α -SMA, *Smooth Muscle Actin*, eng.), calponina, S100, p63[38].

În tabelul 1 sunt redați markerii cel mai frecvent utilizați în practică principalii.

Tabelul 1. **Markeri exprasați de celulele glandulare intacte** [38]

Marker	Expresie	Utilizat pentru identificarea
α -SMA	Citoplasmatică	Celule mioepiteliale
Calponina	Citoplasmatică	
p63	Nucleară	
Miozina mușchiului neted, lanțul greu	Citoplasmatică	
CD10	Membrară	
S100	Citoplasmatică	
CK cu masa moleculară mare (5/6 și 14)	Citoplasmatică	- Diagnostic diferențial al carcinomului invaziv și a leziunilor benigne - Carcinom lobular
E-cadherina	Membrară	Carcinom ductal
CK8	Citoplasmatică periferică	
CK8	Perinucleară	Carcinom lobular
CK7 și 20	Membrară, citoplasmatică	Origine mamară a carcinomului metastatic
ER, PR	Nucleară	Origine mamară a carcinomului metastatic Determinarea subtipurii moleculare
HER2	Membrară	Determinarea subtipurii moleculare
GCDFP-15	Citoplasmatică	Origine mamară a carcinomului metastatic
Mammaglobina A		

Receptorii hormonal pentru estrogeni (ER) și progesteron (PR) reprezintă unii dintre cei mai vizați markeri moleculari în studiile legate de cancerul mamar, iar tumorile ER pozitive sunt cele mai frecvent diagnosticate. Estrogenii sunt hormoni steroizi cu mecanism de acțiune nuclear care includ estrona, 17β -estradiolul, estriolul și estetrolul, sursa principală a acestora la femeia în premenopauză fiind ovarele [19, 39-40]. Estradiolul este cel mai potent estrogen circulant, predomină până la menopauză și contribuie la inițierea și dezvoltarea tumorilor maligne [19, 39].

Rolul estrogenilor în etiopatogenia cancerului mamar a fost pentru prima dată suspectat de George Beatson, care a constatat scăderea dimensiunii tumorii după ovariectomie bilaterală la pacientele cu cancer mamar [41]. Acțiunea estrogenilor este mediată de 2 receptori: $ER\alpha$ și $ER\beta$. Primul predomină în țesutul glandular mamar. $ER\beta$, în schimb, are un rol secundar în glanda mamară, uter, țesutul osos și cel adipos, dar este unicul receptor estrogenic exprimat în vasele sangvine, celulele inflamatorii și în tractul gastro-intestinal [41-42]. Interacțiunea dintre estrogeni și ER activează transcripția și sinteza unui șir de proteine care sunt responsabile de multiplele efecte ale acestor hormoni [41].

Estrogenii joacă un rol crucial în reglarea ciclului celular în țesutul glandular mamar. Frasor et al. au tratat celulele canceroase ER pozitive cu estrogeni pentru 48 ore și au observat că în 30% dintre celule a avut loc supraexpresia proteinelor stimulative a ciclului celular, precum ciclina D1. În același timp a diminuat expresia proteinelor inhibitoare a ciclului celular, de exemplu ciclina G2 [43]. În glanda mamară normală, Clarke et al. au arătat că celulele ER α -pozitive au exprimat gena PR, dar nu și markeri de proliferare BrdU (*Bromodeoxyuridine*, eng.) sau Ki-67 [44]. În carcinoamele mamare, printre efectele estrogenilor se enumeră stimularea metastazării prin fosforilarea ezrinei, proteină ce fixează filamentele citoscheletului și joacă un rol important în stabilirea joncțiunilor intercelulare [40]. De asemenea, estradiolul inhibă expresia E-caderinei [41-42].

La moment sunt descriși un șir de compuși cu rol agonist sau antagonist ce pot fi utilizați pentru blocarea efectului estrogenilor prin legare competitivă cu ER. Tamoxifenul este un antagonist al estrogenilor în celulele glandei mamare, pe când în majoritatea altor celule-țintă are efect agonist. Raloxifenul are acțiune antiproliferativă asupra celulelor tumorale din glanda mamară, dar nu afectează țesutul osos. Un alt antagonist al estrogenilor este compusul fulvestrant [42].

Conform celor relatate anterior, conchidem că expresia ER se atestă atât în țesutul mamar intact, cât și în carcinoamele mamare. De menționat că celulele din glanda mamară normală prezintă pozitivitate sporadică pentru ER α și niveluri ridicate de expresie ale ER β în prezența celulelor proliferative ER α -negative. Diverse studii arată că celulele ER α -pozitive din glanda mamară normală au constituit 4.0% [45], 17.3% [44] și 5-28% [46] din celulele epiteliale [41, 47-48]. Expresia ER poate fi determinată prin IHC, iar o tumoare ER pozitivă presupune, în mod implicit, expresia ER α (în cel puțin 1% din nucleele tumorale), rolul ER β fiind mai puțin cunoscut [41, 47].

Spre deosebire de estrogeni, care reglează alungirea ductală, progesteronul induce sau potențează ramificarea laterală și dezvoltarea lobulară. Totodată, progesteronul este recunoscut drept hormon cu efect proliferativ major în sarcină. În glanda mamară normală, în premenopauză, ER și PR, *per ansamblu*, au o expresie scăzută și distribuție rară. ER prezintă variații ciclice a nivelurilor de expresie pe tot parcursul ciclului menstrual, pe când PR manifestă un nivel de expresie mai constant. În faza foliculară a ciclului menstrual este detectată o expresie joasă a ER. În faza luteală și în sarcină ER este exprimat în cantități infime, în ciuda faptului că expresia PR persistă în timpul acestor faze de dezvoltare. Numărul de celule care exprimă ER crește odată cu vârsta până la menopauză, în timp ce PR prezintă o expresie scăzută la femeile aflate în postmenopauză. Există, de asemenea, din ce în ce mai multe dovezi că sarcina la termen induce modificări ale expresiei genelor pe termen lung, femeile care au născut prezentând o

expresie mai scăzută a ER și PR decât femeile nulipare, un mecanism care poate contribui la efectul protector pe termen lung al sarcinii asupra sânului [30].

Expresia **HER2** și a receptorului 1 al factorului de creștere epidermic (HER1 sau **EGFR**, *Epidermal Growth Factor Receptor 1*, eng.) poate fi detectată atât în celulele maligne, cât și în cele nemodificate. Nivelurile de expresie HER2 sunt mai mari în leziunile maligne față de normă, cu supraexpresie în subtipurile HER2+ și luminal B/ HER2+, în timp ce nivelurile de EGFR sunt înalte în tumorile triplu-negative [25].

AR, în normă, este însoțit de expresia ER în majoritatea cazurilor. Aproximativ 10% dintre celulele luminales sunt numai AR pozitive. În leziunile maligne, este supraexpresat în tumorile HER2+ și cele ER negative [25].

Bcl2 este implicat în blocarea apoptozei celulare, generând celule „nemuritoare”. Această proteină este expresată în toate stadiile de dezvoltare a glandei mamare. În condiții patologice, Bcl2 este expresat de epiteliocele din leziuni hiperplazice și maligne ale sânului. Expresia Bcl2 în tumori totuși este încă un subiect controversat [25].

Ki-67 reprezintă o proteină nucleară nonhistonă expresată în toate fazele active ale ciclului celular, cu excepția fazei G₀ [49]. Acest marker este considerat un criteriu important de prognostic în evaluarea cancerului de sân deoarece corelează puternic cu gradul tumorii [25].

Celulele epiteliale exprimă și markerul **BRCA1**, iar pierderea acestuia, precum s-a discutat anterior, provoacă diverse mutații în celule [50].

Alte proteine expresate în normă de celulele epiteliale sunt factorul indus de hipoxie 1 α și 2 α (HIF, *Hypoxia Inducible Factor*, eng.). În cazul concentrației normale de oxigen, aceste proteine sunt sintetizate și în continuu degradate. În caz de hipoxie (precum este cazul tumorilor), proteinele date sunt stabilizate și concentrația lor crește. Acestea posedă multiple funcții, printre care activarea transcripției unui șir de gene reglatoare a transportului de glucoză, a enzimelor glicolitice, a gluconeogenezei, a factorilor de creștere, a eritropoiezei, a transportului de fier și astfel sporește supraviețuirea celulelor canceroase în condiții nefavorabile. Bos et al. au demonstrat că supraexpresia HIF 1 α este asociată cu o proliferare celulară marcată, un grad jos de diferențiere a tumorii și o expresie înaltă a factorului de creștere a endoteliului vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*, eng.) și, respectiv, cu agresivitate sporită a tumorii [41, 50].

1.5. Clasificarea moleculară a carcinoamelor mamare

Un biomarker este definit ca „o caracteristică care este măsurată și evaluată în mod obiectiv ca un indicator al proceselor biologice normale, al proceselor patologice sau al răspunsurilor farmacologice la o intervenție terapeutică” [51]. Deși există un grup potențial

foarte mare de biomarkeri, ER, PR și HER2 sunt critici pentru stratificarea carcinoamelor mamare [31].

ER a fost identificat de Ellwood Jensen la sfârșitul anilor 1950, iar statutul ER a fost folosit de la mijlocul anilor 1970, atât pentru a prezice receptivitatea tumorii la terapia endocrină, cât și ca factor de prognostic precoce al recidivei și a rezultatului pe termen lung. Aproximativ 80% dintre cancerule de sân sunt ER pozitive. Un al doilea receptor de estrogen a fost identificat în 1996, iar statutul ER în practica clinică se referă la ER α în timp ce noul receptor a fost desemnat ER β [31].

Gena **PR** este reglată de estrogeni și, prin urmare, expresia sa indică o cale ER intactă și funcțională. Aproximativ 40% din tumorile ER- pozitive sunt PR-negative. Tumorile care sunt PR-negative pot reflecta semnalizarea aberantă a factorului de creștere. Se știe că tumorile ER- pozitive/ PR-negative sunt, în general, mai puțin sensibile la tamoxifen decât cele care sunt pozitive pentru ambii receptori [31, 52]. Conform recomandărilor de la St Gallen, ER și PR sunt evaluați prin IHC cu un *cut-off* al expresiei nucleare de 1% [53].

Determinarea amplificării genei/ supraexpresiei proteinei **HER2** este utilizată în practica clinică ca un indicator al prognosticului nefast și ca un predictor al răspunsului la tratamentul sistemic cu Herceptină. Pozitivitatea HER2 este observată în 13-20% din carcinoamele de sân invazive și la mai mult de jumătate dintre aceste tumori se atestă absența expresiei receptorilor hormonalni [31]. Statutul HER2 este determinat folosind o combinație dintre IHC și ADN hibridizare *in situ*. Există ghiduri detaliate pentru evaluarea acestuia, care sunt în continuu actualizate [53].

Ki-67 este un discriminator util al subtipurilor luminal A și B. În timp ce pozitivitatea Ki-67 este asociată cu supraviețuirea generală mai scurtă a pacienților cu cancer de sân, utilizarea sa în practica de rutină a fost împiedicată de lipsa standardizării protocoalelor [31]. *Cut-off*-ul pentru Ki-67 este încă o chestiune de dezbatere. Cel mai recent consens din St Gallen a adoptat *cut-off*-ul de 20%; cu toate acestea, există și variații inter-laborator [54].

În baza expresiei biomarkerilor descriși mai sus, carcinoamele mamare pot fi clasificate după cum urmează:

- subtip **luminal A**: ER+ și/ sau PR+, HER2-, Ki-67<20%
- subtip **luminal B**: ER+ și / sau PR+, HER2+ sau HER2- și/ sau Ki-67>20%
- subtipul **HER2+**: ER-, PR-, HER2+ [55].

Aproximativ 10-15% dintre carcinoamele de sân sunt negative pentru ER, PR și HER2, și sunt numite **tumori triplu negative** (TNBC, *Triple Negative Breast Cancer*, eng.). Ele reprezintă un grup distinct de tumori cu morfologie, prezentare și evoluții specifice [31]. Caracteristicile sale includ vârsta tânără, stadiu avansat la prezentare, majoritatea fiind tumori

slab diferențiate, indice de proliferare ridicat și rată înaltă de metastazare. Supraviețuirea medie în cazul tumorilor TNBC avansate este de 2 luni, mult mai scurtă decât durata de supraviețuire observată la alte subtipuri de cancer de sân. Opțiunile de tratament pentru TNBC sunt foarte limitate și adesea fără succes [56]. Carcinoamele de sân de tip **bazal** sunt un subtip de TNBC în care tumorile exprimă citokeratine cu masă moleculară mare, cum ar fi CK5/6 și CK14, care sunt exprimate de obicei în compartimentul celulelor bazale/ mioepiteliale al TDLU, precum și EGFR [31].

Subtipurile de cancer de sân diferă prin complexitatea lor genomică, modificările genetice și prognostic. Subtipul luminal A este cel mai frecvent diagnosticat, reprezentând de la 40% până la 50% din carcinoamele mamare invazive. De obicei, carcinoamele luminale A au un grad înalt de diferențiere, cu cel mai bun prognostic dintre toate subtipurile. Carcinoamele luminale B tind să fie mai slab diferențiate și au un prognostic mai rezervat decât cele luminale A. Din punct de vedere clinic, subtipul luminal A poate beneficia numai de terapia hormonală, în timp ce tumorile luminale B pot fi candidate pentru chimioterapie suplimentară [53]. Pacienții cu tumori de tip bazal au un prognostic foarte prost, iar în prezent, nu există o terapie țintită [31].

În literatura de specialitate sunt descriși și alți markeri, propuși pentru utilizare în gestionarea pacienților cu cancer de sân, de exemplu ER β și AR. În ciuda a mai mult de un deceniu de cercetări, rolul exact al ER β și AR și interacțiunile lor cu ER α rămân evazive și nu este clar cum pot contribui la rafinarea clasificării tumorilor ER-pozitive și ER-negative. Cel puțin pentru ER β , acest lucru se poate datora parțial numărului mare de izoforme și lipsei de anticorpi specifici pentru detectarea acestuia [31].

Subtipuri noi

Subtipul **normal-like** este caracterizat prin expresia genelor asociate cu țesutul adipos sau cu diverse celule ale țesutului conjunctiv fibros lax. Acesta este un grup controversat și unii autori consideră că reprezintă contaminarea celulelor normale, mult mai probabil decât un subtip intrinsec real [31].

Carcinoamele de tip **claudin-low** sunt caracterizate prin expresia scăzută a genelor implicate în joncțiunile strânse, precum claudinele 3, 4 și 7, ocludina și E-cadherina. Totodată, trebuie menționate expresia scăzută/ lipsa expresiei markerilor luminali, supraexpresia markerilor de tranziție epitelio-mezenchimală și caracteristici asemănătoare celulelor stem canceroase [31, 53]. Tumorile claudin-low sunt de obicei TNBC și au trăsături de carcinom metaplazic și/ sau medular. Ratele de supraviețuire sunt intermediare între tumorile luminale și bazale [31].

Tumorile **apocrine** sunt caracterizate drept ER-negative, prezintă pozitivitate pentru AR și trăsături histologice apocrine, cum ar fi citoplasmă abundentă, eozinofilă și nucleoli proeminenți. Ele pot prezenta, de asemenea, supraexpresia sau amplificarea markerului HER2. Deși aceste tumori sunt asociate cu recidive precoce, clinic, ele manifestă un răspuns bun la chimioterapia neoadjuvantă [31].

Expresia pronunțată a genelor reglate de interferon, inclusiv STAT1, caracterizează subtipul **legat de interferon** [31].

Green et al. au încercat să perfecționeze sistemul de clasificare folosind un panou de zece biomarkeri imunohistochimici (ER, PR, CK5/6, CK7/8, EGFR, HER2, HER3, HER4, p53 și mucina 1). În plus față de subtipurile stabilite de Perou et al. (luminal A, luminal B și HER2 supra-exprimate), au fost sugerate trei clase noi: luminal N, bazal-p53 alterat și bazal-p53 normal [53]. Semnificația desăvârșită a tumorilor ce aparțin acestor clase noi descrise urmează să fie determinată în timp, iar valoarea clinică a clasificării rămâne în așteptarea confirmării. Cu toate acestea, completarea șirului de biomarkeri (de exemplu HER3 și HER4, ER β sau AR) ar putea rafina clasificarea existentă a cancerului de sân [31].

În baza celor sus-menționate rezultă că clasificările tradiționale ale carcinoamelor de sân bazate pe caracteristicile patologice și pe evaluarea IHC a receptorilor hormonal și HER2 au fost bine stabilite pentru aplicarea și validitatea lor clinică, sunt relativ ieftine și pot fi aplicate cu ușurință în practica de rutină. Apariția tehnologiilor noi a dezvăluit o cantitate fără precedent de date privind modificările transcriptomice, epigenetice, genomice și proteomice, oferind o descriere mai completă a modificărilor patogene în cancerule de sân [54].

1.6. Structura stromei din tumorile mamare

Viziunea simplistă a unei tumori drept o enigmă doar a celulelor mutante implicate în expansiunea clonală evoluează în prezent într-o abordare mai holistică, în care tumorile sunt considerate structuri asemănătoare unor organe. Evenimentele de deleție genetică, supraexpresie, mutație și translocare duc la transformarea unei celule normale într-o celulă malignă care va suferi apoi o proliferare susținută. Cu toate acestea, pentru expansiunea și creșterea celulelor neoplazice este nevoie de a crea o microambianță favorabilă tumorii, de aceea capacitatea de a gestiona stroma înconjurătoare devine imperativă [57].

Micromediul tumoral este format dintr-o combinație de celule tumorale și stromale, matrice extracelulară (ECM, *Extracellular Matrix*, eng.) și factori secretați, încadrându-se astfel perfect în definiția unui ecosistem. Celulele care compun stroma tumorală sunt fibroblaste asociate cancerului (CAF, *Cancer Associated Fibroblast*, eng.), celule endoteliale, pericite, adipocite și celule implicate în reacțiile imune, inclusiv monocite, macrofage, limfocite și celule

dendritice (DC, *Dendritic Cells*, eng.) [57]. S-a descris că celulele stromale, din diferite tumori, sunt capabile să sintetizeze ARNm pentru diverse molecule, de exemplu colagenază, MMP și proteaze, cum ar fi plasmina, toate responsabile de etapele incipiente ale creșterii tumorii prin degradarea ECM care este unul dintre mecanismele pe care celulele neoplazice le folosesc pentru a invada țesutul interstițial [58].

Celulele sistemului imun sunt una dintre cele mai dinamice populații celulare prezente în tumori, iar inflamația cronică a fost propusă drept al șaptelea semn distinctiv al cancerului [59]. Regresiile tumorale apărute spontan în cazul asocierii bolilor autoimune și incidența mai mare a tumorilor la pacienții imunosupresați sunt indici ale implicării sistemului imun în evoluția tumorii [60]. Multiple studii au arătat că limfocitele T, macrofagele, killerii naturali, DC care infiltrază tumoarea au diverse funcții, deseori diametral opuse. Astfel limfocitele T helper 1 CD4+ (Th1), limfocitele T citotoxice CD8+, killerii naturali, macrofagele M1 și DC sunt protectoare. Și invers, limfocitele T reglatorii (Treg, *T Regulatory*, eng.) FOXP3+ (*Forkhead Box P3*, eng.), limfocitele T helper 2 CD4+ (Th2), macrofagele M2, celulele supresoare derivate din linia mieloidă (MDSC, *Myeloid-Derived Suppressor Cells*, eng.) stimulează dezvoltarea tumorii [61].

Limfocite

Diverse populații limfocitare înconjoară ariile tumorale, fiind atrase de antigenele tumorale, iar infiltratele limfocitare pot fi depistate începând cu leziuni benigne precum atipia mamară benignă sau hiperplazia ductală benignă [62, 63].

Contează nu numai numărul de limfocite ce infiltrază tumoarea, dar și fenotipul acestora. Circa 75% din limfocitele ce infiltrază tumoarea sunt limfocite T. Dintre acestea, limfocitele T citotoxice CD8+ sunt componente cruciale ale imunității celulare antitumorale deoarece atacă celulele maligne prezentând pe suprafață antigenele tumorale specifice împreună cu MHC I și sintetizează IFN γ , iar ultimul acționează prin intermediul inhibării ciclului celular, inducerea apoptozei, angiostazei și a activității tumoricide a macrofagelor [63-64]. Astfel, s-au propus 3 etape de interacțiune tumoare-sistem imun: 1) eliminare, în care celulele canceroase sunt distruse de către killerii naturali, limfocitele T, fără apariția a careva semne clinice; 2) echilibru, în care celulele transformate sunt ținute sub control, dar nu sunt eliminate de sistemul imun; și 3) evadarea de sub controlul sistemului imun, expresia antigenelor canceroase în proporții foarte mici, crearea unei imunotoleranțe cu dezvoltarea fulminantă a tumorii [61, 64]. Acest proces a fost denumit „imunoeditare” și poate fi văzut ca un mecanism elegant, dar dăunător, de adaptare naturală și explică prezența celulelor imune pasive în apropierea leziunilor canceroase ca o

reflectare a încercării gazdei de a eradica afecțiunile maligne, în special etapele sale incipiente [64].

Killerii naturali servesc ca primă linie de apărare împreună cu limfocitele T CD8+. S-a constatat că ele infiltrază leziunile mamare într-o proporție de aproximativ 5% din populația totală limfocitară [64]. Un alt fenotip de limfocite ce pot fi depistate în tumori este reprezentat de limfocitele Treg, inclusiv cele CD4+ FOXP3+. Funcția proteinei FOXP3 (sau scurfina) constă în supresia activității factorului nuclear kappa B, ceea ce se soldează cu inhibiția limfocitelor T citotoxice [65]. Celulele Treg secretă IL-4, care sprijină diferențierea monocitelor și macrofagelor în fenotipul M2 [66]. Prezența markerului FOXP3+ în tumoră a fost asociată cu un prognostic nefavorabil. Într-o analiză a peste 200 de cancere de sân, în lotul pacienților cu tumori care conțineau mai mult de 15 celule FOXP3+ s-a înregistrat o rată de supraviețuire mai mică [62]. Spre deosebire de Th2, infiltrarea cu limfocite antitumorale de tip Th1 a fost asociată cu un prognostic mai favorabil în cancerul de colon, ovarian, pulmonar și mamar [60, 67-69]. Celulele Th1 sunt implicate în răspunsul imun celular. Fiind activate, eliberează IFN γ ce stimulează macrofagele, promovează procesarea și prezentarea antigenului de către celulele antigen-prezentatoare și inhibă angiogeneza [66].

Răspunsul imun inițiat de către limfocitele T poate fi inhibat de MDSC. Acestea reprezintă o populație heterogenă alcătuită din precursori ai celulelor mieloide. La indivizii sănătoși, celulele mieloide imature produse în măduva osoasă se diferențiază rapid în granulocite mature, macrofage sau DC. În condiții patologice precum cancerul, diferite boli infecțioase, sepsis, traumatisme, transplant de măduvă osoasă sau unele tulburări autoimune, un blocaj parțial în diferențierea celulelor mieloide imature rezultă în extinderea acestei populații. De remarcat că activarea MDSC într-un context patologic are ca rezultat o supraexpresie a factorilor imunosupresori precum arginaza și o creștere a producției de oxid nitric și specii reactive de oxigen (ROS, *Reactive Oxygen Species*, eng.) [70].

În cancerul mamar invaziv, cel mai favorabil prognostic este observat în tumorile în care infiltratul limfocitar constituie peste 50% din totalul celulelor imunocompetente. De asemenea, s-a demonstrat că subtipurile luminale nu prezintă rate mari de infiltrare a limfocitelor, iar subtipurile HER2+ și TNBC sunt foarte imunogene [64]. Unii autori propun chiar de a introduce o clasificare obligatorie a carcinoamelor mamare în dependență de rata de infiltrare cu limfocite (înaltă, intermediară, joasă), care ar permite identificarea pacienților ce necesită terapii imune (stimularea limfocitelor T citotoxice, inhibiția limfocitelor T FOXP3+, etc.) [62].

Macrofage

Macrofagele sunt unele dintre cele mai răspândite celule imune în tumorile mamare (uneori constituie până la 40% din masa tumorală), influențând semnificativ țesutul neoplazic. Ele reprezintă atât o primă linie de apărare, cât și o punte de legătură dintre răspunsul imun înăscut și adaptativ. Cu toate acestea, o mulțime de factori produși de celulele tumorale și stromale pot submina funcția tumoricidă a macrofagelor. Expunerea la condiții hipoxice, factori de creștere și citokine imunosupresoare furnizate de ECM oferă macrofagelor asociate tumorilor (TAM, *Tumor Associated Macrophages*, eng.) proprietăți caracteristice macrofagelor trofice. Aceste caracteristici facilitează creșterea și regenerarea țesuturilor și sunt esențiale dezvoltării tumorii. În acest fel, macrofagele din tumorile mamare sunt autorizate din greșeală să promoveze creșterea tumorii și metastazarea [71-73].

În relație cu tumoarea, macrofagele sunt situate cu predilecție în ariile periferice ale plajelor tumorale dar spre interior numărul acestora scade semnificativ. În cadrul masei tumorale, macrofagele, fie solitar, fie în grupuri, sunt determinate de obicei în asociere cu vasele sangvine unde se consideră că induc neoangiogeneza [72].

În dependență de microambianța locală, macrofagele se pot diferenția pe 2 căi, căpătând un fenotip specific. Astfel deosebim macrofage:

- M1, activate clasic, care orchestrează răspunsul imun antitumoral prin producerea de anioni de superoxid și radicali liberi de azot, citokine imunogene precum IL-1, IL-2, IL-6 și IL-12 Activarea pe cale clasică are loc odată cu expunerea la stimuli proinflamatori cum ar fi IFN γ și TNF- α ;
- M2, activate alternativ, ce promovează imunosupresia și susțin formarea de vase anormale în microambianța tumorală, favorizând progresia tumorii. Activarea pe cale alternativă are loc odată cu expunerea la citokine antiinflamatorii (IL-4, IL-10, IL-13 și TGF- β), glucocorticoizi și complexe imune [6, 66, 71-72, 74].

De menționat că această clasificare este una convențională, macrofagele fiind celule extrem de plastice manifestând un spectru larg de stări de activitate, iar M1 și M2 reprezintă stărilor extreme ale acestora [75].

Inițial, se considera că TAM sunt macrofage de tip M1 deoarece atacă direct celulele canceroase și manifestă acțiune antitumorală. Totuși, majoritatea studiilor recente demonstrează că TAM-urile manifestă proprietăți protumorigenice și, deci, sunt macrofage activate alternativ, de tip M2. Acestea secretă o listă impresionantă de factori de creștere proangiogenici, inclusiv factorul de creștere epidermal (EGF, *Epidermal Growth Factor*, eng.), VEGF, factorul de creștere derivat din trombocite, factorul inhibitor al migrației celulare, TNF- α , TGF- β , IL-8 și IL-1 β , timidin fosforilaza și chemokinele CCL2 și CXCL8 [71-73, 76]. În plus, TAM-urile

recrutează MDSC care cuprind o populație diversă de precursori imaturi ai monocitelor, granulocitelor și DC, precum și Treg [72].

Dovezi emergente sugerează că macrofagele M2 derivate din măduva osoasă se pot transforma în precursori ai celulelor endoteliale limfice (LECP, *Lymphatic Endothelial Cell Precursor*, eng.). LECP-urile derivate din macrofage sunt identificabile *in vivo* prin vizualizarea celulelor dublu imunocolorate care coexprimă markeri mieloizi (de exemplu, CD68) și proteine specifice endoteliului limfatic (LYVE-1, PROX1 sau podoplanina) [77].

Toate cele menționate mai sus fac din macrofage o țintă terapeutică atractivă și promițătoare. Intervențiile actuale sunt concentrate pe trei strategii: blocarea recrutării precursorilor macrofagelor, epuizarea TAM-urilor și a progenitorilor lor, și reprogramarea funcției macrofagelor în cadrul tumorilor [72].

Mastocite

Mastocitele (MC, *Mast Cell*, eng.) formează o populație heterogenă de celule imune cu diferențe în ultrastructură, morfologie, conținut de mediatori și receptori de suprafață [78]. Acestea sunt distribuite pe larg în toate țesuturile, preponderent în spațiile perivasculare, dermul pielii, tunicile mucoase ale tractului respirator și ale tractului gastrointestinal, dar sunt și componente ale micromediului inflamator care modulează inițierea și dezvoltarea tumorii [79, 80]. MC sunt printre primele celule care infiltrază tumoarea și livrează molecule biologice active, cum ar fi enzime proteolitice, citokine și factori de creștere [80].

MC derivă din celule stem hematopoietice pluripotente CD34+, CD117+, care apar în măduva osoasă. Ulterior precursorii MC, care încă nu posedă granule specifice, nimeresc în circulația sistemică, migrează în țesuturi și își finalizează diferențierea sub controlul unor citokine și factori de creștere locali [79, 81-82]. Factorul celulelor stem (SCF, *Stem Cell Factor*, eng.) este un factor de creștere care exercită un efect chemotactic și activator asupra MC. S-a demonstrat că celulele tumorale sintetizează SCF și alături de alte chemokine pot induce migrarea MC în stroma tumorii [80]. Alte molecule atractante pentru MC sunt proteina chemotactică a monocitelor-1 (MCP-1, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*, eng.), VEGF-urile, angiopoietina 1 (Ang1), IL-8, CCL2, CXCL1, CXCL10 și osteopontina, care, pe lângă recrutarea progenitorilor MC, sunt de asemenea capabile să inducă maturizarea și activarea acestora [81].

În mai multe tumori solide, cum ar fi cancerul glandei tiroide [83], gastric [84], pancreatic [85], vezicii urinare [86], de col uterin [87] MC par întotdeauna a fi protumorigenice. În mod similar, în mai multe tumori hematologice, cum ar fi diferite tipuri de limfom Hodgkin [88] și non-Hodgkin [89], MC sunt asociate cu un prognostic nefavorabil. În cancerul mamar, datele

prezentate sunt controversate, unii autori sugerând că MC au un rol antitumorigen [90] și determină un prognostic mai favorabil [91]. De exemplu, della Rovere et al. au documentat că MC peritumorale păreau să aibă o activitate citolitică asupra celulelor tumorale [92]. Alte studii accentuează asupra angiogenezei induse de MC în cadrul carcinoamelor mamare, deci asupra rolului protumoral [93].

Localizarea specifică (de exemplu, regiunea peritumorală *versus* intratumorală) a MC este un alt aspect important în progresia tumorilor [79]. De exemplu, în tumorile de prostată, o densitate mare de MC intratumorale a fost legată cu un prognostic favorabil [94], în timp ce MC peritumorale inițiază proliferarea vasculară îndreptată spre interiorul leziunii proliferative și favorizează în timp transformarea malignă [78].

Deși sunt asociate canonic cu reacțiile alergice, MC au și alte funcții, cele mai importante pentru biologia cancerului fiind: stimularea angio- și limfangiogenezei tumorale prin secreție de molecule proangiogene și prolimfangiogene; facilitarea remodelării stromale și invaziei prin enzime proteolitice; suprimarea răspunsurilor imune antitumorale prin stimularea migrării celulelor imunosupresoare către tumoare [79, 80].

La moment sunt cunoscute cel puțin două populații majore de MC, în baza conținutului lor de proteaze. MC care conțin doar triptază sunt denumite MCT, dar cele care conțin triptază, chimază, carboxipeptidază A și catepsină G sunt denumite MCTC [95]. Aceste enzime, precum și unele metaloproteinaze (de ex. MMP-9) degradează ECM și componentele membranei bazale favorizând detașarea celulelor canceroase, migrarea și tranziția de la carcinomul *in situ* la stadiul invaziv [79, 81]. Prezintă interes faptul că nivelul seric al triptazei este de trei ori mai mare la pacienții cu cancer de sân decât la persoanele sănătoase [80]. Triptaza mai este cunoscută și drept un factor angiogenic puternic, implicat în neovascularizare și proliferarea celulelor endoteliale [95]. Kankkunen et al. au observat că creșterea semnificativă a numărului de MC în carcinomul mamar față de leziunile benigne se datorează MC care conțin triptază. Mai mult decât atât, MC triptază-pozitive sunt semnificativ mai numeroase în zona de invazie decât în altă parte a leziunilor maligne [96]. Ribatti et al. au demonstrat că pacienții cu cancer de sân cu metastaze în nodurile axilare relevă un număr mai mare de MC, comparativ cu pacienții fără metastaze. Totodată, autorii au demonstrat că angiogeneza crește în paralel cu numărul de MC triptază-pozitive [56].

Pe lângă triptază, MC contribuie la angieneză și prin secreția moleculelor angiogenice clasice, VEGF-A și VEGF-B, iar la limfangieneză – prin eliberare de VEGF-C și VEGF-D [66]. Datorită secreției de IL-8 și histamină, care acționează ca factori chemotactici pentru celulele imune și ca mitogeni tumorali, pot promova creșterea tumorii [81].

Activarea MC poate duce la eliberarea a trei clase distincte de molecule bioactive, în funcție de tipul de stimuli și receptori implicați: mediatori preformați (histamina, dopamina, heparina, triptaza, chimaza) stocați în granule, care sunt eliberați rapid (în câteva secunde până la minute); mediatori lipidici sintetizați *de novo* (prostaglandine și leukotriene) (în câteva minute); și o varietate de citokine și chemokine (IL-4, -5, -6, IFN γ , TNF- α , etc.) care sunt produse în urma transcripției și traducerii lor (ore) [81].

Celule dendritice

Celulele dendritice (DC) fac parte din celulele prezentatoare de antigen (APC, *Antigen Presenting Cell*, eng.) specializate în declanșarea răspunsurilor imune adaptative prin activarea celulelor T [97]. Orchestrarea imunității eficiente depinde de DC, echipate cu receptori capabili de a recunoaște antigene, de a integra informațiile și de a iniția răspunsurile imune [98]. DC imature preiau antigenele din țesuturile periferice, le procesează și apoi expun moleculele de antigen pe suprafața membranei sale cu molecule ale MHC clasa I și II. În timpul procesării antigenului, DC suferă procesul de maturare, care determină migrarea acestuia în organele de protecție imună periferice, unde devine o celulă competentă în prezentarea antigenului limfocitului T [99].

DC infiltrează stroma majorității tipurilor de cancer. Acestea joacă un rol protector prin exprimarea citokinelor proinflamatorii și prin inducerea activării limfocitelor T. Pe de altă parte, tot DC promovează imunosupresia prin secreția de citokine antiinflamatorii sau prin exprimarea moleculelor ce blochează *checkpoint*-urile imunologice, astfel inhibând celulele T [97].

DC obținute din sângele periferic și nodurile limfatice ale pacienților cu cancer de sân operabil sunt disfuncționale, cu niveluri scăzute de expresie ale MHC clasa II și CD86 și secreție scăzută de IL-12. Capacitatea DC de a iniția răspunsul imun este strict dependentă de gradul de maturare. DC imature pot induce anergia celulelor T, promovează toleranța specifică la aloantigen și pot genera Treg. Celulele Treg la rândul lor expresează cantități mari de CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4*, eng.) care blochează interacțiunea ligandului CD28 de pe limfocitele T cu receptorul CD80/86 de pe DC, rezultând scăderea activării DC, inhibarea producției de IL-12, oprirea ciclului celulelor T și suprimarea limfocitelor T citotoxice CD8+. Chen et al. au demonstrat că și celulele canceroase din glanda mamară umană pot exprima CTLA-4 și aproape toți markerii de suprafață suprareglați în DC mature au fost suprimați dramatic în prezența celulelor canceroase CTLA-4+. Blocarea CTLA-4 nu numai că a recuperat funcția de prezentare a antigenului a DC și activarea celulelor T, dar a suprimat și activitatea biologică a celulelor canceroase în sine. Astfel, inhibarea maturizării și funcției DC

este modalitatea comună de a evada de sub controlul sistemului imun de către celulele tumorale, iar blocarea CTLA-4 ar putea fi o țintă terapeutică promițătoare [100].

DC exprimă un șir de proteine, în IHC fiind deseori utilizat markerul S100. Membrii familiei S100 sunt proteine mici fixatoare de Ca^{2+} acid, care implică un spectru larg de procese biologice [101]. Este demonstrat că proteinele S100 au o gamă largă de funcții intracelulare și extracelulare și sunt implicate în multiple procese biologice, inclusiv diviziunea celulară, motilitatea, secreția, sinteza proteinelor și permeabilitatea membranelor [102].

Celule mioepiteliale

Celulele mioepiteliale, ca și cele dendritice, expresează markerul S100, motiv pentru care sunt descrise în continuare. Acestea sunt celule contractile din glandele de origine ectodermală, care conțin α -SMA și aderă la membrana bazală (BM, *basement membrane*, eng.) prin hemidesmozomi. De asemenea sintetizează componente ale BM, precum colagen de tip IV, laminina-1, laminina-5 și fibronectina care contribuie la polarizarea epitelului și reglează creșterea ducturilor. Pierderea genelor responsabile de polaritatea epitelocitelor, cum ar fi genele Par3 și LKB1, este asociată cu o evoluție foarte agresivă a cancerului de sân și respectiv cu un prognostic rezervat pentru pacient [103, 104].

Contrația celulelor mioepiteliale este stimulată de oxitocină. Acestea au o formă alungită și sunt unite între ele prin joncțiuni de tip *gap*, formând un strat semi-continuu care înconjoară celulele epiteliale. Atât stratul de celule mioepiteliale, cât și BM acționează ca o barieră naturală și sunt selectiv permeabile pentru moleculele mici. Datorită acestei caracteristici structurale, nutriției, factorii de creștere și alte molecule trebuie să treacă mai întâi prin BM, apoi prin celulele mioepiteliale pentru a ajunge în lumenul TDLU. În cazul carcinoamelor, celulele epiteliale tumorale trebuie să treacă mai întâi prin stratul de celule mioepiteliale și apoi prin BM pentru a contacta fizic stroma. Astfel, celulele mioepiteliale formează o graniță naturală pentru a separa celulele epiteliale proliferante de BM și stroma subiacentă. Perturbarea acestui strat celular duce la eliberarea factorilor de creștere, a factorilor angiogenici și a ROS care provoacă o alterare a micromediului, ceea ce stimulează proliferarea celulelor din jur și crește gradul invaziv al celulelor tumorale [103].

Celulele mioepiteliale au proprietatea de a se reînnoi și suferă în mod constant atât proliferare, cât și diferențiere pentru a înlocui celulele mioepiteliale defecte, îmbătrânite sau moarte [103]. Cu toate acestea, mioepiteliocitele rar suferă mutații, iar atunci când se transformă, ele generează de obicei tumori cu malignitate scăzută. Aceste observații ar putea deschide posibilitatea unei viitoare terapii în care s-ar forța celulele canceroase să se diferențieze pe calea mioepitelială, astfel creându-se celule cu malignitate mai scăzută [104, 105].

Se postulează că tumorile mamare maligne prezintă o creștere dramatică a raportului celule luminales *versus* mioepiteliale, iar în multe carcinoame invazive lipsesc în totalitate celulele mioepiteliale [104]. Un șir de autori au presupus că celulele mioepiteliale sunt degradate de supraproducția enzimelor hidrolitice sau sunt eliminate selectiv prin apoptoză [105-107].

Identificarea stratului de celule mioepiteliale este posibilă grație expresiei de către acestea a unui șir de proteine: α -SMA, S-100, h-caldesmona, p63 [43]. Din cauza originii epiteliale, ele exprimă și CK caracteristice pentru stratul bazal al epiteliiilor stratificate, cum ar fi CK5, CK14 și CK17 [104]. Alte proteine specifice celulelor mioepiteliale includ CD10/CALLA, calponina și EGFR, însă expresia acestora variază foarte mult [103].

Fibroblaste

Fibroblastele reprezintă celule cheie stromale prezente atât în țesuturile intacte, cât și în carcinoamele mamare. În țesuturile neafectate, fibroblastele au un indice de proliferare scăzut și capacitate metabolică minimă, manifestând efect anticanceros, cu rol important în vindecarea plăgilor, reglarea diferențierii epiteliale și a inflamației [25, 108]. În contrast, în timpul vindecării rănilor și în cancer (cunoscute drept „răni care nu se vindecă”), fibroblastele se activează, încep să prolifereze, secretă cantități mai mari de componente ale ECM și dobândesc proprietăți contractile [108].

Fibroblastele din cancer (cunoscute și sub numele de CAF, fibroblaste reactive, fibroblaste peritumorale, miofibroblaste, fibroblaste asociate tumorilor) reprezintă celule stromale care le înconjoară pe cele canceroase și oferă, nu doar un suport mecanic, dar și controlează proliferarea și supraviețuirea, angiogeneza, metastazarea, imunogenitatea și rezistența la terapie [109]. Este esențial să se înțeleagă că CAF-urile apar ca rezultat al răspunsului gazdei la leziunile epiteliale cauzate de tumora în creștere. Recrutarea inițială a CAF-urilor în leziunile neoplazice în curs de dezvoltare ar putea reflecta astfel efectul lor inițial antitumoral. Cu toate acestea, pe măsură ce tumora se dezvoltă, acest proces de reparare ar putea, la rândul său, să promoveze creșterea tumorii, deoarece celulele canceroase utilizează factorii de creștere secretați de CAF pentru a-și facilita propria supraviețuire și proliferare, iar activitatea protumorigenică a CAF-urilor poate evolua treptat [110].

CAF sunt sursa principală de collagen din ECM, ele comunică direct cu celulele canceroase și cu alte celule stromale [109]. Trăsătura caracteristică a CAF-urilor este expresia α -SMA, care este mai pronunțată în fibroblastele din cancer decât în cele din țesuturile normale [108].

Originea CAF-urilor a fost investigată activ și au fost propuse mai multe ipoteze. Una din ele este că sunt derivate din fibroblaste rezidente ale căror fenotip a fost modificat de semnalele aberante provenite de la celulele tumorale vecine [111]. Cu toate acestea, alte linii „non-

fibroblastice” au fost descrise ca surse semnificative de CAF. De exemplu, celulele stem mezenchimale derivate din măduva osoasă s-au dovedit a fi o sursă importantă de CAF în cancerul de sân. În plus, fibrocitele au fost, de asemenea, sugerate ca o altă sursă de CAF. Adipocitele contribuie, de asemenea, la *pool*-ul de CAF în carcinoamele mamare prin intermediul proteinei WNT3a, derivată din celulele canceroase. [107]. Trebuie însă de menționat că un șir de studii *in vivo* și *in vitro* au demonstrat că însăși celulele maligne pot suferi modificări precum tranziția epitelio-mezenchimală și transformări fibroblastice [109]. În baza celor relatate, putem conchide că CAF-urile au o origine eterogenă.

Imunohistochimic, CAF pot fi detectate datorită expresiei de α -SMA, CD34, tenascina-C, antigenul neural glial (NG2, *Neural Glial Antigen 2*, eng.), receptorul α/β al factorului de creștere derivat din trombocite (PDGFR-A, -B, *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*, eng.), proteina de activare a fibroblastelor (FAP, *Fibroblast Activation Antigen*, eng.), CD90 și podoplanina. În plus, aceste celule expresează markeri mezenchimali cum ar fi vimentina, fibronectina, colagenul de tip I, prolil-4-hidroxi-laza și S100A4, dar nu exprimă CK, CD31 și miozina de mușchi neted [107-109]. Markerii expresați nu sunt specifici doar CAF-urilor, dar pot fi exprimați și de o listă întreagă de alte celule. Astfel, cea mai bună metodă de identificare a CAF-urilor este combinația dintre aspectul morfologic (celule fusiforme cu extensii citoplasmice) și IHC [109].

