



Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” București
Facultatea de Medicină

TEZĂ DE DOCTORAT

Cercetări exploratorii ale nișei stem mamare

REZUMAT

Conducător de doctorat
Prof.Dr.Hab.Rusu Mugurel Constantin

Doctorand
dr. Petre Nicoleta

Cuprinsul Tezei de Doctorat

Introducere	Error! Bookmark not defined.
Lista de abrevieri	Error! Bookmark not defined.
1 Elemente de morfogeneză a glandei mamare	Error! Bookmark not defined.
2 Elemente de morfohistologie și histopatologie mamară	Error! Bookmark not defined.
2.1 Morfohistologia glandei mamare	Error! Bookmark not defined.
2.2 Histopatologia glandei mamare	Error! Bookmark not defined.
3 Celule stem, nișe stem	Error! Bookmark not defined.
3.1 Nișa stem hematopoietică	Error! Bookmark not defined.
3.1.1 Celule stem hematopoietice (HSC)	Error! Bookmark not defined.
3.1.2 Celule multipotente adulte progenitoare (MAPC)	Error! Bookmark not defined.
3.2 Nișa stem mezenchimală	Error! Bookmark not defined.
3.2.1 Celulele stem mezenchimale	Error! Bookmark not defined.
3.2.2 Diferențierea originii MSC în funcție de imunofenotip.	Error! Bookmark not defined.
3.2.3 Celule stem mezenchimale perivasculare	Error! Bookmark not defined.
3.2.4 Pericitele	Error! Bookmark not defined.
4 Noțiuni privind morfogeneza neovasculară	Error! Bookmark not defined.
4.1 Angiogeneza	Error! Bookmark not defined.
4.2 Vasculogeneza	Error! Bookmark not defined.
4.2.1 Rolul celulelor endoteliale progenitoare	Error! Bookmark not defined.
4.2.2 Rolul celulelor derivate din măduva osoasă ..	Error! Bookmark not defined.
4.3 Neovascularizația tumorală	Error! Bookmark not defined.
4.3.1 Angiogeneza tumorală	Error! Bookmark not defined.
4.3.2 Vasculogeneza tumorală	Error! Bookmark not defined.
4.3.2.1 Rolul celulelor stem canceroase (CSC)	Error! Bookmark not defined.
4.3.2.2 Rolul celulelor stem precanceroase (pCSC)	Error! Bookmark not defined.
4.3.2.3 Rolul precursorilor endoteliali	Error! Bookmark not defined.
5 Material și metodă	7
5.1 Material biologic	Error! Bookmark not defined.
5.2 Preparatele histologice	Error! Bookmark not defined.
5.3 Metoda imunohistochimică	Error! Bookmark not defined.
5.3.1 Anticorprii primari	Error! Bookmark not defined.

5.3.2	Preparatele imunohistochemice	Error! Bookmark not defined.
5.3.3	Documentarea rezultatelor.....	9
5.4	Microscopia electronică de transmisie	Error! Bookmark not defined.
6	Cercetări imunohistochemice ale nișei stem stromale mamare ...	Error! Bookmark not defined.
6.1	Introducere	Error! Bookmark not defined.
6.2	Rezultate	Error! Bookmark not defined.
6.2.1	Imunomarcarea cu nestină a stromei mamare.....	Error! Bookmark not defined.
6.2.2	Imunomarcarea cu CD133 a stromei mamare	Error! Bookmark not defined.
6.2.3	Imunoexpresia vimentinei în stroma mamară	Error! Bookmark not defined.
6.2.4	Imunoexpresia CD31 în stroma mamară	Error! Bookmark not defined.
6.2.5	Imunoexpresia stromală mamară a CD34.....	Error! Bookmark not defined.
6.2.6	Imunoexpresia VEGFR-2 în stroma mamară ..	Error! Bookmark not defined.
6.2.7	Imunoexpresia mamară a Ki67	Error! Bookmark not defined.
6.2.8	Imunomarcarea cu CK7 a țesutului mamar non-tumoral	Error! Bookmark not defined.
6.2.9	Imunoexpresia Oct3/4 la nivelul glandei mamare	Error! Bookmark not defined.
6.2.10	Imunoexpresia c-erbB-2 la nivelul stromei mamare.....	Error! Bookmark not defined.
6.2.11	Imunoexpresia CD146 la nivelul stromei mamare	Error! Bookmark not defined.
6.2.12	Fenotipul c-kit în stroma mamară.....	Error! Bookmark not defined.
6.2.13	Studiul imunohistochemic al telocitelor mamare.....	Error! Bookmark not defined.
6.2.13.1	Telocite mamare în țesut normal.....	Error! Bookmark not defined.
6.2.13.2	Telocite mamare la nivelul frontului tumoral	Error! Bookmark not defined.
6.3	Discuții.....	Error! Bookmark not defined.
6.3.1	Markerul proliferativ Ki67	10
6.3.2	Celule progenitoare circulante la nivelul stromei mamare..	Error! Bookmark not defined.
6.3.3	Celule endoteliale progenitoare la nivelul stromei mamare	10
6.3.4	Rolul nișei stem microvasculare în structurarea nișelor stem stromale mamare	11
6.3.5	Telocitele mamare	13

