
TEZĂ DE DOCTORAT

Evaluarea mecanismelor moleculare implicate în migrarea și invazia celulelor tumorale mamare

Doctorand **Lorena-Alexandra Lisencu**

Conducător de doctorat Prof. Dr. **Alexandru Irimie**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	19
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	21
1. Cancerul de sân	23
1.1. Epidemiologie	23
1.2. Factori de risc și metode de prevenție	23
1.3. Diagnosticul	24
1.4. Tratamentul cancerului de sân	26
1.5. Factori de prognostic	26
2. Mecanisme de rezistență la tratament și progresie tumorală	29
2.1. Tranziția epitelial-mezenchimală	31
2.2. Diseminarea prin celule circulante tumorale	32
2.3. Cooperarea cu micromediul tumoral	33
2.3.1. Celule imune	33
2.3.2. Celule stromale	34
2.4. Creșterea motilității celulare	36
3. Perspective tehnologice în decodificarea cancerului de sân	37
3.1. Tehnologii microfluidice	37
3.2. Tehnologii „whole human genome”	38
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	41
1. Ipoteza de lucru/obiective	43
2. Studiu 1. Investigarea vitezei de migrarea a celulelor primare recoltate din biopsiile pacienților cu cancer de sân, anterior tratamentului cu chimioterapie	45
2.1. Introducere	45
2.2. Obiective	47
2.3. Material și metodă	47
2.3.1. Pacientele cu cancer de sân și recoltarea probelor	47
2.3.2. Selecția pacienților	47
2.3.3. Înregistrarea pacienților în baza de date	48
2.3.4. Protocol de evaluare	49
2.3.4.1. Protocol de evaluare a pacienților	49
2.3.4.2. Protocol de recoltare a probelor biologice	49
2.3.5. Procesarea probelor biopsice în vederea izolării și cultivării celulelor primare	50
2.3.6. Caracterizarea moleculară prin NGS a celulelor primare izolate	52
2.3.6.1. Izolarea ARN-ului	52
2.3.6.2. Secvențierea ARN-ului	53
2.3.6.3. Procesarea și analiza bioinformatică a datelor de secvențiere ARN	53
2.3.7. Evaluarea potențialului migrator al celulelor primare izolate	53
2.3.7.1. Fabricarea dispozitivelor microfluidice	53
2.3.7.2. Analiza potențialului de migrare a celulelor primare izolate	55
2.3.8. Analiza miRNA	57
2.3.8.1. Analiza microarray	57
2.3.8.2. Analiza bioinformatică	57
2.3.8.3. Evaluarea expresiei miRNA prin Real-Time Quantitative Reverse Transcription (qRT-PCR)	57
2.3.8.4. Analiza datelor TGGA	58
2.3.8.5. Analiza statistică	58
2.4. Rezultate	58
2.4.1. Pacientele și caracteristicile tumorilor	58
2.4.2. Izolarea celulelor tumorale primare	61

2.4.3. Caracterizarea moleculară a celulelor primare izolate	61
2.4.4. Evaluarea fenotipului migrator al celulelor primare izolate în sisteme microfluidice	62
2.5. Discuții	71
2.6. Concluzii	76
3. Studiu 2. Investigarea unor gene asociate vitezei de migrare a celulelor de cancer mamar	77
3.1. Introducere	77
3.2. Obiective	78
3.3. Material și metodă	78
3.3.1. Identificarea unui pachet de gene asociat cu migrarea CAFs	78
3.3.2. Linii celulare	78
3.3.3. Evaluarea vitezelor de migrare a liniilor celulare de sân	79
3.3.4. Screeningul small interfering ribonucleic acid (siRNA)	79
3.3.5. Analiza expresiei genelor din baza de date CCLE	80
3.4. Rezultate	80
3.4.1. Identificarea unui pachet de gene asociat cu migrarea CAFs	80
3.4.2. Capacitatea de migrare a liniilor celulare tumorale mamare	81
3.5. Discuții	86
3.6. Concluzii	90
4. Studiu 3. Investigarea rolului predictiv al unor parametri biologici, clinici și patologici în răspunsul pacientelor cu cancer de sân la tratamentul neoadjuvant	91
4.1. Introducere	91
4.2. Obiective	92
4.3. Material și metode	93
4.3.1. Cohorta de paciente	93
4.3.2. Măsurătorile mamografice	93
4.3.3. Izolarea CTC-urilor din sângele pacientelor cu cancer de sân	94
4.3.3.1. Fabricarea dispozitivelor microfluidice	94
4.3.3.2. Funcționalizarea dispozitivelor microfluidice	94
4.3.3.3. Procesarea probelor de sânge	95
4.3.4. Separarea CTC-urilor	95
4.3.5. Analiza statistică	96
4.4. Rezultate	97
4.4.1. Pacientele incluse în studiu și caracteristicile acestora	97
4.4.2. Izolarea CTC-urilor	99
4.4.3. Corelarea datelor clinice cu parametrii imagistici	100
4.4.3.1. Factori predictivi în răspunsul patologic la tratamentul neoadjuvant	105
4.4.4. Modele predictive ale parametrilor clinici în răspunsul patologic la tratamentul neoadjuvant	106
4.5. Discuții	108
4.6. Concluzii	110
5. Concluzii generale	113
6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	115
REFERINȚE	117

CUVINTE CHEIE

Cancer de sân; migrare tumorală; micromediu tumoral; mecanisme moleculare; Răspuns la terapia neoadjuvantă; Factori prognostici; Celule circulante tumorale; Microfluidică;

INTRODUCERE

Cancerul de sân reprezintă o problemă de sănătate publică fiind cel mai frecvent cancer diagnosticat și cauza principală de deces cauzat de cancer în anul 2020 în rândul populației feminine atât la nivel mondial cât și în România conform datelor Globocan.

Cu toate că există date noi referitoare la clasificarea moleculară a cancerului de sân, terapia actuală continuă să se bazeze pe expresia receptorilor hormonal (RH) și pe expresia receptorului factorului de creștere epidermal uman (HER2). În general, modalitățile de tratament pentru cancerul de sân sunt reprezentate de: chirurgie, radioterapie, terapie hormonală sau țintită și chimioterapie.