Datorită substanțelor secretate, printr-o varietate de mecanisme paracrine, CAF-urile interacționează cu celulele canceroase la toate etapele tumorigenezei. În tumorile mamare, abundența de CAF stromale este asociată cu o agresivitate înaltă a tumorii și este un factor predictiv al recurenței [112]. Totodată, substanțele secretate (factori solubili, factori de creștere, chemokine, componente ale ECM), explică implicarea fibroblastelor în patogenia tumorii. Astfel, CXCL12 și TGF- β , sintetizate de CAF, induc tranziția epitelio-mezenchimală, metastazarea, promovează angiogeneza prin recrutarea celulelor progenitoare endoteliale. Mai mult, CAF-urile care exprimă FAP au activitate imunosupresoare. MMP secretate de CAF degradează și remodelează ECM, creând „căi” pentru invazia celulelor canceroase [109]. Aceste date au fost confirmate de Place et al., care au observat că tumorigenitatea celulelor canceroase a crescut dramatic după inocularea cu fibroblaste [107]. De asemenea, s-a raportat că CAF-urile exercită o presiune fizică prin aderare la celulele tumorale, astfel promovând o invazie colectivă sau co-migrare a CAF-urilor și a celulelor canceroase. Depleția CAF-urilor în cancerul pancreatic prin aplicarea unor metode genetice a produs o tumoare mai invazivă cu hipoxie intratumorală sporită, precum și proporții crescute de celule Treg. Totuși, secretomul CAF ar putea exercita și funcții antitumorale; de exemplu, IL-10, TGF- β , IFN γ și IL-6 participă la recrutarea și polarizarea macrofagelor, limfocitelor NK și limfocitelor T, care promovează un

control imunitar al celulelor canceroase. Astfel, efectul net al secretomului CAF trebuie considerat ca fiind bimodal și dinamic [110].

Conform opiniilor curente, fibroblastele sunt considerate nu numai un determinant esențial al progresiei tumorale dar și reprezintă o țintă importantă pentru terapia anticanceroasă, rezistența la tamoxifen în carcinoamele ER+ fiind, parțial, cauzată de CAF [109, 113, 114]. Cele mai multe abordări terapeutice anticancer convenționale probabil afectează și CAF-urile, deoarece celulele cu o rată de proliferare ridicată sunt mai sensibile la agenții ce induc deteriorarea ADN-ului, împiedică sinteza ADN/ARN și blochează remodelarea citoscheletică necesară diviziunii celulare. Deși eficiența chimio- și radioterapiei se bazează pe premisa că celulele canceroase vor avea o sensibilitate sporită, deoarece sunt mai active din punct de vedere al proliferării, impactul neintenționat al unor astfel de intervenții terapeutice asupra funcției sau acumulării CAF este în mare măsură necunoscut [110].

Matrice extracelulară

Matricea extracelulară reglează o varietate de funcții biologice atât ale celulelor normale, cât și ale celor tumorale, inclusiv migrarea și aderența celulară [66]. S-a dedicat mult efort pentru a determina modul în care componentele celulare ale micromediului tumoral inițiază și promovează dezvoltarea cancerului. Cu toate acestea, studiile recente au evidențiat, de asemenea, importanța componentei non-celulare a nișei, în special a ECM, în timpul progresiei cancerului. Deși este văzută de mulți ca o structură stabilă care joacă în principal un rol de susținere în menținerea morfologiei țesuturilor, ECM este o parte esențială a micromediului unei celule, fiind surprinzător de dinamică și versatilă. Prin mecanisme directe sau indirecte, ECM reglează aproape tot comportamentul celular și este indispensabilă pentru procesele majore de dezvoltare [115].

ECM este compusă dintr-un șir de componente distincte: colageni, fibronectină, laminine, glicozaminoglicani și proteoglicani, proteine matricelulare și enzime de remodelare a ECM, polizaharide, toate cu proprietăți fizice și biochimice diferite [115, 116]. Din punct de vedere structural, aceste componente formează atât BM, care este produsă în comun de celulele epiteliale și stromale pentru a separa epiteliul de stromă, cât și matricea interstițială, care este sintetizată de celulele stromale. BM este formată din colagen de tip IV, laminine, fibronectină și proteine fixatoare, cum ar fi nidogenul și entactina, care conectează colagenul la alte componente proteice. În schimb, matricea interstițială este bogată în fibre de colagen, proteoglicani și diverse glicoproteine, cum ar fi tenascina C și fibronectina și, prin urmare, este foarte încărcată, hidratată și contribuie mult la rezistența la tracțiune a țesuturilor [115].

Interesant este că ECM în cancerul mamar se aseamănă mult cu matricea din țesuturile supuse vindecării plăgilor sau remodelării: se atestă o supraproducție de colagen fibrilar, fibronectină, proteine matricelulare și MMP. Analiza proteomică la modele de șoareci arată că tumorile cu capacitate metastatică prezintă o compoziție ECM distinctă [116]. În tumorile de glandă mamară se atestă un dezechilibru între tipurile de fibre de colagen: producere excesivă de colagen fibrilar tip I, II, III, V și IX, și scădere a conținutului de colagenul de tip IV, în principal datorită degradării BM. Astfel, stroma tumorală devine mai rugoasă decât stroma normală: în cazul cancerului de sân, țesutul modificat poate fi de 10 ori mai rigid decât în organul normal [115, 116].

Rigiditatea stromei are un efect semnificativ asupra semnalizării biochimice și asupra comportamentului epitelocitelor mamare și al celulelor canceroase. Celulele epiteliale neafectate formează structuri acinare polarizate atunci când sunt crescute în matrice de colagen cu densitate scăzută și generează o rețea tubulară organizată ca răspuns la factorul de creștere a hepatocitelor (HGF, *Hepatocyte Growth Factor*, eng.). Cu toate acestea, atunci când aceste celule sunt crescute în condiții cu densitate înaltă a colagenului, ele formează grupuri dezorganizate și foarte proliferative care devin invazive atunci când sunt tratate cu HGF. În plus, rigiditatea crescută promovează activarea căii kinazei în celulele epiteliale mamare și induce proliferarea [116, 117].

Lamininele prezintă un grup de glicoproteine heterotrimerice mari și reprezintă principalele proteine noncolagenice ale BM. Diferite izoforme de laminină joacă un rol important în dezvoltarea cancerului de sân. Laminina-111 (LM-111) este o componentă importantă a BM, secretată de miofibroblastele normale ale sânului pentru a menține polaritatea epitelială. Maturarea celulelor epiteliale mamare indusă de prolactină este promovată de LM-111 [118]. În tumorile mamare, expresia LM-111 este adesea pierdută și se asociază cu modificări ale polarității celulare [119].

Studiile în domeniu au arătat că ECM este esențială pentru stabilirea și menținerea polarității celulelor epiteliale. De exemplu, β 1-integrina menține polaritatea celulelor în diverse organe, inclusiv glanda mamară. Structura anormală a ECM poate compromite BM ca o barieră fizică și promovează tranziția epitelio-mezenchimală, care împreună pot facilita invazia țesuturilor de către celulele canceroase [115].

Enzimele matriceale pot genera căi cu cea mai mică rezistență, facilitând invazia și migrarea celulelor canceroase. Mai mult, ele pot afecta direct proprietățile biologice și funcția componentelor ECM prin expunerea site-urilor criptice, eliberând factori de creștere legați de ECM sau domenii solubile ale proteinelor ECM. Din marea listă de enzime, MMP-2, -3, -9 și -14 joacă un rol important în degradarea ECM. Ele sunt supraexprimate atât în caz de involuție a glandei mamare, cât și în cancerul mamar. MMP-2 și MMP-3 sunt enzime de remodelare

importante ale ECM în glanda mamară normală, controlând ramificarea în timpul morfogenezei. În cancer, invazia prin BM este o etapă necesară pentru răspândirea metastatică, iar MMP-2 și MMP-9 pot juca un rol important în acest proces prin degradarea colagenului de tip IV [116]. MMP-14 este deosebit de important pentru migrarea colectivă, unde celula de vârf a unei mase multicelulare polarizate produce MMP-14 și degradează colagenul interstițial pentru a forma o cale oportună pentru migrare, astfel facilitând invazia [120].

1.7. Angiogeneza și limfangiogeneza în carcinoamele mamare

Angio- și limfangiogeneza sunt evenimente-cheie într-o gamă largă de procese normale (dezvoltarea embrionară, creștere, vindecarea rănilor) și patologice. Numeroase substanțe, denumite factori angiogenici și limfangiogenici, conlucrează în tandem pentru a facilita creșterea celulelor endoteliale (EC) și vascularizarea ulterioară [121].

Angiogeneza

Angiogeneza este un factor critic în dezvoltarea tumorilor și a metastazelor în numeroase tipuri de cancer. Prima dovadă clară că angiogeneza într-o tumoare umană ar putea prezice probabilitatea de metastazare a unei tumori solide a fost raportată de către Srivastava et al. pentru melanomul cutanat. Autorii au analizat 20 de cazuri de tumori și cele 10 cazuri care au dezvoltat metastaze au arătat o zonă vasculară la baza tumorii care a fost de peste două ori mai mare decât cea observată în 10 cazuri fără metastaze [122]. Sporirea angiogenezei este asociată cu scăderea supraviețuirii și la pacienții cu cancer mamar. Prin urmare, o bună înțelegere a mecanismelor angiogenezei ar putea oferi opțiuni eficiente de tratament împotriva progresiei cancerului de sân, sporind astfel rata de supraviețuirea a pacienților. Întreruperea inițierii și progresiei acestui proces prin țintirea factorilor angiogeni, cum ar fi VEGF-A, unul dintre cei mai puternici membri ai familiei VEGF, sau prin țintirea factorilor de transcripție, cum ar fi HIF, care acționează ca regulatori angiogenici, au fost considerate posibile opțiuni de tratament pentru mai multe tipuri de cancer [121].

În normă, rețeaua de capilare de obicei nu proliferază, deoarece celulele endoteliale nu se divid. Nivelurile scăzute de O₂ declanșează numeroase răspunsuri transcripționale, mediate de factorii de transcripție HIF. Aceștia reglează expresia mai multor gene responsabile de stimularea răspunsurilor fiziologice specifice, cum ar fi angiogeneza și diviziunea celulară. Angiogeneza locală este una dintre principalele adaptări pe termen lung a micromediului tumorii la niveluri scăzute de O₂. Ea implică convergența precursorilor EC care dau naștere plexului capilar, dezvoltându-se ulterior vasele de sânge [121]. Angiogeneza anormală este, de asemenea, critică pentru metastazarea cancerului, inclusiv metastazarea cancerului de sân [121, 123, 124].

Mai mult, leziunile premaligne induc un răspuns vasoproliferativ puternic cu mult înainte de a putea fi observat orice semn morfologic de transformare malignă [56].

La debut, tumora nu induce angiogeneză și, cu aport scăzut de nutrienți și oxigen, va rămâne limitată în creștere la aproximativ 1-2 mm în diametru. În această fază incipientă, tumora poate exista într-o stare latentă, în care apoptoza contrabalansează proliferarea celulară, parțial din cauza hipoxiei și, prin urmare, a nutrienților insuficient disponibili în micromediu. În consecință, tumora activează un comutator angiogenic și evoluează ireversibil la o stare angiogenică activă [121].

Astfel, se începe creșterea de noi capilare din vasele de sânge preexistente, prin înmugurire (*sprouting*, eng.) și/ sau prin intususcepție (*intussusception*, eng.) [125]. Angiogeneza **prin înmugurire** cuprinde următoarele etape:

1. degradarea BM, pentru a permite eliberarea și detașarea EC, proces mediat de diverse proteinaze, precum MMP, heparanaze, chimază și triptază;
2. migrarea EC în țesutul conjunctiv, proces coordonat de celula de vârf (*tip cell*, eng.). Aceasta extinde numeroase filopodii care servesc drept ghid pentru noua ramură a vasului;
3. formarea unui cordon solid de EC;
4. formarea lumenului prin ajustarea formei și rearanjarea joncțiunilor intercelulare;
5. anastomozarea germenilor tubulari contigui pentru a forma bucle capilare funcționale, paralel cu sinteza noii BM și cu recrutarea pericitelor [125].

Etapele sus-menționate sunt controlate de membrii familiei VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D și PlGF (factorul de creștere placentar, *Placental Growth Factor*, eng.), care își mediază efectele prin interacțiunea cu trei receptori tirozin-kinazici: VEGFR-1, VEGFR-2 și VEGFR-3 [121, 125]. Acești factori de creștere sunt exprimați și/sau suprareglați în cancerule de sân agresive, iar dintre acești factori de creștere, expresia diferitor izoforme a VEGF a fost caracterizată ca fiind cea mai semnificativă [56, 121, 126]. De asemenea, expresia VEGF corelează cu mutațiile p53, iar combinația atât a p53 mutant, cât și a nivelurilor ridicate de VEGF a fost asociată cu un prognostic rezervat [56]. Alți factori pro-angiogeni vor fi discutați mai jos.

Angiogeneza prin intususcepție se referă la procesul prin care un singur vas este împărțit în două, datorită unui pilon de țesut transluminal care se inserează în zona de contact a pereților opuși ai vasului și are loc în patru faze distincte [125, 127]:

1. contactul celular direct al EC situate *vis-a-vis* datorită proeminenței pereților în lumenul vasului, ceea ce duce la formarea unei punți transluminale interendoteliale;
2. perforarea stratului dublu endotelial și crearea unei punți de țesut care se extinde pe lumenul învelit de EC;

3. încadrarea stâlpului prin procesele citoplasmice ale pericitelor de-a lungul porțiunilor laterale ale pereților capilarului și

4. creșterea stâlpului de țesut subțire într-o plasă intercapilară normală [125].

S-a demonstrat că inducerea angiogenezei depinde de producția factorilor de creștere pro-angiogenici de către celulele tumorale, care afectează vasele existente. În timpul acestor procese strâns reglate, un echilibru complex de semnale, între factorii pro și anti-angiogenici (tabelul 2), este susținut strict în micromediu, pentru a dezvolta și stabiliza vasele de sânge nou formate [121].

Tabelul 2. **Activatori și inhibitori ai angiogenezei** [121]

Factori pro-angiogeni	Factori anti-angiogeni
Angiogenina Ang 1, 2 FGF HGF IL-8 VEGF PIGF	Angiostatina IFN α , β PF4 TSP-1 Endostatine IL-12
Surse	
MC, Macrofage CAF Celulele canceroase	Trombocite ECM Celulele canceroase

Dintre toate celulele stromale, MC joacă un rol esențial în angiogeneză și în progresia tumorii. MC sunt atrase în micromediul tumoral de factorul de celule stem secretat de celulele tumorale, ca apoi să producă mai mulți factori angiogenici, inclusiv VEGF, FGF (*Fibroblast Growth Factor*, eng.), IL-8 și TGF β -1, precum și MMP, care promovează vascularizarea tumorii și, respectiv, invazivitatea, aspecte discutate anterior [56].

IL-8 este un membru al familiei IL despre care s-a raportat că induce sinteza de VEGF în EC prin activarea receptorilor VEGF. IL-8 are, de asemenea, o influență directă asupra angiogenezei prin creșterea proliferării și supraviețuirii EC, reglarea MMP în anumite linii de EC și stimularea formării capilarelor *in vitro*. Mai mult, s-a observat că tumorile mamare cu niveluri înalte de IL-8 sunt mai agresive și invazive [128], făcând concentrațiile IL-8 o țintă atractivă pentru tratamentele anti-angiogenice și un potențial biomarker de prognostic pentru diferite tipuri de cancer, inclusiv cel mamar [129].

Trombospondinele (TSP, *Thrombospondins*, eng.) sunt o familie de glicoproteine fixatoare de calciu, secretate din granulele α ale trombocitelor și joacă un rol critic în reglarea coagulării, adeziunii celulare, angiogenezei și inflamației. TSP-1 a fost prima proteină care a fost calificată drept un inhibitor angiogenic natural [121]. Numeroase cercetări indică faptul că TSP găsite în

cancerul de sân pot funcționa ca factori antiangiogeni endogeni puternici, conducând în consecință la suprimarea tumorii [130, 131].

Moleculele care vizează angiogeneza au fost cercetate pe larg în tratamentul cancerului de sân dar și al altor forme de cancer. Este clar că inhibarea angiogenezei în tumori ar induce repausul sau regresia tumorii prin privarea acesteia de oxigen și nutrienții necesari. Prin urmare, există o justificare practică pentru utilizarea terapierii anti-VEGF (în mod specific) și antiangiogene (în general) în cancerul de sân local și/ sau metastatic, chiar dacă tratamentul chirurgical este de elecție. Cel mai studiat compus este medicamentul Bevacizumab, un anticorp monoclonal umanizat anti-VEGF. FDA a aprobat Bevacizumab în 2008 pentru tratamentul cancerului de sân HER2-negativ, metastatic, după ce au fost observate rezultate promițătoare în țintirea VEGF în studiile preclinice. Însă, până acum, studiile au raportat că o combinație de compuși antiangiogenici cu scheme standard de chimioterapie în cancerul de sân metastatic a produs un impact clinic limitat asupra supraviețuirii generale. Aceasta poate fi explicat prin toxicitate sporită (ceea ce duce la micșorarea dozelor, întreruperea periodică a tratamentului cu re-vascularizarea tumorii), rezistență (prin apariția multiplelor mutații la nivelul endoteliului vascular) [121].

Angiogeneza poate fi „măsurată” prin stabilirea nivelurilor de VEGF sau a densității microvasculare (MVD, *MicroVessel Density*, eng.). MVD poate fi calculată prin IHC în baza celulelor endoteliale CD34-pozitive, ultima fiind o glicoproteină integrală expusă pe membrana celulară a endoteliocitelor, care formează microvase în țesuturile normale și tumori [122].

Limfangiogeneza

Spre deosebire de angiogeneza, limfangiogeneza a fost un domeniu mai puțin studiat în biologia cancerului, din cauza controverselor anterioare cu privire la faptul dacă metastazele se răspândesc prin limfatice preexistente sau prin cele nou formate [133]. Studiile recente însă arată că limfangiogeneza peri- sau intratumorală este un predecesor al metastazelor limfatice în majoritatea carcinoamelor și melanoamelor [87, 134-136].

Vasele limfatice sunt un component esențial al sistemului cardiovascular, fiind responsabile de homeostazia fluidelor tisulare, recirculația celulelor sistemului imun (limfocite, macrofage și DC) și absorbția lipidelor. Capilarele limfatice au o BM incompletă sau absentă și nu conțin pericite sau celulele musculare netede. În plus, între LEC joncțiunile strânse și de aderență sunt rare, ceea ce face capilarele limfatice foarte permeabile pentru fluidele și proteinele interstițiale și, de asemenea, facilitează migrarea celulelor [133].

Limfangiogeneza, adică formarea de noi vase limfatice din vase preexistente poate fi observată în timpul inflamației, regenerării țesuturilor și creșterii tumorii. S-a demonstrat că VEGF-C este esențial pentru etapele inițiale ale dezvoltării vaselor limfatice la embrion. VEGF-C și VEGF-D sunt doi factori majori limfangiogeni produși de celulele canceroase și celulele sistemului imun, cum ar fi macrofagele. Aceștia determină înmugurirea limfaticelor din LEC sau precursorii LEC prin legarea cu receptorul lor primar, de mare afinitate, VEGF-R3 sau receptorii secundari: VEGF-R2, neuropilina 2 și integrina $\alpha 9/\beta 1$ [133].

Pe lângă cei menționați mai sus, mulți alți factori de creștere și receptorii acestora, cum ar fi VEGF-A/ VEGF-R2, FGF 2/ FGFR, PDGF/ PDGF-R, HGF, Ang1, 2/ Tie2 și receptorii de chemokine/chemokine (CCL21/CCR7, CCL12/CCR4) pot, de asemenea, să stimuleze direct sau indirect limfangiogeneza în diferite circumstanțe [133, 137].

Markeri ai endoteliului limfatic sunt LYVE-1, podoplanina și PROX1 [133]. Vasele limfatice nou formate, spre deosebire de cele preexistente, pot fi identificate prin IHC în tumori prin combinarea unuia dintre markerii LEC menționați mai sus, cu un marker de proliferare celulară, cum ar fi Ki-67 [133]. Densitatea vaselor limfatice (LVD, *Lymphatic Vessel Density*, eng.) poate fi evaluată prin numărarea directă a vaselor limfatice colorate prin IHC și este, în prezent, unul dintre cei mai frecvent utilizați parametri pentru caracterizarea limfangiogenezei [138].

În tumori putem găsi vase limfatice atât intratumorale, cât și peritumorale, deși inițial acesta era un subiect controversat. Astfel, unii autori stipulau că limfaticele intratumorale sunt nefuncționale [139, 140], iar alții în general negau existența acestora [141]. Totuși, există dovezi de activare a LEC în noduri înainte de colonizarea acestora cu celule canceroase, deschizând calea pentru metastazare. Acest fenomen ar putea să rezulte dintr-o interacțiune complexă a multor factori de creștere și chemokine din micromediul tumoral care promovează limfangiogeneza, precum și transportul celulelor tumorale către nodurile limfatice [142]. Pentru ca celulele tumorale să se răspândească prin intermediul vaselor limfatice la nodurile santinelă, vasele limfatice păreau a fi amorsate de celulele tumorale pentru o invazie și răspândire eficientă. Prin utilizarea liniilor celulare de cancer de sân care produc VEGF-C/D, Karnezis et al. au demonstrat că acești factori de creștere eliberați de celulele tumorale au cauzat o dilatare a vaselor limfatice colectoare prin creșterea producției de PGE2 de către LEC [143].

Glanda mamară este un organ bogat în vase limfatice, vascularizația limfatică modificându-se profund în timpul sarcinii și involuției post-partum, iar Lyons et al. au sugerat că involuția post-partum a glandei mamare este comparabilă cu vindecarea rănilor, ambele asociate cu creșterea activității COX-2 în stroma bogată în macrofage [133, 144]. Datele clinice și experimentale arată că limfangiogeneza este unul dintre multiplele evenimente promovate de

COX-2 ce însoțesc progresia cancerului epitelial. Expresia aberantă a COX-2 promovează inițierea, progresia și metastazarea tumorii în majoritatea cancerelor epiteliale, inclusiv cancerul de sân, prin mecanisme multiple: inactivarea celulelor sistemului imun anti-tumorale gazdă, facilitarea migrării celulelor canceroase, invazivitatea, angiogeneza asociată tumorilor și limfangiogeneza asociată tumorii datorită reglării pozitive a factorilor limfangiogeni VEGF-C și VEGF-D în tumori. Expresia crescută a COX-2 în cancerul de sân semnalează un prognostic prost, asociat cu o rată mare de proliferare a celulelor tumorale, grad histologic ridicat, statut negativ al receptorilor hormonali, expresie ridicată a p53, amplificare a oncogenei HER-2 și implicarea nodurilor limfatici axilari [133].

2. MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE

2.1. Design-ul studiului, caracteristica lotului de cercetare

Studiul dat a fost unul retrospectiv bazat pe consultarea buletinelor histopatologice și evaluarea microscopică a unui număr de 111 cazuri de carcinoame de glandă mamară. Cazurile incluse în studiu au fost selectate în perioada 2018-2019, în cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență, Serviciul de Anatomie Patologică, Arad, România. Fragmentele biopsice au fost obținute în urma mastectomiei parțiale sau totale de la paciente cu vârsta cuprinsă între 37 și 85 de ani, media de vârstă fiind de $67,9 \pm 8,6$ ani, iar mediana 64 (25-75% IQR 59-73) ani.

Pacientele nu au fost supuse radio- sau chimioterapiei până la operație. Toate procedurile au fost efectuate conform principiilor Declarației de la Helsinki. Cercetarea s-a efectuat în cadrul Catedrei de histologie, citologie și embriologie al USMF „Nicolae Testemițanu” și în cadrul Departamentului de Morfologie Microscopică/ Histologie, Centrul de Cercetare în Angiogenează al UMF „Victor Babeș” din Timișoara, România.

2.2. Metoda histologică

Profilul histopatologic s-a realizat pe secțiuni colorate cu hematoxină și eozină, conform procedurii standard. Specimenele au fost fixate în soluție de formalină tamponată 10% timp de 48 de ore și, tradițional, incluse în parafină după procedurile de deshidratare și clarifiere.

Ulterior, din fiecare bloc s-au tăiat secțiuni cu grosimea de 4 μm pentru colorația cu hematoxină și eozină (HE). Pentru secționare a fost folosit microtomul Leica RM2245 (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK). Secțiunile au fost etalate pe lame silanate Surgipath X-tra Adhesive (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK) și uscate la 37°C timp de 20-30 minute. Aceste lame au servit pentru determinarea tipului histologic a tumorii și evaluarea gradului de diferențiere (scorul Nottingham). Cazurile au fost examinate de 3 morfopatologi independenți, iar secțiunile potrivite au fost alese pentru colorarea imunohistochimică.

2.3. Metoda imunohistochimică

În continuare, din fiecare bloc s-au tăiat secțiuni pentru determinarea subtipului molecular. Apoi, materialul tisular rămas în cadrul fiecărui bloc de parafină a fost utilizat pentru crearea de blocuri tisulare *microarray* cu ajutorul TMA Grand Master (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary).

Pe scurt, *microarray*-urile au fost produse prin extragerea de mostre tisulare de formă cilindrică din mai multe blocuri donoare cu reinsertia ulterioară a acestora într-un singur bloc recipient (bloc de parafină fără țesut). După finalizarea procedurii, blocurile create s-au lăsat 5-7

minute la termostat pentru aderarea țesutului la parafină și o secționare mai ușoară fără pierdere de țesut.

Din cadrul fiecărui bloc s-au extras între 1-4 fragmente tisulare din regiunile cele mai reprezentative ale tumorii. Astfel, au fost obținute 11 blocuri TMA, *per* total conținând 211 de fragmente tisulare (tabelul 3).

Tabelul 3. Repartizarea specimenelor în cadrul blocurilor TMA

Numărul blocului TMA	Nr de fragmente tisulare în fiecare bloc
1-6, 11	19
7, 9, 10	20
8	18
Total	211

Din fiecare bloc *microarray* au fost tăiate o serie de secțiuni de 4 μm. Pentru secționare a fost folosit microtomul Leica RM2245 (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK). Secțiunile au fost etalate pe lame silanate Surgipath X-tra Adhesive (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK). Lamele au fost uscate la 37°C timp de 20-30 minute.

Tehnica imunohistochimică a fost realizată cu ajutorul automatului Leica Bond-Max (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK). Demascarea s-a realizat cu ajutorul PT-link, la 97°C timp de 20 min și Bond Epitope Retrieval Solution 1 și 2, soluții cu pH 6 și pH 9 respectiv (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK). Pentru blocarea peroxidazei endogene a fost folosit peroxid de hidrogen de 3%, timp de 5 minute. Această etapă a fost succedată de incubarea cu anticorpii primari. Anticorpii aplicați au fost:

- ER, PR, HER2, CK5, EGFR, Ki-67 – pentru a determina subtipul molecular;
- CD68 pentru studiul macrofagelor;
- S100 pentru a pune în evidență DC;
- Triptaza mastocitară pentru studiul MC;
- D2-40 pentru determinarea vaselor limfatice;
- CD34 pentru studiul vaselor sangvine.

Cromogenul utilizat a fost 3,3-diaminobenzidină tetraclorid, timp de 10 minute. Contracolorarea nucleilor s-a realizat cu hematoxină Mayer, 5 minute. Secțiunile obținute au fost introduse în alcool absolut pentru 5 minute, uscate și clarificate în benzen timp de 5 minute. Montarea s-a realizat în mod automat cu Leica CV5030 (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK) folosind un mediu de montare permanent de tip ENTELLAN și anume Leica CV Mount (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK).

Din anumite considerente (material tisular insuficient, dezlipirea secțiunilor de pe lame, etc.), colorația imunohistochimică a fost realizată cu succes pe un număr mai mic de fragmente tisulare. Ulterior, dintre acestea s-au selectat doar cazurile la care s-a reușit determinarea profilului molecular prin IHC (tabelul 4).

Tabelul 4. Numărul cazurilor reușite pentru fiecare anticorp

Anticorpi	Cazuri reușite	Cazuri la care se cunoștea profilul molecular	
		n (%)	95% CI
CD68	82	79 (96.3%)	61.44-99.55
CD34	83	80 (96.3%)	62.44-100.55
S100	78	75 (96.1%)	57.44-95.55
D2-40	87	86 (98.8%)	80.14-92.85
Triptaza mastocitară	83	80 (96.3%)	62.44-100.55

Detaliile tehnicii imunohistochimice se regăsesc în tabelul 5.

2.4. Metode de cuantificare

Aprecierea subtipului molecular

Pentru clasificarea specimenelor de carcinoame mamare în funcție de profilul molecular, s-a analizat expresia receptorilor hormonali ER și PR, expresia proteinelor Ki-67, HER2, CK5 și EGFR. Pozitivitatea pentru fiecare marker imunohistochimic a fost determinată microscopic de către 3 morfopatologi care au revizuit fiecare lamă și au atribuit un scor. Ki-67 a fost evaluat semiautomat.

Receptorii hormonali (**ER și PR**) au fost evaluați în funcție de scorul Allred [47]. Acesta a fost determinat luând în calcul proporția de celule colorate și de intensitatea colorației. Pentru ambele criterii se acordă un scor (tabelul 6). Ambele scoruri apoi se sumează și se obține un scor final, care poate avea 8 valori. Scorurile de 0 și 2 sunt considerate negative, iar cele de 3-8 sunt considerate pozitive. Aceste scoruri ulterior se echivalează unui grad:

- “0” – pentru scor Allred 1, 2
- “1” – pentru scor Allred 3, 4
- “2” – pentru scor Allred 5, 6
- “3” – pentru scor Allred 7, 8

Pragul pozitivității (*cut-off-ul*) pentru ER și PR a fost de 10%.

Proteina **HER2** a fost apreciată conform recomandărilor Societății Americane de Oncologie Clinică [145]. Astfel, s-au aplicat următoarele criterii:

“0” – nu se determină colorare sau colorare membranară slabă a $\leq 10\%$ din celule;

“+1” – colorare mebranară incompletă, ce abia se percepe în $>10\%$ din celulele tumorale;

“+2” – colorare membranară slabă completă până la moderată în >10% din celulele tumorale;

“+3” – colorare membranară circumferențială care este completă, intensă și în >10% din celulele tumorale. Cazurile +2 și +3 au fost considerate HER2+.

Tabelul 5. Anticorpi, diluții, sistem de detecție, demascare, incubare

Anticorpi	Sursa	Clona	Diluție	Sistem de detecție	Demascare	Timp incubare cu anticorpul primar
ER	Leica Bond (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK)	6F11	Prediluat	Bond Polymer Refine Detection System	20 de minute ER 2	30 de minute
PR		16				
CK5		XM26				
CD 34		QBEnd10				
Triptaza mastocitară		10D11				
CD68		514H12				
S100		policlonal				
Ki-67	Novocastra (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK)	MM1	1:40		10 minute ER 1	
HER2		CB11				
EGFR	Abcam (Cambridge, UK)	EGFR.113			20 de minute ER 2	
D2-40		gp36				
					10 minute ER 1	1 ora

Notă: ER 1 = Bond Epitope Retrieval Solution 1, pH6; ER 2 = Bond Epitope Retrieval Solution 2, pH9

Tabelul 6. Scorul Allred pentru evaluarea expresiei receptorilor pentru ER și PR

Proporția celulelor pozitive, %	Scor
0	0
<1	1
1-10	2
11-33	3
34-66	4
≥67	5

Intensitatea colorării	Scor
Absentă	0
Slabă	1
Moderată	2
Puternică	3

CK5 s-a evaluat în corespundere cu sistemul de gradare propus de Azoulay et al. după cum urmează [146]:

“0” – nu se determină colorare;

“+1” – colorare slabă a <10% din celulele tumorale;

“+2” – colorare membranară sau membranară și citoplasmatică în 10-50% din celulele tumorale;

“+3” – colorare intensă în >50% din celulele tumorale.

Expresia **EGFR** a fost evaluată conform recomandărilor ghidului Dako, EGFR PharmDX™ [147]. S-au analizat intensitatea și procentajul celulelor tumorale care au manifestat colorație membranară și/sau citoplasmatică. Astfel, s-au acordat următoarele scoruri:

“+1” – intensitate slabă;

“+2” – intensitate moderată;

“+3” – colorare puternică.

Tumoarea s-a considerat EGFR negativă dacă colorație membranară au manifestat mai puțin de 1% din celulele tumorale [147, 148].

Pentru evaluarea markerului **Ki-67** s-a aplicat metoda semiautomată propusă de Suci et al. [149]. Astfel, s-au numărat nucleeele imunomarcate și cele negative din celulele tumorale și s-a calculat procentajul celor colorate. Pragul pozitivității a fost de 14%.

În baza Consensului Internațional de Experți 2017 de la St Gallen, profilul imunohistochimic al subtipurilor moleculare a fost următorul:

ER+ și/ sau PR+, HER2-, Ki-67 < 14% pentru subtipul luminal A;

ER+ și / sau PR+, HER2+ și/ sau Ki-67 > 14% pentru luminal B;

ER-, PR-, HER2+ pentru subtipul HER2+.

Specimenele în care a lipsit colorația pentru ER, PR și HER2 au fost calificate ca subtip triplu-negativ [151].

Identificarea și cuantificarea elementelor stromale

Toate elementele stromale analizate au fost cuantificate prin metoda hot-spot: zonele cu cea mai mare densitate a elementelor vizate au fost mai întâi detectate prin scanarea secțiunilor la ob. 10× folosind microscopul Axio Imager A2 (Carl Zeiss, Germany). Ulterior s-au analizat 2-3 câmpuri consecutive din ariile tumorale și stroma peritumorală, calculându-se media aritmetică. Prin stroma peritumorală avem în vedere zona de după frontul invaziv și septurile care separă ariile tumorale. Pozitivitatea pentru fiecare marker imunohistochimic a fost determinată vizual de către 3 morfopatologi.

Macrofagele au fost identificate grație expresiei citoplasmatică a markerului CD68. Am cuantificat macrofagele în câte 2 câmpuri consecutive din stroma intratumorală și cea peritumorală la ob. 20×, ulterior calculând media aritmetică. De asemenea, s-au analizat intensitatea colorației citoplasmatică și forma celulelor. Am aplicat următorul scor:

- „0” – nu s-a observat nici o celulă CD68+ în câmp;
- „+1” – până la 25% din celulele CD68+ în câmp;
- „+2” – 25-50% celule CD68+ în câmp;
- „+3” – peste 50% de celule CD68+ în câmpul de vedere.

Mastocitele și celulele dendritice au fost identificate datorită expresiei markerilor specifici: triptazei și a proteinei S100 respectiv. Am analizat distribuția acestora în insula tumorală și plajele peritumorale prin numărarea directă a celulelor din zonele respective. Au fost analizate câte 3 câmpuri microscopice, identificate prin metoda hot-spot, pentru fiecare zonă, la ob. 40×. Ulterior, s-a calculat media aritmetică a celor 3 valori. Morfologia celulelor a fost analizată din perspectiva formei și a aspectului citoplasmei.

Vasele sangvine au fost depistate datorită expresiei membranare a CD34, marker al celulelor endoteliale și a progenitorilor celulelor hematopoietice. Astfel, inițial am localizat zonele cele mai vascularizate ale tumorii (CD34it) și din jurul tumorii (CD34pt). Am analizat câte 3 câmpuri din regiunile intratumorală și peritumorală la ob. 20× și am numărat vasele sangvine CD34 pozitive, MVD reprezentând media aritmetică a celor 3 valori.

Vasele limfatice au fost detectate grație expresiei D2-40 de către endoteliul limfatic. Acestea au fost numărate în câte 3 câmpuri consecutive din zonele intra- și peritumorală, la ob. 20×, ulterior calculându-se media aritmetică. Această valoare a reprezentat LVD.

2.5. Analiza statistică

Datele au fost stocate într-o bază de date MS Excel 2010, iar ulterior importate și analizate cu ajutorul programului SPSS (SPSS Statistics 23.0; IBM, Chicago, IL, USA). S-au determinat media, deviația standard, mediana, IQR, CI. Am aplicat testul de corelație al lui Spearman (r_s), iar valorile au fost considerate statistic semnificative în cazul unui $p \leq 0,05$. Gradul de asociere dintre variabile a fost descifrat, în baza ultimelor recomandări din domeniu, după Lovakov și Agadullina (2021) după cum urmează:

- $r_s < 0.12$ - corelație foarte slabă,
- $0.12 \leq r_s < 0.24$ - corelație slabă,
- $0.24 \leq r_s < 0.41$ - corelație moderată,
- $r_s \geq 0.41$ - corelație puternică [152].

Variabilele au fost grupate în dependență de scopul urmărit (de exemplu subtip luminal/non-luminal, densitate joasă/ înaltă, etc.). Valorile numerice ale elementelor stromale, în baza studiilor din domeniu, au fost grupate folosind mediana drept prag (*cut-off*) [153-155]. Ulterior, diferența dintre două grupuri de variabile s-a analizat prin aplicarea testului Mann-Whitney U. Au fost analizate statistic cazurile la care s-a cunoscut profilul molecular.

3. MODIFICĂRI CANTITATIVE ȘI CALITATIVE ALE ELEMENTELOR STROMALE ÎN DIVERSE SUBTIPURI MOLECULARE DE CARCINOAME MAMARE

3.1. Profilul histopatologic al tumorilor incluse în studiu

În studiul realizat, majoritatea tumorilor au fost moderat diferențiate (G2) (78 de cazuri). A fost depistat un singur caz de tumoare cu grad înalt de diferențiere (G1), iar 27 au fost slab diferențiate (G3). 71.7% din tumori (76 de cazuri) au fost clasificate drept carcinoame ductale invazive, tip NST. Majoritatea tumorilor G3 (23 din 27/ 85.2%) au fost de tip ductal invaziv NST. Repartizarea cazurilor conform tipului histologic și gradului de diferențiere a celulelor tumorale este redată în tabelul 7.

Tabelul 7. Clasificarea histopatologică a tumorilor incluse în studiu

Tipul histologic	Gradul tumorii			Total	
	G1	G2	G3	n (%)	95% CI
Carcinom ductal invaziv, tip NST	1	52	23	76 (71.69%)	0-88.77
Carcinom lobular invaziv	-	4	-	4 (3.77%)	0-7.07
Carcinom mucinos	-	2	-	2 (1.88%)	0-3.53
Carcinom medular	-	8	-	8 (7.54%)	0-14.14
Carcinom papilar intraductal	-	1	-	1 (0.94%)	0-1.76
Carcinom <i>in situ</i> :	lobular	-	2	2 (1.88%)	0-3.53
	ductal	-	-	1	1 (0.94%)
Carcinom mixt:					
ductal invaziv+lobular invaziv	-	5	3	8 (7.54%)	0-8.91
ductal invaziv+medular	-	1	-	1 (0.94%)	0-1.76
ductal invaziv+mucinos	-	3	-	3 (2.83%)	0-5.30
Total	1 (0.94%)	78 (73.58%)	27 (25.47%)	106	

Notă: în tabel sunt redat doar cazurile la care s-a reușit determinarea subtipurii moleculare.

Carcinoamele de tip ductal invaziv NST au prezentat tumori cu o varietate mare de *pattern*-uri histologice (figura 2a, b, 3a). Structural, acestea au fost constituite din grupuri de celule epiteliale de o formă neregulată sau rotunjită cu nuclei pleomorfi și cromatina condensată, mixate cu celule unice și/ sau cordoane de celule tumorale, lipsite de caracteristicile morfologice ale oricăruia dintre tipurile speciale de carcinom invaziv. Una dintre cele mai frecvente modificări depistate în stromă a fost prezența infiltratului limfocitar, având o intensitate de la moderată până la marcată. Printre alte modificări observate se enumeră modificări edematoase, mixoide, elastotice și desmoplazice. Frecvent, am putut observa îngroșarea stomei peritumorale cu sporirea cantității de fibre de colagen (figura 3b). În 5 cazuri a fost atestată invazia pielii de către celulele neoplazice (figura 4a, b). În tumorile slab diferențiate, s-a observat prezența necrozei intratumorale sau fibrozarea acesteia.

Neoplazmul bine diferențiat (G1) s-a prezentat drept o tumoare cu formare de structuri tubulare, tubulii și glandele fiind căptușite de un singur strat de celule epiteliale ductale neoplazice cu un grad jos de atipie nucleară. Atipia celulară s-a manifestat printr-o varietate a înălțimii celulelor epiteliale, acestea fiind de tip columnar, cubic sau scuamos haotic aranjate în cadrul aceleiași glande. Atât în lumenul tubulilor neoplazici, cât și în stroma peritumorală am putut observa calcificate, figuri mitotice am identificat ocazional.

În cazurile în care carcinoamele ductal invazive au fost însoțite de alte *pattern*-uri structurale (de ex. carcinom lobular invaziv, mucinos, medular) –acestea au fost atribuite la carcinoame mixte.

Neoplasmele de tip **lobular infiltrativ** tradițional au fost constituite din celule dispuse liniar, în șiraguri de cel mult una sau două celule (figura 5a, b). Celulele tumorale erau mici, preponderent uniforme, deseori cu vacuole transcitoplasmice umplute cu mucină, cu nucleu rotunjit, adesea excentrice și nucleoli nedetectabili. Ocazional, am putut observa infiltrate limfocitare peritumorale.

În studiul nostru au fost determinate și 11 cazuri de carcinoame **de tip special**, unul dintre care a fost cel **mucinos** (2 cazuri). Structural, aceste tumori au avut și o cantitate impunătoare de mucină extracelulară în care erau dispersate celule epiteliale neoplazice. Paternul arhitectural al celulelor era destul de variat reprezentat de cordoane, cuiburi alveolare, *clustere* papilare și micropapilare sau lamele cribriforme (figura 6). Astfel de structuri combinate cu arii de carcinom ductal invaziv au fost identificate doar în 3 cazuri și au fost atribuite la tumori mixte. Toate carcinoamele de tip mucinos incluse în studiu au fost tumori cu grad mediu de diferențiere celulară G2.

Carcinoamele **medulare** (8 cazuri) au fost tumori clar circumscrise cu patern difuz de creștere, microscopic alcătuite din celule neoplazice mari, pleiomorfe cu limite incerte (model sincițial de creștere)cu numeroase mitoze și nuclei mari având nucleoli proeminenți.

Stroma peritumorală redusă și infiltrat limfoplasmocitar proeminent (figura 7a), conținând limfocite, eozinofile, bazofile și un număr considerabil de plasmocite. Celulele imune au fost concentrate preponderent la interfața dintre tumoare și parenchimul neafectat al glandei mamare. Acestea, de asemenea, înconjurau ducturi și lobuli mai îndepărtați, care nu conțineau celule tumorale detectabile. Infiltratul limfoplasmocitar din interiorul tumorii era limitat la stroma fibrovasculară dintre zonele sincițiale ale celulelor tumorale.