6.3.6	Stroma mamară la nivelul frontului tumoral – telocitele asociate carcinomului mamar	15
6.3.6.1	Fenotipul mioid al telocitelor peritumorale.....	15
6.3.6.2	Telocitele CD34– și celulele stem mezenchimale, componente stromale peritumorale	16
6.3.6.3	Expresia mamară a p120 în celulele stromale	18
6.3.7	Expresia nestinei în celule stromale.....	19
6.3.8	Expresia CD133 în celulele stromale mamare.....	19
6.3.9	Platelet-Derived Growth Factor- β (PDGFR- β)	Error! Bookmark not defined.
6.3.10	Expresia stromală a c-erbB-2	19
6.3.11	Formarea de neovase în stroma mamară	20
7	Cercetări ultrastructurale ale nișei stromale mamare... Error! Bookmark not defined.	
7.1	Introducere	Error! Bookmark not defined.
7.2	Rezultate	Error! Bookmark not defined.
7.3	Discuții.....	Error! Bookmark not defined.
7.3.1	Centrozomii, ciclul celular și celulele fibroblastoide/telocitare.....	Error! Bookmark not defined.
7.3.2	Subseturi de telocite cu potențial stem/progenitor	23
7.3.3	Pericitele și celulele perivasculare – nișa stem universală a țesutului adult 24	
	Concluzii	25
	Bibliografie	Error! Bookmark not defined.
	Index de figuri în text	Error! Bookmark not defined.

IPOTEZĂ

Abordarea limitată a procesului de progresie tumorală precum un proces etapizat definit prin acumularea de mutații în celulele stem canceroase a ignorat consistent contribuția micromediului tumoral la procesul malign.

Celulele carcinomatoase, precum și cele epiteliale normale, se găsesc într-un micromediu complex constituit din matricea extracelulară, factori de creștere, citokine difuzibile și o populație heterogenă de celule non-epiteliale, iar elucidarea compoziției stromei peritumorale poate determina avansul înțelegerii biologiei cancerului.

Numeroase studii au încercat să caracterizeze telocitele. Studiile publicate în ultimii ani indică din ce în ce mai frecvent faptul că aceste telocite ar putea fi, cel puțin la nivel de subseturi sau subpopulații, celule cu fenotip stem sau progenitor.

În cercetările mele doctorale am pornit de la ipoteza existenței la nivelul țesutului mamar atât normal, non-tumoral, cât și peritumoral, a unei nișe stem stromale cu un model molecular care ar putea permite identificarea unor linii celulare descendente distincte.

Scopul cercetărilor mele a fost în principal de a explora anatomia moleculară a celulelor stromale mamare, căutând în același timp să caracterizez funcțional telocitele mamare prin aprecierea fenotipului ultrastructural al acestora, folosind microscopia electronică de transmisie.

Cercetările mele de doctorat au fost susținute financiar prin contractul de studii universitare de doctorat cu bursă finanțată din Fondul Social European de către Organismul Intermediar pentru Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane (POS DRU), în cadrul proiectului „*Burse doctorale și postdoctorale în sprijinul inovării și competitivității în cercetare (InnoRESEARCH)*” nr.13855/30.05.2014.