Când vine vorba de oncologia medicală, caracteristicile tumorii și extinderea bolii orientează alegerea și momentul tratamentelor sistemice. În cazul unei tumori primare cu risc crescut sau în cazul cancerului de sân avansat local, terapia neoadjuvantă (NAT) (preoperatorie) este o abordare terapeutică frecvent eficientă, deoarece oferă avantajul scăderii dimensiunii tumori, deci, reduce amploarea intervenției chirurgicale.

Răspunsul la NAT este un factor de prognostic puternic. Ținta NAT este răspunsul patologic complet (pCR) cu lipsa identificării patologiei maligne la nivelul sânului și a ganglionilor limfatici. Urmărirea răspunsului la tratament se face atât clinic și paraclinic, dar evaluarea patologică rămâne esențială. Au fost propuse multiple sisteme de evaluare a răspunsului patologic la NAT, cel mai frecvent utilizate fiind sistemul Miller-Payne (MP) și indicele Residual Cancer Burden (RCB). Pe baza factorilor de prognostic consacrați ai cancerului de sân se poate evalua prognosticul pacienților în doar 30% din cazuri, pentru restul de 70%, sunt necesari noi factori prognostici.

În ciuda faptului că depistarea precoce prin mamografie și îmbunătățirea metodelor de tratament au dus la creșterea supraviețuirii pacientelor cu cancer de sân în țările occidentale, aproximativ 30% dintre acestea nu răspund la tratamentele convenționale, prezentând recidivă tumorală. Principala cauză de mortalitate în rândul pacienților oncologici este reprezentată de metastazare. Una dintre cele mai importante etape ale procesului de metastazare este reprezentată de tranziția epitelial-mezenchimală (TEM), proces etapizat prin care celulele tumorale epiteliale care sunt celule imobile, își pierd caracteristicile epiteliale și dobândesc caracteristici mezenchimale precum abilitatea de a migra, invada și disemina.

Capacitatea de migrare crescută a celulelor tumorale este o condiție prealabilă necesară pentru boala metastatică, migrarea celulară fiind un proces de bază implicat în toate etapele cascadei metastatice. În vederea studierii motilității celulare, în ultimul deceniu, noi instrumente de cercetare și modele experimentale au fost dezvoltate pentru a recrea cu cât mai mare exactitate constrângerea mecanică pe care celulele tumorale o experimentează în țesuturi. De mare interes, s-au dezvoltat noi sisteme microfluidice, care, în cercetarea cancerului, au fost folosite in vitro pentru a imita condițiile dure în care celulele tumorale trebuie să supraviețuiască în timpul procesului de metastazare, studiul comunicării intercelulare, analize proteomice, genomice și metabolomice și pentru testarea medicamentelor. Tehnologiile microfluidice au numeroase avantaje, precum faptul că permit efectuarea de analize complexe care oferă informații de înaltă acuratețe legate de micromediul tumoral necesitând probe biologice de cantități reduse.

Este acum larg acceptat că micromediul tumoral joacă un rol integral în dezvoltarea, progresia și metastazarea cancerului. Cel mai frecvent întâlnite celule stromale la nivelul micromediului tumoral, sunt reprezentate de fibroblaștii asociați cancerului- Cancer Associated Fibroblasts (CAFs). În cancerul de sân prezența CAFs-urilor este asociată cu un prognostic negativ, aceștia fiind implicați în multiple procese biologice și moleculare responsabile de progresia tumorală.

O altă categorie de celule foarte importantă în procesul de rezistență tumorală și metastazare la distanță sunt celulele tumorale circulante (CTC). CTC-urile care exprimă caracteristici mezenchimale și stem-like sunt corelate cu un fenotip mai agresiv al bolii și cu formarea de metastaze. S-a observat că persistența CTC-urilor după chimioterapie este un factor de prognostic negativ asociat cu chimiorezistența și progresia bolii, iar scăderea numărului de CTC-uri pe parcursul terapiei indică un prognostic favorabil. Acestea pot fi obținute din sângele periferic al pacienților, proces minim invaziv având deci un real potențial pentru monitorizarea prognosticului și a tratamentului, fiind considerate ca și promițători factorii prognostici.

Dezvoltarea tehnologiilor de tip „whole human genome” precum secvențierea de nouă generație (NGS) și microarray au făcut posibilă caracterizarea detaliată a genomului și a epigenomului uman, aducând informații esențiale în înțelegerea și lupta împotriva cancerului. Poate una dintre cele mai importante descoperiri în domeniu a fost identificarea de modele unice de expresie genică în cancerul de sân și clasificarea moleculară a acestuia, ceea ce a avansat considerabil tratamentul patologiei maligne mamare. Mai mult, analizele transcriptomice au adus, de asemenea, date importante în identificarea mecanismelor de acțiune ale medicamentelor și în monitorizarea răspunsului terapeutic, sute de gene fiind analizate și descrise ca supra- sau sub- exprimate ca urmare a terapiei. O problemă recurentă este dificultatea țintirii terapeutice a mai multor gene, astfel fiind necesară identificarea genelor cheie cu potențial de a fi ținte terapeutice. O altă abordare include analiza acizilor micro ribonucleici (miRNA- miR), datorită funcției lor modulatoare a expresiei genice în aval, prin reglarea activității a multiple ARN-uri mesager (ARNm) specifice. Datele arată că aceste structuri sunt implicate în diferitele procese de reglare, precum proliferarea, apoptoza și migrarea celulelor maligne. MiR-urile se pot comporta fie ca gene oncogene (oncomiruri), fie miR-uri supresoare tumorale fie ca ambele.

CONTRIBUȚIE PERSONALĂ

Ipoteza de lucru a acestei lucrări se bazează pe realizarea unei cercetări care să aducă date noi legate de alterarea mecanismelor și căilor moleculare care sunt implicate în migrarea și invazia celulelor tumorale mamare umane. Invazia și metastazarea reprezintă momentul critic în ceea ce privește supraviețuirea în cancerul de sân, mecanismele moleculare asociate migrării și invaziei tumorale mamare fiind încă neelucidate.

Obiective generale și specifice

Obiectivul general constă în explorarea mecanismelor moleculare implicate în migrarea și invazia celulelor tumorale și rolul acestora în răspunsul la tratamentul neoadjuvant în cancerul mamar.