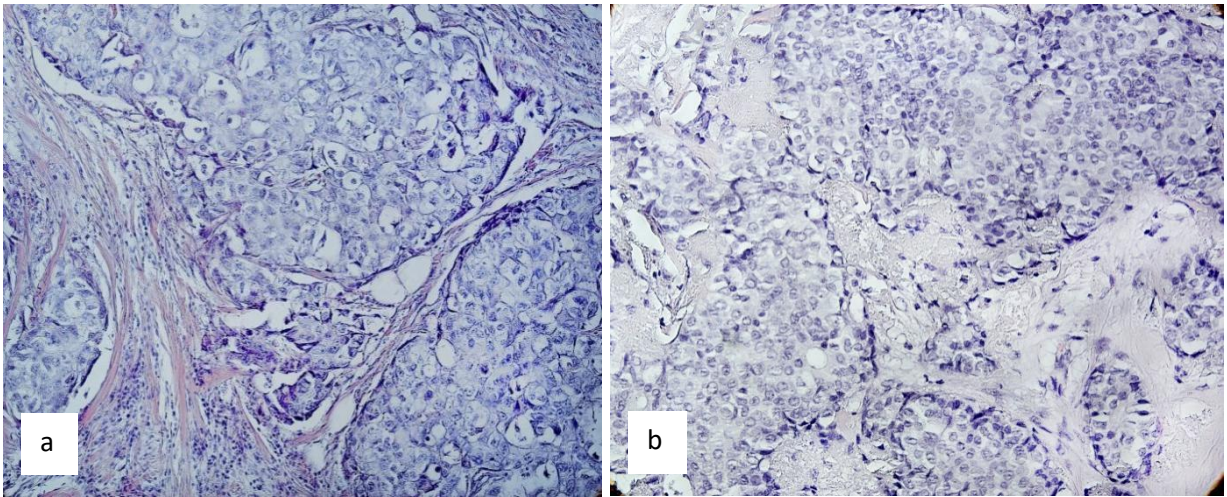


Figura 2. Carcinom ductal invaziv, de tip NST cu: (a) patern solid, scor Nottingham 8, G3 și (b) patern solid tubular, scor Nottingham 6, G2 (ob. 40×). Colorație HE.

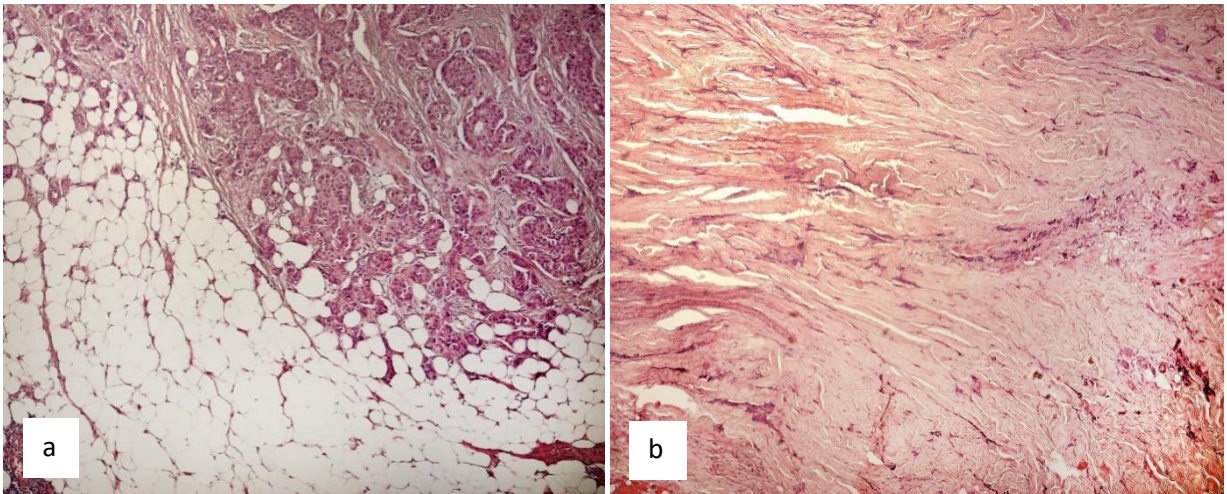


Figura 3. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. Invazia țesutului adipos (a), îngroșarea stromei peritumorale (b) (a – ob. 10×, b – ob. 20×). Colorație HE.

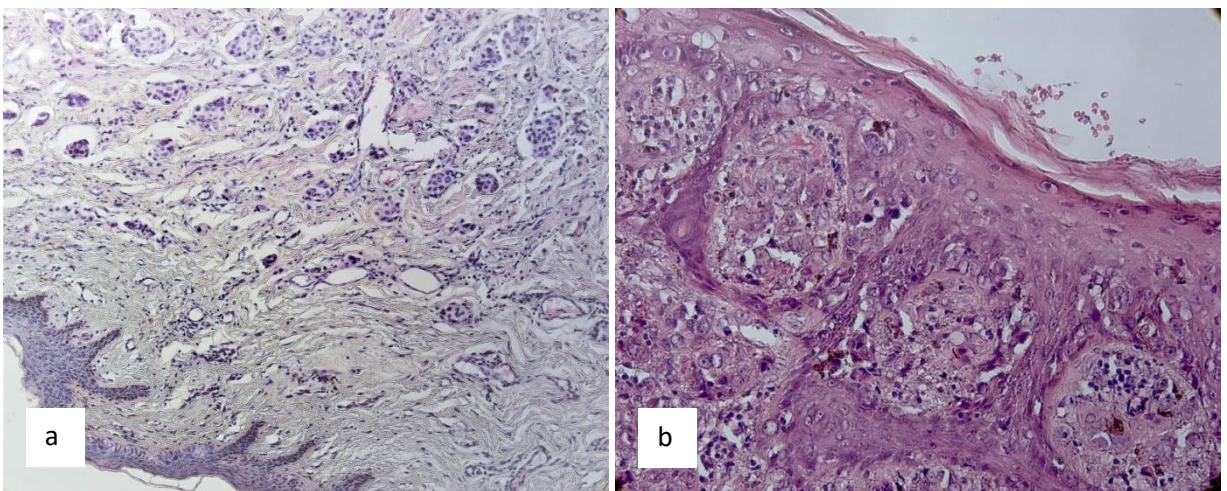
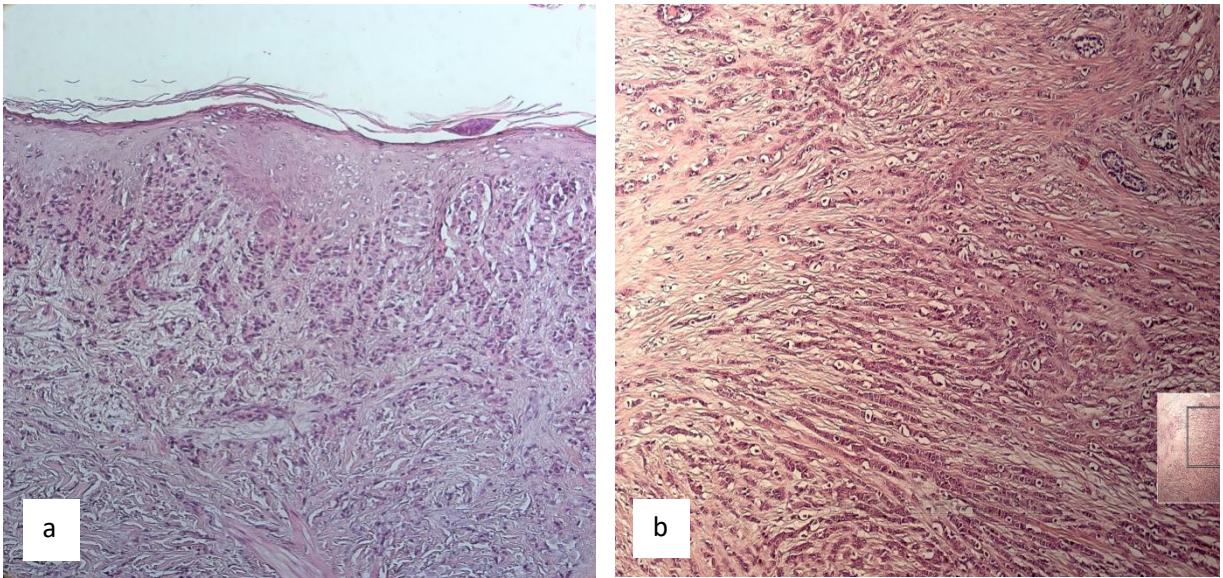


Figura 4. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. Invazia pielii (a – ob. 20×, b – ob. 40×). Colorație HE.



**Figura 5. Carcinom lobular infiltrativ, patern arhitectural liniar (a, b)
(ob. 20×). Colorație HE.**

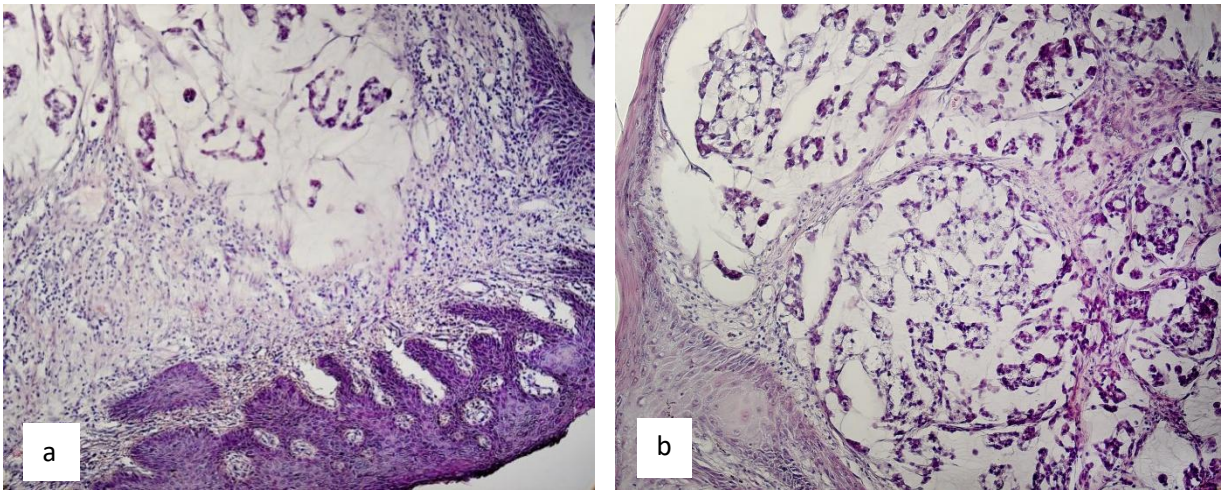
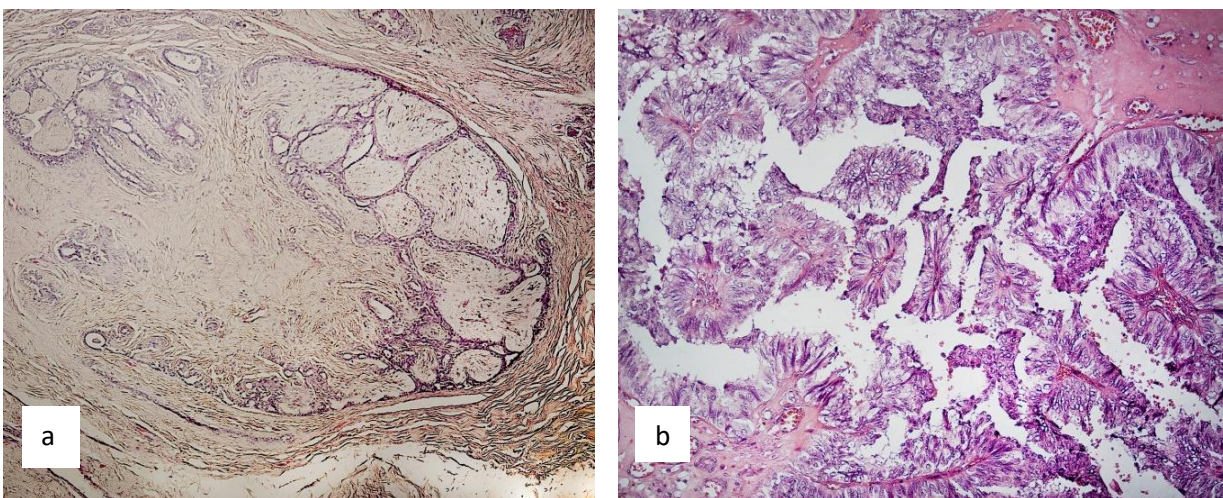


Figura 6. Carcinom mucinos, invazia pielii (ob. 20×). Colorație HE.



**Figura 7. Carcinom medular (a) și carcinom intraductal papilar (b)
(ob. 10×). Colorație HE.**

Carcinomul **intraductal papilar** s-a depistat într-un singur caz, fiind format din celulele neoplazice pe un schelet fin arborizant de tije fibrovasculare (figura 7b). Microscopic, se caracterizează prin proliferarea tubilor angulați, ovali și alungiți cu aranjament dezordonat cu lumen deschis căptușit de un singur strat de epiteliu nesustținut de stratul de celule mioepiteliale și BM. Nucleele au manifestat grade variate de atipie.

Carcinomul **ductal *in situ*** (1 caz) a fost format din *cluster*e de celule neoplazice polimorfe, care și-au pierdut polaritatea dar au rămas limitate de BM ocupând doar lumenul ducturilor implicați în proces. Celulele mioepiteliale au fost prezente, dar erau atenuate. Acest fenomen a fost însoțit de îngroșarea membranei bazale și de formarea unui manșon alcătuit din stromă desmoplazică. Rareori, în ducturile afectate de DCIS, puteau fi observate rămășițe de epiteliu non-neoplazic normal sau hiperplazic. În jurul regiunilor afectate, am putut observa și infiltrat inflamator în cantități variabile (figura 8a, b). Carcinoamele **lobulare *in situ*** (2 cazuri) (figura 9) au prezentat proliferare epitelială atipică în lobuli, celulele fiind mici, rotunde, cu citoplasmă redusă, slab coezive. Am observat carcinoamele *in situ* unifocale (dacă au implicat o singură TDLU sau mai multe unități terminale învecinate fără țesut mamar neafectat între ele) și multifocale (dacă au implicat mai multe TDLU la distanță).

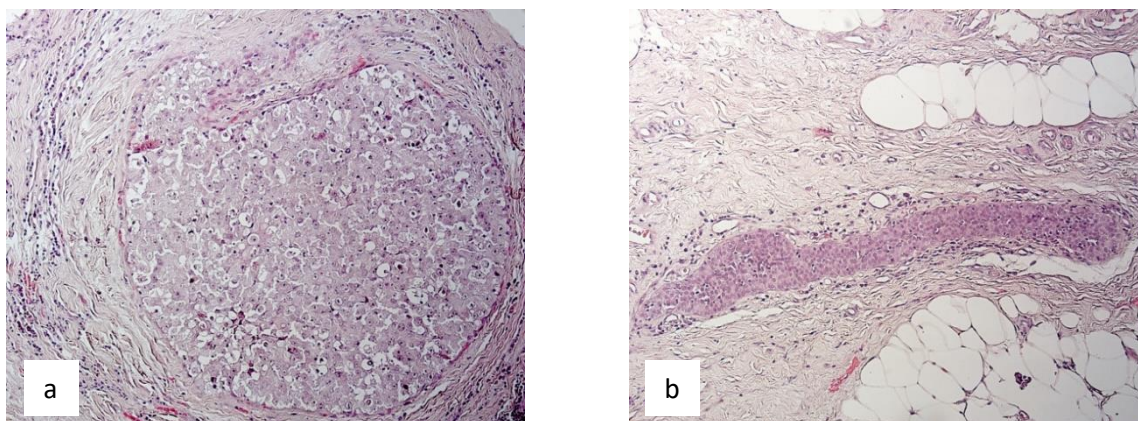


Figura 8. **Carcinom ductal *in situ*, infiltrat inflamator periductal (a, b) (a – ob. 40×, b – ob. 20×). Colorație HE.**

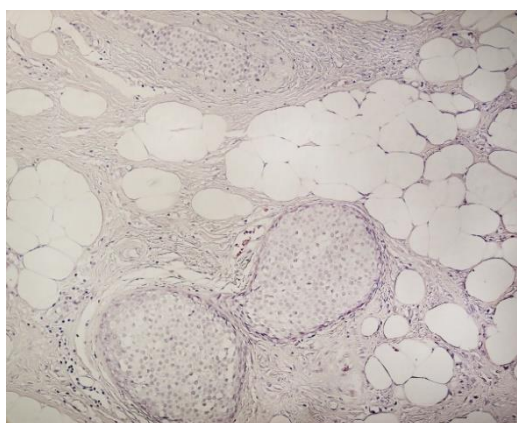


Figura 9. **Carcinom lobular *in situ* (ob. 20×). Colorație HE.**

3.2. Profilul molecular al tumorilor incluse în studiu

Cuantificarea ER, PR, HER2, Ki-67 s-a efectuat conform metodei semiautomate după Suci et al. [149] (figura 10).

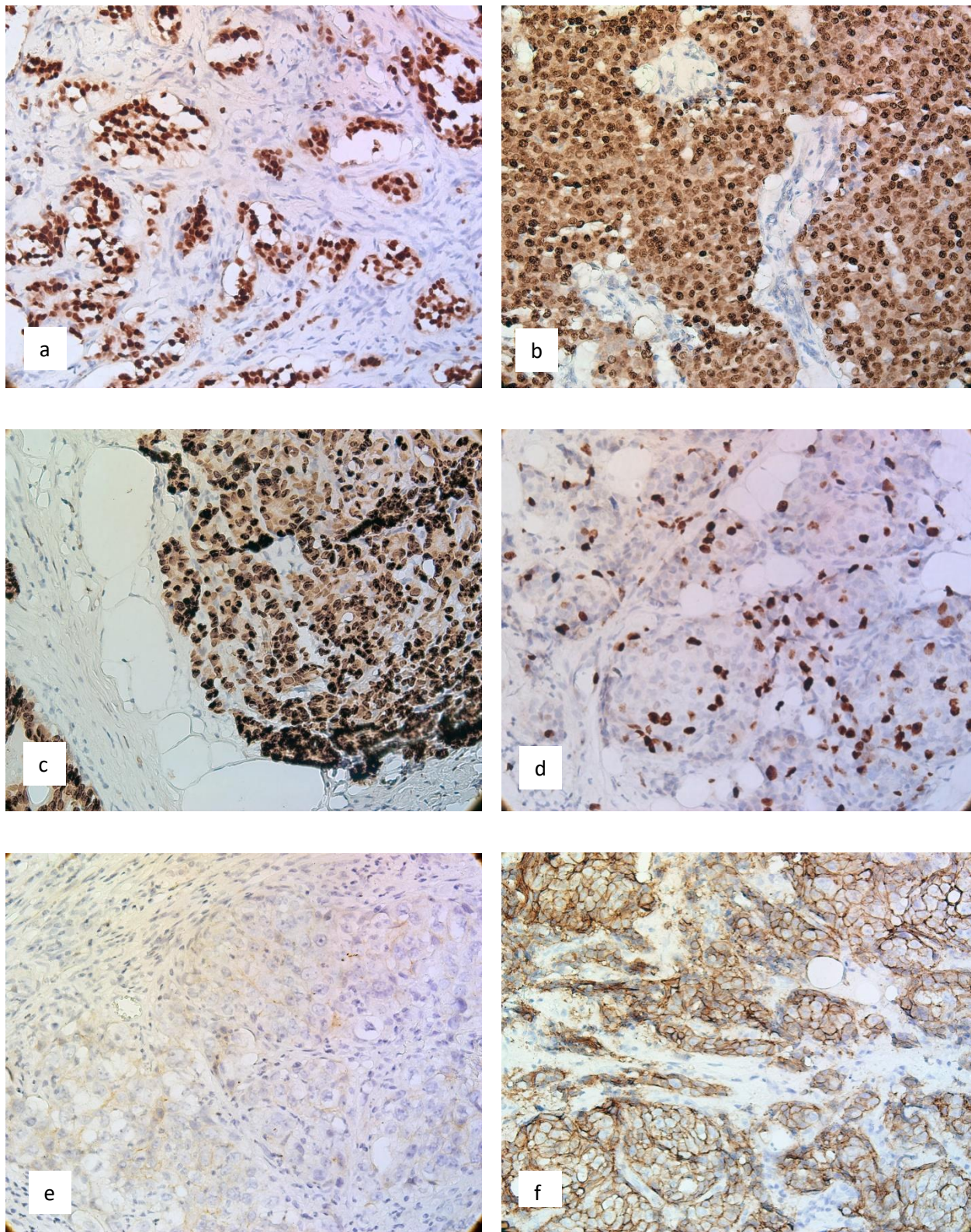


Figura 10. Carcinom ductal invaziv, tip NST. Celule tumorale imunomarcate pentru: ER, scor +2 (a) și +3 (b) după Allred; PR, scor +3 după Allred (c); Ki-67 (d); HER2, scor +1 (e), scor +3 (f). Contracolorare cu hematoxină Lille, ob. 40×.

Repartizarea cazurilor conform imunoreactivității pentru receptorii hormonali și proteina HER2 poate fi regăsită în tabelul 8.

Tabelul 8. **Expresia markerilor versus gradul tumorii**

Gradul tumorii	ER		PR		HER2		Total	
	poz	neg	poz	neg	neg	poz	n (%)	95% CI
G1	1	-	1	-	1	-	1 (0.94%)	0-43.4
G2	66	12	60	18	22	56	78 (73.58%)	0-40.93
G3	11	16	9	18	12	15	27 (25.47%)	0-39.26
Total	78 (73.58%)	28 (26.41%)	70 (66.03%)	36 (33.96%)	35 (33.01%)	71 (66.98%)	106	

Notă: în tabel sunt redată doar cazurile la care s-a reușit determinarea subtipului molecular

Cel mai frecvent subtip molecular stabilit în urma colorației imunohistochemice a fost cel luminal B/ HER2+ (figura 11). Cele mai multe tumori de acest subtip molecular au fost carcinoame ductale invazive (36 de cazuri), 7 cazuri au fost carcinoame de tip medular, 1 caz – papilar, 1 caz – DCIS, celelalte – de tip mixt.

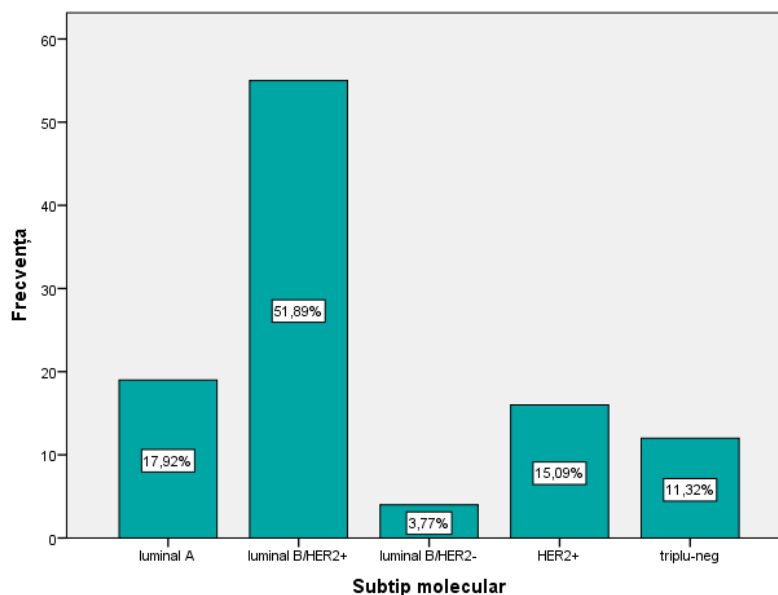


Figura 11. **Distribuția cazurilor conform clasificării moleculare, %**

11 din 12 tumori TNBC au fost carcinoame ductale invazive, ceea ce reprezintă 2/3 din cazuri (8 din 12) toate fiind slab diferențiate. Dintre neoplasmelor HER2+, într-un singur caz am identificat tumoare medulară, celelalte sunt ductal invazive, de tip NST. 8 din 16 cazuri de tumori HER2+ au fost slab diferențiate. Tumorile de tip luminal A au inclus unicul caz de tumoare bine diferențiată G1, iar 14 cazuri din 19 au fost moderat diferențiate. Carcinoamele

lobulare infiltrative au fost fie de tip luminal A (1 caz), fie de tip luminal B/ HER2+ (3 cazuri). Repartizarea cazurilor conform subtipurii molecular *versus* vârsta pacientelor este redată în tabelul 9. În tabelul 10 putem analiza distribuția subtipurilor moleculare în raport cu tipul histopatologic al tumorii.

Tabelul 9. **Profilul molecular al tumorilor *versus* vârsta pacientelor**

		Subtipuri moleculare				
		luminal A	luminal B/ HER2+	luminal B/ HER2-	HER2+	TNBC
Vârsta, ani	media	69.2	65.9	66.5	60.6	63.2
	Dev. std.	10.3	9.9	6.2	5.2	5.1
	mediana	73	64	66	62	63.5
	25-75% IQR	63-76	58-74	60.8-72.8	57.5-64	59.3-65

Notă: TNBC – carcinom mamar triplu-negativ, Dev. std. – deviația standard

Tabelul 10. **Profilul molecular al tumorilor *versus* tipul histopatologic al umorii**

		Subtipuri moleculare					Total
		luminal A	luminal B/ HER2+	luminal B/ HER2-	HER2+	TNBC	
Carcinom ductal invaziv, tip NST, n (%)		11 (57.90%)	36 (65.45%)	3 (75,0%)	15 (93.75%)	11 (91.67%)	76
Carcinom lobular invaziv, n (%)		1 (5.26%)	3 (5.45%)	-	-	-	4
Carcinom mucinos, n (%)		1 (5.26%)	-	1 (25.0%)	-	-	2
Carcinom medular, n (%)		-	7 (12.72%)	-	1 (6.25%)	-	8
Carcinom papilar intraductal, n (%)		-	1 (1.81%)	-	-	-	1
Carcinom <i>in situ</i>:	lobular, n (%)	-	2 (3.63%)	-	-	-	2
	ductal, n (%)	-	1 (1.81%)	-	-	-	1
Carcinom mixt, n (%)		6 (31.57%)	5 (9.09%)	-	-	1 (8.33%)	12
Total		19	55	4	16	12	106

Notă: în tabel sunt redat doar cazurile la care s-a reușit determinarea subtipurii molecular.
n – numărul de cazuri, Dev. std. – deviația standard

3.3. Macrofage CD68 pozitive în carcinoamele mamare

Markerul CD68 a manifestat expresie citoplasmatică în macrofage. Celulele tumorale nu au exprimat CD68.

Densitatea macrofagelor a fost evaluată separat în stroma peritumorală și intratumorală. În conformitate cu procentajul celulelor CD68+ cu o morfologie caracteristică monocitelor/macrofagelor (citoplasmă abundentă, nucleu de mărime medie, formă ovală sau în formă de bob, cu nucleol proeminent, cromatină fină) s-a acordat un scor, variind în limitele de la 0 (macrofage absente) până la +3 (densitate sporită, macrofagele ocupând >50% din câmpul de vedere).

Macrofagele, colorate brun, au prezentat aspecte variate din punct de vedere morfologic. În unele specimene au apărut drept celule mici și rotunjite, cu puține sau fără extensii citoplasmatic. Citoplasma a fost uniform colorată, moderat sau intens (figura 12a). Totodată au fost puse în evidență și macrofage cu aspect ameboid, cu numeroase extensii citoplasmatic pe suprafața celulară (figura 12b). Un alt grup de macrofage s-a caracterizat printr-o puternică granulație citoplasmatică (figura 13a, b). Pe lângă cele menționate, au fost prezente și macrofage fusiforme, unele multinucleate care au fost caracterizate printr-un corp celular alungit cu prelungiri citoplasmatic la polurile opuse (figura 13c, d).

Din punct de vedere topografic, în toate secțiunile au fost determinate atât macrofage CD68 pozitive intratumorale (figura 14a), cât și peritumorale (figura 14b). Ultimele au fost concentrate în jurul celulelor tumorale (figura 15a), perivascular (figura 15b, 16) și/ sau în zonele de invazie (figura 15c, d). Date comparative privind distribuția celulelor CD68+ sunt prezentate în tabelul 11.

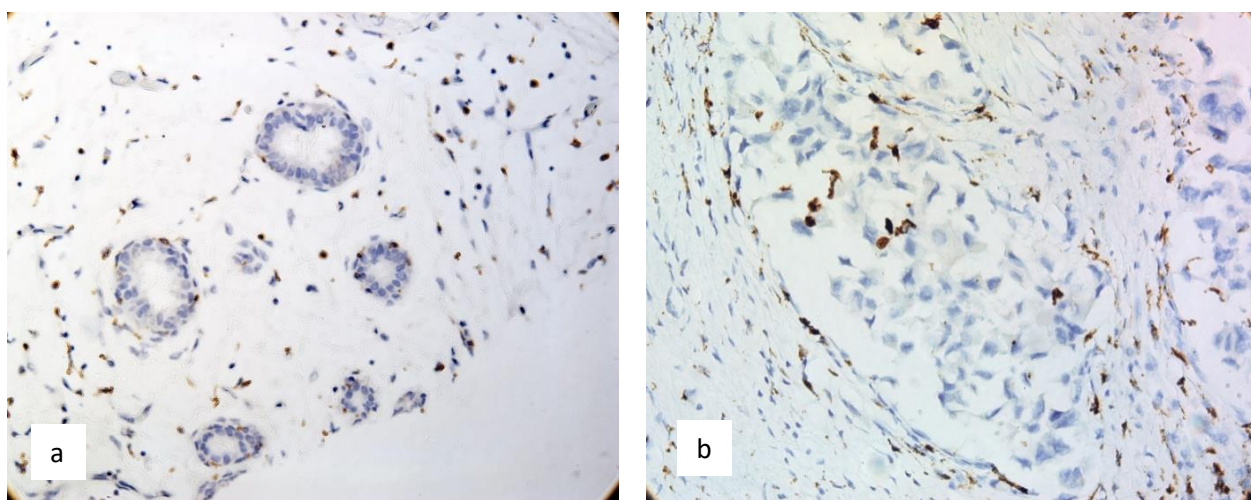


Figura 12. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. Diverse aspecte ale macrofagelor: (a) punctiforme, (b) stelate (a - ob. 20×, b - ob. 40×). Imunoreacție pentru CD68, DAB.

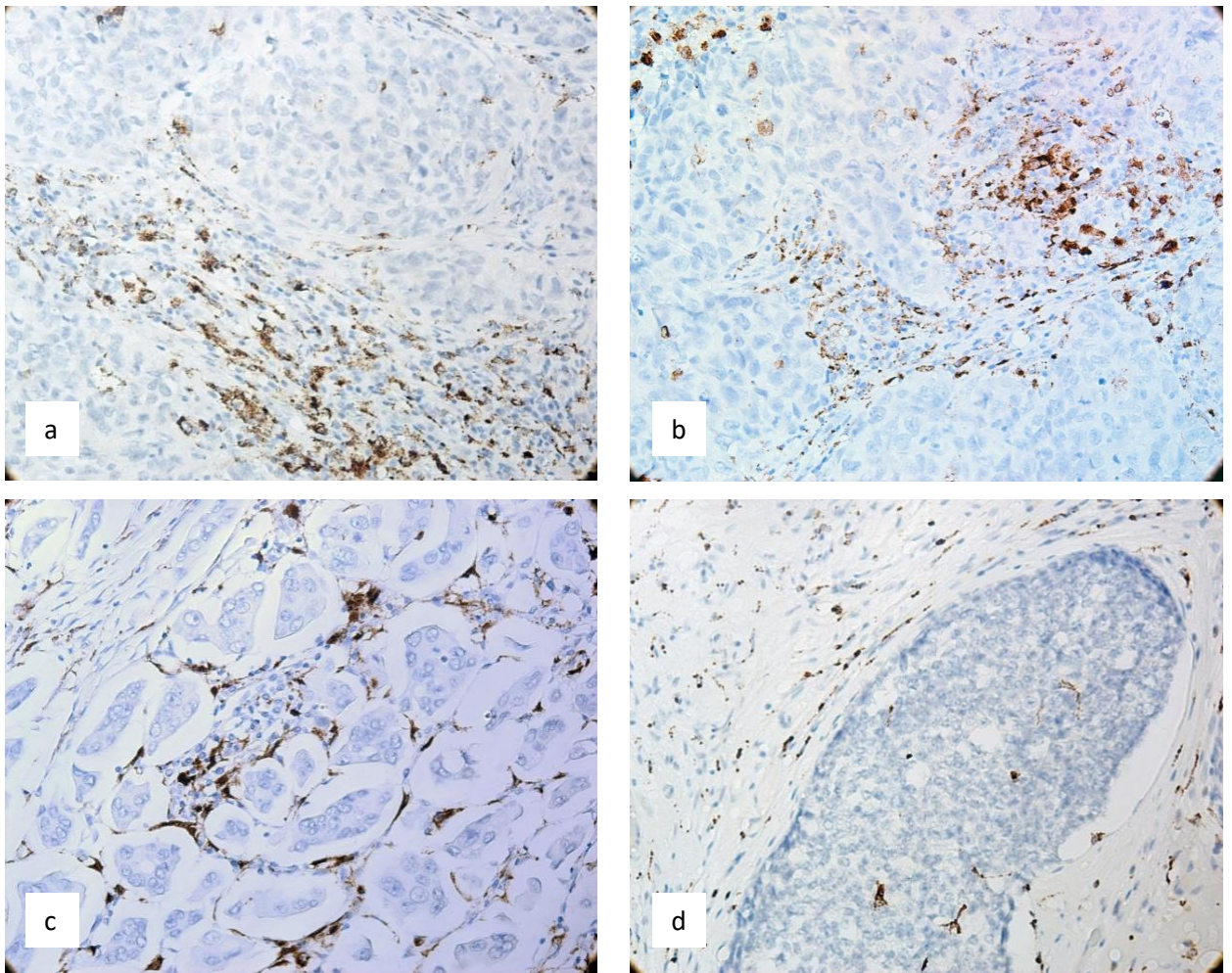


Figura 13. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. Diverse aspecte ale macrofagelor CD68 pozitive: (a, b) granulare, (c, d) fusiforme (a-c ob. 40×, d - ob. 20×).

Imunoreacție pentru CD68, DAB.

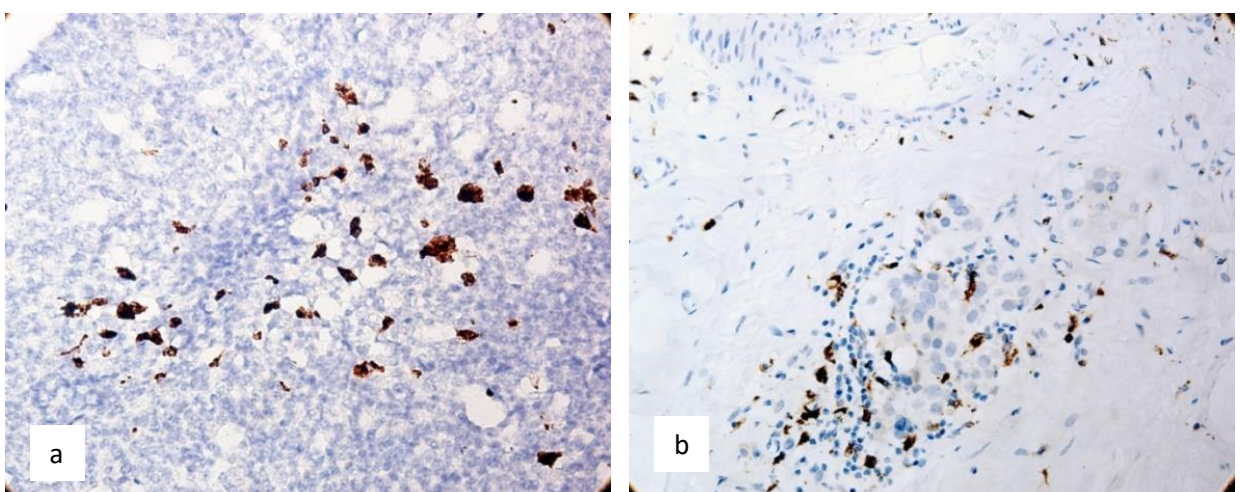


Figura 14. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. Macrofage localizate (a) intratumoral și (b) în infiltratul inflamator peritumoral (ob. 40×).

Imunoreacție pentru CD68, DAB.

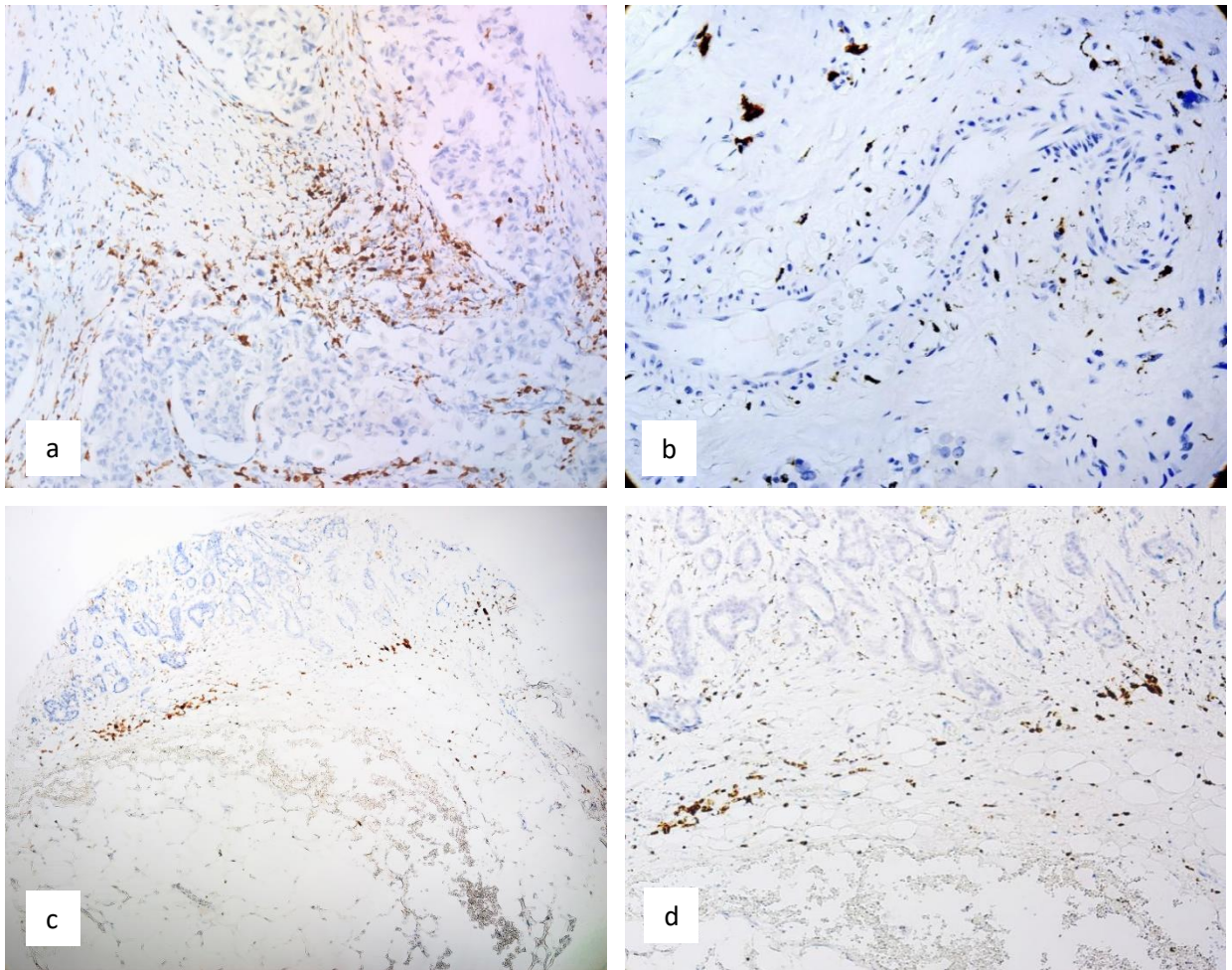


Figura 15. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. Macrofage: (a) înconjurând celulele tumorale, (b) perivasculare și (c, d) la hotarul ariei de invazie.

(a, d - ob. 20×, b - ob. 40×, c - ob. 10×). Imunoreacție pentru CD68, DAB.

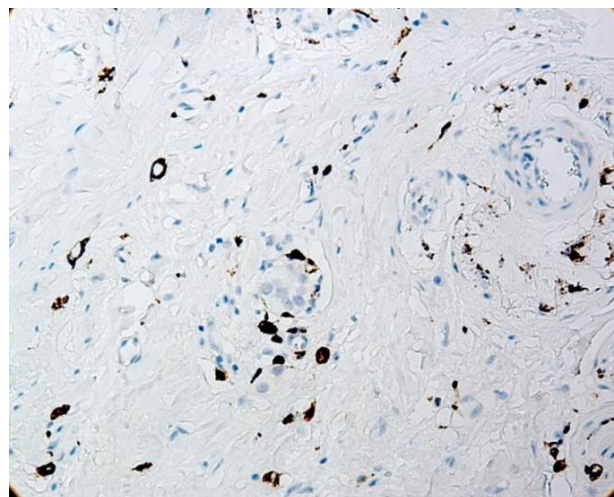


Figura 16. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. Multiple macrofage perivasculare și peritumorale (ob. 40×). Imunoreacție pentru CD68, DAB.

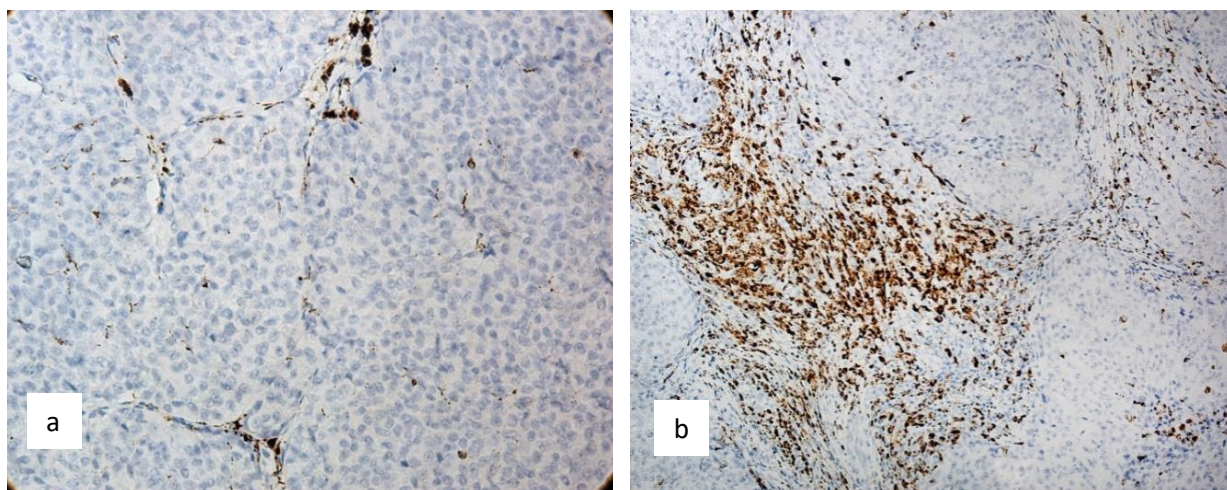


Figura 17. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. Macrofage CD68+, (a) scor +1 și (b) +2 (ob. 20×). Imunoreacție pentru CD68, DAB.