REZUMAT PARTE GENERALĂ

Dezvoltarea și diferențierea glandei mamare sunt procese dinamice, care includ multiple stadii de proliferare și morfogeneză, controlate de o serie de hormoni

și factori de creștere, atât în viața intrauterină cât și postnatal, în funcție de diferitele etape ale vieții reproductive.

Cancerul mamar reprezintă o leziune heterogenă, cuprinzând multiple entități, diferite din punct de vedere genetic, al evoluției clinice, al aspectului histopatologic sau al responsivității la tratament și al prognosticului.

Numeroasele cercetări efectuate în domeniul celulelor stem susțin faptul ca acestea reprezintă o sursă tisulară enormă în cadrul terapiilor regenerative fiind caracterizate de o capacitatea de proliferare nelimitată, autoreînnoire și de diferențiere în țesuturi mature, derivate din toate cele trei foșe embrionare.

Celule stem sunt clasificate în trei mari categorii: celule stem embrionare, celule stem adulte și celule stem pluripotente induse.

Celulele stem adulte au capacitatea de autoregenerare, de menținere a morfologiei și funcției țesutului de origine, fiind caracterizate de o plasticitate crescută având capacitatea de a adopta și exprima fenotipuri funcționale ale celulelor aparținând altor țesuturi. Capacitatea de autoreînnoire a celulelor stem trebuie sa echilibreze nevoile tisulare permanente cu potențialul de hiperplazie sau de transformare malignă.

Celulele stem hematopoietice (HSC) reprezintă cele mai studiate celule stem de tip adult, atât fenotipic cât și funcțional. Localizate la nivelul măduvei spinării, se divid sporadic dând naștere progenitorilor hematopoietici, precursori ai populațiilor celulare hematopoietice diferențiate, care pătrund zilnic în sângele periferic.

Celulele progenitoare adulte multipotente (MAPC) sunt celule primitive non-hematopoietice derivate din măduva osoasă cu capacitate de diferențiere și de proliferare vaste, descrise prima dată în 2002 la rozătoare.

Pornind de la o singură celulă, au capacitatea de a diferenția pe una dintre cele trei linii celulare, endodermale, mezodermale sau neuroectodermale.

Sunt studii care indică faptul că celule derivate din MAPC exprimă în continuare OCT-4, dar exprimă și markeri moleculari timpurii specifici diferențierii pe cele trei linii germinale.

Celulele stromale/stem mezenchimale (MSC) au fost descrise pentru prima dată în urmă cu 130 de ani, ca celulele stem multipotente, non-hematopoietice, produse de măduva osoasă.

MSC reprezintă o populație heterogenă de celule multipotente care pot fi izolate în diferite alte țesuturi sau organe umane precum în țesutul adipos, muscular, cordon ombilical, cord și sunt caracterizate de capacitatea de a produce diferite substanțe paracrine cu rol în regenerarea tisulară, menținerea homeostaziei și imunomodulare. Diferite studii au demonstrat dispoziția perivasculară a MSC la nivelul întregului organism precum și capacitatea de a secreta diferiți factori angiogenici sugerând participarea lor la formarea de noi vase in vivo.

Astfel s-a ridicat ipoteza originii vasculare a MSC care de la acest nivel migrează în întregul organism, inclusiv în țesutul adipos, unde rezidă sub forma de ADSC (celule stem adipocitare).

Pericitele, descrise încă din 1923 ca celule cu prelungiri citoplasmice care înconjoară celulele endoteliale pe partea opusă lumenului vascular de calibru mic, sunt considerate în ultimul timp ca fiind progenitori mezenchimali, prin capacitatea demonstrată de a diferenția în osteoblaste, condrocite sau adipocite.

Ulterior s-a demonstrat capacitatea lor regenerativă și de vindecare, dar și implicarea în angiogeneza tumorală prin recutarea din țesuturile înconjurătoare sau din măduva osoasă, sugerându-se ipoteza că pericitele reprezintă o subpopulație de MSC, dar nu toate MSC dețin intrinsec comportament pericitar.