Obiectivele specifice:

- 1) Investigarea și caracterizarea motilității celulelor primare obținute din biopsiile pacientelor cu cancer de sân;
- 2) Identificarea unor profile de expresie genică asociate cu motilitatea celulelor primare izolate;
- 3) Validarea rolului genelor identificate în reglarea motilității celulare

- 4) Explorarea potențialului prognostic al parametrilor clinici, patologici și moleculari asociați motilității celulare în răspunsul la tratamentul neoadjuvant al pacientelor cu cancer de sân;

Studiu 1. Investigarea vitezei de migrarea a celulelor primare recoltate din biopsiile pacientelor cu cancer de sân, anterior tratamentului cu chimioterapie

În acest studiu, ne-am propus izolarea de celule primare de la paciente cu cancer de sân și caracterizarea acestor celule din punct de vedere al fenotipului migrator. Obiectivele acestui studiu clinic prospectiv, analitic, observațional și experimental au fost reprezentare de investigarea și caracterizarea motilității celulelor primare obținute din biopsiile pacientelor cu cancer de sân, identificarea unor particularități moleculare asociate cu invazia și metastazarea cancerului de sân și explorarea rolului unor molecule cu potențial prognostic în răspunsul la tratamentul neoadjuvant al pacientelor introduse în studiu. În vederea identificării unor molecule implicate în reglarea acestui fenotip, s-a făcut o analiză de tip ‚whole human genome‘ a expresiei miRNA a tumorilor investigate. Mai mult, s-a evaluat valoarea prognostică a miARN-rilor identificate, în țesuturile cancerului de sân, prin investigarea asocierii expresiei lor cu răspunsul patologic al pacientelor la NAT și cu caracteristicile clinico-patologice ale acestora.

În studiu au fost incluse conform criteriilor de includere 60 de paciente diagnosticate cu cancer mamar invaziv la Institutul de Oncologie „Ion Chiricuță”, Cluj-Napoca, România (IOCN). Protocolul terapeutic urmat de paciente este stabilit în funcție de caracteristicile histologice și moleculare ale fenotipului malign, administrat în mod obișnuit de către medicul curant, fără nici o modificare cauzată de desfășurarea acestui proiect de cercetare. Evaluarea răspunsului terapeutic a fost realizată clinic și imagistic de către medicul curant, la finalizarea NAT.

Conform evaluării Miller-Payne, 14 paciente nu au răspuns la NAT, 4 au prezentat un răspuns minor, 13 au avut un răspuns intermediar și 13 au avut un răspuns patologic aproape complet. Conform sistemului de clasificare RCB, 13 paciente au atins un răspuns patologic ridicat, 16 au dezvoltat rezistență la terapie și 15 au avut un răspuns parțial. În urma rezultatelor obținute, s-a constatat că un număr inițial redus de celule primare nu se corelează neapărat cu absența proliferării celulelor de tip tumoral, în cultură selectându-se și celule de tip fibroblastoid care aparent au avut un rol de feeder-layer pentru celulele mai puțin proliferante de tip epitelial. Cu privire la tipul de celule primare izolate, rezultatele obținute au evidențiat că o singură cultură primară are o semnătură moleculară specifică celulelor epiteliale, majoritatea culturilor primare având semnături moleculare asociate fibroblaștilor. Având în vedere proveniența tumorală a acestor culturi primare, cel mai probabil, celulele izolate sunt CAFs. În concordanță cu datele din literatură, CAFs izolați prezintă un fenotip heterogen.

Cu ajutorul sistemelor de microfluidică, s-a evaluat capacitatea de migrare a 48 de culturi primare izolate de la pacientele cu cancer de sân: 13% au prezentat un fenotip non- migrator, 31% slab migrator, 23% intermediar, iar 33% au avut capacitate crescută de migrare. Datele de analiză de corelare clinică au evidențiat corelația dintre un comportament tumoral agresiv cu un fenotip migrator crescut pentru CAFs.

S-a observat o asociere semnificativă între fenotipul migrator crescut și valoarea ridicată a Ki-67. Cu privire la subtipul molecular, în general pacientele care au prezentat un fenotip migrator redus au prezentat subtip luminal A. Nu s-a observat nici o asociere între fenotipul migrator și răspunsul patologic al pacientelor la NAT.

Tumorile au fost grupate în două: cu capacitate de migrare mare (high) vs. capacitate de migrare scăzută (low). Un fenotip migrator crescut al CAFs a fost asociat semnificativ cu o expresie crescută de miR-375 și scăzută de miR-210. Dintre cele trei miARN investigate, miR-375-3p și miR-210-3p au fost asociate semnificativ cu răspunsul MP, în timp ce expresia miR-210-3p a fost, de asemenea, asociată semnificativ cu RCB. Conform sistemului Miller-Payne, pacientele cu un răspuns patologic ridicat la NAT au avut expresii mai mari ale miR-375-3p și miR-210-3p în comparație cu pacientele cu răspuns intermediar și scăzut. Pacientele cu boli avansate au avut o expresie mai mare a miR-210-3p, în timp ce o scădere ușoară a expresiei miR-210-3p a fost asociată cu o supraviețuire mai bună. În cohorta de

paciente incluse în prezentul studiu, un răspuns parțial sau complet a fost semnificativ asociat cu o expresie crescută de miR-210-3p comparativ cu pacientele care nu au răspuns la NAT.

Pe baza acțiunilor mecaniste documentate ale celor două miARN-uri, rezultatele noastre sugerează că tumorile cu niveluri mai mari ale expresiei miR-375-3p sunt mai sensibile la terapia neoadjuvantă în comparație cu tumorile rezistente și că o expresie mai crescută a miR-210-3p în tumorile receptive ar putea indica tumori „fierbinți” imunologic. Aceste date sugerează un potențial rol prognostic al acestor două miARN-uri în stratificarea pacientelor cu cancer de sân care vor răspunde la NAT. Cu toate acestea, deoarece datele referitoare la aceste două miARN sunt controversate, sunt necesare studii suplimentare pentru a elucida rolul lor complex în mediarea răspunsului pacientelor cu cancer de sân la terapia neoadjuvantă.

Studiu 2. Investigarea unor gene asociate vitezei de migrare a celulelor de cancer mamar

În acest studiu am utilizat linii celulare tumorale stabilizate pentru a identifica un pachet de gene asociat cu un fenotip migrator crescut al CAFs-urilor în vederea identificării unor posibile ținte terapeutice și explorarea rolului genelor asociate cu fenotipul migrator al CAFs în modularea migrării celulelor tumorale. Pe scurt, CAFs-urile sunt recrutate de factori secretați de celulele tumorale și sunt integrate peritumoral prin proprietățile de aderență celulară. Pe baza motilității lor, astfel de cohorte CAF se întind de la periferia până la nucleul tumoral, exercitând astfel presiune asupra frontului de invazie a tumorii și promovează creșterea invazivă a celulelor tumorale. De interes pentru acest studiu a fost cum o posibilă țintire a căilor de semnalizare implicate în motilitatea CAFs ar afecta comportamentul în aval al celulelor tumorale.