Tabelul 11. Expresia CD68 în regiunile intra- și peritumorale

	CD68it	CD68pt
Media	1.53	1.54
Dev. std.	0.75	0.81
Mediana	1.5	1
25-75% IQR	1-2	1-2

Notă: CD68it – celule CD68+ intratumorale, CD68pt – celule CD68+ peritumorale, Dev. std. – deviația standard

În majoritatea tumorilor, atât CD68it cât și CD68pt au prezentat o densitate joasă, cu scor +1 (adică până la 25% din câmpul de vedere) (figura 17a) în 38 (48.1%) și scor <1 în 43 de cazuri (54.5%). Scorul +2 a fost frecvent acordat tumorilor de tip luminal (figura 17b). Macrofagele CD68+ peri- și intratumorale au fost practic egal distribuite în tumorile de tip luminal B/ HER2+ și cele TNBC. Cea mai înaltă densitate a macrofagelor CD68it a fost înregistrată în tumorile TNBC, iar a CD68pt – în tumorile HER2+. De remarcat că, 10 din cele 14 tumori în care s-a acordat scorul +3 pentru CD68pt, au exprimat proteina HER2. De asemenea, 5 din 8 tumori în care s-a acordat scorul +3 pentru CD68it, au exprimat proteina HER2.

Cel mai mare decalaj dintre macrofagele intra- și peritumorale s-a înregistrat în tumorile HER2+. Distribuția macrofagelor intra- și peritumorale nu a prezentat diferențe în tumorile G2; macrofagele intratumorale au prevalat ușor asupra celor peritumorale în tumorile G3 (figura 18).

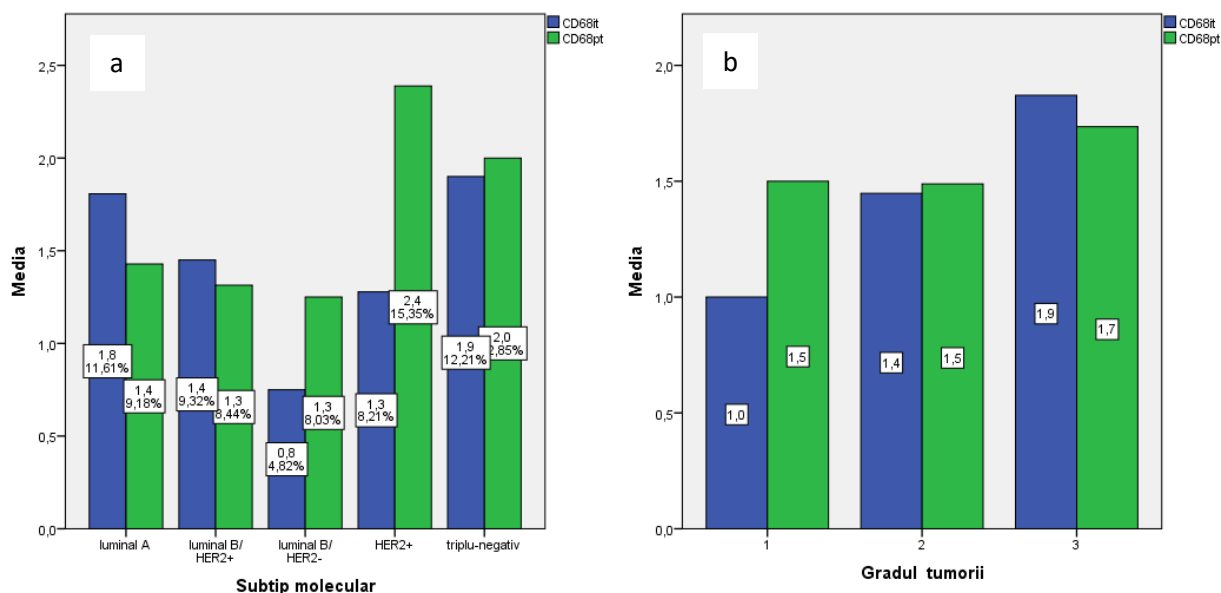


Figura 18. Densitatea macrofagelor CD68+ în dependență de: (a) subtipul molecular și (b) gradul de diferențiere a tumorii.

Analiza statistică a arătat corelații inverse, semnificative statistic dintre CD68pt și receptorii hormonali ER ($r_s = -0.316$, $p = 0.005$) și PR ($r_s = -0.280$, $p = 0.012$). De asemenea, CD68pt a corelat cu subtipul molecular al tumorii ($r_s = 0.267$, $p = 0.017$). CD68it au fost influențate de gradul tumorii ($r_s = 0.233$, $p = 0.039$) (tabelul 12).

Ulterior, cazurile au fost grupate în 2 categorii: luminal și non-luminal. Pentru a compara CD68pt și CD68it în subtipurile luminal *versus* non-luminal, am efectuat testul Mann-Whitney U (tabelul 13). Datele obținute au confirmat influența expresiei receptorilor hormonali asupra dinamicii CD68pt ($U = 265$, $p = 0.0002$).

Tabelul 12. Corelații statistice dintre macrofage CD68 pozitive, vârsta pacientelor, gradul de diferențiere al tumorii, expresia ER, PR, HER2 și subtipul molecular al tumorii

		Vârsta	Grad	ER	PR	HER2	Subtip	CD68it	CD68pt
Vârsta	rs		,037	,183	-,184	-,348	-,228	,096	,046
	p		,745	,106	,104	,002	,044	,402	,687
	n		79	79	79	79	79	79	79
Grad	rs	,037		-,152	-,409	-,262	,333	,233	,097
	p	,745		,182	,000	,020	,003	,039	,394
	n	79		79	79	79	79	79	79
ER	rs	,183	-,152		,555	,121	-,633	,038	-,316
	p	,106	,182		,000	,287	,000	,739	,005
	n	79	79		79	79	79	79	79
PR	rs	-,184	-,409	,555		,244	-,622	-,070	-,280
	p	,104	,000	,000		,030	,000	,538	,012
	n	79	79	79		79	79	79	79
HER2	rs	-,348	-,262	,121	,244		,152	-,194	-,061
	p	,002	,020	,287	,030		,181	,086	,593
	n	79	79	79	79		79	79	79
Subtip	rs	-,228	,333	-,633	-,622	,152		-,095	,267
	p	,044	,003	,000	,000	,181		,405	,017
	n	79	79	79	79	79		79	79
CD68it	rs	,096	,233	,038	-,070	-,194	-,095		,149
	p	,402	,039	,739	,538	,086	,405		,191
	n	79	79	79	79	79	79		79
CD68pt	rs	,046	,097	-,316	-,280	-,061	,267	,149	
	p	,687	,394	,005	,012	,593	,017	,191	
	n	79	79	79	79	79	79	79	

Notă: vârsta – vârsta pacientelor, grad – gradul de diferențiere al tumorii, subtip – subtipul molecular al tumorii, CD68it – celule CD68+ intratumorale, CD68pt – celule CD68+ peritumorale, rs – coeficientul de corelație al lui Spearman, n – numărul de cazuri analizate. Rezultatele semnificative statistic au fost marcate prin **bold**

Tabelul 13. CD68pt și CD68it în carcinoamele mamare lumenale versus non-lumenale

	CD68it	CD68pt
Mann-Whitney U	562,000	265,000
Wilcoxon W	2392,000	2095,000
Z	-,096	-3,699
p	,924	,0002

Notă: grupul luminal a cuprins subtipurile lumenale A, B/ HER2+ și B/ HER2-; grupul non-luminal a cuprins tumorile HER2+ și cele triplu-negative; CD68it – celule CD68+ intratumorale, CD68pt – celule CD68+ peritumorale

3.4. Mastocite triptază pozitive în carcinoamele mamare

Reacția pozitivă pentru triptază a fost localizată la nivel citoplasmatic, colorația imunohistochimică fiind realizată cu succes în 83 de cazuri, dar pentru 3 dintre acestea nu a fost posibilă determinarea subtipului molecular.

Microscopic, MC au fost caracterizate drept celule de dimensiuni mari, de o formă ovoidă, nucleu rotund, deseori invizibil din cauza conținutului înalt de granule cu mediatori în citoplasmă. Astfel de MC aveau o citoplasmă întunecată, intens colorată și au fost clasificate drept granulate (figura 27a, b). În schimb, în cazul MC degranulate, mai numite și activate, nucleul a fost vizibil, citoplasma s-a colorat mai slab, iar granulele au putut fi observate în ECM (figura 28a, b).

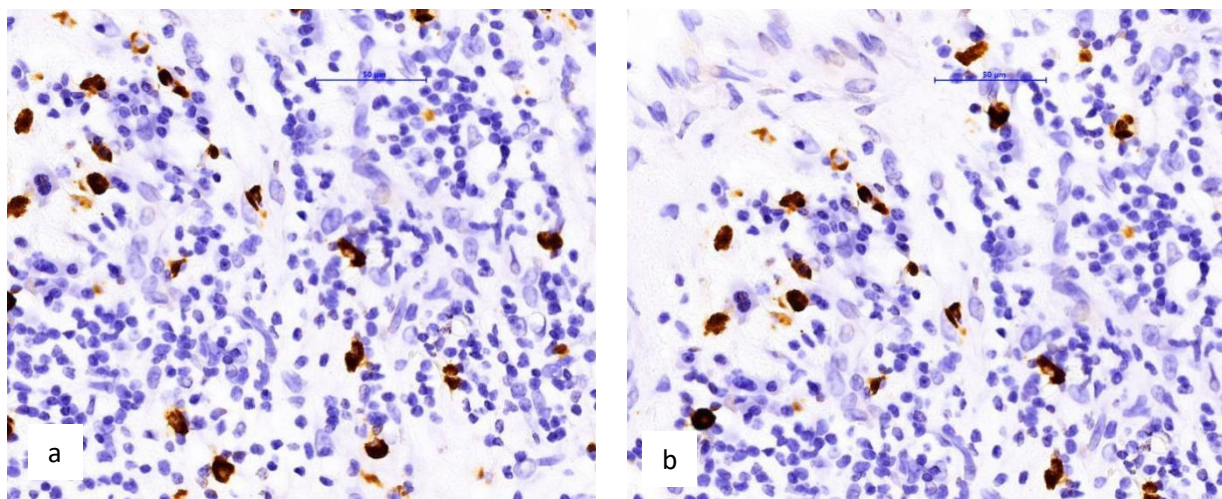


Figura 27. Carcinom ductal invaziv de tip NST, mastocite granulate (a, b - ob. 40×).

Imunoreacție pentru triptază, DAB.

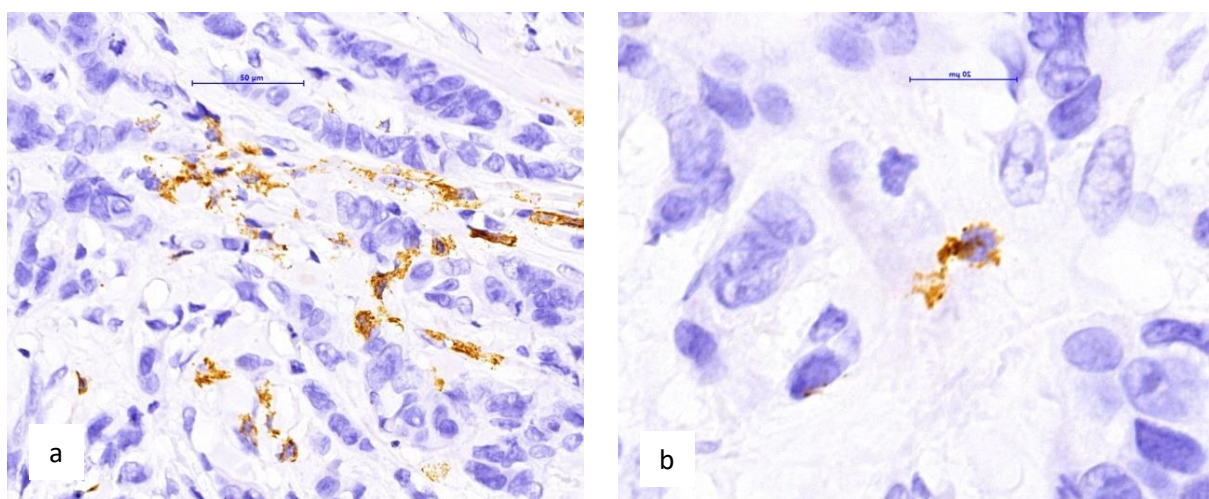


Figura 28. Carcinom lobular infiltrativ, mastocite degranulate, aranjate liniar (a - ob. 40×, b - ob. 100×). Imunoreacție pentru triptază, DAB.

Din punct de vedere topografic, MC au fost localizate în locuri diferite, iar numărul acestora a variat mult. Astfel, în unele cazuri putea fi găsit un singur mastocit, solitar, „furișat” printre celulele maligne; în altele – grupuri numeroase conținând până la 65 de celule. MC solitare au fost mai frecvent cele intratumorale (MCit). Aranjamentul MC a variat în funcție de tipul histologic. În carcinoamele ductal invazive, acestea erau distribuite difuz printre celulele neoplazice (figura 29a-d). În cazul carcinoamelor lobular infiltrative, MC intratumorale erau aranjate liniar de-a lungul cordoanelor de celule tumorale (figura 28a, b).

MC din stroma peritumorală aveau tendința de „a delimita” insulele de celule tumorale (figura 30, 31a, b), situându-se la interfața dintre aria tumorală și stroma conjunctivă peritumorală. Frecvent am putut observa MC peritumorale în jurul vaselor sangvine (figura 32a, b) sau în cadrul infiltratului inflamator. Ultimul a servit pentru control negativ intern, limfocitele fiind negative pentru triptază (figura 33). În cazul MCpt s-au înregistrat și cele mai înalte valori numerice (figura 34).

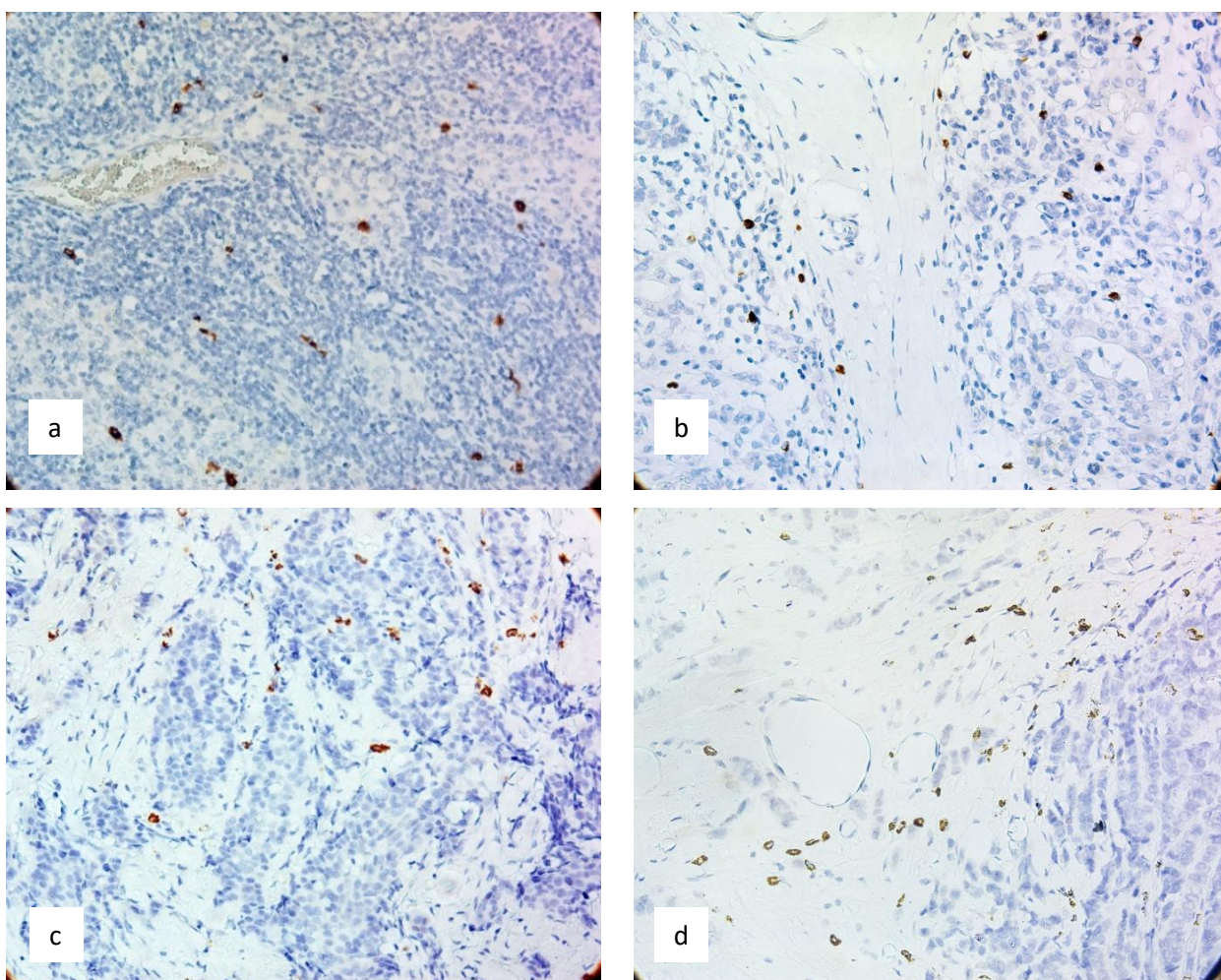
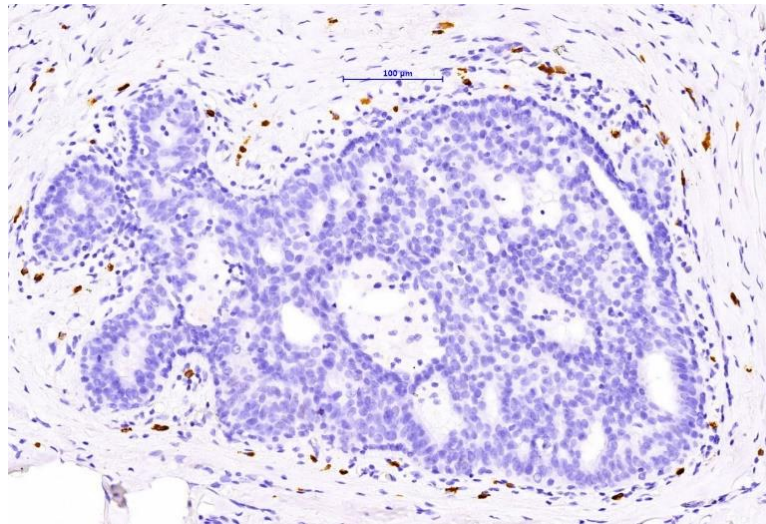
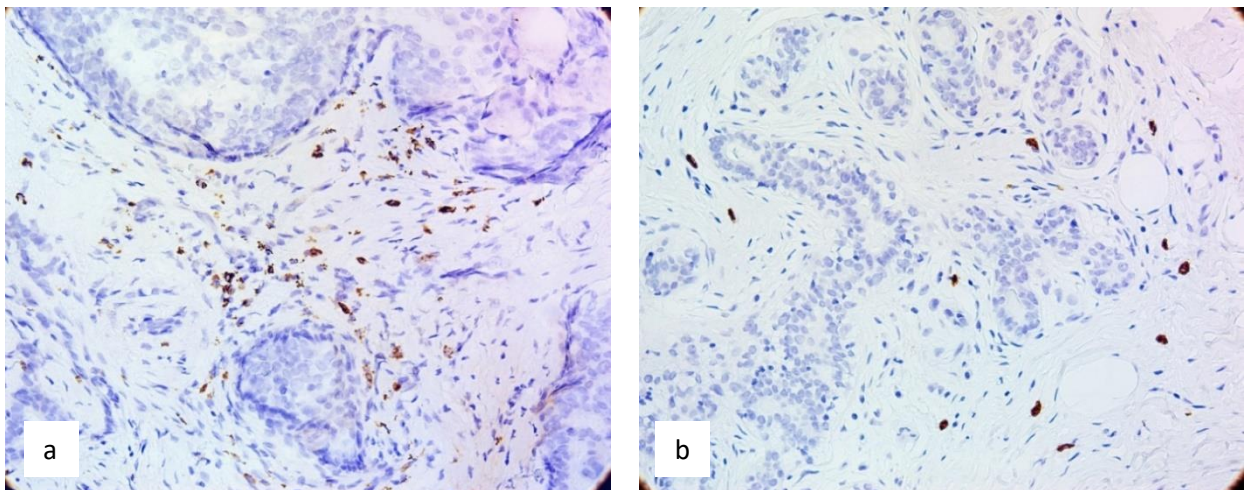


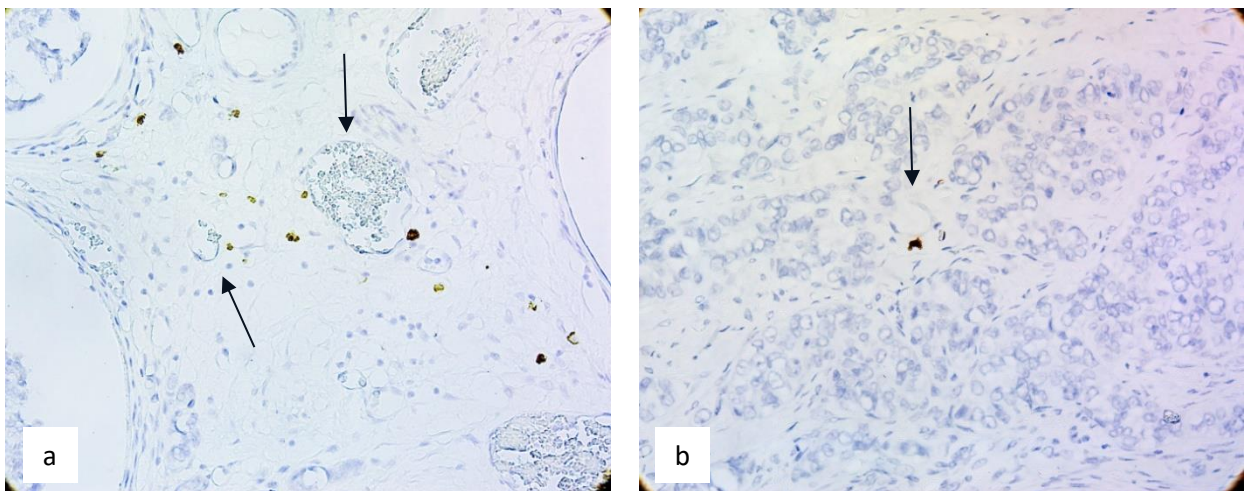
Figura 29. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. (a-c) Mastocite intratumorale distribuite haotic printre celulele tumorale. (d) Creșterea numărului de mastocite odată cu apropierea de aria de invazie (ob. 40×). Imunoreacție pentru triptază, DAB.



**Figura 30. Carcinom medular. Mastocite peritumorale (ob. 20×).
Imunoreacție pentru triptaza mastocitară, DAB.**



**Figura 31. Carcinom medular. (a, b) Mastocite peritumorale (ob. 40×).
Imunoreacție pentru triptaza mastocitară, DAB.**



**Figura 32. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. (a, b) Mastocite solitare în vecinătatea
vaselor sangvine (săgeată) (ob. 40×). Imunoreacție pentru triptază, DAB.**

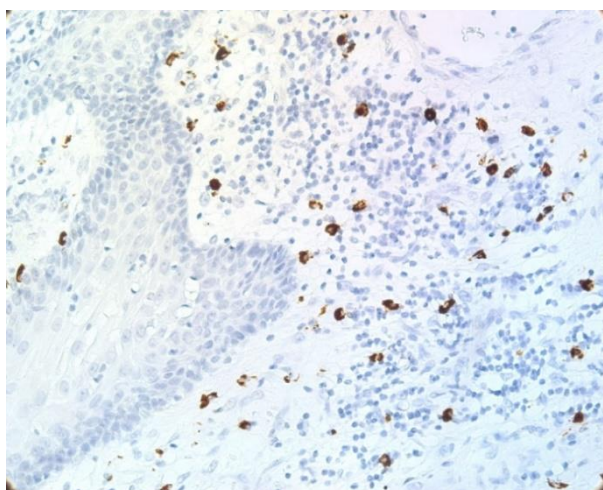


Figura 33. Carcinom ductal invaziv de tip NST. Control negativ intern al imunoreacției pentru triptază prin reacție absentă la nivelul limfocitelor (ob. 40×).
Imunoreacție pentru triptază, DAB.

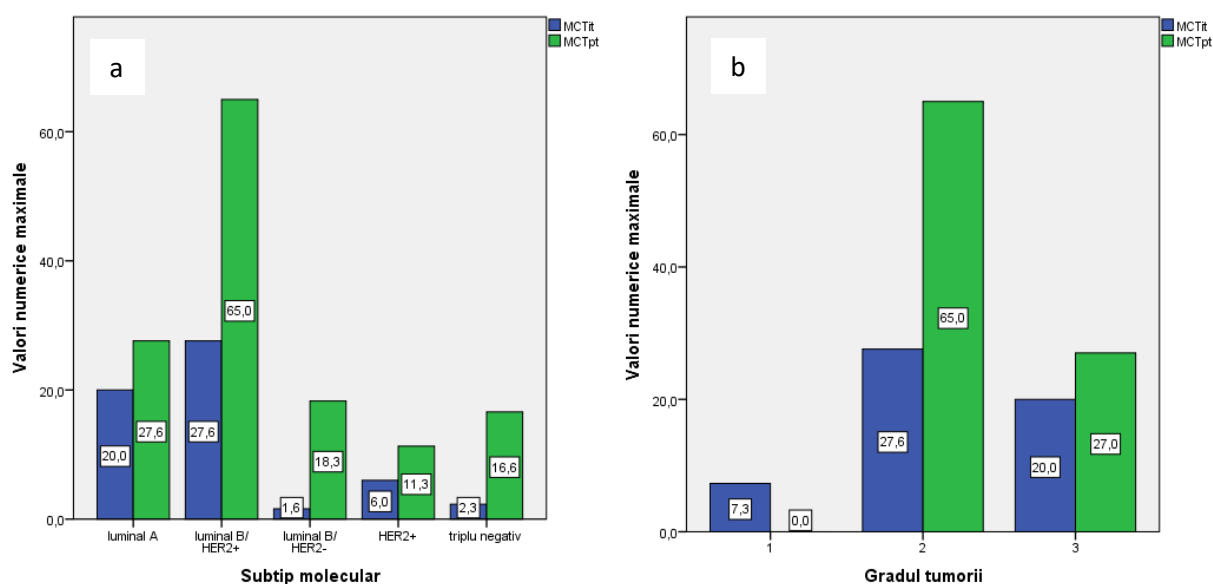


Figura 34. Maximele numerice pentru MCit și MCpt în dependență de: (a) subtipul molecular și (b) gradul de diferențiere a tumorii.

Pentru o mai bună apreciere a infiltrării cu MC, datele au fost ulterior dihotomizate. Astfel, cazurile au fost divizate în 2 grupuri: cu o densitate înaltă a MC și cu o densitate scăzută, drept prag (*cut-off*) servind mediana. Pentru MCit, media și eroarea standard au fost 3.54 ± 0.61 , cu mediana 1.3 (25-75% IQR 0.3-3.9). În cazul MCpt – media și eroarea standard au constituit 12.26 ± 1.39 , iar mediana – 9.0 (25-75% IQR 3.3-15.9). 41 de cazuri (51.2%) au avut o densitate scăzută a MC intratumorale (≤ 1.3). La fel, 41 de tumori (51.2%) au avut o densitate scăzută a MC peritumorale (≤ 9.0) (tabelul 14). Dintre toate cazurile, 29 de tumori (36.2%) au avut o

densitate joasă atât a MCit cât și a MCpt. 17 dintre ele au aparținut grupului luminal. O densitate înaltă atât a MCit cât și a MCpt a fost înregistrată în 27 de tumori (33.8%), majoritatea dintre ele fiind de tip luminal (23 de tumori).

Tabelul 14. **Repartizarea tumorilor luminale și non-luminale în raport cu densitatea MC**

		Grup luminal n (%)	Grup non-luminal n (%)	Total	
				n	95% CI
MCit	densitate scăzută (≤ 1.3)	34	5	39	0-203.75
	densitate înaltă (> 1.3)	26	15	41	0-90.38
MCpt	densitate scăzută (≤ 9.0)	32	7	39	0-178.32
	densitate înaltă (> 9.0)	28	13	41	0-115.79

Notă: grupul luminal a cuprins subtipurile luminal A, B/ HER2+ și B/ HER2-; grupul non-luminal a cuprins tumorile HER2+ și cele triplu-negative; MCit – mastocite triptază+ intratumorale, MCpt – mastocite triptază+ peritumorale, n – numărul de cazuri

Studiul cazurilor conform subtipului molecular a arătat că cele mai înalte densități, atât pentru MCit cât și pentru MCpt, s-au înregistrat în cadrul subtipului luminal B/ HER2+, aceste tumori fiind moderat diferențiate. Cele mai mici densități s-au înregistrat în tumorile G3, subtipurile HER2+ și cele TNBC, adică non-luminale. În toate subtipurile moleculare, MCpt au fost mai numeroase decât MCit (figura 35).

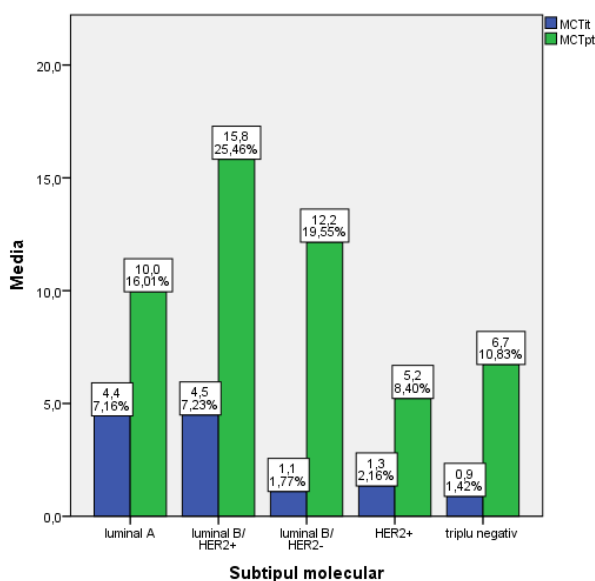


Figura 35. **Distribuția MCpt și MCit conform subtipului molecular al tumorii.**

Analizând fiecare subtip molecular în parte, au fost depistate mai multe corelații semnificative statistic dintre populațiile de MC intra- și peritumorale, precum și cu receptorii hormonali ER și PR. Astfel, în subtipul luminal A, MC intratumorale au fost influențate de expresia PR ($r_s = -0.703$, $p = 0.005$). În subtipul molecular luminal B, MC intratumorale au fost dependente de ER ($r_s = 0.350$, $p = 0.017$), pe când cele peritumorale au corelat cu ambii receptori hormonali ($r_s = 0.322$, $p = 0.029$ pentru ER și $r_s = 0.308$, $p = 0.037$ pentru PR). În acest subtip

molecular, precum și în cel triplu-negativ, densitatea celor două categorii de MC a fost interdependentă ($r_s=0.590$, $p=0.00001$ și $r_s=0.687$, $p=0.002$, respectiv) (tabelul 15).

Ulterior, am verificat dacă există corelații semnificative statistic în cadrul tumorilor slab diferențiate și moderat diferențiate. În tumorile G2, MC au corelat cu expresia receptorilor hormonal. Expresia ER a influențat MCit ($r_s=0.309$, $p=0.015$) precum și MCpt ($r_s=0.346$, $p=0.006$). Expresia PR a influențat doar densitatea MCpt ($r_s=0.357$, $p=0.005$). Mai mult decât atât, densitatea MCit a fost dependentă de densitatea MCpt ($r=0.493$, $p=0.00005$). Ambele populații de MC au fost dependente de vârsta pacientelor ($r_s= -0.259$, $p=0.044$ pentru MCit și $r_s= -0.281$, $p=0.028$ pentru MCpt) (tabelul 16).

Tabelul 15. Corelațiile semnificative statistic stabilite între receptorii hormonal și mastocite

Subtipul luminal A	Subtipul luminal B	TNBC
MCit și PR ($r_s=-0.703$, $p=0.005$)	MCit și MCpt ($r_s=0.590$, $p=0.00001$)	MCit și MCpt ($r_s=0.687$, $p=0.002$)
	MCpt și ER ($r_s=0.322$, $p=0.029$)	
	MCpt și PR ($r_s=0.308$, $p=0.037$)	
	MCit și ER ($r_s=0.350$, $p=0.017$)	

Notă: r_s – coeficientul de corelație al lui Spearman, MCit – mastocite triptază+ intratumorale, MCpt – mastocite triptază+ peritumorale. Valorile au fost considerate semnificative statistic la un $p \leq 0.05$

În grupul tumorilor slab diferențiate MCit au corelat cu expresia ambilor receptori hormonal (ER: $r_s=0.626$, $p=0.005$ și PR: $r_s=0.561$, $p=0.015$). MCpt au fost influențate doar de ER ($r_s=0.497$, $p=0.036$). MC din zona peritumorală și cele intratumorale s-au influențat reciproc ($r_s=0.689$, $p=0.002$) (tabelul 17).

Analiza statistică a cazurilor *per total* a confirmat corelațiile stabilite în cadrul subtipurilor moleculare. MCit au corelat semnificativ statistic cu expresia ER ($r_s=0.393$, $p=0.0003$) și PR ($r_s=0.236$, $p=0.035$). Similar, MCpt au fost dependente atât de ER ($r_s=0.378$, $p=0.001$) cât și de PR ($r_s=0.383$, $p=0.0004$). În toate subtipurile moleculare incluse în studiul dat, MC peri- și intratumorale au fost dependente unele de altele ($r_s=0.445$, $p=0.000003$) (tabelul 18).

În continuare, am grupat cazurile conform subtipului molecular în luminale și non-luminale. Pentru a compara MC din grupurile luminale și non-luminale am aplicat testul Mann-Whitney U. Acesta a confirmat influența expresiei receptorilor hormonal asupra dinamicii atât a MC intra- ($U= 390.5$, $p=0.019$) cât și a celor din zonele peritumorale ($U=361.0$, $p=0.008$) (tabelul 19).

Tabelul 16. Corelații statistice pentru tumorile moderat diferențiate (G2)

		Vârsta	ER	PR	HER2	MCit	MCpt
Vârsta	rs		,089	-,300	-,403	-,259	-,281
	p		,495	,019	,001	,044	,028
	n		61	61	61	61	61
ER	rs	,089		,525	-,022	,309	,346
	p	,495		,000	,867	,015	,006
	n	61		61	61	61	61
PR	rs	-,300	,525		,151	,178	,357
	p	,019	,000		,246	,170	,005
	n	61	61		61	61	61
HER2	rs	-,403	-,022	,151		,037	,013
	p	,001	,867	,246		,776	,920
	n	61	61	61		61	61
MCit	rs	-,259	,309	,178	,037		,493
	p	,044	,015	,170	,776		,00005
	n	61	61	61	61		61
MCpt	rs	-,281	,346	,357	,013	,493	
	p	,028	,006	,005	,920	,000	
	n	61	61	61	61	61	

Notă: vârsta – vârsta pacienților, MCit – mastocite triptază+ intratumorale, MCpt – mastocite triptază+ peritumorale, rs – coeficientul de corelație al lui Spearman, n – numărul de cazuri analizate. Rezultatele semnificative statistic au fost marcate prin **bold**

Tabelul 17. Corelații statistice pentru tumorile slab diferențiate (G3)

		Vârsta	ER	PR	HER2	MCit	MCpt
Vârsta	rs		,459	,605	,050	,185	,325
	p		,055	,008	,842	,464	,188
	n		18	18	18	18	18
ER	rs	,459		,829	,354	,626	,497
	p	,055		,000	,150	,005	,036
	n	18		18	18	18	18
PR	rs	,605	,829		,126	,561	,455
	p	,008	,000		,619	,015	,058
	n	18	18		18	18	18
HER2	rs	,050	,354	,126		,181	,266
	p	,842	,150	,619		,473	,285
	n	18	18	18		18	18
MCit	rs	,185	,626	,561	,181		,689
	p	,464	,005	,015	,473		,002
	n	18	18	18	18		18
MCpt	rs	,325	,497	,455	,266	,689	
	p	,188	,036	,058	,285	,002	
	n	18	18	18	18	18	

Notă: vârsta – vârsta pacienților, MCit – mastocite triptază+ intratumorale, MCpt – mastocite triptază+ peritumorale, rs – coeficientul de corelație al lui Spearman, n – numărul de cazuri analizate. Rezultatele semnificative statistic au fost marcate prin **bold**

Tabelul 18. Corelațiile statistice obținute în urma analizei cazurilor per total

		Vârsta	Grad	ER	PR	HER2	MCit	MCpt
Vârsta	rs		,069	,172	-,182	-,328	-,162	-,218
	p		,542	,127	,105	,003	,151	,052
	n		80	80	80	80	80	80
Grad	rs	,069		-,160	-,411	-,206	-,075	-,088
	p	,542		,157	,000	,067	,506	,440
	n	80		80	80	80	80	80
ER	rs	,172	-,160		,576	,109	,393	,378
	p	,127	,157		,000	,335	,0003	,001
	n	80	80		80	80	80	80
PR	rs	-,182	-,411	,576		,218	,236	,383
	p	,105	,000	,000		,052	,035	,0004
	n	80	80	80		80	80	80
HER2	rs	-,328	-,206	,109	,218		,044	,106
	p	,003	,067	,335	,052		,701	,349
	n	80	80	80	80		80	80
MCit	rs	-,162	-,075	,393	,236	,044		,495
	p	,151	,506	,000	,035	,701		,000003
	n	80	80	80	80	80		80
MCpt	rs	-,218	-,088	,378	,383	,106	,495	
	p	,052	,440	,001	,000	,349	,000003	
	n	80	80	80	80	80	80	

Notă: vârsta – vârsta pacienților, MCit – mastocite triptază+ intratumorale, MCpt – mastocite triptază+ peritumorale, rs – coeficientul de corelație al lui Spearman, n – numărul de cazuri analizate. Rezultatele semnificative statistic au fost marcate prin **bold**

Tabelul 19. Rezultatele testului Mann-Whitney U la compararea MC în grupurile luminal și non-luminal de carcinoame mamare

	MCit	MCpt
Mann-Whitney U	390,500	361,000
Wilcoxon W	600,500	571,000
Z	-2,340	-2,657
p	,019	,008

Notă: grupul luminal a cuprins subtipurile luminale A, B/ HER2+ și B/ HER2-; grupul non-luminal a cuprins tumorile HER2+ și cele triplu-negative. MCit – mastocite triptază+ intratumorale, MCpt – mastocite triptază+ peritumorale

3.5. Celule dendritice S100 pozitive în carcinoamele mamare

Markerul S100 a avut o expresie citoplasmatică și nucleară și a fost folosit pentru identificarea DC. În țesutul mamar normal adiacent tumorii, proteina S100 a fost expresată într-o varietate de structuri: celule mioepiteliale, adipocite, nervi. Acestea au fost folosite pentru controlul pozitiv intern (figura 19a-f).

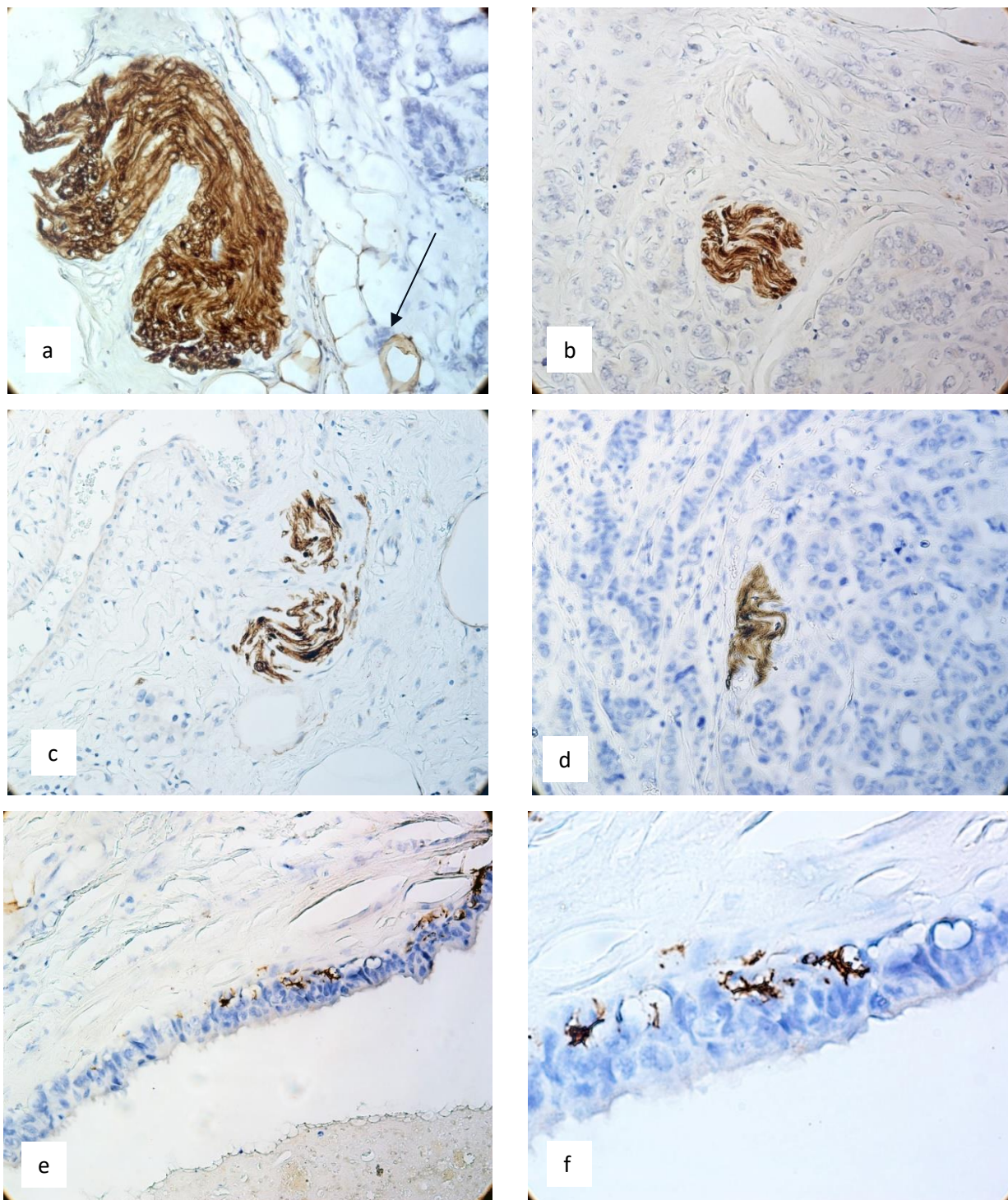


Figura 19. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. (a - d) Celule Schwann, adipocite (săgeată) și (e, f) mioepiteliocite S100+, control pozitiv intern (a-e ob. 40×, f - ob. 100×).