Deși capilarele nu dețin adventice, celule progenitoare adventiceale (APC) există și la acest nivel prin demonstrarea prezenței celulelor cu fenotip CD34+CD31-CD140b-SMA- care pot diferenția spontan sau indus în pericite, în celule endoteliale și în celule musculare netede. În același timp APC pot diferenția și în alte subtipuri celulare specifice precum adipocite, osteocite sau condrocite ridicându-se ipoteza ca de fapt acestea să reprezinte adevăratele celule stem vasculare (VSC) .

Angiogeneza reprezintă procesul prin care noi vase se formează din vase preexistente, atât în cadrul dezvoltării embrionare cât și în situații patologice postnatal, în evoluția diferitelor boli precum diabetul sau în timpul dezvoltării tumorale, fiind astfel responsabil de remodelarea și extinderea rețelei vasculare.

Vasculogeneza reprezintă formarea de noi vase în stadiile timpurii ale embriogenezei din angioblaști, precursori mezodermali in situ sau hemangioblaști, precursori hematopoietici in situ, care prin migrare și coeziune vor forma o rețea

vasculara primitivă alcătuită din cordoane și tubi, ce vor da naștere patternului vascular final.

Celulele endoteliale progenitoare (EPC), considerate ca fiind derivate din hemangioblaști, sunt celule precursorare capabile să diferențieze în celule endoteliale mature acolo unde este necesară vasculogeneza.

Neovascularizația tumorală este un element critic pentru creșterea tumorală. Noile vase se formează atât prin angiogeneză, din vase preexistente din apropierea procesului tumoral (prin intususcepție, mimetism vasculogenic, cooptare vasculară sau limfangiogeneză) cât și prin vasculogeneză, din progenitorii vasculari circulanți recrutați și migrați de la nivelul măduvei osoase.

Există studii care susțin teoria conform căreia vascularizația tumorală poate avea originea în celulele stem canceroase (CSC), o populație celulară izolată în țesuturile maligne, cu proprietăți stem de autoreînnoire și de diferențiere multiplă, care determină progresia tumorală și rezistența la tratament.

REZUMAT PARTE SPECIALĂ

MATERIAL ȘI METODĂ

Am evaluat probe tisulare de la 20 de paciente cu vârste cuprinse între 42 și 58 de ani, diagnosticate clinic și imagistic cu tumori mamare cu grade BIRADS IV și V, care au suferit intervenții chirurgicale de tip sectorectomie pentru examenul extemporaneu de certitudine, urmate în același timp operator, de mastectomie de completare cu evidare ganglionară axilară.

Din punct de vedere histopatologic, dintre cele 20 de tumori examinate, 19 au fost diagnosticate ca și carcinom mamar ductal invaziv, de tip NOS, cu grade de diferențiere variate, de la G1 la G3 și un singur caz de tip lobular invaziv, G3.

De asemenea am utilizat fragmente de țesut mamar nontumoral prelevate de la 2 cadavre de sex feminin cu vârsta de 49 de ani, respectiv 57 de ani. Pacientele sau aparținătorii acestora au fost informați și și-au dat consimțământul informat pentru utilizarea țesuturilor în scop de diagnostic și cercetare.

Studiul țesuturilor autopsice a fost condus în acord cu legislația națională privind utilizarea cadavrelor în scop de cercetare (inclusiv Legea 104/2003 privind

manipularea cadavrelor umane) și cu principiile generale ale Declarației de la Helsinki, revizia Rio de Janeiro.

Specimenele tisulare au fost conservate în formol tamponat (8%), fiind ulterior incluse în parafină și pregătite pentru imunohistochimie. Blocurile de parafină au fost procesate cu un histoprosesor automat (Diapath, Martinengo, BG, Italy). Secțiunile au fost tăiate manual la 3 μm și au fost montate pe lame electrostatice SuperFrost® pentru imunohistochimie (Thermo Scientific, Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany). Pentru evaluarea histologică am folosit secțiuni de 3-4 μm grosime colorate cu hematoxilină-eozină.