În vederea identificării genelor cu rol în reglarea migrării tumorale, s-a investigat în prealabil modul și vitezele de migrare a șapte linii celulare de cancer mamar cu diferite caracteristici moleculare: două linii celulare din subtipul luminal (MCF7, T47D) și cinci triplu negative (HS 578T, BT 549, HCC 1937, MDA-231 și MDA-468). Pentru modelarea modului de migrare au fost utilizate dispozitive microfluidice cu canale liniare cu lățimea de 10 până la 50 μm.

În urma experimentelor de evaluare a migrării celulare în canale de diferite mărimi s-a observat că celulele tumorale au moduri de migrare diferite. Liniile celulare de cancer mamar triplu negativ migrează cu precădere individual (MDA-231, Hs578T, BT 549, MDA-468), în timp ce liniile MCF7 și HCC 1937 migrează cu precădere în clustere. Linia T47D a prezentat un fenotip foarte slab migrator. În urma analizei datelor de secvențiere din baza de date CCLE concomitent cu vitezele de migrare specifice fiecărei linii, s-au identificat ca și model experimental de interes liniile celulare MDA-231 și BT 549. Aceste 2 linii au cele mai multe gene exprimate din pachetul de gene de interes și prezintă viteze de migrare mari, respectiv intermediare.

Datele de expresie genică arată că SIX1, STEAP2, ASPH, PLAG1, TFPI, și LOXL2 sunt supraexprimate în CAFs cu fenotip migrator, în timp ce NOP56, DDX39A, FABP5, ALDH6A1, NOP16 și PINX 1 sunt subexprimate. Conform datelor obținute, prin inhibarea expresiei genelor SIX1, STEAP2, ASPH, NOP56, PLAG1, TFPI, DDX39A, FABP5, LOXL2, ALDH6A1 și NOP16, viteza de migrare a celulelor MDA-231 scade, iar inhibarea expresiei genelor FAXDC2, LOXL4, EPOR și PINX 1 stimulează migrarea acestor celule. De asemenea, inhibarea genelor BNC2 și PKD1 în linia BT-549 induce scăderea vitezei de migrare, iar inhibarea genelor ZNF5034, CCDC85B, NOP16, CPT1A, EVA1B, LOXL2, TFPI duce la stimularea vitezei de migrare.

Integrarea datelor de siARN obținute pe cele două linii tumorale sugerează că genele SIX1, STEAP2, ASPH, PLAG1, BNC2, PKD1 și CPT1A ar fi posibile ținte terapeutice benefice atât pentru reducerea potențialului migrator al CAFs cât și al celulelor tumorale. O expresie crescută a acestora a fost asociată cu un fenotip migrator crescut al CAFs, iar inhibarea expresiei acestor gene a dus fie la scăderea vitezei de migrare în una dintre cele două linii studiate, fie nu au afectat semnificativ acest proces. Studiul nostru a relevat că deși genele LOXL2 și TFPI sunt supraexprimate în CAFs cu fenotip

migrator crescut, inhibiția expresiei acestor gene a dus la efecte opuse în cele două linii studiate. De asemenea, este de menționat că deși expresia genelor ALDH6A1, NOP56, DDX39A, FABP5 și PINX1 a fost mai scăzută în CAFs cu fenotip migrator crescut, inhibarea acestora în linia MDA-MB-231 a dus la scăderea vitezei de migrare. Aceste date sugerează că rolul acestor gene în motilitatea celulară tumorală este dependent și de alți factori intrinseci, specifici fiecărui tip celular, necesitând studii mai aprofundate pentru elucidarea rolului acestora în modularea fenotipului migrator.

Studiu 3. Investigarea rolului predictiv al unor parametri biologici, clinici și patologici în răspunsul pacientelor cu cancer de sân la tratamentul neoadjuvant

În acest studiu retrospectiv am evaluat valoarea predictivă a diferiți parametri biologici, clinici și patologici în răspunsul la NAT. Deci, în acest studiu am explorat posibile asocieri între numărul de CTCs, densitatea mamografică (MD), marginile tumorii și microcalcificările și datele clinice și patologice pe o cohortă de 84 paciente cu cancer de sân tratate la Institutul de Oncologie „Prof. Dr I. Chiricuta” Cluj-Napoca (IOCN).

Șaptezeci și unu de paciente au primit o indicație pentru NAT. Conform evaluării Miller-Payne, aproximativ 30% dintre paciente au prezentat fie absența unui răspuns fie un răspuns minor, 23% au avut un răspuns intermediar și 35% au avut un răspuns patologic aproape complet. Conform sistemului de clasificare RCB, 12,7% dintre paciente au atins un răspuns patologic complet, 17% au fost rezistente la terapie și aproximativ jumătate au avut un răspuns parțial.

Un prim obiectiv a fost acela de a explora valoarea prognostică a prezenței CTC-urilor în sângele pacientelor cu cancer de sân. Pentru aceasta s-a încercat izolarea de CTC-uri din sângele pacientelor utilizând dispozitive microfluidice de tip Herringbone, funcționalizate cu anticorpi pentru proteina EpCAM. Deși datele obținute arată izolarea cu succes de celule circulante ce exprimă EpCAM, limitarea tehnologiilor disponibile a făcut imposibilă cuantificarea cu acuratețe a acestora și calcularea unor asocieri statistice cu datele clinice.

Un alt obiectiv a fost analizarea unor factori clinici precum densitatea glandulară și semnele mamografice sugestive pentru cancer: masele (marginile lor) și asimetriile densităților glandulare. În ceea ce privește densitățile mamare, acestea au fost semnificativ asociate cu vârsta pacientelor; odată cu înaintarea în vârstă, s-a observat o scădere a densităților mamare. În studiul nostru, în conformitate cu sistemele MP și RCB, MD a fost un predictor pentru pCR, observându-se șanse mai mici de a ajunge la pCR la pacientele cu MD mai crescută. Șansele de a avea un răspuns scăzut sau intermediar mai degrabă decât un răspuns ridicat sunt mai mici la pacientele cu sâni aproape în întregime grași (densitatea a) comparativ cu sâni mai denși (densitatea c). Acest model poate prezice pacientele care vor avea un răspuns ridicat cu o probabilitate de 82,4%. Șansele de a avea o boală reziduală (RCB II și RCB III) mai degrabă decât un răspuns patologic complet cresc odată cu densitatea țesuturilor. Cu toate acestea, specificitatea acestui model este mai mică decât cea a modelului Miller Payne; la doar 44,4% dintre paciente a fost prezis corect atingerea unui răspuns patologic complet.