Imunoreacție pentru S100, DAB.

Celulele S100 pozitive au fost prezente în majoritatea cazurilor (71 de tumori din 75, 94,6%), dar au fost variate din punct de vedere morfologic, ceea ce ne-a permis să le grupăm în câteva categorii. Astfel, primul grup a fost constituit din celule S100 pozitive ce au prezentat o morfologie tipică DC. Acestea au fost de dimensiuni medii, cu o citoplasmă colorată uniform, intensitatea colorației variind de la slabă până la puternică. De la corpul celular porneau numeroase extensii citoplasmatic subțiri și lungi, deseori ramificate. În cazul localizării în zonele intratumorale aceste extensii citoplasmatice interdigitau celulele tumorale (figura 20, 21a, b). Astfel de celule au putut fi observate și în cadrul infiltratului inflamator peritumoral, dar și în zonele de invazie a pielii.

Un alt grup de celule S100 pozitive a manifestat caracteristici similare celor descrise mai sus, cu unele diferențe. Aceste celule aveau de asemenea o formă stelată, însă erau de dimensiuni mai mari cu citoplasma intens colorată, iar procesele citoplasmatic erau groase și scurte. Astfel de DC erau localizate în regiunile peritumorale, în componența infiltratului inflamator. Acest aspect a fost caracteristic și DC din cadrul câtorva noduri limfatici analizați pentru comparație (figura 21c, d).

Al treilea fenotip de celule S100 pozitive a fost complet diferit față de cele descrise anterior, fiind constituit din celule mici, punctiforme, cu o citoplasmă intens colorată, lipsite de citoplasmatic. Astfel de celule au putut fi observate atât în plajele tumorale, cât și în zonele din vecinătatea tumorii (figura 21e, f).

Următorul grup de celule S100 pozitive pe care l-am observat prezintă un interes deosebit deoarece acesta cuprindea celule tumorale propriu-zise. Astfel, în unele tumori markerul S100 putea fi exprimat de toate celulele neoplazice din cadrul unui grup de celule tumorale (figura 22a-c). În alte cazuri, ariile expresau proteina în cauză doar regional (figura 22d). În cadrul cuiburilor era neomogenă și intensitatea reacției, variind de la slabă până la intens pozitivă. Celulele canceroase S100 pozitive s-au caracterizat printr-o citoplasmă spumoasă, neuniform colorată, cu granulație intra-citoplasmatică.

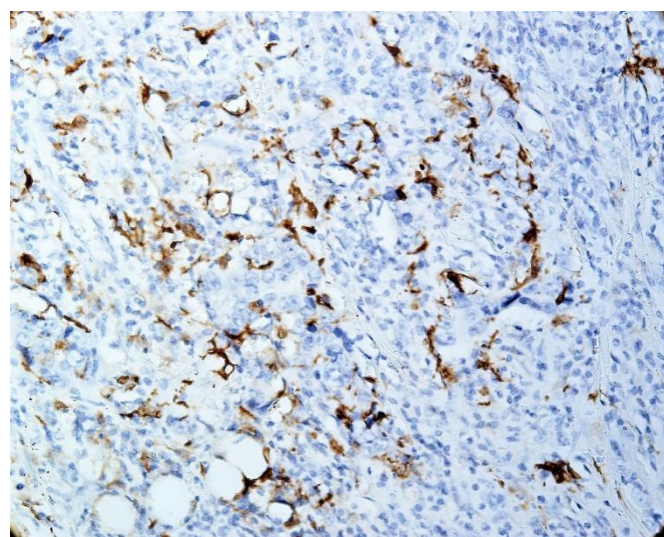


Figura 20. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. Celule S100 pozitive cu morfologie caracteristică pentru celulele dendritice (ob. 40×). Imunoreacție pentru S100, DAB.

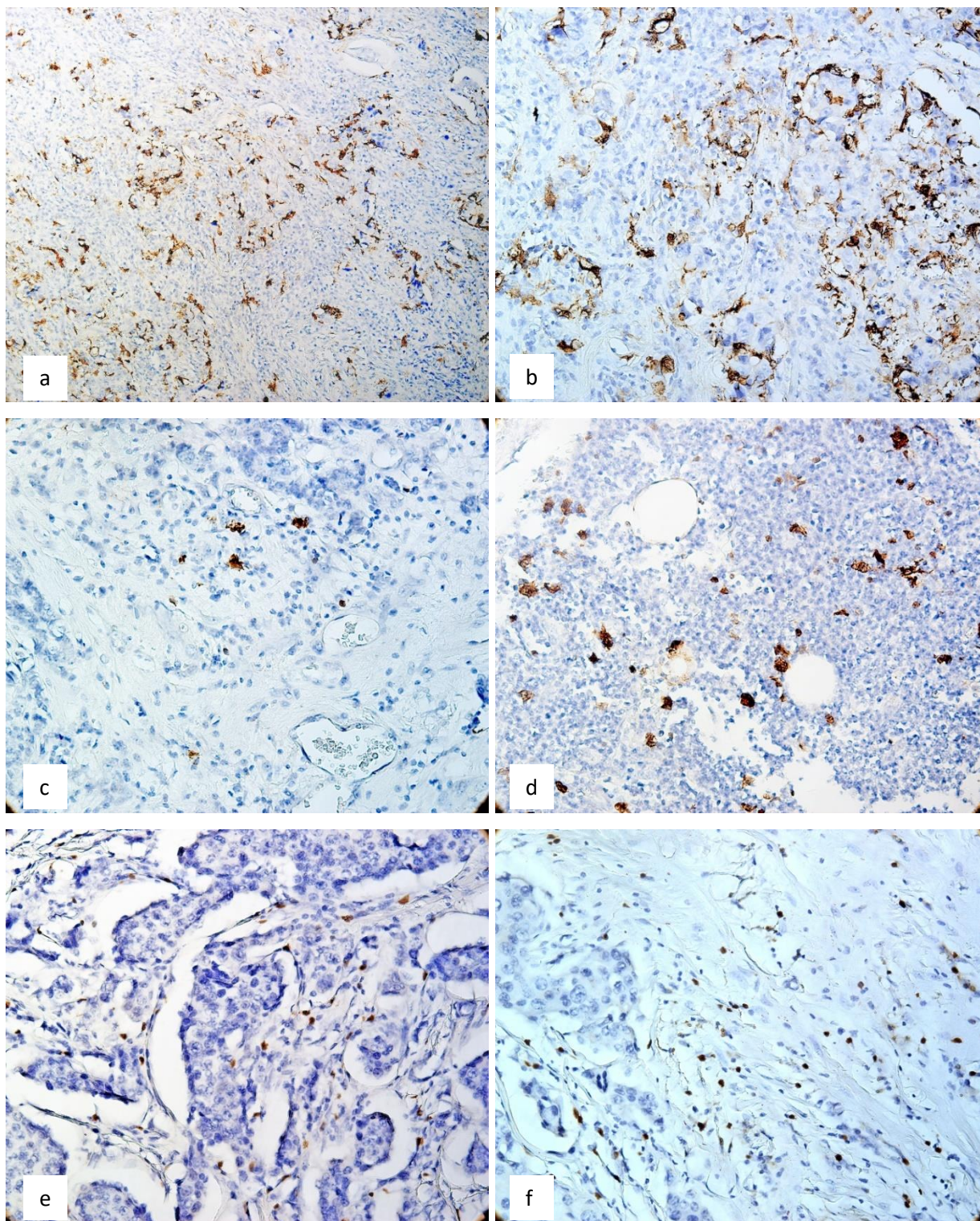


Figura 21. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. (a, b) Celule dendritice cu aspect stelat și numeroase extensii citoplasmatic subțiri. (c) Celule dendritice cu aspect stelat având extensii citoplasmatic groase și scurte. (d) Nod limfatic. Celule dendritice cu extensii citoplasmatic groase. Celule S100 punctiforme din regiunea (e) intra- și (f) peritumorală. (a - ob. 20×, b-f ob. 40×). Imunoreacție pentru S100, DAB.

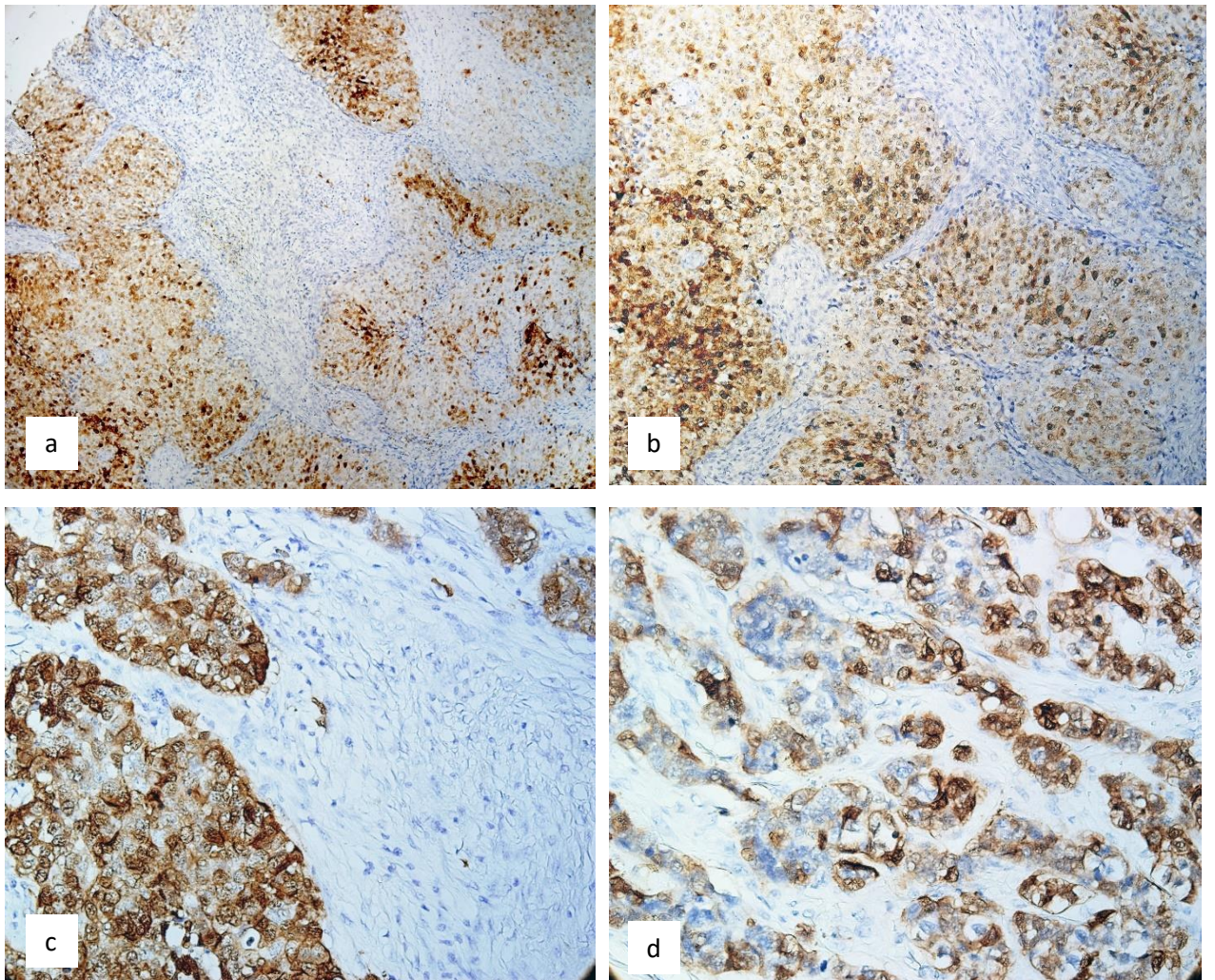


Figura 22. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. Arii tumorale S100 pozitive (a - ob. 10×, b - ob. 20×, c, d - ob. 40×). Imunoreacție pentru S100, DAB.

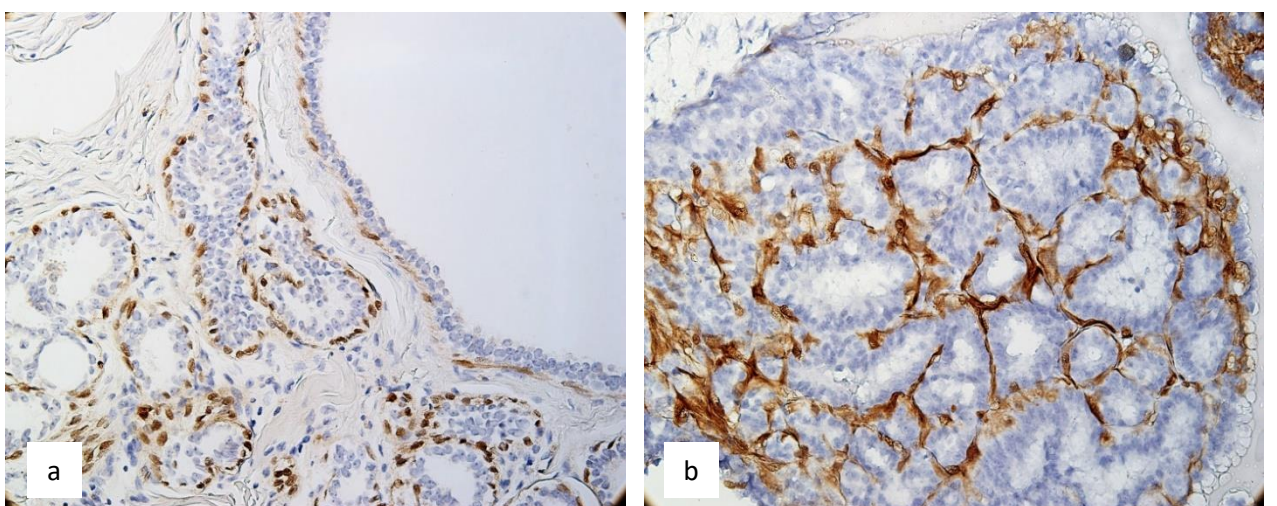


Figura 23. Carcinom medular. (a, b) Expresie bazală a proteinei S100 (ob. 40×). Imunoreacție pentru S100, DAB.

Ultimul grup observat de noi a inclus cazuri cu expresie bazală a proteinei S100. Celulele din această categorie prezentau o formă cubică, fiind aranjate într-un strat continuu sau discontinuu, iar expresia markerului S100 a fost una nucleară și citoplasmatică. De menționat, că toate carcinoamele cu expresie bazală a proteinei S100 erau de tip medular (figura 23a, b).

În cadrul unor fragmente tisulare puteau fi găsite combinații dintre fenotipurile sus-menționate, de exemplu atât celule punctiforme cât și stelate (figura 24); celule S100 pozitive canceroase și celule S100 pozitive în cadrul infiltratului inflamator (figura 25).

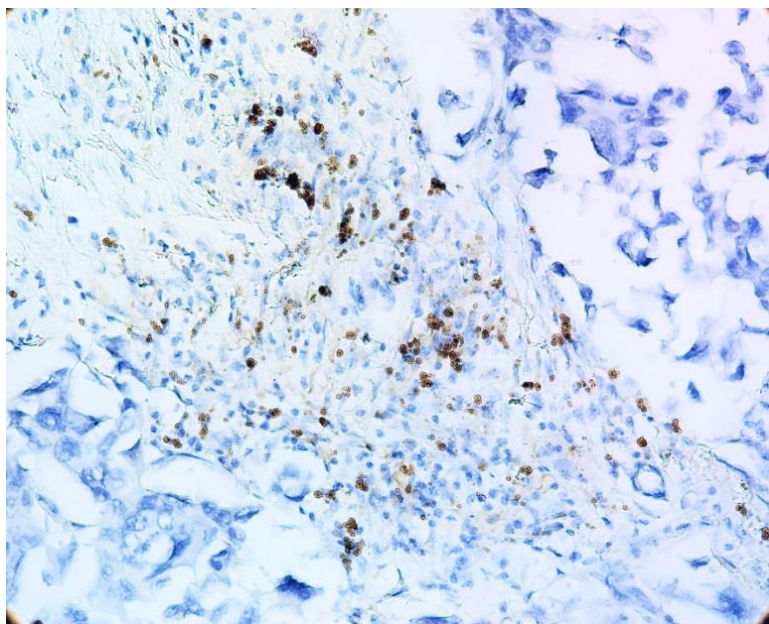


Figura 24. Carcinom ductal invaziv NST. Celule S100 pozitive punctiforme și stelate (ob. 40×). Imunoreacție pentru S100, DAB.

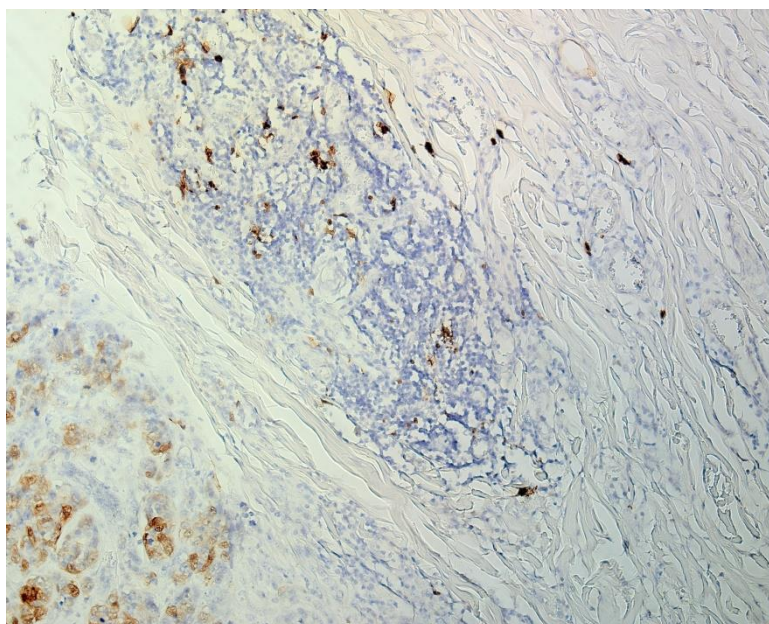


Figura 25. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. Arii tumorale S100 pozitive și DC din infiltratul inflamator (ob. 40×). Imunoreacție pentru S100, DAB.

Cele mai multe celule S100 pozitive intratumorale s-au înregistrat în cadrul carcinoamelor G3 și HER2+. Cele peritumorale au fost mai numeroase în cazul neoplasmelor G2 și TNBC (figura 26).

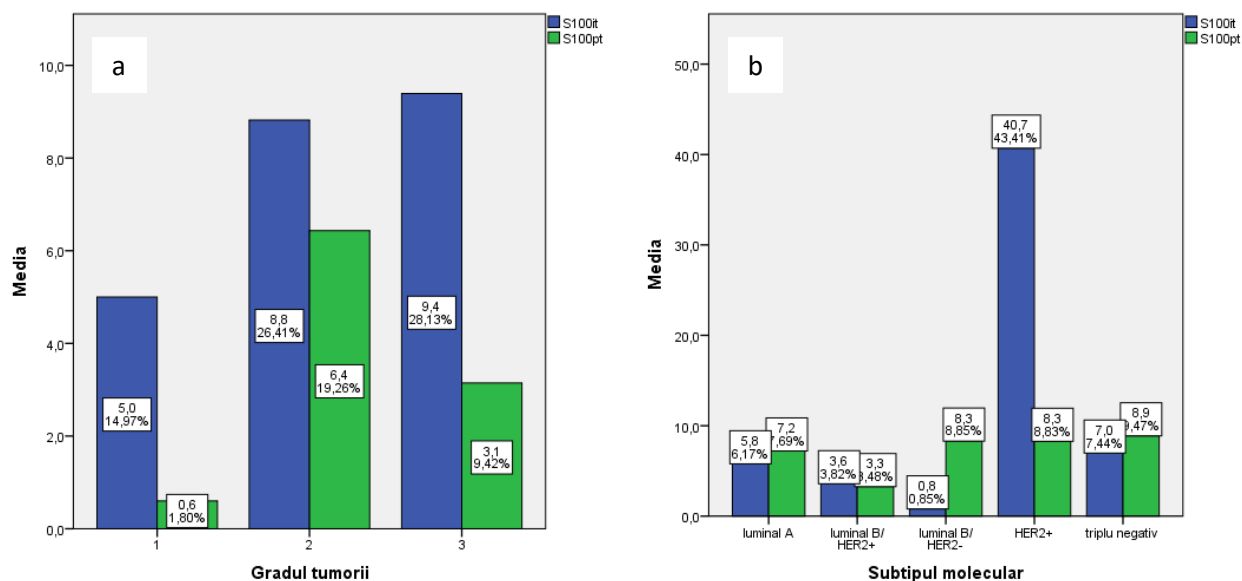


Figura 26. Distribuția celulelor S100+ în dependență de: (a) gradul de diferențiere a tumorii și (b) subtipul molecular.

S100it nu au fost prezente în 25 de cazuri (33.3%), dintre care, 17 (68%) au exprimat proteina HER2. S100pt au absentat în 10 cazuri (13.3%), dintre care, 7 au exprimat proteina HER2 (70%). În cazul tumorilor de tip luminal B, celulele S100it au corelat invers cu vârsta ($r_s = -0.357$, $p = 0.024$) și direct cu expresia PR ($r_s = 0.364$, $p = 0.021$). În tumorile TNBC, S100it au fost influențate de gradul tumorii ($r_s = -0.719$, $p = 0.013$). Analiza statistică a tuturor cazurilor a pus în evidență corelații semnificative statistic între S100it și vârsta pacienților ($r_s = -0.271$, $p = 0.019$), precum și dintre S100pt și expresia PR ($r_s = -0.239$, $p = 0.039$). De asemenea, densitățile celulelor S100it și S100pt au corelat între ele ($r_s = 0.349$, $p = 0.002$) (tabelul 20). De menționat că corelațiile stabilite în urma analizei cazurilor *per total* au fost confirmate și în tumorile G2. În tumorile slab diferențiate corelații semnificative statistic nu s-au stabilit.

Ulterior, am analizat expresia proteinei S100 în carcinoamele luminale *versus* non-luminale. În acest scop, am efectuat testul Mann-Whitney U (tabelul 21). Datele obținute au confirmat că există diferențe ale densității S100it în tumorile din grupul luminal și cel non-luminal ($U = 346.0$, $p = 0.013$).

Tabelul 20. Corelații statistice dintre S100it, S100pt și diverși parametri

		Vârsta	Grad	ER	PR	HER2	S100it	S100pt
Vârsta	rs		,059	,161	-,107	-,359	-,271	-,018
	p		,613	,169	,363	,002	,019	,879
	n		75	75	75	75	75	75
Grad	rs	,059		-,131	-,430	-,231	-,079	-,057
	p	,613		,264	,000	,046	,498	,627
	n	75		75	75	75	75	75
ER	rs	,161	-,131		,644	,129	-,224	-,120
	p	,169	,264		,000	,272	,053	,304
	n	75	75		75	75	75	75
PR	rs	-,107	-,430	,644		,226	-,115	-,239
	p	,363	,000	,000		,051	,328	,039
	n	75	75	75		75	75	75
HER2	rs	-,359	-,231	,129	,226		-,074	-,012
	p	,002	,046	,272	,051		,528	,920
	n	75	75	75	75		75	75
S100it	rs	-,271	-,079	-,224	-,115	-,074		,349
	p	,019	,498	,053	,328	,528		,002
	n	75	75	75	75	75		75
S100pt	rs	-,018	-,057	-,120	-,239	-,012	,349	
	p	,879	,627	,304	,039	,920	,002	
	n	75	75	75	75	75	75	

Notă: vârsta – vârsta pacienților, grad – gradul de diferențiere al tumorii, S100it – celule S100+ intratumorale, S100pt – celule S100+ peritumorale, rs – coeficientul de corelație al lui Spearman, n – numărul de cazuri analizate. Rezultatele semnificative statistic au fost marcate prin **bold**.

Tabelul 21. Datele testului Mann-Whitney U privind expresia diferită a markerului S100 pozitive în carcinoamele mamare luminale versus non-luminale

	S100it	S100pt
Mann-Whitney U	346,000	435,000
Wilcoxon W	1886,000	1975,000
Z	-2,492	-1,383
p	,013	,167

Notă: grupul luminal a cuprins subtipurile luminale A, B/ HER2+ și B/ HER2-; grupul non-luminal a cuprins tumorile HER2+ și cele triplu-negative. S100it – celule S100+ intratumorale, S100pt – celule S100+ peritumorale

3.6. Vase sangvine CD34 pozitive în carcinoamele mamare

Markerul CD34 s-a exprsat la nivelul endoteliului vaselor sangvine și la nivelul fibroblastelor din stroma tumorală. Acestea au manifestat o colorație membranară intensă. În calitate de control negativ intern, am examinat infiltratul inflamator, în care limfocitele nu s-au colorat (figura 36).

Vasele sangvine CD34 pozitive au fost prezente în ambele zone studiate: atât intra- cât și peritumoral, fiind diferite din punct de vedere morfologic. Astfel, au fost depistate 2 tipuri de vase sangvine: cu lumen și fără lumen. Mai frecvent, vase fără lumen erau cu sediu intratumoral. Morfologic, acestea erau mici, fără lumen, prezentând cordoane de celule endoteliale (figura 37). Vasele cu lumen erau concentrate cu predilecție la periferia tumorii, la hotarele ariei de invazie și în stroma peritumorală (figura 38).

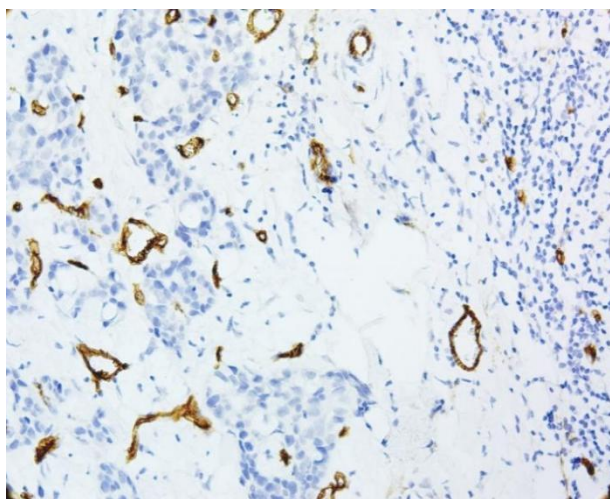


Figura 36. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. Vase sangvine CD34 pozitive, absența colorației în limfocite (ob. 40×). Imunoreacție pentru CD34, DAB.

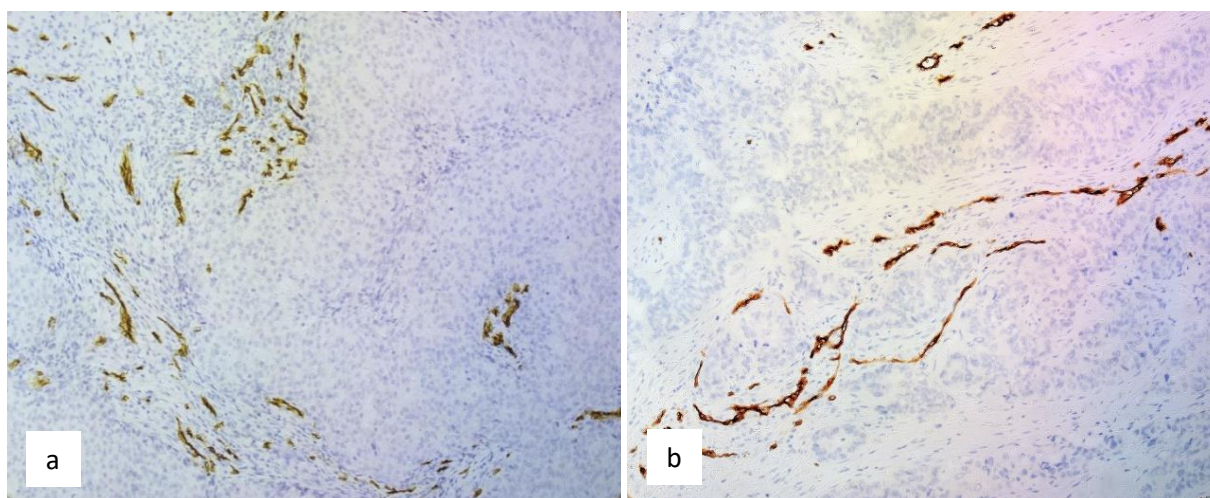


Figura 37. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. (a, b) Vase sangvine intratumorale (ob. 20×). Imunoreacție pentru CD34, DAB.

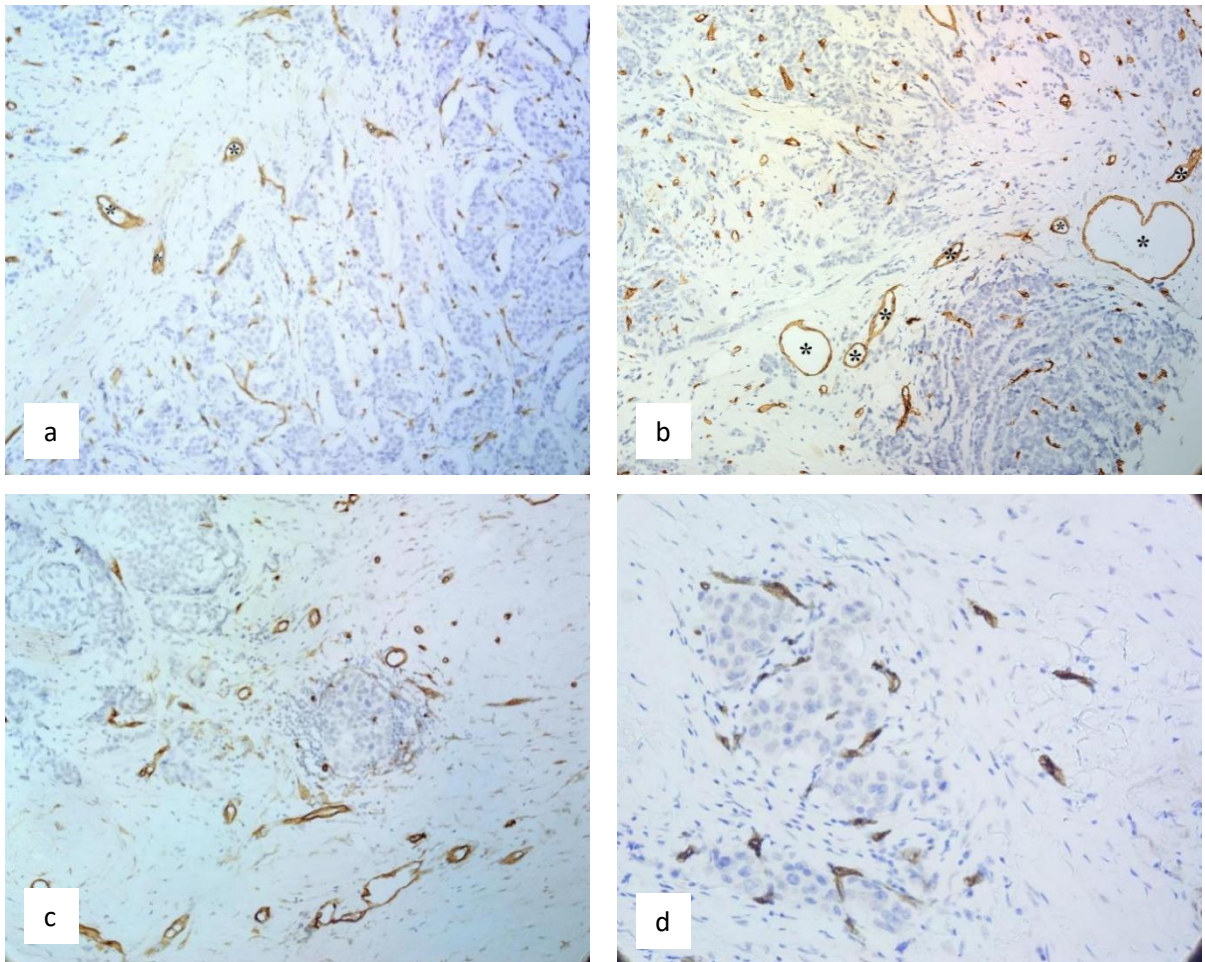


Figura 38. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. Vase sangvine intra- și peritumorale cu lumen (asterisc) (a-c ob. 20×, d - ob. 40×). Imunoreacție pentru CD34, DAB.

În cazul vaselor peritumorale au putut fi frecvent intuite fenomene de angiogeneză, cu posibile imagini a procesului de intususcepție (figura 39a, b) și/ sau sprouting (figura 40a, b).

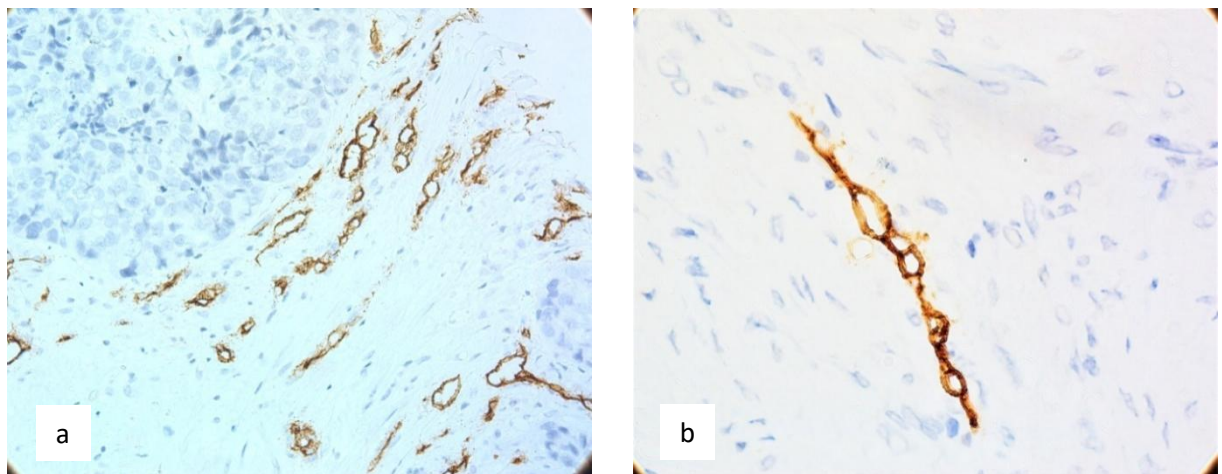


Figura 39. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. Fenomenul de intususcepție (a - ob. 40×, b. - ob.100×). Imunoreacție pentru CD34, DAB.

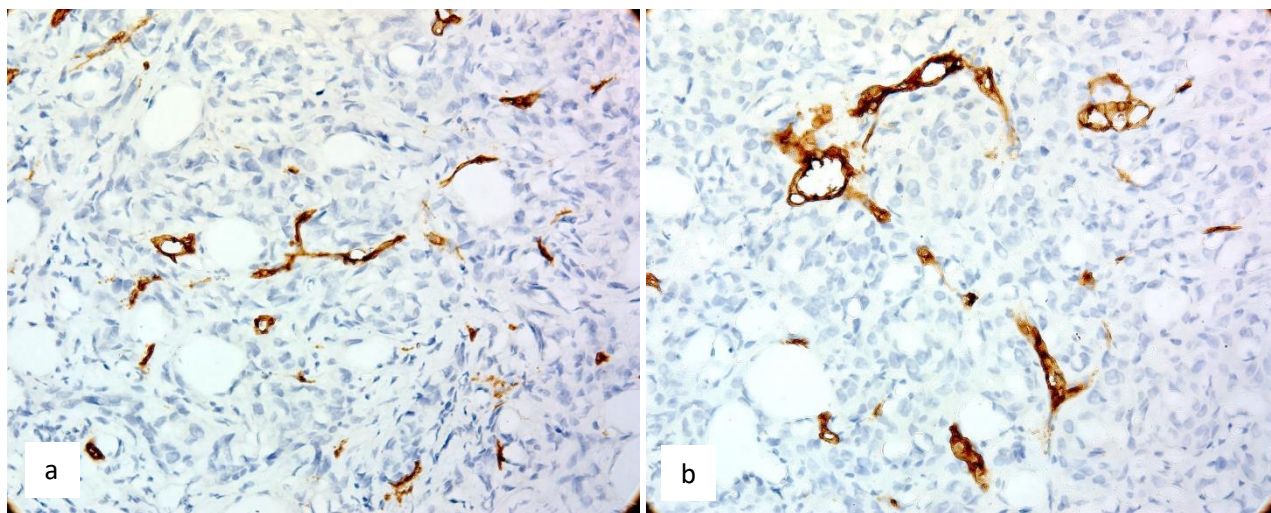


Figura 40. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. (a, b) Fenomenul de sprouting: cordoane de endoteliocite cu origine în vasul sangvin cu lumen (ob. 40×). Imunoreacție pentru CD34, DAB.

Deși valori numerice maxime au fost înregistrate în cazul vaselor peritumorale (158,3 vase CD34 pozitive), media (MVD) și mediana CD34pt și CD34it nu au prezentat diferențe semnificative (tabelul 22).

Tabelul 22. Date comparative privind CD34it și CD34pt

	CD34it	CD34pt
Media	29,514	31,452
Dev. std.	22.23	25.99
Mediana	24,600	23,600
Valoarea minimală	1,0	1,0
Valoarea maximală	96,0	158,3
25-75% IQR	13.3-38.6	14-42.3

Vasele CD34 pozitive peritumorale au prevalat numeric în cazul tumorilor slab diferențiate. În cazul tumorilor moderat diferențiate – densitățile vaselor intra- și peritumorale au fost aproximativ identice (figura 41a). MVD a fost diferită și în dependență de subtipul molecular. Astfel, densitatea vaselor peritumorale a fost mai înaltă în toate subtipurile moleculare, cu excepția celui luminal A. Cele mai mici valori ale MVD intratumorale au fost determinate în subtipul luminal B/ HER2- (figura 41b).

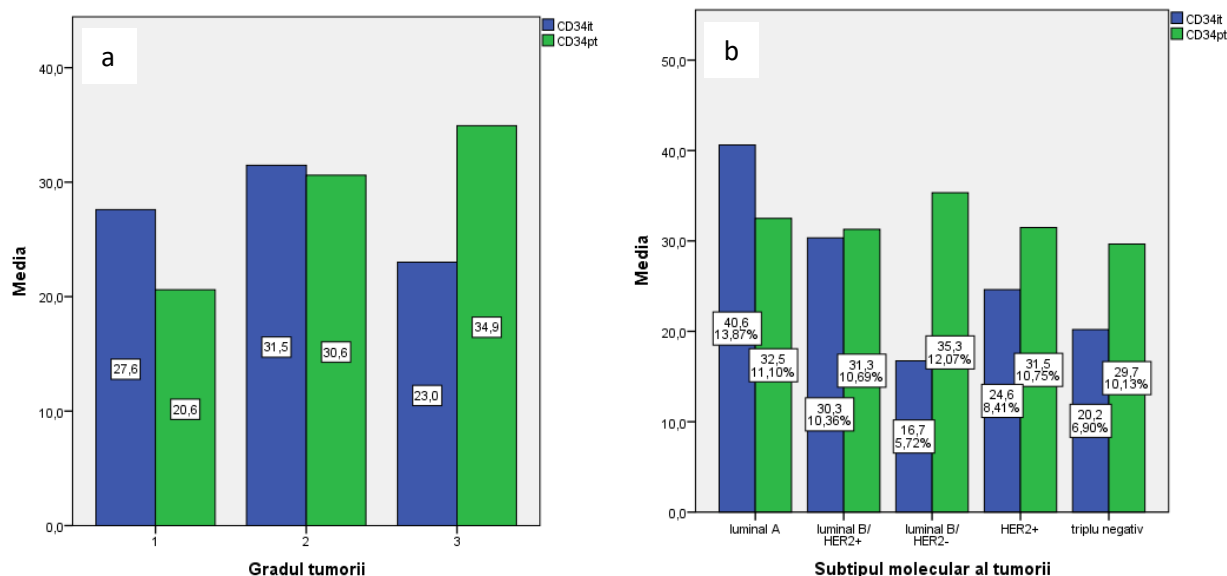


Figura 41. MVD în zonele intra- și peritumorale în dependență de: (a) gradul de diferențiere a tumorii și (b) subtipul molecular.

Analizând subtipurile moleculare în parte, nu au fost stabilite careva corelații semnificative statistic între MVD, expresie receptorilor hormonal, a proteinei HER2 și alți parametri incluși în studiu. Analizând cazurile *per total*, unica corelație semnificativă statistic a fost cea dintre CD34it și subtipul molecular ($r_s = -0,225$, $p = 0,045$). Totodată, trebuie să menționăm că nu au fost stabilite corelații semnificative statistic dintre CD34it sau CD34pt și expresia receptorilor hormonal, a proteinei HER2 sau cu ceilalți parametri clinicopatologici incluși în acest studiu (vârsta pacientelor, gradul tumorii). Compararea grupurilor conform criteriului luminal/ non-luminal nu a confirmat că MVD este influențată de subtipul molecular ($p = 0,172$ pentru CD34it și $p = 0,619$ pentru CD34pt) (tabelul 23).

Tabelul 23. Datele testului Mann-Whitney U privind MVD în carcinoamele grupului luminal versus non-luminal

	CD34it	CD34pt
Mann-Whitney U	494,500	574,000
Wilcoxon W	725,500	2344,000
Z	-1,367	-,498
p	,172	,619

Notă: grupul luminal a cuprins subtipurile luminale A, B/HER2+ și B/HER2-; grupul non-luminal a cuprins tumorile HER2+ și cele triplu-negative. CD34it – vase sangvine cu sediu intratumoral, CD34pt – vase sangvine cu sediu peritumoral

3.7. Vasele limfatice D2-40 pozitive în carcinoamele mamare

Markerul D2-40 a fost detectat la nivelul endoteliului vaselor limfatice, având o expresie membranară și citoplasmatică. Pentru control negativ intern am analizat vasele sangvine, endoteliul cărora nu s-a colorat (figura 42).

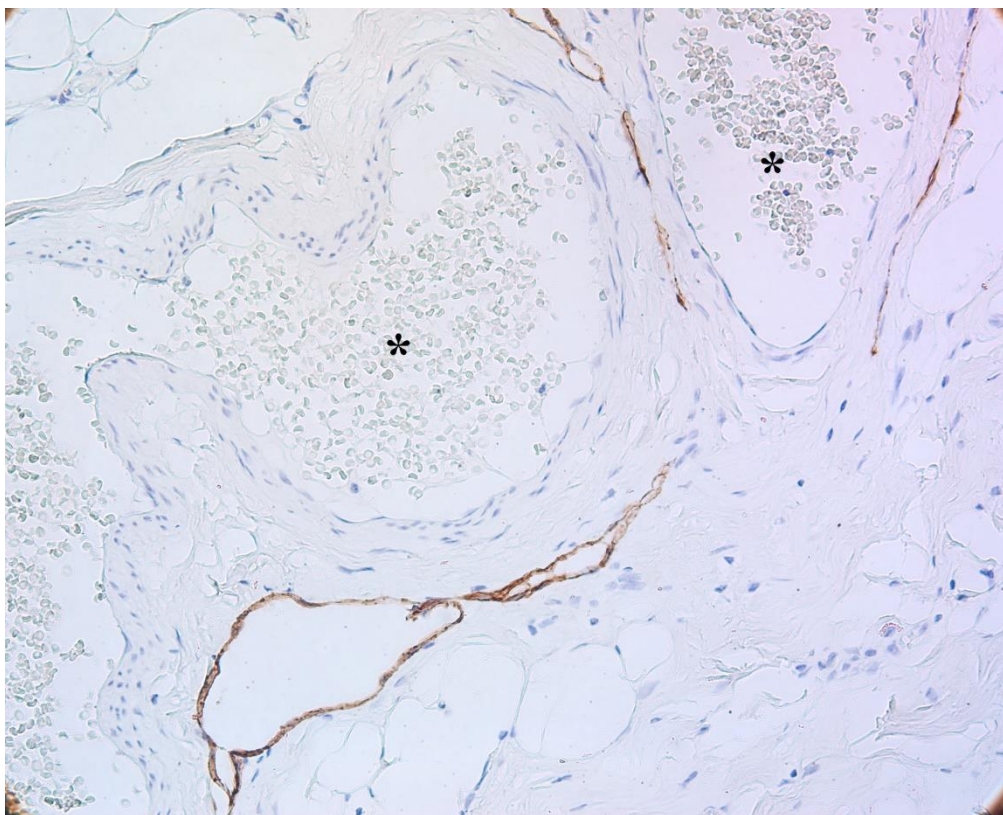


Figura 42. **Carcinom lobular infiltrativ. Vase limfatice D2-40 pozitive, vase sangvine D2-40 negative (asterisc) (ob. 40×). Imunoreacție pentru D2-40, DAB.**

Imunoreacția pentru D2-40 a fost reușită în 87 de cazuri, pentru unul dintre acestea fiind imposibilă determinarea subtipului molecular. Majoritatea cazurilor cercetate (56 de tumori, 65,11%) nu au conținut vase limfatice intratumorale (tabelul 24). În celelalte cazuri, când erau prezente, vasele limfatice intratumorale erau de dimensiuni mici, cu un traiect sinuos, perete subțire, deseori colabate sau aveau un lumen mic. Lumenul vaselor era deseori septat, iar la margini puteau fi observate cordoane de celule endoteliale, posibil reflectând procesul de limfangiogenază (figura 43). Ocazional conțineau emboli de celule tumorale (figura 44).

În regiunea peritumorală, vasele limfatice au fost absente în 38 (44,18%) de cazuri. Este de remarcat că majoritatea dintre aceste tumori (25 de cazuri) au expresat proteina HER2, 16 fiind de tip luminal B/HER2+ și 9 fiind de tip HER2+. În celelalte tumori, în care vasele limfatice peritumorale au fost prezente, ele aveau dimensiuni mai mari, și un lumen (figura 45). Vasele din regiunea ariei de invazie erau deseori însoțite de infiltrat inflamator.

Tabelul 24. Date comparative privind expresia D2-40 în regiunile intra- și peritumorale

	D2-40it	D2-40pt
Media	1,049	1,935
Dev. std.	2.73	3.07
Mediana	0	0,45
25-75% IQR	0-0.6	0-3

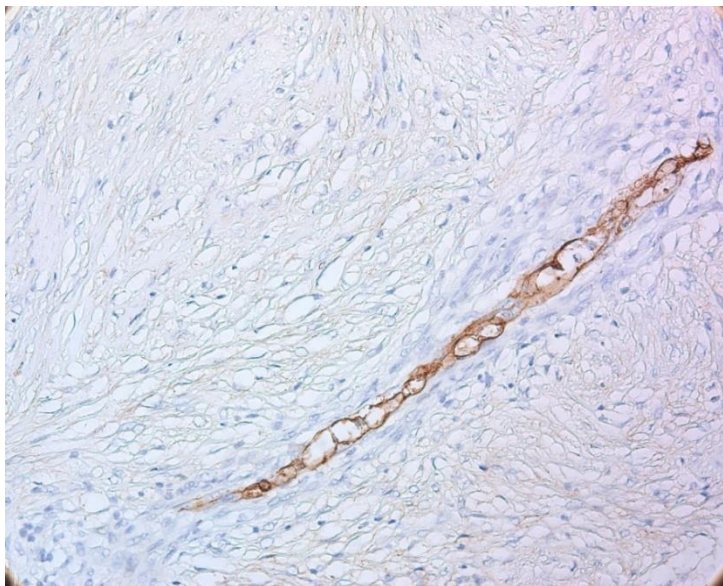


Figura 43. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. Vase limfatice D2-40 pozitive cu sediul intratumoral (ob. 40×). Imunoreacție pentru D2-40, DAB.

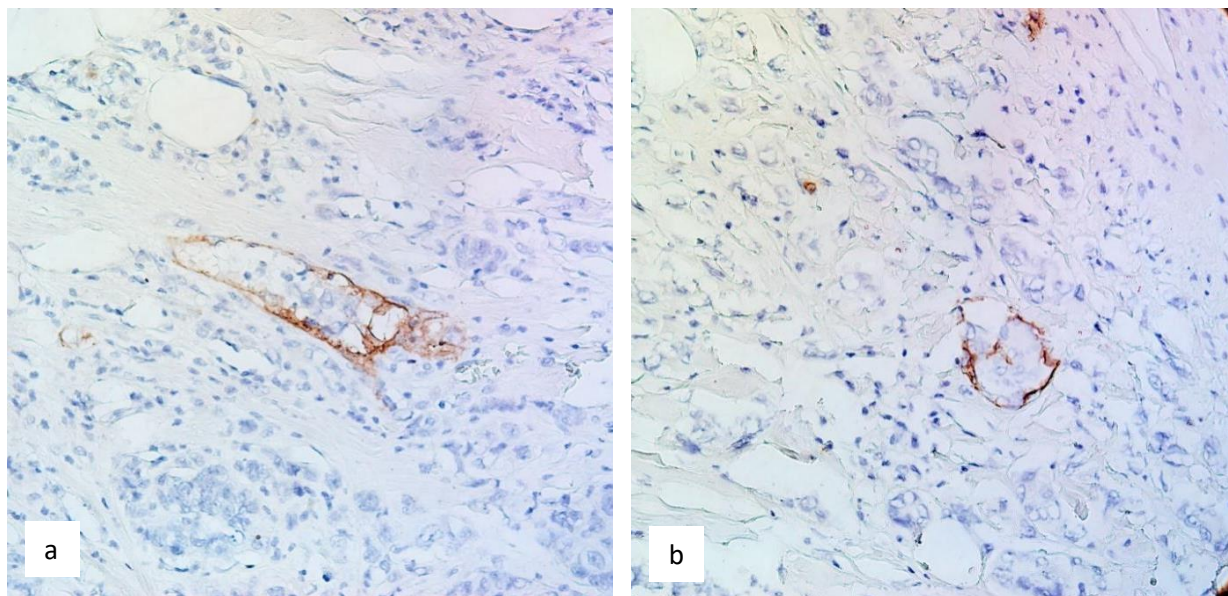


Figura 44. Carcinom ductal invaziv de tip NST. (a, b) Invazie limfovaculară (ob. 40×). Imunoreacție pentru D2-40, DAB.

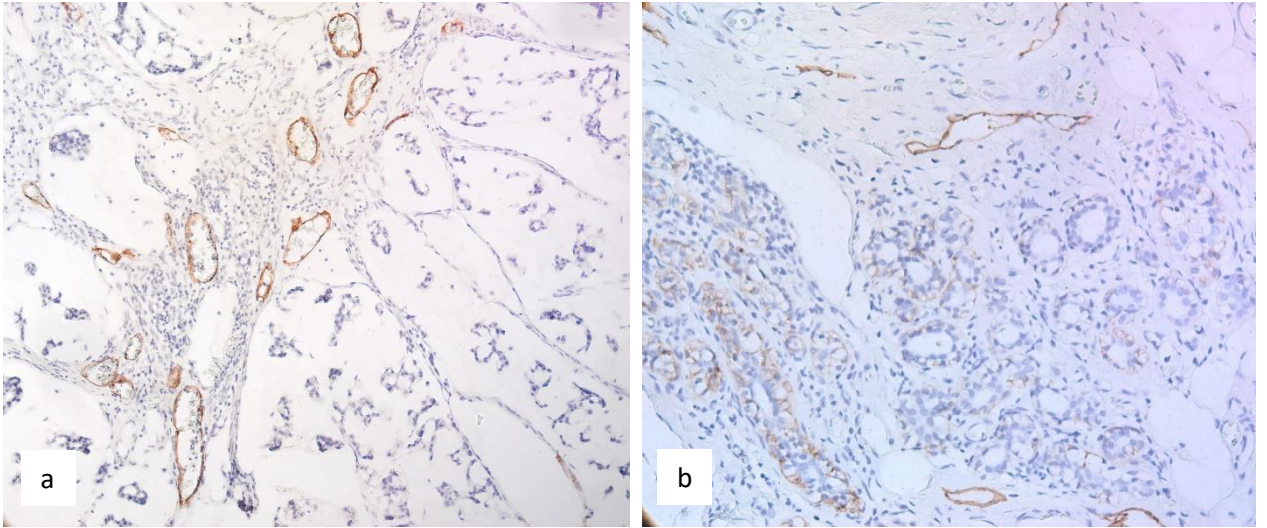


Figura 45. Carcinom ductal invaziv, tip NST. Vase limfatice D2-40 pozitive peritumorale (a - ob. 20×, b - ob. 40×). Imunoreacție pentru D2-40, DAB.

Vasele limfatice peritumorale au fost mai numeroase decât cele intratumorale în toate subtipurile moleculare cu excepția celui HER2+ (figura 46a). De remarcat că valorile numerice maxime atât ale D2-40it, cât și ale D2-40pt au fost obținute în cazul carcinoamelor mamare TNBC (respectiv 19 și 17). În relație cu gradul histologic, am determinat că atât în tumorile slab diferențiate, cât și în cele moderat diferențiate predomină vasele limfatice peritumorale (figura 46b).

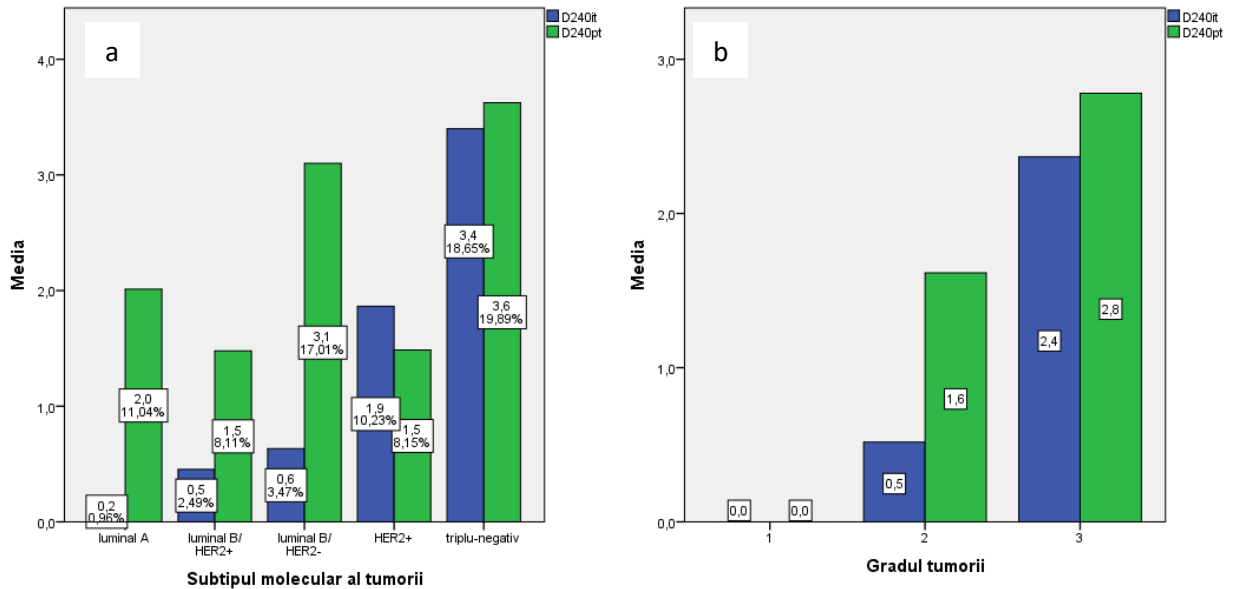


Figura 46. Densitatea limfovaculară (LVD) în dependență de: (a) subtipul molecular și (b) gradul de diferențiere a tumorii.

În cazul subtipului luminal A, a fost detectată o corelație pozitivă dintre vasele limfatice intratumorale și expresia ER ($r_s = 0.659$, $p = 0.005$). Tot în cadrul acestui subtip molecular am determinat că LVD peritumorale crește odată cu regresarea gradului de diferențiere a tumorii ($r_s = 0.543$, $p = 0.03$). Densitatea vaselor limfatice intratumorale și a celor peritumorale au fost interdependente în subtipul molecular HER2+ ($r_s = 0.545$, $p = 0.044$). În lotul tumorilor TNBC, a fost stabilită o asociere inversă dintre vasele limfatice peritumorale și vârstă ($r_s = -0.832$, $p = 0.001$) și o asociere directă dintre D2-40it și gradul tumorii ($r_s = 0.657$, $p = 0.02$).

Analiza statistică a cazurilor conform grupurilor luminal și non-luminal nu a pus în evidență corelații semnificative statistic dintre densitatea vaselor limfatice intra- și peritumorale și apartenența la un anumit subtip molecular ($p = 0.185$ și $p = 0.806$ pentru D2-40it și D2-40pt respectiv) (tabelul 25).

Tabelul 25. Datele testului Mann-Whitney U privind LVD în carcinoame mamare aparținând grupului luminal și non-luminal

	D2-40it	D2-40pt
Mann-Whitney U	660,000	755,000
Wilcoxon W	2490,000	1106,000
Z	-1,327	-,246
p	,185	,806

Notă: grupul luminal a cuprins subtipurile luminale A, B/ HER2+ și B/ HER2-; grupul non-luminal a cuprins tumorile HER2+ și cele triplu-negative. D2-40it – vase limfatice cu sediul intratumoral, D2-40pt – vase limfatice cu sediu peritumoral

La compararea cazurilor *per total* am determinat mai multe corelații veridice statistic. Astfel, vasele limfatice intratumorale au corelat pozitiv cu gradul tumorii ($r_s = 0.269$, $p = 0.012$). Corelație pozitivă a fost determinată și la asocierea vaselor limfatice intratumorale și a celor peritumorale ($r_s = 0.325$, $p = 0.002$). Nu au găsit confirmare statistică observațiile privind expresia proteinei HER2 și lipsa vaselor limfatice peritumorale ($p = 0.798$) (tabelul 26).

Tabelul 26. Corelații statistice dintre vasele limfatice intra- și tumorale și diverși parametri clinicopatologici incluși în studiu

		Vârsta	Grad	ER	PR	HER2	Subtip	D2-40it	D2-40pt
Vârsta	rs		,000	,343	,097	-,320	-,353	-,042	-,064
	p		,997	,001	,374	,003	,001	,698	,559
	n		86	86	86	86	86	86	86
Grad	rs	,000		-,221	-,443	-,133	,333	,269	,078
	p	,997		,041	,000	,223	,002	,012	,478
	n	86		86	86	86	86	86	86
ER	rs	,343	-,221		,647	-,047	-,745	-,054	,019
	p	,001	,041		,000	,666	,000	,619	,862
	n	86	86		86	86	86	86	86
PR	rs	,097	-,443	,647		,017	-,723	-,062	,055
	p	,374	,000	,000		,873	,000	,569	,613
	n	86	86	86		86	86	86	86
HER2	rs	-,320	-,133	-,047	,017		,147	,015	-,028
	p	,003	,223	,666	,873		,176	,893	,798
	n	86	86	86	86		86	86	86
Subtip	rs	-,353	,333	-,745	-,723	,147		,199	,029
	p	,001	,002	,000	,000	,176		,066	,791
	n	86	86	86	86	86		86	86
D2-40it	rs	-,042	,269	-,054	-,062	,015	,199		,325
	p	,698	,012	,619	,569	,893	,066		,002
	n	86	86	86	86	86	86		86
D2-40pt	rs	-,064	,078	,019	,055	-,028	,029	,325	
	p	,559	,478	,862	,613	,798	,791	,002	
	n	86	86	86	86	86	86	86	

Notă: vârsta – vârsta pacientelor, grad – gradul de diferențiere al tumorii, subtip – subtipul molecular al tumorii, D2-40it – vase limfatice cu sediul intratumoral, D2-40pt – vase limfatice cu sediu peritumoral, rs – coeficientul de corelație al lui Spearman, n – numărul de cazuri analizate. Rezultatele semnificative statistic au fost marcate prin **bold**

3.8. Interrelații statistice dintre vasele sangvine, limfatice și elementele celulare incluse în studiu în dependență de subtipul molecular al tumorii

Analiza cazurilor per total. Densitatea vaselor sangvine în stroma intratumorală a fost dependentă de numărul MC atât intratumorale ($r_s = 0,384$, $p = 0,001$), cât și a celor peritumorale ($r_s = 0,232$, $p = 0,041$); dar a fost invers dependentă de macrofagele peritumorale ($r_s = -0,260$, $p = 0,021$). Vasele sangvine peritumorale au corelat cu MC peritumorale ($r_s = 0,349$, $p = 0,002$) dar și cu vasele limfatice din aceeași zonă ($r_s = 0,261$, $p = 0,033$).

Vasele limfatice din zonele intra- și peritumorale au prezentat asocieri pozitive ($r_s = 0,303$, $p = 0,009$). Totodată vasele peritumorale au fost influențate de MC din regiunile omoloage ($r_s = 0,309$, $p = 0,010$).

Asocieri pozitive au fost stabilite și dintre populațiile de celule S100 pozitive intra- și peritumorale ($r_s = 0,349$, $p = 0,002$), precum și dintre MC din ambele localizări ($r_s = 0,506$, $p = 0,0000014$). Celulele S100 pozitive peritumorale au corelat cu macrofagele de aceeași localizare ($r_s = 0,258$, $p = 0,030$) (anexa 1).

Ulterior am analizat interrelațiile în cadrul formelor moleculare aparte, fiecare prezentând anumite particularități.

Subtipul luminal A. Macrofagele peritumorale au corelat invers cu DC intratumorale ($r_s = -0,540$, $p = 0,046$). LVD peritumorale a fost direct dependentă de numărul MC peritumorale ($r_s = 0,737$, $p = 0,006$) și a corelat pozitiv cu densitatea vaselor sangvine peritumorale ($r_s = 0,789$, $p = 0,002$) (anexa 2).

Subtipul luminal B. În cadrul acestui subtip molecular în prim plan a ieșit densitatea vaselor sangvine (anexa 3). Astfel, densitatea vaselor sangvine peritumorale a fost direct dependentă de expresia markerului S100 ($r_s = 0,342$, $p = 0,035$) și de numărul MC peritumorale ($r_s = 0,358$, $p = 0,02$). Pornind de la ideea că MC stimulează angiogeneza, am verificat dacă există aceleași corelații și în regiunea intratumorală. Răspunsul a fost afirmativ ($r_s = 0,468$, $p = 0,002$ pentru asocierea MCit și CD34it). Ideea a fost susținută și de corelația veridică statistic dintre cele 2 populații de MC (adică intra- și peritumorale): $r_s = 0,590$, $p = 0,0000161$. Putem astfel presupune că MC din stroma intra- și peritumorală se stimulează reciproc și induc angiogeneza în regiunile respective.

Subtipul HER2+. Și în acest subtip molecular am demonstrat dependența dintre MC și LVD, însă doar în stroma intratumorală ($r_s = 0,872$, $p = 0,005$). Atât MC, cât și vasele limfatice din această zonă au corelat cu macrofagele din ariile peritumorale ($r_s = 0,815$, $p = 0,007$ și $r_s = 0,860$, $p = 0,006$, respectiv). Vasele limfatice din stroma peritumorală s-au asociat cu expresia S100 în aceeași zonă ($r_s = 0,727$, $p = 0,041$), iar expresia S100 în regiunea intratumorală a corelat cu MC peritumorale ($r_s = 0,728$, $p = 0,026$) (anexa 4).

Subtipul triplu-negativ. LVD din zona intratumorală a fost influențată nu de MC, ci de macrofagele intratumorale ($r_s = 0.686$, $p = 0.02$). MC din aceeași zonă în schimb au prezentat mai multe corelații semnifictive statistic, influențând densitatea vaselor sangvine peritumorale ($r_s = 0.582$, $p = 0.047$) și omoloagele sale din plajele peritumorale ($r_s = 0.668$, $p = 0.018$). De asemenea, s-a stabilit și o asociere inversă cu macrofagele peritumorale ($r_s = -0.623$, $p = 0.041$) (anexa 5).

În figura 47 sunt prezentate imagini comparative ale unor imunoreacții realizate în studiu.

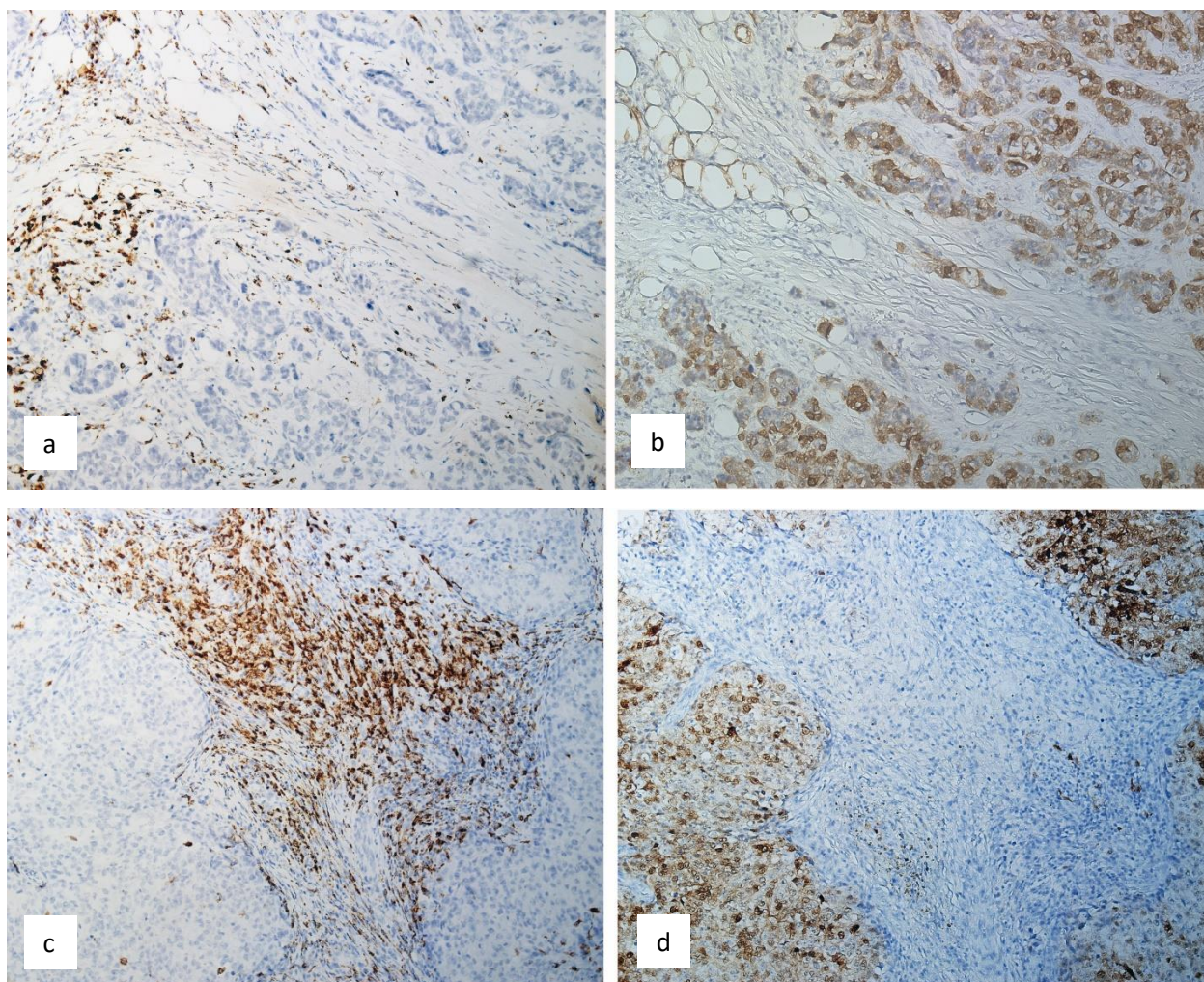


Figura 47. Carcinom ductal invaziv, de tip NST. (a, c) Celule CD68+ peritumorale versus (b, d) celule S100+ intratumorale (a, b - ob. 40×, c, d - ob. 20×). Imagini din aceeași zonă a tumorii. Imunoreacție pentru (a, c) CD68 și (b, d) pentru S100, DAB.

4. EVALUAREA MODIFICĂRILOR STROMALE ÎN VARIANTELE MOLECULARE DE CANCER MAMAR

Cancerul de sân rămâne o problemă globală cu impact major, cu o morbiditate și mortalitate considerabilă, fiind necesare strategii noi de tratament. Micromediul tumoral este considerat un important factor al progresiei tumorii și al răspunsului la tratament. Ca urmare, există un interes din ce în ce mai mare pentru dezvoltarea de noi terapii care vizează micromediul tumoral, în special în ceea ce privește progresia invazivă și metastatică. Stabilitatea genomică a celulelor din stromă face ca dezvoltarea chimiorezistenței să fie mai puțin probabilă. În plus, modificările epigenetice care contribuie la modificările fenotipice, deși sunt moștenite, sunt reversibile și există un interes crescând pentru „normalizarea” stromei modificate, abrogând astfel rolul său de susținere a tumorii [107]. Conform datelor din literatură, ER, PR, HER2 și proteina nucleară Ki-67 sunt principalii biomarkeri necesari în evaluarea prognosticului carcinoamelor mamare. Pozitivitatea celulelor neoplazice pentru ER și/ sau PR este un factor important pentru evaluarea preliminară a terapiei hormonale. Supraexpresia HER2 indică un grad mai mare de malignitate, cu progresie rapidă, grad înalt de diferențiere a tumorii, probabilitate mai înaltă de recidivare și metastazare [156]. În timpul evoluției unei tumori, se stabilește o comunicare complexă și dinamică între celulele neoplazice și celulele din microambianța tumorală; de aceea, elucidarea acțiunii componentelor stromei asupra expresiei markerilor incluși în studiul actual (ER, PR, HER2) ar putea contribui la înțelegerea mecanismelor de inițiere și progresie ale tumorii [157, 158].

Se estimează că cel puțin o treime din toate tipurile de cancer sunt asociate cu infecții cronice sau cu procese inflamatorii de lungă durată. În literatura de specialitate, cancerele asociate cu infecții și/ sau inflamații descrise sunt carcinomul gastric, colorectal, cervical și hepatocelular. Cancerul de sân poate, de asemenea, să fie asociat cu inflamația cronică, deși rolul acesteia nu este pe deplin elucidat; iar celulele proinflamatorii, deși infiltrază neoplaziile, totuși nu par a fi protectoare. Ba din contra, multe celule ale sistemului imun au funcții protumorale, după cum s-a menționat anterior [81].

Unul dintre actorii micromediului tumoral abordați în acest studiu sunt macrofagele. Rezultatele ne-au demonstrat că densitatea acestor celule diferă în funcție de apartenența la grupul luminal sau non-luminal, corelația statistică cu receptorii hormoni fiind una inversă, adică macrofagele peritumorale ar putea diminua expresia ER și PR în celulele tumorale. De asemenea, cu cât mai slab diferențiată este tumoarea, cu atât mai multe macrofage intratumorale vor fi. Aceleași date au fost obținute și de Lindsten et al., care afirmă că creșterea de macrofage a fost asociată negativ cu ER α sau PR, în timp ce a fost observată o asociere pozitivă cu Ki-67.

Similar rezultatelor noastre, legătura dintre infiltratele macrofagelor și statusul HER2 a fost inconsecventă [157]. Jeong et al. susțin că numărul mare de macrofage (CD68+, CD11c+ sau CD163+) a fost asociat cu un grad înalt de diferențiere, indice de proliferare Ki-67 înalt, negativitatea receptorilor pentru estrogeni și progesteron [159]. Hollmén et al. au demonstrat că în carcinoamele mamare invazive, abundența TAM-urilor corelează cu gradul înalt al tumorii, expresie diminuată a receptorilor hormonal și supraviețuirea redusă [160]. Datele respective pun în evidență rolul pro-tumoral al macrofagelor din regiunile peritumorale. Aflându-se în afara ariei neoplazice, ele inhibă expresia receptorilor hormonal și pot orienta tumoarea spre un fenotip non-luminal, care nu poate beneficia de terapia antihormonală și are un prognostic mai rezervat. Stosi et al. de asemenea sprijină un mecanism alternativ ce nu pornește de la celula tumorală, dar este derivat din interacțiunea cu micromediul tumoral, care ar putea duce la rezistență endocrină și ar putea fi vizat terapeutic pentru a preveni pierderea expresiei ER α în tumorile mamare [161]. În cazul regenerării cutanate, Campbell et al. au demonstrat că ablația ER α duce la o vindecare mai proastă a rănilor și invers, expresia ER α polarizează preferențial macrofagele pe calea alternativă [162]. Dacă extrapolăm aceste date la carcinoamele mamare, ar fi posibil ca în stadiile inițiale ale tumorigenezei, estrogenii să orienteze macrofagele spre activarea pe cale alternativă, ca ulterior, macrofagele M2 să inhibe expresia ER și să orienteze tumoarea spre fenotipul non-luminal [163].

În tumorile de col uterin, Șaptefrați L. et al. au determinat că densitatea macrofagelor CD68 pozitive sporește pe măsura progresiei neoplaziei de col uterin, atingând valori maxime în carcinoame scuamocelulare franc invazive [164]. În studiul nostru, macrofagele intratumorale au corelat pozitiv cu gradul de diferențiere a tumorii, confirmând că densitatea acestora crește odată cu creșterea severității tumorii.

Klingen et al. afirmă că nivelurile ridicate de macrofage CD163 pozitive au fost asociate cu invazia vaselor de sânge și implicarea limfatică. În plus, prezența unor niveluri ridicate de macrofage CD163+ a fost observată mai frecvent în carcinoamele mamare HER2 pozitive, bazale și TNBC [165]. În studiul nostru la fel am determinat corelații pozitive statistic semnificative dintre densitatea macrofagelor peritumorale și CD34it precum și MC intratumorale, care pot stimula limfangiogeneza. Globa et al. au raportat date similare în cazul carcinoamelor de prostată și anume a fost obținută corelație statistic semnificativă dintre densitățile celulelor CD68+ peritumorale și vasele CD34+ intratumorale [166]. De remarcat că în studiul nostru macrofagele au corelat cu LVD anume în tumorile non-luminale (HER2+ și TNBC). Astfel, putem presupune că, stimulând angio- și limfangiogeneza, macrofagele contribuie la prognosticul rezervat al tumorilor non-luminale. O corelație pozitivă dintre densitatea TAM și creșterea vascularizației, precum și un prognostic rezervat, a fost raportată de

Takeya et al. în cancerul pulmonar non-microcelular [167]. Klingen et al. de asemenea susține că macrofagele asociate tumorilor sunt strâns legate de invazia vasculară și subtipurile non-luminale [165].

Conform datelor lui Alishekevitz et al., celulele mioeloide și macrofagele contribuie la recidivarea tumorii prin promovarea rezistenței la medicamente [168]. Mai mult, Timaner et al. afirmă că macrofagele limitează eficacitatea antitumorală a terapiei prin mecanisme necunoscute [169]. Aceste date sugerează că celulele neoplazice, ca răspuns la terapia medicamentoasă, pot genera efecte pro-metastatice și pro-tumorigenice inclusiv prin modularea microambianței [168]. Alishekevitz et al., în urma unor studii *in vivo* au arătat că axa VEGF-C/ VEGFR3 este activată semnificativ după chimioterapia cu paclitaxel. Acest medicament a crescut nivelurile de VEGF-C circulant atât la pacienți, cât și la modelele de șoarece, rezultând o limfangiogeneză intensificată. Acest studiu sugerează că blocarea axei VEGF-C/ VEGFR3 reduce contribuția limfangiogenezei la metastazare după chimioterapie prin două mecanisme distincte: (1) afectează direct activitatea celulele endoteliului limfatic în tumori și (2) afectează indirect limfangiogeneza prin reducerea nivelului catepsinei eliberată de macrofage, care este, de altfel, crescută ca răspuns la chimioterapie [168, 169].

O altă corelație stabilită în studiul nostru a fost cea dintre macrofagele și DC. Considerăm că este o asociere firească, pentru că DC participă împreună cu macrofagele în reacțiile imune și este logic ca densitățile acestor populații celulare să fie interdependente. Asocierile au prezentat câteva variante: densitățile CD68pt și S100it au corelat invers în subtipul luminal A, iar densitatea CD68pt a corelat direct cu densitatea S100pt în urma analizei cazurilor *per total*. Similar datelor noastre, în carcinoamele de prostată, Globa T. et al. au obținut corelații statistice semnificative atât pentru celulele CD68+ ($p=0,008$ intratumoral, $p=0,001$ peritumoral), cât și pentru celulele S100+ ($p=0,036$ intraepitelial, $p=0,042$ stromal). În plus, autorii au descris o corelație pozitivă statistic semnificativă dintre densitatea celulelor S100+ intraepiteliale și a celulelor CD68+ intratumorale. De asemenea, densitatea celulelor S100+ și CD68+ s-a asociat semnificativ statistic cu gradul histologic al tumorii, ceea ce le-a permis autorilor să considere aceste celule drept biomarkeri predictivi în carcinoamele de prostată [99].

Cercetările din ultimele decenii au arătat că proteinele S100 joacă un rol crucial în dezvoltarea și progresia multor tipuri de cancer, cum ar fi cancerul de sân, cancerul pulmonar și melanomul. Fiecare tip de cancer prezintă un profil specific de expresie ale proteinelor S100, iar membri diferiți ai familiei S100 acționează deosebit, în dependență de țesut. S100A2, de exemplu, acționează ca supresor tumoral în cancerul oral, dar promovează creșterea tumorii în cancerul pulmonar [170]. În studiul nostru, corelațiile au fost în dependență de subtipul molecular al tumorii, iar majoritatea dintre ele au vizat S100it. Astfel, S100it au corelat invers cu

gradul de diferențiere al tumorii în subtipul TNBC, iar în subtipul luminal B – cu expresia PR de către celulele neoplazice și cu vârsta pacienților. Aceste asocieri statistice au fost valabile pentru tumorile G2, însă nu și pentru tumorile slab diferențiate. Prin urmare, odată cu progresia tumorii se pierde interdependența dintre S100, vârsta pacienților și expresia PR de către celulele tumorale.

Observațiile noastre privind legătura dintre S100 și expresia proteinei HER2 au fost confirmate și de alți cercetători. Astfel, Nava et al. au emis ipoteza că proteinele familiei S100 ar putea influența creșterea și metastazarea celulelor tumorale induse de EGF, contribuie indirect la rezistența la herceptină și ar putea servi drept țintă în terapia carcinoamelor HER2+ [171].

Expresia proteinei S100 de către celulele tumorale poate crea mai multe speculații. Activarea limfocitelor T necesită procesarea antigenelor asociate tumorii în peptide antigenice, care sunt prezentate de celule. DC sunt celule capabile să inducă răspunsuri imune antitumorale prin legarea răspunsului imun înăscut și adaptiv. Procesarea eficientă a Ag și prezentarea de către DC sunt esențiale pentru inducerea imunității antitumorale [172]. Fuziunea celulară este un mecanism care permite materialului genetic să se deplaseze de la o celulă la alta și să producă celule hibride viabile. Schimbul genetic reciproc dintre celulele canceroase și micromediul lor stromal explică eterogenitatea celulelor canceroase, ceea ce le permite ultimelor să dobândească modificări distincte pentru a supraviețui și a se adapta la schimbările din micromediu. Această capacitate a tumorilor maligne de a evolua la nivel celular este un proces critic în progresia cancerului și o posibilă țintă terapeutică. De asemenea, este posibil ca fuziunea celulară să contribuie la inhibarea progresiei cancerului atunci când genele supresoare de tumori sunt active în hibrid, prevenind dezvoltarea tumorii prin inhibarea proliferării celulare. Astfel, într-un studiu, hibridii de celule normale și celule tumorale nu au fost capabili să formeze neoplazii din cauza genelor supresoare de tumori moștenite de la celula normală [173].

Există mai multe tipuri de gene supresoare de tumori care pot fi inactivate într-o varietate de cancere. De exemplu, se consideră că gena supresoare p53 ar putea fi implicată în cca 50% din cazuri de cancer. Cu toate acestea, dacă o celulă normală are încă o genă supresoare tumorală funcțională, procesul de fuziune celulară ar putea inhiba progresia tumorii [173]. Astfel, formarea hibridilor ar putea fi o parte componentă a procesului de imunoeditare, acesta fiind un proces dinamic care are loc în trei etape consecutive: eliminare, echilibru și evadare. Eliminarea este primul pas, numit și imunosupraveghere, în care celulele transformate sunt distruse de sistemul imunitar competent. În timpul fazei de echilibru, celulele tumorale care au supraviețuit fazei de eliminare și celulele imune se modelează reciproc. Se stabilește un echilibru între tumoare și sistemul imunitar cu o presiune de selecție asupra celulelor tumorale, care sunt instabile genetic și suportă rapid mutații. Variantele de celule tumorale care au dobândit

rezistență la eliminare intră apoi în faza de evadare, etapa finală a procesului, când tumora crește și devine evidentă clinic. Faza de evadare este caracterizată prin stabilirea progresivă a unui micromediu imunosupresor sau camuflarea celulelor canceroase prin expresia unor proteine ce le permit evadarea de la răspunsul imun [158].

Chistiakov et al. au raportat expresia markerului CD68 de către celulele tumorale. Acest fapt nu este surprinzător, deoarece celulele tumorale metastatice exprimă pe scară largă markeri imuni pentru a scăpa de fagocitoza mediată de macrofage și de efectele dăunătoare ale limfocitelor T CD8+ citotoxice. Mecanismele moleculare care duc la exprimarea antigenelor proprii celulelor imune de către celulele tumorale rămân încă incomplet descifrate, însă, conform acestor autori, unul dintre acestea ar putea fi schimbul genetic dintre celule, realizat prin fuziunea celulară sau eliberarea de exozomi [174].

Aceste considerații ar putea sugera idea că fuziunea DC și a celulelor tumorale pentru a genera celule hibride ar putea fi o opțiune alternativă pentru tratarea pacienților cu cancer. Metoda de fuziune celulară permite DC să fie expuse la o gamă largă de antigene proprii celulelor tumorale. Ulterior, aceste antigene endogene sunt procesate și prezentate prin căile complexului MHC clasa I și II în contextul moleculelor co-stimulatoare, rezultând activarea simultană a celulelor T CD4+ și CD8+. În aceste celule hibride, citoplasma DC, cât și a celulelor tumorale este integrată fără fuziune nucleară. Astfel, ADN-ul intact, permite păstrarea funcțiilor originale ale ambelor tipuri de celule, inclusiv co-expresia antigenelor tumorale (atât cunoscute, cât și neidentificate) și moleculele MHC de clasa I și II derivate din DC [172].

Totuși, ideea de a crea/ ținti celulele hibride nu este lipsită de minusuri: Bastida-Ruiz et al. susțin că fuzionarea celulelor poate contribui la formarea unor simplaste foarte tumorigene și chimiorezistente. Mai mult decât atât, metastazarea poate fi inițiată prin fuziunea celulelor canceroase și a celulelor derivate din măduva hematogenă. După fuziunea celulă-celulă dintre o celulă derivată din măduva hematogenă și o celulă canceroasă, populația polipoidă nou-formată pierde unele trăsături epiteliale, cum ar fi adeziunea celulară, expresia E-cadherinei și urmează calea tranziției epitelio-mezenchimale [173].

Evenimentele de fuziune celulară pot contribui la dezvoltarea rezistenței la medicamente de către populațiile de celule tumorale. Diferite linii celulare care fuzionează pot păstra aceeași rezistență la terapia anticanceroasă ca și populațiile originale sau pot dezvolta mecanisme noi de rezistență la medicamente [173].

Macrofagele și MC sunt complici cunoscuți, fiind reglatori ai inflamației, răspunsului imunologic și angiogenezei în micromediul tumoral [175]. Datele noastre accentuează asupra corelațiilor spațiale dintre cele 2 tipuri de celule. Astfel, în tumorile non-luminale (HER2+ și TNBC), macrofagele peritumorale au influențat densitatea MC intratumorale. Aceasta ne permite

să speculăm că inițial macrofagele sunt poziționate în jurul ariilor tumorale unde, prin diverse mecanisme, atrag alte celule, precum MC. MC la rândul lor exercită efectele protumorale (angio- și limfangiogeneza, degradarea ECM, etc.) cu toate consecințele respective. Aceasta ar putea fi una din explicațiile agresivității tumorilor non-luminale. Tamma et al. au confirmat rolul important al macrofagelor și MC în progresia tumorii și angiogeneza în carcinoamele mamare ductale invazive [175]. În studiile noastre anterioare, am prezentat că dinamica MC este puternic influențată de receptorii hormonal și statutul HER2. Densitatea MCit a crescut în tumorile G3 și astfel, celulele respective pot fi considerate drept un factor de prognostic nefavorabil [176]. Ammendola et al. sugerează că MC triptază+ și macrofagele cooperează în micromediul tumoral și influențează angiogeneza carcinoamelor colorectale, iar combinația acestora ar putea fi evaluată ca țintă a unor noi terapii anti-angiogenice la pacienții cu cancer colorectal [177].

Deși sunt de obicei asociate cu reacțiile alergice, MC sunt printre primele celule care infiltrează o tumoare [79, 178]. Este din ce în ce mai evident că fenotipul și funcția MC sunt influențate direct de micromediului local care modifică capacitatea lor de a recunoaște în mod specific și de a răspunde la diverși stimuli prin eliberarea unei serii de mediatori activi biologic [179]. Însă acești mediatori au un rol dual: unele molecule sunt pro-tumorigene (de exemplu, factorii angiogeni și limfangiogeni), iar altele sunt anti-tumorigene (de exemplu, TNF- α și IL-90) [79]. Astfel, acumularea MC și semnificația lor prognostică au fost o sursă de discuții aprinse, cu dovezi atât în favoarea rolului lor protumoral cât și antitumoral, iar până în prezent, nu există încă un verdict clar care ar încununa aceste dezbateri [81].

Afirmațiile precum că prezența acestor celule în carcinoamele mamare este asociată cu un prognostic rezervat pot fi explicate prin faptul că MC:

- 1) stimulează angiogeneza tumorală prin intermediul moleculelor proangiogene;
- 2) facilitează remodelarea stromală și invazia stromală prin enzime proteolitice, cum ar fi triptaza; și
- 3) suprimă răspunsul imun antitumoral prin stimularea migrării celulelor imunosupresoare în micromediul tumoral [80].