În ceea ce privește marginile, cele spiculate de pe mamografiile sunt asociate cu cancer de sân cu un grad scăzut și HR-pozitiv (luminal A), în timp ce în cazul tumorilor triplu negative, marginile sunt cel mai frecvent circumscrise. Conform clasificării RCB, șansele de a atinge pCR au fost cele mai crescute în subtipul TNBC și cele mai reduse în subtipurile luminale.

Rezultatele noastre sugerează că pacientele cu cancer de sân supuse NAT care prezintă MD mai scăzută au șanse mai mari de a obține pCR.

CONCLUZII GENERALE

- Utilizarea de dispozitive microfluidice pentru simularea constrângerii mecanice pe care celulele o experimentează în țesuturi a relevat faptul că CAFs izolate de la pacientele cu cancer de sân prezintă potențial migrator diferit.
- Un fenotip migrator crescut al CAFs a fost asociat semnificativ cu o expresie crescută de miR-375 și scăzută de miR-210 în tumorile mamare primare.
- Concomitent, s-a observat ca tumorile cu o expresie miR-375-3p și a miR-210-3p mai crescută sunt mai sensibile la NAT, aceste două miR-uri reprezentând potențiali markeri de prognostic pentru răspunsul la tratament.
- De asemenea, s-a identificat un pachet de 70 de gene diferit exprimate între CAFs care prezintă potențiale diferite de migrare.
- Gene precum SIX1, STEAP2, ASPH, NOP56, PLAG1, TFPI, DDX39A, FABP5, LOXL2, ALDH6A1, NOP16, FAXDC2, LOXL4, EPOR, BNC2, PKD1, ZNF5034, CCDC85B, CPT1A, EVA1B și PINX 1 sunt implicate semnificativ în modularea vitezei de migrare a celulelor tumorale.
- Asocierea unei expresii crescute a genelor SIX1, STEAP2, ASPH, PLAG1, BNC2, PKD1 și CPT1A cu fenotipul migrator al CAFs-urilor, sugerează posibilitatea ca aceste gene să reprezinte potențiale ținte terapeutice.
- Inhibarea anumitor gene care au fost găsite ca fiind supraexprimate în CAFs-urile cu fenotip migrator a dus la efecte opuse în diferite linii celulare, sugerând astfel rolul multifactorial și incomplet elucidat al diferiților factori intrinseci implicați în modularea motilității celulare.
- S-au utilizat dispozitive microfluidice de tip "Herringbone" pentru izolarea de CTCs de la pacientele cu cancer de sân, preprocesarea sângelui periferic pentru îndepartarea eritrocitelor generând dispozitive mai curate și cu o acuratețe mai ridicată a capturării CTC-urilor.
- Limitările tehnologice disponibile nu au făcut posibilă cuantificarea CTC-urilor pentru pacientele incluse în studiu, posibilă asociere a acestora cu răspunsul la NAT rămânând incomplet explorată.
- S-a identificat densitatea mamografică mai scăzută ca factor de prognostic bun pentru obținerea pCR în urma NAT.
- Comparativ cu modelul RCB, modelul de regresie Miller-Payne a prezentat o probabilitate superioară de a calcula corect atingerea unui răspuns patologic complet la pacientele incluse în studiu.

PhD THESSIS SUMMARY

Evaluation of molecular mechanisms involved in breast tumor cell migration and invasion

PhD Student **Lorena-Alexandra Lisencu**

PhD Supervisor Prof. Dr. **Alexandru Irimie**

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	19
THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	21
1. Breast Cancer	23
1.1. Epidemiology	23
1.2. Risk factors and prevention methods	23
1.3. Diagnosis	24
1.4. Breast cancer treatment	26
1.5. Prognosis factors	26
2. Mechanisms of treatment resistance and tumor progression	29
2.1. Epithelial-Mesenchymal Transition	31
2.2. Dissemination by circulating tumor cells	32
2.3. Cooperation with the tumor microenvironment	33
2.3.1. The immune cells	33
2.3.2. The stromal cells	34
2.4. Increase cell motility	36
3. Technical perspectives in the decoding of breast cancer	37
3.1. Microfluidic technologies	37
3.2. „Whole human genome“ technologies	38
PERSONAL CONTRIBUTION	41
1. Work hypothesis/objectives	43
2. Study 1. Investigation of the migration rate of primary cells harvested from biopsies of breast cancer patients prior to chemotherapy treatment	45
2.1. Introduction	45
2.2. Objectives	47
2.3. Material and method	47
2.3.1. Breast cancer patients and sampling	47
2.3.2. Patient selection	47
2.3.3. Registration of patients in the database	48
2.3.4. Assessment procedure	49
2.3.4.1. Protocol of patient evaluation	49
2.3.4.2. Biological sample collection procedure	49
2.3.5. Processing of biopsic samples for the isolation and cultivation of primary cells	50
2.3.6. Molecular characterization by NGS of the primary isolated cells	52
2.3.6.1. RNA isolation	52
2.3.6.2. RNA sequencing	53
2.3.6.3. Processing and bioinformatics analysis of RNA sequencing data	53
2.3.7. Assessment of the migratory potential of isolated primary cells	53
2.3.7.1. The manufacture of microfluidic devices	53
2.3.7.2. Analysis of the migration potential of isolated primary cells	55
2.3.8. MiRNA analysis	57
2.3.8.1. Microarray analysis	57
2.3.8.2. Bioinformatics analysis	57
2.3.8.3. The assessment of miRNA expression using Real-Time Quantitative Reverse Transcription (qRT-PCR)	57
2.3.8.4. TGGGA data analysis	58
2.3.8.5. Statistics analysis	58
2.4. Results	58
2.4.1. Patients and tumors characteristics	58
2.4.2. Isolation of primary tumor cells	61
2.4.3. Molecular characterization of primary isolated cells	61
2.4.4. Assessment of migratory phenotype of primary cells isolated in microfluidic systems	62
2.5. Discussion	71

2.6. Conclusions	76
3. Study 2. Investigation of genes associated with the migration rate of breast cancer cells	77
3.1. Introduction	77
3.2. Objectives	78
3.3. Material and method	78
3.3.1. Identifying a gene bundle associated with CAFs migration	78
3.3.2. Cellular lines	78
3.3.3. Assessment of migration speed of breast cell lines	79
3.3.4. Small interfering ribonucleic acid (siRNA) screening	79
3.3.5. Analysis of gene expression in the CCLE database	80
3.4. Results	80
3.4.1. Identifying genes associated with CAFs migration	80
3.4.2. The migration capacity of breast tumor cell lines	81
3.5. Discussions	86
3.6. Conclusions	90
4. Study 3. Investigation of the predictive role of biological, clinical and pathological parameters in the response of breast cancer patients to neoadjuvant treatment	91
4.1. Introduction	91
4.2. Objectives	92
4.3. Material and methods	93
4.3.1. Patients cohort	93
4.3.2. Mammographic measurements	93
4.3.3. The isolation of CTCs from the blood of breast cancer patients	94
4.3.3.1. The manufacture of microfluidic devices	94
4.3.3.2. Functionalization of microfluidic devices	94
4.3.3.3. Blood samples processing	95
4.3.4. Separation of CTTs	95
4.3.5. Statistical analysis	96
4.4. Results	97
4.4.1. Included patients characteristics	97
4.4.2. CTCs isolation	99
4.4.3. Correlation of clinical data with imaging parameters	100
4.4.3.1. The predictive factors in the pathological response to neoadjuvant treatment	105
4.4.4. The predictive models of clinical parameters in the pathological response to neoadjuvant treatment	106
4.5. Discussions	108
4.6. Conclusions	110
5. General conclusions	113
6. Originality and innovative contributions of the thesis	115
REFERENCES	117

KEYWORDS

Breast cancer; tumour migration; tumour microenvironment; molecular mechanisms; response to neoadjuvant therapy; prognostic factors; circulating tumour cells; microfluidics;

INTRODUCTION

Breast cancer is a public health problem being the most frequently diagnosed cancer and the leading cause of cancer death in 2020 among the female population both worldwide and in Romania, according to Globocan data.

Although there are new data on the molecular classification of breast cancer, current therapeutic strategies continue to be based on hormone receptor (HR) expression and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression. In general, treatment modalities for breast cancer are surgery, radiotherapy, hormonal or targeted therapy and chemotherapy.

When it comes to medical oncology, the tumour's characteristics and the disease's extent guide the choice and timing of systemic treatments. In the case of a high-risk primary tumour or locally advanced breast cancer, neoadjuvant therapy (NAT) (preoperative) is a frequently practical therapeutic approach, as it offers the advantage of decreasing tumour size, thus reducing the extent of surgery.

Response to NAT is a significant prognostic factor. The NAT target is a complete pathological response (pCR) with lack of identification of malignant pathology in the breast and lymph nodes. Tracking response to treatment is done clinically and paraclinical, but pathological assessment remains essential. Multiple systems have been proposed to assess pathological response to NAT, the most commonly used being the Miller-Payne (MP) system and the Residual Cancer Burden (RCB) index. Based on the established breast cancer prognostic factors mentioned above, it is possible to assess the prognosis of patients in only 30% of cases; for the remaining 70%, new prognostic factors are needed.

Even though early detection by mammography and improved treatment methods have led to increased survival of breast cancer patients in Western countries, about 30% of these patients do not respond to conventional treatments and experience tumour recurrence. The leading cause of mortality among cancer patients is metastasis. One of the most critical steps in the metastatic process is the epithelial-mesenchymal transition (EMT), a stepwise process whereby immobile epithelial tumour cells lose their epithelial characteristics and acquire mesenchymal features such as the ability to migrate, invade and spread.

The increased migratory capacity of tumour cells is a prerequisite for metastatic disease, cell migration being a basic process involved in all stages of the metastatic cascade. To study cell motility, new research tools and experimental models have been developed over the last decade to recreate the mechanical constraint that tumour cells experience in tissues as accurately as possible. Of great interest, new microfluidic systems have been developed, which in cancer research, have been used in vitro to mimic the harsh conditions under which tumour cells must survive during metastasis, the study of intercellular communication, proteomic, genomic and metabolomic analyses and for drug testing. Microfluidic technologies have many advantages, such as allowing complex analyses that provide highly accurate information related to the tumour microenvironment while requiring small biological samples.

It is now widely accepted that the tumour microenvironment plays an integral role in cancer development, progression and metastasis. The most commonly encountered stromal cells in the tumour microenvironment are Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs). In breast cancer, CAFs are associated with a poor prognosis, as they are involved in multiple biological and molecular processes

responsible for tumour progression.

Another category of cells crucial in tumour resistance and distant metastasis are circulating tumour cells (CTCs). These can be obtained from the patient's peripheral blood, a minimally invasive process with a real potential for monitoring prognosis and treatment. CTCs are also considered promising prognostic factors. CTCs expressing mesenchymal and stem-like characteristics are correlated with a more aggressive disease phenotype and metastasis formation. CTC persistence after chemotherapy is a negative prognostic factor associated with chemoresistance and disease progression, and a decrease in CTCs during therapy indicates a favourable prognosis.

The development of „whole human genome technologies“, such as next-generation sequencing (NGS) and microarrays, have made it possible to characterise the human genome and epigenome in detail, providing essential information for understanding and fighting cancer. Perhaps one of the most important breakthroughs in the field has been identifying unique gene expression patterns in breast cancer and its molecular classification, which has dramatically advanced breast cancer treatment. Furthermore, transcriptomic analyses have also provided essential data in identifying drug mechanisms of action and monitoring therapeutic response, with hundreds of genes being analysed and described as over or under-expressed due to therapy. A recurring problem is a difficulty of therapeutically targeting multiple genes, thus the need to identify critical genes that could represent potential therapeutic targets. Another approach includes the analysis of microribonucleic acids (miRNA- miR) due to their downstream modulatory function on gene expression by regulating the activity of multiple specific messenger RNAs (mRNAs). MiRs can behave either as oncogenic genes (oncomirs), tumour suppressor miRs or both. Data show that these structures are involved in various regulatory processes such as proliferation, apoptosis and migration of malignant cells.