De cealaltă parte, un șir de studii clinice susțin rolul protector al MC care infiltrează tumorile mamare. De exemplu, după o analiză multivariată, Dabiri Sh. et al. au constatat că prezența MC stromale este un factor de prognostic pozitiv, prezentând o corelație puternică cu o rată înaltă de supraviețuire [180]. Ulterior, acest studiu a fost continuat prin includerea unui număr mai mare de pacienți, care au fost supravegheați o perioadă de până la 18,4 ani. Concluziile la care s-a ajuns în urma acestui studiu au fost foarte asemănătoare, autorii propunând MC drept un marker de prognostic favorabil, independent de vârsta pacienților, gradul și mărimea tumorii, metastazele în nodurile limfatice și subtipul molecular [181].

Similar cu rezultatele noastre, alte trei grupuri de cercetători au observat o densitate mare de MC în subtipurile luminale de carcinom mamar, care pot fi tratate hormonal și au un prognostic mai favorabil [92, 156, 178]. Acest lucru sugerează că MC sunt asociate cu tumori mai puțin agresive. Pe de altă parte, știm că estrogenii acționează ca un factor proliferativ și pot stimula dezvoltarea carcinoamelor mamare [21]. Acest lucru poate explica de ce, în studiul nostru, densitatea atât a MCit, cât și a MCpt a corelat cu expresia ER în tumorile G2 și G3. Corelațiile pozitive dintre ER și MC sugerează că estrogenii ar putea fi molecule chemotactice pentru MC. Ne-a interesat în special corelația dintre celulele carcinomului ER+ și MC intratumorale, deoarece unele studii au demonstrat că estrogenii activează MC în endometrioza ovariană și că MC uterine umane exprimă ERβ [182, 183]. Keser S. et al. de asemenea raportează corelații dintre MCit și pozitivitatea tumorii pentru ER [80]. Alt grup de cercetători au constatat că administrarea de estrogeni duce la infiltrarea cu eozinofile și MC [184]. Rao et al. susțin că ultimele joacă un rol pro-tumorigenic în cancerul de vezică urinară prin stimularea ERβ și într-un model murin de cancer de vezică urinară s-a demonstrat că un antagonist selectiv ERβ poate inhiba creșterea tumorală promovată de MC [86].

În studiul nostru, densitatea MC din zonele peri- și intratumorală a corelat invers cu vârsta pacientelor, dar numai în tumorile G2. Sang et al. au constatat că densitatea MC la pacienții cu vârsta sub 50 de ani a fost semnificativ mai mare decât la pacienții cu vârsta ≥ 50 de ani [156], susținând astfel datele noastre.

Un alt aspect al studiului nostru a evidențiat faptul că densitatea MC din cele 2 localizări analizate s-au asociat între ele, corelația fiind una de talie puternică ($r_s > 0.41$). Date asemănătoare au fost obținute de Keser S. et al. Aceștia au arătat că conținutul de MC intratumorale a corelat pozitiv cu MC peritumorale, care, la rândul lor, au corelat cu MC din țesuturile neafectate [80].

Există studii care au arătat o corelație negativă dintre populațiile de MC și gradul de diferențiere a tumorii [178], date care nu au fost confirmate de noi. În studiul asupra carcinoamelor mamare efectuat de către Sang et al., densitatea MC la pacienții cu Ki-67 $\leq 14\%$ a fost semnificativ mai mare decât conținutul MC la pacienții cu Ki-67 $> 14\%$. Deși nu au putut concluziona că MC sunt un factor inhibitor al proliferării celulelor canceroase, rezultatele au arătat că densitatea MC este, de asemenea, invers asociată cu gradul de proliferare al tumorii, ceea ce sugerează din nou că MC ar putea avea un efect inhibitor asupra diviziunii celulare [156]. Globa T. et al. infirmă această idee. Autorii susțin că în carcinoamele de prostată, MC chimază+ din zonele peritumorale și MC CD117+ din zonele intratumorale corelează direct cu gradul tumorii [185]. Unii autori au ajuns la concluzia că prognosticul este mai nefavorabil în cazul creșterii densității MC în stroma tumorală [156]. Xiang et al. au observat mai multe MC

peritumorale în cancerule de sân G3, triptaza crescută fiind asociată cu tumorile slab diferențiate și mai multe metastaze nodale în comparație cu tumorile G1 și G2. Autorii au remarcat, de asemenea, că triptaza facilitează invazia și migrarea celulelor canceroase prin activarea MMP-2 [186]. Raica et al. au relevat corelații pozitive puternice între populațiile de MC și vasele limfatice în unele subtipuri moleculare de cancer de sân, susținând astfel ideea implicării MC în metastazare prin limfangiogenază [187]. În studiul nostru, MC peritumorale au corelat cu LVD în subtipul luminal A. În subtipul HER2+, MC din zona intratumorală au influențat LVD cu sediul intratumoral. Keser S. et al. au demonstrat că există interrelații dintre densitatea MC și LVD [80]. Similar datelor noastre, mai multe studii raportează că MC au fost în general observate în stroma adiacentă celulelor neoplazice și în apropierea structurilor vasculare [180, 181]. Angio- și limfangiogeneza permit progresia tumorii cu inițierea metastazării. Vasele de sânge și limfatice oferă însă condiții diametral opuse pentru migrarea și supraviețuirea celulelor tumorale. Aceste condiții sunt strâns legate de funcțiile distincte și caracteristicile structurale ale acestor două sisteme (de exemplu diferența în lumen, structura membranei bazale, ancorarea la ECM, etc.) [137]. Modul în care celulele tumorale aleg să se răspândească depinde de localizarea tumorii primare, de agresivitatea celulelor tumorale, de semnalele extrinseci și de condițiile intrinseci de micromediu ale tumorii, inclusiv de interacțiunile directe celulă-celulă și celulă-matrice într-o nișă tumorală și prezența factorilor paracrini care mediază formarea de noi vase [137, 188].

Limfangiogeneza este esențială pentru evadarea celulelor canceroase din locul lor primar către nodurile limfatice regionale, ceea ce are ca rezultat răspândirea sistemică a tumorii [189]. În trecut, din cauza lipsei markerilor specifici ai celulelor endoteliului limfatic, majoritatea studiilor anterioare au detectat invazia limfovaculară folosind metoda de colorare HE. O provocare majoră a acestei metode constă în a distinge invazia limfovaculară de artefactele de retracție cauzate de manipularea și fixarea țesuturilor. În prezent însă, cu ajutorul unor markeri specifici, cum ar fi D2-40/podoplanină, LYVE-1, VEGFR-3 și PROX1, vasele limfatice pot fi distinse în mod eficient de vasele de sânge sau artefactele de retracție [190], astfel mărindu-se esențial acuratețea studiilor.

Vasele limfatice sunt relativ permeabile în comparație cu vasele de sânge și, de aceea, sunt considerate de elecție pentru răspândirea celulelor tumorale [137]. În studiul nostru, atât în subtipurile moleculare luminale, cât și în cele non-luminale, densitatea microvasculară și LVD au fost dependente de MC. De remarcat că în subtipurile luminale, MC peritumorale au influențat vasele limfatice și sangvine din aceeași zonă. În subtipurile non-luminale, densitatea MC intratumorale a corelat cu vasele intratumorale. Aceasta poate fi una din explicațiile agresivității mai înalte a carcinoamelor non-luminale. Ribatti et al. au subliniat că angiogeneza a

crescut în paralel cu numărul de MC triptază+, în special în interiorul nodurilor limfatice asociate cu micrometastaze, comparativ cu nodurile limfatice neafectate [191].

De asemenea, în literatura de specialitate, există date precum că în timpul progresiei cancerului de sân, MC pot contribui la remodelarea stromală și diferențierea miofibroblastelor, prin triptaza eliberată în ECM [192]. Keser S. et al. au demonstrat în studiile sale că invazia limfovaculară, cea perineurală, precum și expresia ER au fost asociate pozitiv cu densitatea MC intratumorale [80]. În carcinoamele de prostată, Globa T. et al. au determinat o corelație totală dintre CD34pt și triptază în zonele peritumorale precum și absența unei asocieri semnificative dintre acestea în zonele intratumorale [78]. În leziunile cervixului uterin, Cebanu A. et al. au presupus că MC au rol limfangiogen. Rezultatele acestora au semnalat o corelație semnificativă dintre numărul de vase limfatice și cel al MC din zonele peritumorale în carcinoamele invazive, în comparație cu metaplazia scuamoasă și cu carcinomul *in situ* [87].

Cele menționate ne sugerează că MC ar putea fi o țintă terapeutică în vederea inhibării angio- și limfangiogenezei și nu doar. De exemplu, în modelele murine de adenocarcinom de prostată, tratamentul cu cromolin, un cunoscut inhibitor al degranulării MC, a blocat creșterea tumorii de prostată. Însă, în mod paradoxal, șoarecii tratați au dezvoltat cancere neuroendocrine extrem de maligne, un efect advers fatal care ar trebui studiat mai profund înainte de a propune utilizarea cromolinului sau țintirea MC ca terapie [95, 193].

Depleția MC cu imatinib a favorizat creșterea tumorii într-un model murin de carcinom mamar, susținând un rol antitumoral al MC. La fel, șoarecii tratați cu cromolin au prezentat tumori mamare cu regiuni hemoragice hipoxice extinse și trombi, care nu au fost observate în grupul de control, ceea ce sugerează că MC joacă un rol important în inhibarea coagulării sângelui și menținerea perfuziei sangvine în cancerul de sân, probabil prin secreția de heparină, activator de plasminogen, chimază și triptază [95, 194, 195]. Citokinele angiogenice secretate de MC facilitează vascularizarea tumorii nu numai printr-un efect direct, ci și prin stimularea altor celule proinflamatorii ale micromediului tumoral pentru a elibera alți mediatori angiogeni [196], de aici și corelațiile semnificative statistic dintre MC, macrofage și DC în studiul nostru.

DC exercită o activitate pro-angiogenă puternică care este mediată de factorul de creștere angiogenic VEGF-A. De asemenea, DC se pot transdiferenția în endoteliocite, astfel contribuind la angio- și vasculogeneză [197]. Acest aspect poate explica rezultatele studiului nostru și anume interrelațiile dintre expresia CD34 și S100. Similar carcinoamelor mamare, Yamagata et al. au stabilit că în carcinoamele scuamocelulare orale, macrofagele CD163 pozitive promovează limfangiogeneza prin expresia VEGF-C, care contribuie la metastazarea în nodurile limfatice regionale [189]. Astfel, mediatorii angiogeni, produși de diverse celule stromale și de însăși celulele canceroase pot avea acțiune paracrină, creându-se un cerc vicios. Sammarco G. et al.

confirmă că și în cancerul gastric densitatea MC este crescută și există o corelație cu angiogeneza, numărul metastazelor în nodurile limfatice și supraviețuirea acestor pacienți. MC exercită un rol protumorigen în cancerul gastric prin eliberarea de factori angiogenici (VEGF-A, CXCL8, MMP-9) și limfangiogenici (VEGF-C și VEGF-F). De asemenea, MC exprimă liganzii morții programate (PD-L1 și PD-L2, *Programmed Death Ligand*, eng.) care sunt relevanți ca puncte de control imun în neoplazii [134].

Metastazarea limfatică cuprinde o serie de procese secvențiale, cum ar fi limfangiogeneza asociată tumorii, invazia limfovaculară, „implantarea” celulelor canceroase în nodurile limfatice regionale și proliferarea micrometastazelor în organe îndepărtate [190]. Din punct de vedere istoric, inițial se credea că vasele limfatice au un rol pasiv în răspândirea celulelor canceroase, fiind simple conducte. Inițial, se considera că există doar vase limfatice peritumorale, nu și în interiorul tumorii, din cauza presiunii interstițiale crescânde indusă de celulele tumorale în proliferare [139, 198]. Însă, progresul substanțial în domeniu a condus rapid la recunoașterea limfaticelor drept un sistem activ într-o mulțime de tumori maligne. Datorită dezvoltării IHC, a devenit posibilă demonstrarea existenței limfaticelor intratumorale, care acum sunt considerate că sunt supuse unor modificări dinamice și facilitează metastazarea tumorii [199].

În studiul nostru, prin utilizarea anticorpului D2-40 am demonstrat existența vaselor limfatice în interiorul tumorii. Pathak A. et al. raportează că limfaticele intratumorale au fost detectate în general în 40,07% dintre speciemenle de cancer de sân, iar rata de detectare a limfaticelor peritumorale a fost de 77,09% [200]. De remarcat că diferiți autori abordează diferit termenul „intratumoral”, ceea ce poate crea o discrepanță în rezultatele obținute. Astfel unii cercetători tratează limfaticele intratumorale drept orice vas din zona tumorii, fie în interior, fie la periferie. Totodată, există opinii precum că limfaticele intratumorale reprezintă vase prezente doar printre celulele tumorale. O altă părere este că limfaticele intratumorale se referă la vasele din 2/3 interioare a leziunii tumorale [198, 199, 201, 202].

Vasele limfatice nu numai că oferă o cale de acces în circuitul sistemic pentru celulele tumorale, dar au și câteva contribuții cheie la metastazare, cum ar fi asigurarea unei nișe pentru celulele stem canceroase și modularea răspunsurilor imune antitumorale [138]. Vasele limfatice oferă o cale sigură pentru diseminarea celulelor canceroase, datorită structurii discontinue a membranei bazale și a unei concentrații mari de acid hialuronic. În literatură, s-a accentuat de asemenea asupra formării vaselor limfatice în noduri, care constituie astfel o platformă intermediară pentru metastazarea limfatică a celulelor canceroase. Experimental, s-a demonstrat că tumorile primare pot induce formarea vaselor limfatice (neo-limfangieneză) în nodul limfatic santinelă [137]. Rămâne însă neclar care vase limfatice apar primele, peritumorale sau intratumorale?

În studiul dat am demonstrat interrelația dintre D2-40it și D2-40pt, corelația fiind una de talie moderată ($r_s = 0.325$). Densitatea mai înaltă a vaselor limfatice peritumorale comparativ cu cele intratumorale ne poate sugera ideea că ele formează o rețea la periferia tumorii și sunt vase funcționale. Într-un studiu meta-analitic, Zhang S. et al. susține că rezultatele analizate susțin afirmația precum că vasele limfatice peritumorale predomină asupra celor intratumorale [199]. Prin creșterea suprafeței de absorbție, limfaticele peritumorale colectează fluide și celule din regiunile periferice ale masei canceroase, care sunt în principal celule tumorale cu proliferare rapidă. Limfaticele intratumorale sunt, pe de altă parte, de obicei mici, comprimate și nefuncționale, din cauza forțelor mecanice legate de creșterea tumorii, invazia celulelor tumorale migratoare și o presiune crescută a lichidului interstițial în interiorul masei tumorale. În opinia lui Duong et al., acestea pot fi implicate în metastazare, dar într-o măsură mai mică [203].

În studiul nostru am determinat o corelație statistic semnificativă dintre densitatea vaselor limfatice intratumorale și expresia ER de către celulele tumorale în subtipul luminal A, ceea ce presupune un control hormonal al sistemului limfatic. În ciuda numeroaselor date care indică un efect benefic al estradiolului asupra vaselor sangvine, surprinzător de puține date sunt cunoscute despre efectele acestuia asupra endoteliului limfatic. Cunoaștem că influența estradiolului asupra endoteliului limfatic este mediată în exclusivitate de receptorul ER α . Aceasta este o diferență majoră față de endoteliul vaselor sangvine, care exprimă atât ER α cât și ER β [204]. În țesutul conjunctiv subcutanat, estradiolul controlează sinteza acidului hialuronic – un ligand major al ECM pentru receptorul de celule endoteliale limfatice LYVE-1, sugerând un efect indirect asupra homeostaziei limfatice. Pornind de la aceste premise, Morfousse F. et al. au modelat limfedemul la șoareci și au ajuns la concluzia că ER α reglează direct genele limfangiogene, ceea ce stimulează migrarea și înmugurirea (sprouting-ul) endoteliului limfatic. De asemenea, grupul dat de cercetători a stabilit că blocarea ER α folosind un modulator selectiv de estrogen, cum ar fi tamoxifenul, are un efect dăunător asupra drenajului și funcției vaselor limfatice, crescând riscul de a se dezvolta limfedem secundar [205], ceea ce și se întâmplă în cazul tratamentului cancerului mamar de tip luminal. Peste 10% dintre supraviețuitorii cancerului de sân de tip luminal dezvoltă limfedem secundar peste câteva luni sau câțiva ani de la operație, ceea ce sugerează că limfedemul nu este doar un efect advers al intervenției chirurgicale, ci implică și o contribuție a medicației antihormonale [206].

Angiogeneza tumorală duce la formarea unor vase ce diferă semnificativ de vasele normale. Structura vaselor de sânge ar forța, în condiții normale, celulele tumorale să utilizeze mai multă energie în timpul extravazării și intravazării. Însă vasele formate în urma angiogenezei tumorale sunt caracterizate printr-o structură haotică în care celulele endoteliale nu aderă strâns între ele, ba mai mult, formează invaginări în interiorul lumenului vascular. De asemenea,

pericitele aderă slab la endoteliu. BM este mai subțire decât în vasele normale și are multe fenestre, ceea ce face vasele permeabile. Diametrul de-a lungul aceluiași vas poate varia și se pot forma cheaguri de sânge, ceea ce poate duce la oscilații locale ale presiunii arteriale [132, 137, 207]. Fiind procese esențiale pentru supraviețuirea și metastazarea tumorii, nu este de mirare că toate elementele celulare incluse în studiul nostru au corelat fie cu expresia CD34, fie cu expresia D2-40.

Corelațiile statistic semnificative dintre CD34 și D2-40 stabilite de noi sugerează legătura strânsă dintre aceste procese. Atât modelele *in vivo* pe animale, cât și testele *in vitro* au indicat că limfangiogeneza are loc după angiogeneză [208]. Prin urmare, formarea vaselor limfatice se poate baza nu numai pe factori limfangiogeni, ci și pe factori angiogenici [137]. În leziunile de col uterin, Șaptefrați et al. au observat că principala sursă de VEGF sunt celulele tumorale. VEGF nu s-a expresat în specișnenele normale de col uterin. Markerul a fost identificat într-un număr redus de cazuri de CIN1, dar expresia VEGF s-a intensificat pe măsura progresiei neoplaziei de col uterin. Datele acestor autori atestă dobândirea fenotipului angiogenic al leziunilor de col uterin la stadiile de CIN2-3, adică mult mai devreme decât apariția carcinomului propriu-zis. Expresia imunohistochimică a VEGF nu a fost limitată doar la celulele epiteliale, dar s-a observat și în celulele stromale, care în cazurile cu carcinoame invazive exprimau VEGF într-o proporție de peste 60% [209].

Micromediul stromal joacă un rol major în menținerea homeostaziei tisulare normale și în promovarea creșterii tumorii. Tot mai multe dovezi ne sugerează faptul că micromediul tisular normal este o barieră în calea tumorigenezei, în timp ce semnalele proinflamatorii aberante destabilizează homeostazia țesuturilor și promovează tumorigeneza [134]. Astfel, celulele canceroase educă celulele din micromediul tumoral și le forțează să joace după regulile proprii. În această lucrare, au fost analizați actorii cheie din stroma tumorilor mamare și rolul lor în tumorigeneză și progresia cancerului. Cu toate acestea, rămâne o întrebare cheie: ce vine mai întâi, disfuncția celulelor epiteliale sau disfuncția micromediului lor?

CONCLUZII GENERALE

1. Microambianța tumorală constituie un element esențial în structura carcinoamelor mamare, influențând creșterea și progresia acestora. Interrelațiile dintre celulele epiteliale și structurile stromale sunt complexe, stimulatorii sau inhibitorii, astfel gestionarea stromei este imperativă pentru potențarea sau încetinirea expansiunii celulelor neoplazice.
2. În carcinoamele mamare de tip luminal densitatea mastocitelor în ariile peritumorale prevalează față de cea a macrofagelor și a celulelor dendritice manifestând o corelație pozitivă statistic semnificativă. În tumorile ER+ și PR+ ariile intratumorale au prezentat o densitate mai înaltă a mastocitelor față de cele peritumorale, astfel tumorile hormonal pozitive manifestă chemoatractivitate pentru celulele triptază+, stimulând migrarea acestora.
3. Majoritatea carcinoamelor mamare hormonal independente au prezentat o densitate înaltă a macrofagelor atât în stroma intratumorală cât și în cea peritumorală. În cadrul carcinoamelor ER+ și PR+ densitatea celulelor CD68+ a înregistrat valori joase.
4. Pierderea receptorilor pentru estrogeni/ progesteron este însoțită de creșterea densității celulelor S100+ peritumorale. Pozitivitatea pentru S100 a celulelor canceroase sugerează modularea antigenică a acestora, cu transfer de proprietăți și „mimetism” sau poate fi consecința fuziunii celulei dendritice cu celula neoplazică.
5. Mastocitele sunt elementele celulare capabile să moduleze stroma carcinoamelor mamare, fiind implicate în angiogeneză și limfangiogeneză, densitatea înaltă a mastocitelor fiind însoțită și de scăderea numărului de celule dendritice și macrofage.
6. În carcinoamele mamare slab diferențiate densitatea vaselor sangvine și limfatice este mai înaltă, cu predilecție în ariile peritumorale, creând astfel condiții favorabile pentru expansiunea tumorală. Carcinoamele mamare ce expresează receptori pentru estrogeni, progesteron sau proteina HER2 nu manifestă corelație semnificativ statistică cu densitatea vasculară.

RECOMANDĂRI

1. În studiul elementelor stromale, propunem determinarea densității acestora separat în ariile intra- și peritumorale.
2. În studiul varietăților celulare, se recomandă utilizarea medianei drept valoare prag pentru a diviza ulterior datele în 2 categorii: densitate joasă și densitate înaltă.
3. Determinarea macrofagelor CD68+ și a celulelor dendritice S100+ în speciunile neoplazice de glandă mamară permite selectarea pacienților care ar putea beneficia de terapia imună.

BIBLIOGRAFIE

1. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011;22(8):1736–47.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
3. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol.* 2011;5(1):5–23.
4. Nakai K, Hung MC, Yamaguchi H. A perspective on anti-EGFR therapies targeting triple-negative breast cancer. *Am J Cancer Res.* 2016;6(8):1609–23.
5. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Renshaw CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747–52.
6. Choi J, Gyamfi J, Jang H, Koo JS. The role of tumor-associated macrophage in breast cancer biology. *Histol Histopathol.* 2018 Feb;33(2):133–45.
7. Williams CB, Yeh ES, Soloff AC. Tumor-associated macrophages: Unwitting accomplices in breast cancer malignancy. *npj Breast Cancer.* 2016;2(1).
8. Soysal SD, Tzankov A, Muenst SE. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology.* 2015;82(3–4):142–52.
9. Chemencedji I. Cancerul glandei mamare. Protocol clinic national. Chişinău, 2019.
10. Tao ZQ, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem Biophys.* 2015;72(2):333–8.
11. Global Cancer Observatory. <https://gco.iarc.fr/>
12. Jovmir V, Moraru L. Dinamica cancerului mamar în Republica Moldova. *Bul Acad Ştiinţe a Mold Ştiinţe Medicale.* 2005;3(7):45–50.
13. Gaikwad NW, Yang L, Muti P, Meza JL, Pruthi S, Ingle JN, et al. The molecular etiology of breast cancer: Evidence from biomarkers of risk. *Int J Cancer.* 2008;122(9):1949–57.
14. Petrakis NL. Genetic factors in the etiology of breast cancer. *Cancer.* 1977;39(6):2709–15.
15. Antoni MH, Dhabhar FS. The impact of psychosocial stress and stress management on immune responses in patients with cancer. *Cancer.* 2019;125(9):1417–31.
16. Lillberg K, Verkasalo PK, Kaprio J, Teppo L, Helenius H, Koskenvuo M. Stressful life events and risk of breast cancer in 10,808 women: A cohort study. *Am J Epidemiol.* 2003;157(5):415–23.
17. Arnaboldi P, Riva S. Role Played By Stress and Traumatic Stress in Breast Cancer Diagnosis and Trajectory_2017. 2017;473–85.
18. Purohit A, Newman SP, Reed MJ. The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: Implications for the etiology of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2002;4(2):65–9.
19. Travis RC, Key TJ. Oestrogen exposure and breast cancer risk. *Breast Cancer Res.* 2003;5(5):239–47.
20. Salehi F, Turner MC, Phillips KP, Wigle DT, Krewski D, Aronson KJ. Review of the etiology of breast cancer with special attention to organochlorines as potential endocrine

disruptors. *J Toxicol Environ Heal - Part B Crit Rev.* 2008;11(3–4):276–300.

21. Cavalieri E, Chakravarti D, Guttenplan J, Hart E, Ingle J, Jankowiak R, et al. Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: Implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2006;1766(1):63–78.

22. Lovett JL, Chima MA, Wexler JK, Arslanian KJ, Friedman AB, Yousif CB, et al. Oral contraceptives cause evolutionarily novel increases in hormone exposure. *Evol Med Public Heal.* 2017;2017(1):97–108.

23. Karim SM, Baeshen W, Neamatullah SN, Bin B. Oral contraceptives, abortion and breast cancer risk: A case control study in Saudi Arabia. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2015;16(9):3957–60.

24. Mørch LS, Skovlund CW, Hannaford PC, Iversen L, Fielding S, Lidegaard Ø. Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2017;377(23):2228–39.

25. Margan MM, Jitariu AA, Cimpean AM, Nica C, Raica M. Molecular portrait of the normal human breast tissue and its influence on breast carcinogenesis. *J Breast Cancer.* 2016;19(2):99–111.

26. Yuan G, Zhang J, Ren Y, Ding W, Du Y, Zhang L, et al. Dietary effects on breast cancer molecular subtypes, a 1:2 paired case–control study. *Food Sci Nutr.* 2020;8(10):5545–9.

27. Tamimi RM, Spiegelman D, Smith-Warner SA, Wang M, Pazaris M, Willett WC, et al. Population attributable risk of modifiable and nonmodifiable breast cancer risk factors in postmenopausal breast cancer. *Am J Epidemiol.* 2016;184(12):884–93.

28. Michels KB, Xue F. Role of birthweight in the etiology of breast cancer. *Int J Cancer.* 2006;119(9):2007–25.

29. Ross MH, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology.* Wolters Kluwer Health; 2016. 866–872 p.

30. Hilton HN, Clarke CL, Graham JD. Estrogen and progesterone signalling in the normal breast and its implications for cancer development. *Mol Cell Endocrinol .* 2018;466:2–14.

31. Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch.* 2014;465(1):1–14.

32. Makki J. Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. *Clin Med Insights Pathol.* 2015;8(1):23–31.

33. Sinn HP, Kreipe H. A brief overview of the WHO classification of breast tumors, 4th edition, focusing on issues and updates from the 3rd edition. *Breast Care.* 2013;8(2):149–54.

34. McCart Reed AE, Kalaw E, Reid A, Lakhani SR. Breast cancer: Pathology and genetics . 3rd ed. *Encyclopedia of Cancer.* Elsevier Inc.; 2018. 170–183 p.

35. King TA, Pilewskie M, Muhsen S, Patil S, Mautner SK, Park A, et al. Lobular carcinoma *in situ*: A 29-year longitudinal experience evaluating clinicopathologic features and breast cancer risk. *J Clin Oncol.* 2015;33(33):3945–52.

36. Moinfar F. *Essentials of diagnostic breast pathology.* Springer Berlin Heidelberg; 2007. 192 p.

37. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer.* 1957;11(3):359–77.

38. Zaha DC. Significance of immunohistochemistry in breast cancer. *World J Clin Oncol.* 2014;5(3):382–92.

39. Yaşar P, Ayaz G, User SD, Güpür G, Muyan M. Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol.* 2017;16(1):4–20.
40. Lipovka Y, Konhilas JP. The complex nature of oestrogen signalling in breast cancer: Enemy or ally? *Biosci Rep.* 2016;36(3):1–10.
41. Awolaran OT. Cellular Mechanisms of Oestrogen in Breast Cancer Development. *Open Access J Sci Technol.* 2015;3.
42. Ricketts D, Turnbull L, Ryall G, Bakhshi R, Rawson NSB, Gazet JC, et al. Estrogen and Progesterone Receptors in the Normal Female Breast. *Cancer Res.* 1991;51(7):1817–22.
43. Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KCN, Richard Lyttle C, Katzenellenbogen BS. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: Insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology.* 2003;144(10):4562–74.
44. Clarke RB, Howell A, Anderson CSPE. Dissociation between Steroid Receptor Expression and Cell Proliferation in the Human Breast. *Cancer Res.* 1997;57(22):4987–91.
45. Roger P, Sahla ME, Mäkelä S, Gustafsson JÅ, Baldet P, Rochefort H. Decreased expression of estrogen receptor β protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res.* 2001;61(6):2537–41.
46. Li S, Han B, Liu G, Li S, Ouellet J, Labrie F, et al. Immunocytochemical localization of sex steroid hormone receptors in normal human mammary gland. *J Histochem Cytochem.* 2010;58(6):509–15.
47. Allred C, Harvey JM, MD B, Clark G. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol.* 1998;11:155–68.
48. Takuya M. Pathology of female cancers. Springer Nature Singapore; 2018. 86 p.
49. Fulga V. Eterogenitatea tipurilor histologice a cancerului de sân: origini, cauze și aplicare practică. Chișinău: Impresum; 2016. 25 p.
50. Bos R, Zhong H, Semenza GL, Herbert M, Abeloff MD, Simons W, et al. Levels of Hypoxia-Inducible AND. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(4):309–14.
51. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89–95.
52. Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol.* 2003;21(10):1973–9.
53. Tomaskovic-Crook E, Thompson EW, Thiery JP. Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2009;11(6).
54. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol.* 2020;27(1):27–35.
55. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart MJ, et al. Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol.* 2015;26(8):1533–46.
56. Ribatti D, Nico B, Ruggieri S, Tamma R, Simone G, Mangia A. Angiogenesis and antiangiogenesis in triple-negative breast cancer. *Transl Oncol.* 2016;9(5):453–7.
57. Zuazo-Gaztelu I, Casanovas O. Unraveling the role of angiogenesis in cancer ecosystems.

Front Oncol. 2018;8(JUL):1–13.

58. Rossi FW, Prevede N, Rivellese F, Napolitano F, Montuori N, Postiglione L, et al. The Urokinase/Urokinase Receptor System in Mast Cells: Effects of its Functional Interaction with fMLF Receptors. *Transl Med @ UniSa*. 2016;15(5):34–41.

59. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009;30(7):1073–81.

60. Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, et al. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol*. 2008;26(27):4410–7.

61. Dushyanthen S, Beavis PA, Savas P, Teo ZL, Zhou C, Mansour M, et al. Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *BMC Med*. 2015;13(1):1–13.

62. Stanton SE, Disis ML. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer*. 2016;4(1):1–7.

63. Mahmoud SMA, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AHS, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):1949–55.

64. Ravelli A, Roviello G, Cretella D, Cavazzoni A, Biondi A, Cappelletti MR, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and breast cancer: Beyond the prognostic and predictive utility. *Tumor Biol*. 2017;39(4).

65. Kim CH. FOXP3 and its role in the immune system. *Adv Exp Med Biol*. 2009;665:17–29.

66. Aponte-López A, Muñoz-Cruz S. Mast Cells in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1273(June 2019):159–73.

67. Pagès F, Kirilovskiy A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, et al. *In situ* cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(35):5944–51.

68. Hwang WT, Adams SF, Tahirovic E, Hagemann IS, Coukos G. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: A meta-analysis. *Gynecol Oncol*. 2012;124(2):192–8.

69. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(1):105–13.

70. Winter A, Becker J, Loehl F, Rehlich K, Simrock S, Tege P. An integrated optical timing and rf reference distribution system for large-scale linear accelerators. *23rd Int Linear Accel Conf LINAC 2006 - Proc*. 2006;9(3):565–7.

71. Linde N, Casanova-Acebes M, Sosa MS, Mortha A, Rahman A, Farias E, et al. Macrophages orchestrate breast cancer early dissemination and metastasis. *Nat Commun*. 2018;9(1):1–14.

72. Williams CB, Yeh ES, Soloff AC. Tumor-associated macrophages: Unwitting accomplices in breast cancer malignancy. *npj Breast Cancer*. 2016;2(1).

73. Sousa S, Brion R, Lintunen M, Kronqvist P, Sandholm J, Mönkkönen J, et al. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast Cancer Res*. 2015;17(1):1–14.

74. Mills CD. Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages. *Front Immunol.* 2015;6(MAY):1–12.
75. Jayasingam SD, Citartan M, Thang TH, Mat Zin AA, Ang KC, Ch'ng ES. Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice. *Front Oncol.* 2020;9(January):1–9.
76. De Palma M, Lewis CE. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell.* 2013;23(3):277–86.
77. Ran S, Montgomery KE. Macrophage-mediated lymphangiogenesis: The emerging role of macrophages as lymphatic endothelial progenitors. *Cancers (Basel).* 2012;4(3):618–57.
78. Globa T. Angiogeneza și mastocitele în leziunile proliferative benigne de prostată. Probleme actuale ale Morfologiei. *Materialele Conferinței Științifice Internaționale dedicată celor 70 ani la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu", Chișinău.* 2015; pp. 64–70.
79. Varricchi G, Galdiero MR, Loffredo S, Marone G, Iannone R, Marone G, et al. Are mast cells MASTers in cancer? *Front Immunol.* 2017;8(424):1–13.
80. Keser SH, Kandemir NO, Ece D, Gecmen GG, Gul AE, Barisik NO, et al. Relationship of mast cell density with lymphangiogenesis and prognostic parameters in breast carcinoma. *Kaohsiung J Med Sci.* 2017;33(4):171–80.
81. Aponte-López A, Fuentes-Pananá EM, Cortes-Muñoz D, Muñoz-Cruz S. Mast Cell, the Neglected Member of the Tumor Microenvironment: Role in Breast Cancer. *J Immunol Res.* 2018;2018(2584243).
82. Juremalm M, Nilsson G. Chemokine receptor expression by mast cells. *Chem Immunol Allergy.* 2005;87:130–44.
83. Melillo RM, Guarino V, Avilla E, Galdiero MR, Liotti F, Prevete N, et al. Mast cells have a protumorigenic role in human thyroid cancer. *Oncogene.* 2010;29(47):6203–15.
84. Ammendola M, Marech I, Sammarco G, Zuccalà V, Luposella M, Zizzo N, et al. Infiltrating mast cells correlate with angiogenesis in bone metastases from gastric cancer patients. *Int J Mol Sci.* 2015;16(2):3237–50.
85. Strouch MJ, Cheon EC, Salabat MR, Krantz SB, Gounaris E, Melstrom LG, et al. Crosstalk between mast cells and pancreatic cancer cells contributes to pancreatic tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2010;16(8):2257–65.
86. Rao Q, Chen Y, Yeh C-R, Ding J, Li L, Chang C, et al. Recruited mast cells in the tumor microenvironment enhance bladder cancer metastasis via modulation of ERβ/CCL2/CCR2 EMT/MMP9 signals. *Oncotarget.* 2016;7(7):20–2.
87. Cebanu A, Șaptefrați L, Mazuru V, Globa T, David V, Rudico L. The lymphangiogenic role of mast cells in premalignant and malignant lesions of uterine cervix. *Analele Științifice ale USMF „N Testemițanu”.* 2011;1(12):168–73.
88. Andersen MD, Kamper P, Nielsen PS, Bendix K, Riber-Hansen R, Steiniche T, et al. Tumour-associated mast cells in classical Hodgkin's lymphoma: Correlation with histological subtype, other tumour-infiltrating inflammatory cell subsets and outcome. *Eur J Haematol.* 2016;96(3):252–9.
89. Franco G, Guarnotta C, Frossi B, Piccaluga PP, Boveri E, Gulino A, et al. Bone marrow stroma CD40 expression correlates with inflammatory mast cell infiltration and disease progression in splenic marginal zone lymphoma. *Blood.* 2014;123(12):1836–49.

90. Hanes MR, Giacomantonio CA, Marshall JS. Mast Cells and Skin and Breast Cancers: A Complicated and Microenvironment-Dependent Role. *Cells*. 2021;10(5):1–21.
91. Majorini MT, Cancila V, Rigoni A, Botti L, Dugo M, Triulzi T, et al. Infiltrating mast cell–mediated stimulation of estrogen receptor activity in breast cancer cells promotes the luminal phenotype. *Cancer Res*. 2020;80(11):2311–24.
92. Della Rovere F, Granata A, Familiari D, D’Arrigo G, Mondello B, Basile G. Mast cells in invasive ductal breast cancer: Different behavior in high and minimum hormone-receptive cancers. *Anticancer Res*. 2007;27(4 B):2465–71.
93. Cimpean AM, Tamma R, Ruggieri S, Nico B, Toma A, Ribatti D. Mast cells in breast cancer angiogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;115:23–6.
94. Johansson A, Rudolfsson S, Hammarsten P, Halin S, Pietras K, Jones J, et al. Mast cells are novel independent prognostic markers in prostate cancer and represent a target for therapy. *Am J Pathol*. 2010;177(2):1031–41.
95. Aponte-López A, Fuentes-Pananá EM, Cortes-Muñoz D, Muñoz-Cruz S. Mast Cell, the Neglected Member of the Tumor Microenvironment: Role in Breast Cancer. *J Immunol Res*. 2018;2018.
96. Kankkunen JP, Harvima IT, Naukkarinen A. Quantitative analysis of tryptase and chymase containing mast cells in benign and malignant breast lesions. *Int J Cancer*. 1997;72(3):385–8.
97. Michea P, Noël F, Zakine E, Czerwinska U, Sirven P, Abouzid O, et al. Adjustment of dendritic cells to the breast-cancer microenvironment is subset specific. *Nat Immunol* . 2018;19(8):885–97.
98. Collin M, Mcgovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology*. 2013;140(1):22–30.
99. Globa T, Globa L, David V, Globa P, Pelin E, Saptefrati L. Macrophages and dendritic cells density correlates with depth of invasion in the prostate carcinoma. *Mold Med J*. 2020;63(4):27–34.
100. Chen X, Shao Q, Hao S, Zhao Z, Wang Y, Guo X, et al. CTLA-4 positive breast cancer cells suppress dendritic cells maturation and function. *Oncotarget*. 2017;8(8):13703–15.
101. Zhang S, Wang Z, Liu W, Lei R, Shan J, Li L, et al. Distinct prognostic values of S100 mRNA expression in breast cancer. *Sci Rep* . 2017;7(September 2016):1–11.
102. Kuberappa PH, Bagalad BS, Ananthaneni A, Kiresur MA, Srinivas GV. Certainty of S100 from physiology to pathology. Vol. 10, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*; 2016. p. 10–5.
103. Pandey PR, Jamila S, Watabe K. Role of myoepithelial cells in breast tumor progression. *Front Biosci* . 2011; 15:226–36.
104. Gudjonsson T, Adriance MC, Sternlicht MD, Petersen OW, Bissell MJ. Myoepithelial cells: their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005;10(3):261–72.
105. **Carpenco E**. The key players of tumor microenvironment and their role in breast cancer. *Mold Med J*. 2019;62(3):67–71.
106. Pandey PR, Saidou J, Watabe K. Role of myoepithelial cells in breast tumor progression. *Front Biosci*. 2010;15(1):226–36.
107. Place AE, Jin Huh S, Polyak K. The microenvironment in breast cancer progression:

biology and implications for treatment. *Breast Cancer Res* . 2011;13(6):227.

108. Yu Y, Xiao CH, Tan LD, Wang QS, Li XQ, Feng YM. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- β signalling. *Br J Cancer*. 2014;110(3):724–32.

109. Ishii G, Ochiai A, Neri S. Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment. *Adv Drug Deliv Rev* . 2016;99:186–96.

110. LeBleu *VERSUS*, Kalluri R. A peek into cancer-associated fibroblasts: Origins, functions and translational impact. *Dis Model Mech*. 2018;11(4):1–9.

111. Custódio M, Biddle A, Tavassoli M. Portrait of a CAF: The story of cancer-associated fibroblasts in head and neck cancer. *Oral Oncol* . 2020;110(August):104972.

112. Costa A, Kieffer Y, Scholer-Dahirel A, Pelon F, Bourachot B, Cardon M, et al. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell*. 2018 Mar;33(3):463-479.e10.

113. Aboussekhra A. Role of cancer-associated fibroblasts in breast cancer development and prognosis. *Int J Dev Biol*. 2011;55(7–9):841–9.

114. Gao Y, Li X, Zeng C, Liu C, Hao Q, Li W, et al. CD63+ Cancer-Associated Fibroblasts Confer Tamoxifen Resistance to Breast Cancer Cells through Exosomal miR-22. *Adv Sci*. 2020;7(21):1–17.

115. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*. 2012;196(4):395–406.

116. Insua-Rodríguez J, Oskarsson T. The extracellular matrix in breast cancer. *Adv Drug Deliv Rev* . 2016;97:41–55.

117. Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Keely PJ. Matrix density-induced mechanoregulation of breast cell phenotype, signaling and gene expression through a FAK-ERK linkage. *Oncogene*. 2009;28(49):4326–43.

118. Streuli CH, Edwards GM. Control of Normal Mammary Epithelial Phenotype by Integrins. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1998;3(2):151–63.

119. Gudjonsson T, Rønnov-jessen L, Villadsen R, Rank F, Mina J, Petersen OW. Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *J Cell Sci*. 2010;115(Pt 1):39–50.

120. Lintz M, Muñoz A, Reinhart-King CA. The Mechanics of Single Cell and Collective Migration of Tumor Cells. *J Biomech Eng*. 2017;139(2):1–9.

121. Madu CO, Wang S, Madu CO, Lu Y. Angiogenesis in breast cancer progression, diagnosis, and treatment. *J Cancer*. 2020;11(15):4474–94.

122. Bais C, Mueller B, Brady MF, Mannel RS, Burger RA, Wei W, et al. Tumor Microvessel Density as a Potential Predictive Marker for Bevacizumab Benefit: GOG-0218 Biomarker Analyses. *J Natl Cancer Inst*. 2017;109(11):1–10.

123. Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat*. 1995;36(2):169–80.

124. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *Biol Chem*. 1992;267(16):10931–4.

125. Kolte D, McClung JA, Aronow WS. Vasculogenesis and Angiogenesis . *Translational Research in Coronary Artery Disease: Pathophysiology to Treatment*. Elsevier Inc.; 2016. 49–65 p.