PERSONAL CONTRIBUTION

The working hypothesis of this thesis is based on research that will provide new data related to the alteration of molecular mechanisms and pathways involved in the migration and invasion of human breast tumours. Invasion and metastasis represent the critical time point for survival in breast cancer, but the molecular mechanisms associated with breast tumour migration and invasion are still unresolved.

General and specific objectives

The overall objective is to explore the molecular mechanisms involved in tumour cell migration and invasion and their role in responding to neoadjuvant treatment in breast cancer.

Specific objectives:

- 1) Investigate and characterise the motility of primary cells obtained from biopsies of breast cancer patients;
- 2) Identify gene expression profiles associated with the motility of isolated primary cells;
- 3) Validate the role of identified genes in regulating cell motility.
- 4) Exploring the predictive potential of clinical, pathological and molecular parameters associated with cell motility in response to neoadjuvant treatment of breast cancer patients;

Study 1. To investigate the migration rate of primary cells harvested from biopsies of breast cancer patients before chemotherapy treatment.

The objectives of this prospective, analytical, observational and experimental clinical study were to investigate and characterise the motility of primary cells obtained from biopsies of breast cancer patients, to identify molecular features associated with breast cancer invasion and metastasis, and to explore the role of potentially prognostic molecules in response to neoadjuvant treatment of

breast cancer patients. In this study, we aimed to isolate primary cells from breast cancer patients and characterise these cells in terms of a migratory phenotype. To identify molecules involved in regulating this phenotype, a “whole human genome” analysis of miRNA expression of the investigated tumours was performed. Furthermore, the predictive value of the identified miRNAs in breast cancer tissues was assessed by analysing the association of their expression with the pathological response of the patients to NAT and with the clinicopathological characteristics.

Sixty patients diagnosed with invasive breast cancer at the Institute of Oncology "Ion Chiricuță", Cluj-Napoca, Romania (IOCN), were included in the study according to the inclusion criteria. Assessment of therapeutic response was performed clinically, and imaging by the treating physician after NAT. The therapeutic protocol followed by the patients is established according to the histological and molecular characteristics of the malignant phenotype, routinely administered by the attending physician, without any modification caused by the conduct of this research project.

According to the Miller-Payne assessment, 14 patients did not respond to NAT, 4 had a minor response, 13 had an intermediate response, and 13 had an almost complete pathological response. According to the RCB classification system, 13 patients achieved a high pathological response, 16 developed resistance to therapy, and 15 had a partial response. The results showed that a low initial number of primary cells did not necessarily correlate with the absence of proliferating tumour-like cells, as fibroblastoid-like cells were also selected in culture and appeared to have a feeder-layer role for the less proliferating epithelial-like cells. Concerning the type of isolated primary cells, the results showed that only one primary culture had a molecular signature specific to epithelial cells, with most primary cultures having molecular signatures associated with fibroblasts. Given the tumoural origin of these primary cultures, it is most likely that the isolated cells are CAFs. Consistent with literature data, isolated CAFs exhibit a heterogeneous phenotype.

Using microfluidic systems, 48 primary cultures isolated from breast cancer patients were assessed for migration ability: 13% showed a non-migratory phenotype, 31% were poorly migratory, 23% intermediate, and 33% had increased migration ability. Clinical correlation analysis data revealed the correlation between aggressive tumour behaviour with an increased migratory phenotype for CAFs.

A significant association was observed between the increased migratory phenotype and elevated Ki-67. Regarding the molecular subtype, generally, patients with a reduced migratory phenotype showed luminal A subtype. No association was observed between migratory phenotype and the pathological response of patients to NAT.

Tumours were grouped into two groups: high migratory capacity (high) vs low migratory capacity (low). An increased migratory phenotype of CAFs was significantly associated with increased miR-375 and decreased miR-210 expression. Of the three miRNAs investigated, miR-375-3p and miR-210-3p were associated considerably with MP response, while miR-210-3p expression was also significantly associated with RCB. According to the Miller-Payne system, patients with high pathological responses to NAT had higher miR-375-3p and miR-210-3p expression than patients with intermediate and low responses. Patients with advanced disease had a higher miR-210-3p expression, while a slight decrease in miR-210-3p expression was associated with better survival. In the cohort of patients included in the present study, a partial or complete response was significantly associated with increased miR-210-3p expression compared to patients who did not respond to NAT.

Based on the documented mechanistic actions of the two miRNAs, our results suggest that tumours with higher levels of miR-375-3p expression are more responsive to neoadjuvant therapy compared to resistant tumours and that higher miR-210-3p expression in responsive tumours may indicate immunologically "hot" tumours. These data suggest a potential prognostic role of these two miRNAs in stratifying breast cancer patients who will respond to NAT. However, as data on these two miRNAs are controversial, further studies are needed to elucidate their complex role in mediating breast cancer patient's response to neoadjuvant therapy.

Study 2. Investigation of genes associated with breast cancer cell migration

Briefly, CAFs are recruited by factors secreted by tumour cells and are peritumorally integrated through cell adhesion properties. Based on their motility, such CAF cohorts extend from the periphery to the tumour core, exerting pressure on the tumour invasion front and promoting invasive tumour cell growth. Of interest to this study was how a possible targeting of the signalling pathways involved in CAFs motility would affect the downstream behaviour of tumour cells. In this study, we used stabilized tumour cell lines to identify a gene cluster associated with an increased migratory phenotype of CAFs to identify potential therapeutic targets and explore the role of genes related to the migratory phenotype of CAFs in modulating tumour cell migration.

To identify genes with a role in regulating tumour migration, the migration mode and rates of seven breast cancer cell lines with different molecular characteristics were previously investigated: two luminal subtype cell lines (MCF7, T47D) and five triple negatives (HS 578T, BT 549, HCC 1937, MDA-231 and MDA-468). Microfluidic devices with 10 μm to 50 μm wide linear channels were used to model the migration mode.

Experiments evaluating cell migration in channels of different sizes showed that tumour cells have different migration modes. Triple-negative breast cancer cell lines migrate predominantly individually (MDA-231, Hs578T, BT 549, MDA-468), while MCF7 and HCC 1937 lines migrate mainly in clusters. Following analysis of sequencing data from the CCLE database and lineage-specific migration rates, the MDA-231 and BT 549 cell lines were identified as experimental models of interest. These two lines have the highest number of expressed genes from in the investigated gene set and also they present with high, respectively intermediate, migration velocities. The T47D line showed a very poorly migratory phenotype.

Gene expression data show that SIX1, STEAP2, ASPH, PLAG1, TFPI, and LOXL2 are overexpressed in CAFs with migratory phenotype, while NOP56, DDX39A, FABP5, ALDH6A1, NOP16 and PINX 1 are underexpressed. According to the data, by inhibiting the expression of SIX1, STEAP2, ASPH, NOP56, PLAG1, TFPI, DDX39A, FABP5, LOXL2, ALDH6A1 and NOP16 genes, the migration rate of MDA-231 cells decreases and inhibiting the expression of FAXDC2, LOXL4, EPOR and PINX 1 gene stimulates the migration of these cells. Similarly, inhibition of BNC2 and PKD1 genes in the BT-549 line induces decreased migration velocity, and inhibition of ZNF5034, CCDC85B, NOP16, CPT1A, EVA1B, LOXL2, TFPI genes leads to stimulation of migration velocity.

Integration of siRNA screening data obtained on the two tumour lines suggests that SIX1, STEAP2, ASPH, PLAG1, BNC2, PKD1 and CPT1A genes would be beneficial therapeutic targets for reducing the migratory potential of both CAFs and tumour cells. Increased expression of these genes was associated with an increased migratory phenotype of CAFs, and inhibition of expression of these genes either resulted in decreased migration velocity in one of the two lines studied or did not significantly affect this process. Our study revealed that although LOXL2 and TFPI genes are overexpressed in CAFs with increased migratory phenotype, inhibition of expression of these genes resulted in opposite effects in the two lines studied. It is also noteworthy that although the expression of ALDH6A1, NOP56, DDX39A, FABP5 and PINX1 genes was lower in CAFs with increased migratory phenotype, their inhibition in the MDA-MB-231 line resulted in decreased migration velocity. These data suggest that the role of these genes in tumour cell motility is also dependent on other intrinsic, cell type-specific factors, requiring further studies to elucidate their role in modulating migratory phenotype.

Study 3. Investigating the predictive role of biological, clinical and pathological parameters in the response of breast cancer patients to neoadjuvant treatment

In this retrospective study, we evaluated the predictive value of different biological, clinical and pathological parameters in response to NAT. Therefore, in this study, we explored possible associations between the number of CTCs, mammographic density (MD), tumour margins and microcalcifications and clinical and pathological data on a cohort of 84 breast cancer patients treated at the Institute of Oncology "Prof. Dr I. Chiricuta" Cluj-Napoca (IOCN).

Seventy-one patients received an indication for NAT. According to the RCB classification system, 12.7% of patients achieved a complete pathological response, 17% were resistant to therapy, and about half had a partial response. According to the Miller-Payne assessment, approximately 30% of patients had either no response or a minor response, 23% had an intermediate response, and 35% had an almost complete pathological response.

The first objective was to explore the predictive value of the presence of CTCs in the blood of breast cancer patients. It was achieved by attempting to isolate CTCs from patients' blood using Herringbone microfluidic devices functionalised with antibodies to the EpCAM protein. Although the data obtained showed successful isolation of circulating cells expressing EpCAM, the limitation of available technologies made it impossible to quantify them accurately and to calculate statistical associations with clinical data.

Another objective was to analyse clinical factors such as glandular density and mammographic signs suggestive of cancer: masses (their margins) and asymmetries of glandular densities. Regarding breast densities, they were significantly associated with the age of the patients; with advancing age, a decrease in breast densities was observed. In our study, according to the MP and RCB systems, MD was a predictor for pCR, with lower odds of reaching pCR followed in patients with higher MD. The odds of having a low or intermediate response rather than a high response are lower in patients with almost entirely fat breasts (density a) compared to denser breasts (density c). This model can predict patients who will have a high response with a probability of 82.4%. The odds of having a residual disease (BCR II and BCR III) rather than a complete pathological response increase with tissue density. However, the specificity of this model is lower than that of the Miller-Payne model; in only 44.4% of patients, a complete pathological response was correctly predicted.

In terms of margins, spiculated ones on mammograms are associated with low-grade and HR-positive breast cancer (luminal A), whereas in TN tumours, margins are most commonly circumscribed. According to the RCB classification, the odds of achieving pCR were highest in TNBC subtypes and lowest in luminal subtypes.

Our results suggest that breast cancer patients undergoing NAT who exhibit lower MD are more likely to achieve pCR.

OVERALL CONCLUSIONS

- The use of microfluidic devices to simulate the mechanical constraint cells experience in tissues revealed that CAFs isolated from breast cancer patients exhibit different migratory potentials.
- An increased migratory phenotype of CAFs was significantly associated with increased expression of miR-375 and decreased expression of miR-210 in primary breast tumours.
- Concomitantly, tumours with higher miR-375-3p and miR-210-3p expression were more sensitive to NAT, these two miRs representing potential prognostic markers for treatment response.
- A package of 70 differentially expressed genes among CAFs that exhibit different migration potentials has also been identified.
- Genes such as SIX1, STEAP2, ASPH, NOP56, PLAG1, TFPI, DDX39A, FABP5, LOXL2, ALDH6A1, NOP16, FAXDC2, LOXL4, EPOR, BNC2, PKD1, ZNF5034, CCDC85B, CPT1A, EVA1B and PINX 1 are significantly involved in modulating the migration rate of tumour cells.
- The association of increased expression of SIX1, STEAP2, ASPH, PLAG1, BNC2, PKD1 and CPT1A genes with the migratory phenotype of CAFs suggests the possibility that these genes represent potential therapeutic targets.
- Inhibition of specific genes that were found to be overexpressed in CAFs with migratory phenotype resulted in opposite effects in different cell lines, suggesting the multifactorial and incompletely elucidated role of various intrinsic factors involved in modulating cell motility.
- Herringbone microfluidic devices were used to isolate CTCs from breast cancer patients, as pre-processing peripheral blood for erythrocyte removal generates cleaner devices with higher CTC capture accuracy.
- Available technological limitations did not make it possible to quantify CTCs for the patients included in the study; their presumed association with NAT response still needs to be explored.
- Lower mammographic density was identified as a good prognostic factor for obtaining pCR following NAT.
- Compared to the RCB model, the Miller-Payne regression model showed a higher probability of correctly calculating the achievement of a complete pathological response in patients included in the study.