126. Relf M, Lejeune S, Scott PAE, Fox S, Smith K, Leek R, et al. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor β -1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary br. *Cancer Res.* 1997;57(5):963–9.
127. Zhan K, Bai L, Hu Q. Selective induction of sprouting and intussusception is associated with the concentration distributions of oxygen and hypoxia-induced VEGF. *Microvasc Res.* 2020;132(March).
128. Lin Y, Huang R, Chen L, Li S, Shi Q, Jordan C, et al. Identification of interleukin-8 as estrogen receptor-regulated factor involved in breast cancer invasion and angiogenesis by protein arrays. *Int J Cancer.* 2004;109(4):507–15.
129. Shahzad A, Knapp M, Lang I, Köhler G. Interleukin 8 (IL-8)-a universal biomarker? *Int Arch Med.* 2010;3(1):2–5.
130. Streit M, Velasco P, Brown LF, Skobe M, Richard L, Riccardi L, et al. Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas. *Am J Pathol.* 1999;155(2):441–52.
131. Rice A, Quinn CM. Angiogenesis, thrombospondin, and ductal carcinoma *in situ* of the breast. *J Clin Pathol.* 2002;55(8):569–74.
132. Moraru S, Cruc D, Șaptefrați L. Angiogeneza tumorală - o abordare complexă și multidisciplinară. *Bul Acad Științe a Mold Științe Medicale.* 2017;56(4):134–41.
133. Lala PK, Nandi P, Majumder M. Roles of prostaglandins in tumor-associated lymphangiogenesis with special reference to breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2018;37(2–3):369–84.
134. Sammarco G, Varricchi G, Ferraro V, Ammendola M, De Fazio M, Altomare DF, et al. Mast cells, angiogenesis and lymphangiogenesis in human gastric cancer. *Int J Mol Sci.* 2019;20(9):2106.
135. Schoppmann SF, Tamandl D, Roberts L, Jomrich G, Schoppmann A, Zwrtek R, et al. HER2/neu expression correlates with vascular endothelial growth factor-C and lymphangiogenesis in lymph node-positive breast cancer. *Ann Oncol.* 2009;21(5):955–60.
136. Špirić Z, Vještica M, Erić M. Survival prediction in patients with cutaneous melanoma by tumour lymphangiogenesis. *Acta Clin Belgica Int J Clin Lab Med.* 2020;75(6):379–87.
137. Paduch R. The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor metastasis. *Cell Oncol.* 2016;39(5):397–410.
138. Zhang S, Zhang D, Yi S, Gong M, Lu C, Cai Y, et al. The relationship of lymphatic vessel density, lymphovascular invasion, and lymph node metastasis in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(2):2863–73.
139. Padera TP, Kadambi A, Di Tomaso E, Mouta Carreira C, Brown EB, Boucher Y, et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science (80-).* 2002;296(5574):1883–6.
140. Leu AJ, Berk DA, Lymboussaki A, Alitalo K, Jain RK. Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: A molecular and functional evaluation. *Cancer Res.* 2000;
141. Vleugel MM, Bos R, Groep P van der, Greijer AE, Shvarts A, Stel H V, et al. Lack of lymphangiogenesis during breast carcinogenesis. *J Clin Pathol.* 2004;57:746–51.
142. Qian CN, Berghuis B, Tsarfaty G, Bruch MB, Kort EJ, Ditlev J, et al. Preparing the “soil”: The primary tumor induces vasculature reorganization in the sentinel lymph node before the arrival of metastatic cancer cells. *Cancer Res.* 2006;66(21):10365–76.

143. Karnezis T, Shayan R, Fox S, Achen MG, Stacker SA. The connection between lymphangiogenic signalling and prostaglandin biology: A missing link in the metastatic pathway. *Oncotarget*. 2012;3(8):890–903.
144. Lyons TR, Schedin PJ, Borges VF. Pregnancy and breast cancer: When they collide. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2009;14(2):87–98.
145. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett MS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer : American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol*. 2019;36(20):2105–22.
146. Azoulay S, Laé M, Fréneaux P, Merle S, Al Ghuzlan A, Chnecker C, et al. KIT is highly expressed in adenoid cystic carcinoma of the breast, a basal-like carcinoma associated with a favorable outcome. *Mod Pathol*. 2005;18(12):1623–31.
147. Dako. EGFR pharmDx. In: *Dako EGFR pharmDx Interpretation Manual*. 2006. p. 10–2.
148. Harder J, Waiz O, Otto F, Geissler M, Olschewski M, Weinhold B, et al. EGFR and HER2 expression in advanced biliary tract cancer. *World J Gastroenterol*. 2009;15(36):4511–7.
149. Suciú C, Muresan A, Cornea R, Suciú O, Dema A, Raica M. Semi-automated evaluation of Ki-67 index in invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncol Lett*. 2014;7(1):107–14.
150. Thomssen C, Balic M, Harbeck N, Gnant M. St. Gallen/Vienna 2021: A brief summary of the consensus discussion on customizing therapies for women with early breast cancer. *Breast Care*. 2021;16(2):135–43.
151. Curigliano G, Burstein HJ, Winer EP, Gnant M, Dubsy P, Loibl S, et al. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: The St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Ann Oncol*. 2017;28(8):1700–12.
152. Lovakov A, Agadullina ER. Empirically derived guidelines for effect size interpretation in social psychology. *Eur J Soc Psychol*. 2021;51(3):485–504.
153. Medrek C, Pontén F, Jirström K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer* . 2012;12(1):1. ???
154. Zhang Y, Cheng S, Zhang M, Zhen L, Pang D, Zhang Q, et al. High-Infiltration of Tumor-Associated Macrophages Predicts Unfavorable Clinical Outcome for Node-Negative Breast Cancer. *PLoS One*. 2013;8(9):1–8.
155. Jeremiasen M, Borg D, Hedner C, Svensson M, Nodin B, Leandersson K, et al. Tumor-Associated CD68+, CD163+, and MARCO+ Macrophages as Prognostic Biomarkers in Patients With Treatment-Naïve Gastroesophageal Adenocarcinoma. *Front Oncol*. 2020;10(October).
156. Sang J, Yi D, Tang X, Zhang Y, Huang T. The associations between mast cell infiltration, clinical features and molecular types of invasive breast cancer. *Oncotarget*. 2016;7(49):81661–9.
157. Lindsten T, Hedbrant A, Ramberg A, Wijkander J, Solterbeck A, Eriksson M, et al. Effect of macrophages on breast cancer cell proliferation, and on expression of hormone receptors, uPAR and HER-2. *Int J Oncol*. 2017;51(1):104–14.
158. Salemme V, Centonze G, Cavallo F, Defilippi P, Conti L. The Crosstalk Between Tumor Cells and the Immune Microenvironment in Breast Cancer: Implications for Immunotherapy. *Front Oncol*. 2021;11(March):1–20.
159. Jeong H, Hwang I, Kang SH, Shin HC, Kwon SY. Tumor-associated macrophages as

potential prognostic biomarkers of invasive breast cancer. *J Breast Cancer*. 2019;22(1):38–51.

160. Hollmén M, Roudnicky F, Karaman S, Detmar M. Characterization of macrophage - Cancer cell crosstalk in estrogen receptor positive and triple-negative breast cancer. *Sci Rep*. 2015;5:1–10.

161. Stossi F, Madak-Erdoğan Z, Katzenellenbogen BS. Macrophage-elicited loss of estrogen receptor- α in breast cancer cells via involvement of MAPK and c-Jun at the ESR1 genomic locus. *Oncogene*. 2012;31(14):1825–34.

162. Campbell L, Emmerson E, Williams H, Saville CR, Krust A, Chambon P, et al. Estrogen receptor-alpha promotes alternative macrophage activation during cutaneous repair. *J Invest Dermatol*. 2014;134(9):2447–57.

163. Pepe G, Locati M, Della Torre S, Mornata F, Cignarella A, Maggi A, et al. The estrogen-macrophage interplay in the homeostasis of the female reproductive tract. *Hum Reprod Update*. 2018;24(6):652–72.

164. Șaptefrați L, Mazuru V, Rudico L, David V, Fulga V. Densitatea macrofagelor în cadrul progresiei neoplaziei de cervix uterin. *Analele Științifice ale USMF „N Testemițanu”*. 2012;13(1):32–7.

165. Klingen TA, Chen Y, Aas H, Wik E, Akslen LA. Tumor-associated macrophages are strongly related to vascular invasion, non-luminal subtypes, and interval breast cancer. *Hum Pathol* . 2017;69:72–80.

166. Globa T, Globa L, Pelin E, Globa P, David V. Analiza imunohistochimică a macrofagelor CD68+ din stroma carcinomului de prostată. *Probl actuale ale Morfol Mater Conferinței Științifice Internaționale dedicată celor 70 ani la fondarea Univ Stat Med și Farm “Nicolae Testemițanu”, Chișinău*. 2020;63–7.

167. Takeya M, Komohara Y. Role of tumor-associated macrophages in human malignancies: friend or foe? *Pathol Int*. 2016;66(9):491–505.

168. Alishekevitz D, Gingis-Velitski S, Kaidar-Person O, Gutter-Kapon L, Scherer SD, Raviv Z, et al. Macrophage-Induced Lymphangiogenesis and Metastasis following Paclitaxel Chemotherapy Is Regulated by VEGFR3. *Cell Rep* . 2016;17(5):1344–56.

169. Timaner M, Bril R, Kaidar-Person O, Rachman-Tzemah C, Alishekevitz D, Kotsifruk R, et al. Dequalinium blocks macrophage-induced metastasis following local radiation. *Oncotarget*. 2015;6(29):27537–54.

170. Allgöwer C, Kretz AL, von Karstedt S, Wittau M, Henne-Bruns D, Lemke J. Friend or foe: S100 proteins in cancer. Vol. 12, *Cancers*. 2020. 1–38 p.

171. Miguel Nava, Zemke NR, Berk A, Farias-Eisner R, Vadgama J, Wu Y. Abstract 362: EGFR signaling activates S100 gene expression in HER2-positive breast cancer cells. *Cancer Res*. 2018;78(13):362.

172. Koido S. Dendritic-tumor fusion cell-based cancer vaccines. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6).

173. Bastida-Ruiz D, Van Hoesen K, Cohen M. The dark side of cell fusion. *Int J Mol Sci*. 2016;17(5).

174. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev Y V. CD68/macrosialin: Not just a histochemical marker. *Lab Investig*. 2017;97(1):4–13.

175. Tamma R, Guidolin D, Annese T, Tortorella C, Ruggieri S, Rega S, et al. Spatial distribution of mast cells and macrophages around tumor glands in human breast ductal carcinoma. *Exp Cell Res* . 2017;359(1):179–84.

176. **Carpenco E**, Ceaușu RA, Cimpean AM, Gaje PN, Șaptefrați L, Fulga V, et al. Mast cells as an indicator and prognostic marker in molecular subtypes of breast cancer. *In vivo*. 2019; 33(3):743-748.
177. Ammendola M, Patruno R, Sacco R, Marech I, Sammarco G, Zuccalà V, et al. Mast cells positive to tryptase and tumour-associated macrophages correlate with angiogenesis in locally advanced colorectal cancer patients undergone to surgery. *Expert Opin Ther Targets*. 2016;20(5):533–40.
178. Glajcar A, Szpor J, Pacek A, Tyrak KE, Chan F, Streb J, et al. The relationship between breast cancer molecular subtypes and mast cell populations in tumor microenvironment. *Virchows Arch*. 2017;470(5):505–15.
179. da Silva EZM, Jamur MC, Oliver C. Mast Cell Function: A New Vision of an Old Cell. Vol. 62, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2014. 698–738 p.
180. Dabiri S, Huntsman D, Makretsov N, Cheang M, Gilks B, Badjik C, et al. The presence of stromal mast cells identifies a subset of invasive breast cancers with a favorable prognosis. *Mod Pathol*. 2004;17(6):690–5.
181. Rajput AB, Turbin DA, Cheang MC, Voduc DK, Leung S, Gelmon KA, et al. Stromal mast cells in invasive breast cancer are a marker of favourable prognosis: A study of 4,444 cases. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;107(2):249–57.
182. Zhu T, Shao-Jie D, Tian-Tian L, Li-Bo Z, Xiu-Feng H, Xin-Mei Z. Estrogen is an important mediator of mast cell activation in ovarian endometriomas. *Reproduction*. 2016;155(1):73–83.
183. De Leo B, Esnal-Zufiaurre A, Collins F, Critchley HOD, Saunders PTK. Immunoprofiling of human uterine mast cells identifies three phenotypes and expression of ER β and glucocorticoid receptor. *F1000Res*. 2017;6(667):1–19.
184. Costin N, Malutan A, Ciortea R, Trif IA, Nagy AL. Histological changes in the vulva and vagina from ovariectomised rats undergoing oestrogen treatment. *Folia Morphol*. 2016;75(4):467–73.
185. Globa T, Șaptefrați L, Ceaușu RA, Gaje PN, Cimpean AM, Raica M. Mast cell phenotype in benign and malignant tumors of the prostate. *Polish J Pathol*. 2014;65(2):147–53.
186. Xiang M, Gu Y, Zhao F, Lu H, Chen S, Yin L. Mast cell tryptase promotes breast cancer migration and invasion. *Oncol Rep*. 2010;23(3):615–9.
187. Raica M, Cimpean AM, Ceaușu R, Ribatti D, Gaje P. Interplay between mast cells and lymphatic vessels in different molecular types of breast cancer. *Anticancer Res*. 2013;33(3):957–64.
188. Khosravi A, Shahrabi S, Shahjehani M, Saki N. The bone marrow metastasis niche in retinoblastoma. *Cell Oncol*. 2015;38(4):253–63.
189. Yamagata Y, Tomioka H, Sakamoto K, Sato K, Harada H, Ikeda T, et al. CD163-Positive Macrophages Within the Tumor Stroma Are Associated With Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2017;75(10):2144–53.
190. Zhang S, Zhang D, Gong M, Wen L, Liao C, Zou L. High lymphatic vessel density and presence of lymphovascular invasion both predict poor prognosis in breast cancer. *BMC Cancer*. 2017;17(1):1–8.
191. Ribatti D, Finato N, Crivellato E, Guidolin D, Longo V, Mangieri D, et al. Angiogenesis and mast cells in human breast cancer sentinel lymph nodes with and without micrometastases.

Histopathology. 2007;51(6):837–42.

192. Mangia A, Malfettone A, Rossi R, Paradiso A, Ranieri G, Simone G, et al. Tissue remodelling in breast cancer: Human mast cell tryptase as an initiator of myofibroblast differentiation. *Histopathology*. 2011;58(7):1096–106.

193. Pittoni P, Tripodo C, Piconese S, Mauri G, Parenza M, Rigoni A, et al. Mast cell targeting hampers prostate adenocarcinoma development but promotes the occurrence of highly malignant neuroendocrine cancers. *Cancer Res*. 2011;71(18):5987–97.

194. Samoszuk M, Corwin MA. Mast cell inhibitor cromolyn increases blood clotting and hypoxia in murine breast cancer. *Int J Cancer*. 2003;107(1):159–63.

195. Samoszuk M, Corwin MA. Acceleration of tumor growth and peri-tumoral blood clotting by imatinib mesylate (GleevecTM). *Int J Cancer*. 2003;106(5):647–52.

196. Cimpean AM, Tamma R, Ruggieri S, Nico B, Toma A, Ribatti D. Mast cells in breast cancer angiogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2017;115:23–6.

197. Sozzani S, Rusnati M, Riboldi E, Mitola S, Presta M. Dendritic cell-endothelial cell cross-talk in angiogenesis. *Trends Immunol*. 2007;28(9):385–92.

198. van der Schaft DWJ, Pauwels P, Hulsmans S, Zimmermann M, van de Poll-Franse L V., Griffioen AW. Absence of lymphangiogenesis in ductal breast cancer at the primary tumor site. *Cancer Lett*. 2007;254(1):128–36.

199. Zhang S, Yi S, Zhang D, Gong M, Cai Y, Zou L. Intratumoral and peritumoral lymphatic vessel density both correlate with lymph node metastasis in breast cancer. *Sci Rep* 2017;7(December 2016):1–7.

200. Pathak AP, Bhujwalla ZM, Pepper MS. Visualizing function in the tumor-associated lymphatic system. *Lymphat Res Biol*. 2004;2(4):165–72.

201. Van Der Auwera I, Van Den Eynden GG, Colpaert CG, Van Laere SJ, Van Dam P, Van Marck EA, et al. Tumor lymphangiogenesis in inflammatory breast carcinoma: A histomorphometric study. *Clin Cancer Res*. 2005;11(21):7637–42.

202. Mohammed RAA, Ellis IO, Elsheikh S, Paish EC, Martin SG. Lymphatic and angiogenic characteristics in breast cancer: Morphometric analysis and prognostic implications. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;113(2):261–73.

203. Duong T, Koopman P, Francois M. Tumor lymphangiogenesis as a potential therapeutic target. *J Oncol*. 2012;2012.

204. Evans MJ, Harris HA, Miller CP, Karathanasis SK, Adelman SJ. Estrogen receptors α and β have similar activities in multiple endothelial cell pathways. *Endocrinology*. 2002;143(10):3785–95.

205. Morfoisse F, Tatin F, Chaput B, Therville N, Vaysse C, Métivier R, et al. Lymphatic Vasculature Requires Estrogen Receptor- α Signaling to Protect From Lymphedema. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38:1346–57.

206. Garmy-Susini B. Hormone therapy outcome in lymphedema. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(2):291–2.

207. Cernîi A, Şaptefraţi L. Angiogeneza și limfangiogeneza tumorală. *Bull Acad Sci Mold Med Sci*. 2010;27(4):60–6.

208. Li T, Yang J, Zhou Q, He Y. Molecular regulation of lymphangiogenesis in development and tumor microenvironment. *Cancer Microenviron*. 2012;5(3):249–60.

209. Şaptefraţi L, Mazuru V, Rudico L, David V, Globa T. Expresia factorului de creștere a

endoteliului vascular (VEGF) și a receptorului lui (VEGFR2) în procesul progresiei neoplaziei de cervix uterin. Bul Acad Științe a Mold Științe Medicale. 2012;1(33):49–54.

Anexa 1. Interrelații dintre conținutul vaselor sangvine, limfatice și a elementelor celulare incluse în studiu, analiza cazurilor *per total*

		Subtip	CD68it	CD68pt	S100it	S100pt	MCit	MCpt	CD34it	CD34pt	D2-40it	D2-40pt
Subtip	rs		-,108	,281	,171	,031	-,266	-,201	-,243	,077	,219	,094
	p		,339	,012	,142	,789	,017	,072	,030	,502	,063	,429
	n		80	80	75	75	81	81	80	79	73	73
CD68it	rs	-,108		,139	-,005	,204	,108	,068	,084	,011	,139	-,048
	p	,339		,220	,969	,088	,344	,552	,463	,925	,261	,697
	n	80		80	71	71	79	79	78	77	67	67
CD68pt	rs	,281	,139		,127	,258	-,248	-,216	-,260	-,150	,106	-,148
	p	,012	,220		,291	,030	,028	,056	,021	,192	,392	,233
	n	80	80		71	71	79	79	78	77	67	67
S100it	rs	,171	-,005	,127		,349	,137	,077	,094	,187	,087	,011
	p	,142	,969	,291		,002	,251	,518	,431	,119	,495	,929
	n	75	71	71		75	72	72	72	71	64	64
S100pt	rs	,031	,204	,258	,349		,109	,155	,079	,142	-,081	-,013
	p	,789	,088	,030	,002		,360	,193	,508	,239	,524	,917
	n	75	71	71	75		72	72	72	71	64	64
MCit	rs	-,266	,108	-,248	,137	,109		,506	,384	,148	,036	,237
	p	,017	,344	,028	,251	,360		,0000014	,001	,200	,767	,050
	n	81	79	79	72	72		81	78	77	69	69
MCpt	rs	-,201	,068	-,216	,077	,155	,506		,232	,349	,061	,309
	p	,072	,552	,056	,518	,193	,0000014		,041	,002	,616	,010
	n	81	79	79	72	72	81		78	77	69	69
CD34it	rs	-,243	,084	-,260	,094	,079	,384	,232		,186	-,149	,086
	p	,030	,463	,021	,431	,508	,001	,041		,101	,224	,483
	n	80	78	78	72	72	78	78		79	68	68
CD34pt	rs	,077	,011	-,150	,187	,142	,148	,349	,186		,031	,261
	p	,502	,925	,192	,119	,239	,200	,002	,101		,805	,033
	n	79	77	77	71	71	77	77	79		67	67
D2-40it	rs	,219	,139	,106	,087	-,081	,036	,061	-,149	,031		,303
	p	,063	,261	,392	,495	,524	,767	,616	,224	,805		,009
	n	73	67	67	64	64	69	69	68	67		73

		Subtip	CD68it	CD68pt	S100it	S100pt	MCit	MCpt	CD34it	CD34pt	D2-40it	D2-40pt
D2-40pt	rs	,094	-,048	-,148	,011	-,013	,237	,309	,086	,261	,303	
	p	,429	,697	,233	,929	,917	,05	,01	,483	,033	,009	
	n	73	67	67	64	64	69	69	68	67	73	

Notă: subtip – subtipul molecular al tumorii, CD68it – celule CD68+ intratumorale, CD68pt – celule CD68+ peritumorale, S100it – celule S100+ intratumorale, S100pt – celule S100+ peritumorale, MCit – mastocite triptază+ intratumorale, MCpt – mastocite triptază+ peritumorale, CD34it – vase sangvine cu sediu intratumoral, CD34pt – vase sangvine cu sediu peritumoral, D2-40it – limfatice cu sediu intratumoral, D2-40pt – limfatice cu sediu peritumoral, rs – coeficientul de corelație al lui Spearman, n – numărul de cazuri analizate. Rezultatele semnificative statistic au fost marcate prin **bold**.

Anexa 2. Interrelații dintre conținutul vaselor sangvine, limfatice și a elementelor celulare incluse în studiu, subtipul luminal A

		CD68it	CD68pt	S100it	S100pt	MCit	MCpt	CD34it	CD34pt	D2-40it	D2-40pt
CD68it	rs		,326	-,075	,251	-,219	,064	-,320	-,237	,000	-,402
	p		,256	,798	,386	,451	,829	,264	,416	1,000	,195
	n		14	14	14	14	14	14	14	12	12
CD68pt	rs	,326		-,540	-,274	-,280	,309	-,484	-,016	-,267	-,299
	p	,256		,046	,344	,333	,283	,080	,956	,401	,345
	n	14		14	14	14	14	14	14	12	12
S100it	rs	-,075	-,540		,433	,072	-,245	,430	,162	-,179	,164
	p	,798	,046		,107	,806	,398	,124	,579	,559	,593
	n	14	14		15	14	14	14	14	13	13
S100pt	rs	,251	-,274	,433		,219	,096	,344	-,046	,090	-,024
	p	,386	,344	,107		,452	,744	,229	,877	,771	,938
	n	14	14	15		14	14	14	14	13	13
MCit	rs	-,219	-,280	,072	,219		-,024	,080	,183	,510	,412
	p	,451	,333	,806	,452		,936	,785	,531	,090	,183
	n	14	14	14	14		14	14	14	12	12
MCpt	rs	,064	,309	-,245	,096	-,024		,334	,411	-,088	,737
	p	,829	,283	,398	,744	,936		,243	,145	,786	,006
	n	14	14	14	14	14		14	14	12	12
CD34it	rs	-,320	-,484	,430	,344	,080	,334		,220	-,358	,438
	p	,264	,080	,124	,229	,785	,243		,449	,253	,155
	n	14	14	14	14	14	14		14	12	12
CD34pt	rs	-,237	-,016	,162	-,046	,183	,411	,220		-,097	,789
	p	,416	,956	,579	,877	,531	,145	,449		,765	,002
	n	14	14	14	14	14	14	14		12	12
D2-40it	rs	,000	-,267	-,179	,090	,510	-,088	-,358	-,097		,247
	p	1,000	,401	,559	,771	,090	,786	,253	,765		,416
	n	12	12	13	13	12	12	12	12		13

D2-40pt	rs	-,402	-,299	,164	-,024	,412	,737	,438	,789	,247	
	p	,195	,345	,593	,938	,183	,006	,155	,002	,416	
	n	12	12	13	13	12	12	12	12	13	

Notă: CD68it – celule CD68+ intratumorale, CD68pt – celule CD68+ peritumorale, S100it – celule S100+ intratumorale, S100pt – celule S100+ peritumorale, MCit – mastocite triptază+ intratumorale, MCpt – mastocite triptază+ peritumorale, CD34it – vase sangvine intratumorale, CD34pt – vase sangvine peritumorale, D2-40it – limfatice cu sediu intratumoral, D2-40pt – limfatice cu sediu peritumoral, rs – coeficientul de corelație al lui Spearman, n – numărul de cazuri analizate. Rezultatele semnificative statistic au fost marcate prin **bold**.

Anexa 3. Interrelații dintre conținutul vaselor sangvine, limfatice și a elementelor celulare incluse în studiu, subtipul luminal B

		CD68it	CD68pt	S100it	S100pt	MCit	MCpt	CD34it	CD34pt	D2-40it	D2-40pt
CD68it	rs		,228	-,077	,284	,269	,108	,203	,093	,046	-,229
	p		,128	,642	,080	,073	,478	,186	,552	,791	,179
	n		46	39	39	45	45	44	43	36	36
CD68pt	rs	,228		-,106	,301	-,154	-,125	-,211	-,240	-,108	-,171
	p	,128		,521	,063	,311	,412	,170	,122	,530	,317
	n	46		39	39	45	45	44	43	36	36
S100it	rs	-,077	-,106		,235	,239	,281	,141	,342	,113	-,245
	p	,642	,521		,144	,143	,083	,392	,035	,538	,177
	n	39	39		40	39	39	39	38	32	32
S100pt	rs	,284	,301	,235		,215	,305	,021	,264	-,260	-,057
	p	,080	,063	,144		,189	,059	,900	,110	,151	,756
	n	39	39	40		39	39	39	38	32	32
MCit	rs	,269	-,154	,239	,215		,590	,468	,138	,056	,142
	p	,073	,311	,143	,189		,00001	,002	,384	,742	,401
	n	45	45	39	39		46	43	42	37	37
MCpt	rs	,108	-,125	,281	,305	,590		,222	,358	,258	,203
	p	,478	,412	,083	,059	,00001		,152	,02	,123	,228
	n	45	45	39	39	46		43	42	37	37
CD34it	rs	,203	-,211	,141	,021	,468	,222		,289	-,079	,031
	p	,186	,170	,392	,900	,002	,152		,060	,653	,859
	n	44	44	39	39	43	43		43	35	35
CD34pt	rs	,093	-,240	,342	,264	,138	,358	,289		,039	,174
	p	,552	,122	,035	,110	,384	,02	,060		,828	,325
	n	43	43	38	38	42	42	43		34	34
D2-40it	rs	,046	-,108	,113	-,260	,056	,258	-,079	,039		,219
	p	,791	,530	,538	,151	,742	,123	,653	,828		,186
	n	36	36	32	32	37	37	35	34		38
D2-40pt	rs	-,229	-,171	-,245	-,057	,142	,203	,031	,174	,219	
	p	,179	,317	,177	,756	,401	,228	,859	,325	,186	
	n	36	36	32	32	37	37	35	34	38	

Anexa 4. Interrelații dintre conținutul vaselor sangvine, limfatice și a elementelor celulare incluse în studiu, subtipul HER2+

		CD68it	CD68pt	S100it	S100pt	MCit	MCpt	CD34it	CD34pt	D2-40it	D2-40pt
CD68it	rs		-,243	,252	,418	-,023	-,342	-,023	,023	-,054	,679
	P		,529	,513	,263	,953	,367	,954	,954	,900	,064
	n		9	9	9	9	9	9	9	8	8
CD68pt	rs	-,243		,472	,027	,815	,470	-,124	,124	,860	,344
	p	,529		,200	,945	,007	,202	,750	,750	,006	,404
	n	9		9	9	9	9	9	9	8	8
S100it	rs	,252	,472		,264	,474	,728	-,494	-,293	,466	,274
	p	,513	,200		,493	,197	,026	,177	,444	,244	,511
	n	9	9		9	9	9	9	9	8	8
S100pt	rs	,418	,027	,264		,165	-,068	-,034	-,051	,307	,727
	p	,263	,945	,493		,672	,862	,931	,897	,459	,041
	n	9	9	9		9	9	9	9	8	8
MCit	rs	-,023	,815	,474	,165		,409	,162	,009	,872	,563
	p	,953	,007	,197	,672		,275	,678	,983	,005	,147
	n	9	9	9	9		9	9	9	8	8
MCpt	rs	-,342	,470	,728	-,068	,409		-,133	-,333	,355	-,300
	p	,367	,202	,026	,862	,275		,732	,381	,389	,470
	n	9	9	9	9	9		9	9	8	8
CD34it	rs	-,023	-,124	-,494	-,034	,162	-,133		-,122	-,099	-,275
	p	,954	,750	,177	,931	,678	,732		,738	,799	,474
	n	9	9	9	9	9	9		10	9	9
CD34pt	rs	,023	,124	-,293	-,051	,009	-,333	-,122		,386	,091
	p	,954	,750	,444	,897	,983	,381	,738		,305	,815
	n	9	9	9	9	9	9	10		9	9
D2-40it	rs	-,054	,860	,466	,307	,872	,355	-,099	,386		,358
	p	,900	,006	,244	,459	,005	,389	,799	,305		,344
	n	8	8	8	8	8	8	9	9		9
D2-40pt	rs	,679	,344	,274	,727	,563	-,300	-,275	,091	,358	
	p	,064	,404	,511	,041	,147	,470	,474	,815	,344	
	n	8	8	8	8	8	8	9	9	9	

Anexa 5. Interrelații dintre conținutul vaselor sangvine, limfatice și a elementelor celulare incluse în studiu, subtipul triplu-negativ

		CD68it	CD68pt	S100it	S100pt	MCit	MCpt	CD34it	CD34pt	D2-40it	D2-40pt
CD68it	rs		,469	-,053	,162	-,180	,226	-,039	-,107	,686	,245
	p		,146	,893	,678	,597	,504	,909	,754	,020	,469
	n		11	9	9	11	11	11	11	11	11
CD68pt	rs	,469		,456	,140	-,623	-,306	-,372	-,237	,387	-,277
	p	,146		,217	,720	,041	,360	,260	,484	,240	,410
	n	11		9	9	11	11	11	11	11	11
S100it	rs	-,053	,456		,445	-,030	,030	-,261	-,358	-,285	-,120
	p	,893	,217		,171	,933	,934	,467	,310	,396	,726
	n	9	9		11	10	10	10	10	11	11
S100pt	rs	,162	,140	,445		,170	,185	-,228	-,185	-,140	-,051
	p	,678	,720	,171		,638	,610	,527	,610	,681	,881
	n	9	9	11		10	10	10	10	11	11
MCit	rs	-,180	-,623	-,030	,170		,668	,582	,318	-,448	,380
	p	,597	,041	,933	,638		,018	,047	,314	,144	,223
	n	11	11	10	10		12	12	12	12	12
MCpt	rs	,226	-,306	,030	,185	,668		,466	,501	-,157	,546
	p	,504	,360	,934	,610	,018		,127	,097	,625	,066
	n	11	11	10	10	12		12	12	12	12
CD34it	rs	-,039	-,372	-,261	-,228	,582	,466		,460	-,008	,432
	p	,909	,260	,467	,527	,047	,127		,133	,981	,161
	n	11	11	10	10	12	12		12	12	12
CD34pt	rs	-,107	-,237	-,358	-,185	,318	,501	,460		-,153	,157
	p	,754	,484	,310	,610	,314	,097	,133		,636	,626
	n	11	11	10	10	12	12	12		12	12
D2-40it	rs	,686	,387	-,285	-,140	-,448	-,157	-,008	-,153		,422
	p	,020	,240	,396	,681	,144	,625	,981	,636		,151
	n	11	11	11	11	12	12	12	12		13
D2-40pt	rs	,245	-,277	-,120	-,051	,380	,546	,432	,157	,422	
	p	,469	,410	,726	,881	,223	,066	,161	,626	,151	
	n	11	11	11	11	12	12	12	12	13	

Anexa 6. Densitatea mastocitelor ca factor predictiv și de prognostic în evoluția subtipurilor moleculare de carcinom mamar. Certificat de inovator.



Anexa 7. Act de implementare: Densitatea mastocitelor ca factor predictiv și de prognostic în evoluția subtipurilor moleculare de carcinom mamar.

	<p>USMF „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova Institutul Național de Cercetare în Medicină și Sănătate</p>	Pag. 1/ 1
<p>APPROB Proiectul pentru activitate de cercetare, USMF „Nicolae Testemițanu” din RM academician al ASM, prof. univ. dr. hab. șt. med.  Stanislav GROPPA “ _____ 2022</p>		
<p>ACTUL nr. 90 DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI (în procesul științifico-practic)</p>		
<p>în cadrul tezei de doctor cu genericul „Modificări ale stromei în subtipurile moleculare de cancer mamar”.</p>		
<ol style="list-style-type: none">Denumirea propunerii de implementare: „DENSITATEA MASTOCITELOR CA FACTOR PREDICTIV ȘI DE PROGNOSTIC ÎN EVOLUȚIA SUBTIPURILOR MOLECULARE DE CARCINOM MAMAR”.Autorii: CARPENCO E., cer. șt.; ȘAPTEFRAȚI L., dr. hab. șt. med., prof. universitar; FULGA V., dr. hab. șt. med., conf. universitar; FOCA E., dr. șt. med., conf. universitar; DAVID V., dr. șt. med., conf. universitar.Numărul inovației: Nr. 5967 din 13 decembrie 2022.Unde și când a fost implementată: Laboratorul de Morfologie a USMF “Nicolae Testemițanu”, al doilea semestru al anului 2022.Eficacitatea implementării: metodă accesibilă tehnic și argumentată economic-financiar cu efect pozitiv ce a permis: aplicarea densității diferențiate a mastocitelor intra- și peritumorale în determinarea prognosticului în evoluția subtipurilor moleculare de carcinom mamar cu definitivarea a două categorii: densitate joasă/ înaltă.Obiecții/proponeri: Metodologia elaborată și implementată servește drept componentă a unui protocol în compartimentul diagnostic-morfopatologic în vederea determinării impactului densității mastocitelor ca factor predictiv și de prognostic în evoluția subtipurilor moleculare de carcinom mamar. Are un efect maximal, deschide noi perspective în specificarea deplină a caracteristicilor subtipurilor moleculare a maladiei în cauză. Este rațional de a extinde utilizarea și implementarea metodologiei ca parte componentă a unui protocol clinico-morfologic la nivel național.		
<p>Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere</p>		
Șef laborator Morfologie dr. șt. med., conf. univ.		Valeriu DAVID
Șef Departament Cercetare, conf. univ., dr. hab. șt. med.		Elena RAEVSCHI
COORDONAT:		Eugenia GROZA

INFORMAȚII PRIVIND VALORIFICAREA REZULTATELOR CERCETĂRII

LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI MANIFESTĂRILOR ȘTIINȚIFICE

la care au fost prezentate rezultatele cercetărilor

la teza de doctor în științe medicale,

cu tema „Modificări ale stromei în subtipurile moleculare de cancer mamar”,
realizată în cadrul Catedrei de histologie, citologie și embriologie de dna Carpenco Ecaterina,
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

- **Articole în reviste științifice peste hotare:**

- ✓ **articole în reviste ISI, SCOPUS și alte baze de date internaționale**

1. **Carpenco E.**, Ceausu R. A., Cimpean A. M., Gaje P. N., Saptefrati L., Fulga V., David V., Raica M. Mast cells as an indicator and prognostic marker in molecular subtypes of breast cancer. In: *IN VIVO*. 2019, 33(3):743-748. PMID: 31028192. ISSN: 0258-851X. DOI: <https://doi.org/10.21873/invivo.11534>. (IF 1,541)

- **Articole în reviste științifice naționale acreditate:**

- ✓ **articole în reviste de categoria B+**

2. **Carpenco E.** Tumor associated macrophages in breast cancer. In: *Moldovan Medical Journal*, 2019, 62(1):24-27. ISSN 2537-6373. https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/75800
3. **Carpenco E.** The key players of tumor microenvironment and their role in breast cancer. In: *Moldovan Medical Journal*, 2019, 62(3):67-71. ISSN 2537-6373. https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/84122
4. **Carpenco E.** S100 protein in molecular subtypes of breast cancer. In: *Moldovan Medical Journal*, 2020, 63(5):15-18. ISSN 2537-6373. https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/116021
5. **Carpenco E.**, Fulga V., David V., Foca E., Șaptefrăți L. Mast cells in luminal versus non-luminal breast cancers. In: *Moldovan Medical Journal*, 2021, 64(4):35-38. ISSN 2537-6373. https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/140666

- ✓ **articole în reviste de categoria B**

6. **Carpenco E.**, Fulga V., Șaptefrăți L. Peculiarities of lymphangiogenesis in molecular subtypes of breast carcinomas: experimental study. In: *Moldovan Journal of Health Sciences*, 2020, 25(4):26-34. ISSN 2345-1467. https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/145592

- ✓ **articole în lucrările conferințelor științifice:**

- ✓ **internaționale**

7. **Carpenco Ecaterina.** The influence of mast cells on tumor lymphatic vessels in breast cancer. In: *Probleme actuale ale morfologiei. Materialele Conferinței științifice internaționale dedicată aniversării a 75 de ani de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova*, Chișinău, 30-31 octombrie 2020, pp. 19-22

- **Brevete de invenții, patente, certificate de înregistrare, materiale la saloanele de invenții:**
 8. **Carpenco E.,** Șaptefrați L., Fulga V., Foca E., David V. Densitatea mastocitelor ca factor predictiv și de prognostic în evoluția subtipurilor moleculare de carcinom mamar. Certificat de inovator Nr. 5967. 13.12.2022.
- **Rezumate în materialele congreselor, conferințelor, simpoziunelor științifice**
 - ✓ **naționale**
 9. **Carpenco E.,** David V., Foca E. Mastocitele în cancerul mamar luminal versus non-luminal. In: *Materialele Conferinței științifice anuale Cercetarea în biomedicină și sănătate. Calitate, excelență și performanță. Zilele Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova.* Chișinău, 2021, p.11
 - ✓ **internaționale desfășurate în Republica Moldova**
 10. **Carpenco E.** Lymphatic vessels density and its implications in breast cancer. In: *MedEspera 2020: abstract book. The 8th International Medical Congress for Students and Young Doctors,* Chișinău, 24-26 septembrie 2020, pp. 244-245.
- **Participări cu comunicări la forumuri științifice:**
 - ✓ **internaționale**
 11. **Carpenco E.** Lymphatic vessels density and its implications in breast cancer. *MedEspera 2020. The 8th International Medical Congress for Students and Young Doctors,* Chișinău, 24-26 septembrie 2020.
 12. **Carpenco E.** The influence of mast cells on tumor lymphatic vessels in breast cancer. *Probleme actuale ale morfologiei. Conferința științifică internațională dedicată aniversării a 75 de ani de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova,* Chișinău, 30-31 octombrie 2020.
 - ✓ **naționale**
 13. **Carpenco E.** Studiul mastocitelor în stroma tumorală din cancerul mamar. *Conferința științifică anuală în cadrul Zilelor Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova,* Chișinău, 15-18 octombrie 2019.
 14. **Carpenco E.** Proteina S100 în subtipurile moleculare de cancer mamar. *Congresul consacrat aniversării a 75 de ani de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova,* Chișinău, 21-23 octombrie 2020.
 15. **Carpenco E.,** David V., Foca E. Mastocitele în cancerul mamar luminal versus non-luminal. *Conferința științifică anuală Cercetarea în biomedicină și sănătate. Calitate, excelență și performanță. Zilele Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova.* Chișinău, 20-22 octombrie 2021.

- **Participări cu postere la forumuri științifice:**

16. **Carpenco E.** Macrofagele asociate tumorilor în cancerul mamar. *Poster moderat la Zilele Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova, Chișinău, 15-18 octombrie 2019.*

Declarația privind asumarea răspunderii

Subsemnata, declar pe răspundere personală, că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Carpenco Ecaterina

Semnătura _____

Data _____

Declaration on accountability

I declare the personal responsibility that information presented in this thesis are the result of my own research and scientific achievements. I realize that, otherwise, will suffer the consequences in accordance with law.

Carpenco Ecaterina

Signature _____

Date _____



Informații personale	
<i>Nume/ Prenume</i>	Carpenco Ecaterina
<i>Adresa</i>	str. Zelinski 38/4 ap.54, mun.Chișinău, MD 2038, Republica Moldova
<i>Telefoane</i>	+373 68 333 806, +373 22 55 24 82
<i>e-mail</i>	katya_c@list.ru
<i>sex</i>	Feminin
<i>Data nașterii</i>	13 iunie 1990
<i>Naționalitatea</i>	Ucraineană
<i>Titlul științifico-didactic</i>	Asistent universitar
Experiența profesională	
Perioada	mai 2018- prezent
<i>Funcția și postul ocupat</i>	cercetător științific, Laboratorul de Morfologie Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „N.Testemițanu”, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165 MD-2004, Chișinău, Republica Moldova
<i>Tipul activității</i>	Activitate științifică
Perioada	august 2016 - prezent
<i>Funcția și postul ocupat</i>	asistent universitar, Catedra de histologie, citologie și embriologie Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „N.Testemițanu”, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165 MD-2004, Chișinău, Republica Moldova
<i>Tipul activității</i>	Activitate științifico-didactică
Educație și formare	
Perioada	septembrie 2009 – iunie 2016
<i>Calificarea/ diploma obținută</i>	Licențiat în medicină
<i>Numele și tipul instituției de învățământ</i>	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „N.Testemițanu”
Perioada	septembrie 1997 – iunie 2009
<i>Calificarea/diploma obținută</i>	Bacalaureat
<i>Numele și tipul instituției de învățământ</i>	Liceul teoretic cu profil de arte „Elena Alistar”

<i>Alte formări/instruiri</i>	<i>Educație profesională continuă:</i>
<i>16.02 – 9.03.2017</i>	Psihopedagogia învățământului superior Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „N.Testemițanu” 100 credite
<i>2.12.2020 -29.10.2021</i>	Psihopedagogie Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „N.Testemițanu”
	<i>Participări la conferințe:</i>
<i>18-21 octombrie 2016</i>	Conferința științifică anuală a cadrelor științifico-didactice, doctoranzilor, masteranzilor, rezidenților și studenților Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „N.Testemițanu” 12 ore de educație medicală continuă
<i>15-18 octombrie 2019</i>	Zilele Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova, Chișinău
<i>24-26 septembrie 2020</i>	MedEspera 2020: the 8th International Medical Congress for Students and Young Doctors, Chișinău
<i>30-31 octombrie 2020</i>	Conferința științifică internațională dedicată aniversării a 75 de ani de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova, Chișinău
<i>20-22 octombrie 2021</i>	Conferința științifică anuală Cercetarea în biomedicină și sănătate. Calitate, excelență și performanță. Zilele Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova. Chișinău
<i>19-21 octombrie 2022</i>	Conferința științifică anuală Cercetarea în biomedicină și sănătate. Calitate, excelență și performanță. Zilele Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova. Chișinău
	<i>Domeniul de activitate științifică:</i>
<i>Specialitatea de bază</i>	311.02. Anatomie patologică;
<i>Domenii de cercetare</i>	Modificări ale stromei în subtipurile moleculare de cancer mamar

Participarea la proiecte					
2017	Evaluarea imunofenotipică a subtipului molecular în tumoarea primară și metastazele limfonodale în carcinomul invaziv de glandă mamară				
2021	Abordarea morfologică prin metode convenționale, histo- și imunohistochimice ale particularităților profilului patologic al placentogenezei precoce în sarcini dereglate la termen mic				
Aptitudini și competențe personale					
Limba maternă	Română				
Autoevaluare	Înțelegere	Vorbire	Scriere		
Nivel european (*)	Ascultare	Citire	Participare la conversație	Discurs oral	Exprimare scrisă
Rusă	C2	C2	C2	C2	C2
Engleză	B2	B2	B2	B2	B2
	(*) Nivelul Cadrului European Comun de Referință Pentru Limbi Străine				
Competențe și aptitudini PC	Windows, MS Office applications: Word, Excel, Power Point; Internet				
Competențe organizaționale/ manageriale	Capacitate de comunicare Spiritului de echipă Amabilitate Diplomație Tact în relațiile cu ceilalți Sociabilitate Punctualitate				
Informații suplimentare	Căsătorită, 1 copil				