Pentru imunomarcarea cu CD34 și Stro-1 țesuturile au fost deparafinate și hidratate, apoi au fost blocate peroxidazele endogene cu Peroxidazed 1 (Biocare Medical, Concord, CA, USA). Pentru digestia enzimelor s-a folosit tripsina – Carezyme I. Biotina endogenă a fost blocată și s-a aplicat blocant de background pentru a reduce colorația nespecifică. A fost aplicat anticorpul primar la diluția indicată, la temperatura camerei, pentru 60 minute. Ulterior a fost folosită o detecție în doi timpi cu HRP (horseradish peroxidase) cu un sistem de detecție 4 plus, fiind aplicat un cromogen (DAB) compatibil cu HRP.

Pentru imunomarcarea cu Ki67, Oct3/4, CD10, CD68, CD146, c-erbB2, CK7, CD45, SMM și α-SMA țesuturile au fost deparafinate și hidratate, apoi au fost blocate peroxidazele endogene cu Peroxidazed 1 (Biocare Medical, Concord, CA, USA). Pentru descoperirea la căldură a epitopului a fost utilizată o cameră de demascare – Decloaking Chamber (Biocare Medical, Concord, CA, SUA) și soluție de recuperare pH 6 (Biocare Medical, Concord, CA, SUA). S-a folosit Background Blocker (Biocare Medical, Concord, CA, USA) pentru a reduce colorația de fond nespecifică. Anticorpii primari au fost aplicați la diluțiile specifice respective. A fost folosit sistemul de detecție MACH 4 (Biocare Medical, Concord, CA, USA) care este o metodă de detecție cu HRP universală în doi timpi (sondă/polimer). A fost aplicat un cromogen (DAB) HRP-specific.

Pentru imunomarcarea cu CD133, PDGFR-β, CD117/c-kit, nestină, VEGFR-2, p120 și CD31 țesuturile au fost deparafinate și hidratate, apoi au fost blocate peroxidazele endogene cu Peroxidazed 1 (Biocare Medical, Concord, CA, USA). Pentru descoperirea la căldură a epitopului a fost utilizată o cameră de demascare –

Decloaking Chamber (Biocare Medical, Concord, CA, SUA) și soluție de recuperare pH 6 (Biocare Medical, Concord, CA, SUA). S-a folosit Background Blocker (Biocare Medical, Concord, CA, USA) pentru a reduce colorația de fond nespecifică. Anticorpii primari au fost aplicați la diluțiile specifice respective. A fost folosit sistemul de detecție MACH 2 rabbit HRP polymer detection (Biocare Medical, Concord, CA, USA) care constă dintr-un singur reactiv aplicat peste anticorpul primar. A fost aplicat un cromogen (DAB) HRP-specific.

Toate secțiunile au fost supracolorate cu hematoxină și clătite cu apă deionizată. Pentru spălare s-a folosit soluție Tris-Buffered Saline la pH de 7,6.

Lamele de microscopie au fost analizate; au fost făcute microfotografii care au fost scalate pe o stație calibrată. Am utilizat o stație de lucru Zeiss compusă dintr-un microscop AxioImager M1 cu o cameră AxioCam HRc și comandat printr-un software de procesare digitală a imaginii microscopice AxioVision (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Pentru explorare în TEM fragmentele tisulare de circa 1-2 mm³ au fost prefixate în glutaraldehidă 4% proaspătă rece în tampon de cacodilat de sodiu, pH 7.4, 4 ore la 4°C. După fixare țesuturile au fost spălate de 6 ori în tampon de cacodilat de sodiu 0.05M, pH 7.4 la 4°C, apoi au fost postfixate în tetroxid de osmiu 2% în cacodilat de sodiu 0.1M la temperatura camerei timp de 2½ ore, colorate în bloc cu acetat de uranil apos 0.5% peste noapte la 4°C și spălate cu cacodilat de sodiu 0.05M. După deshidratare în serii gradate de etanol și infiltrare cu oxid de propilenă, speciunile au fost incluse în eter Glycid (echivalent Epon 812) și în final au fost polimerizate la 60°C timp de 48 de ore. Secțiunile semifine au fost colorate cu albastru de toluidină 1% pentru examinare în microscopie optică. Secțiunile ultrafine (80-100 nm) au fost tăiate cu un cuțit de diamant și au fost colectate pe grile de cupru, fiind apoi dublu contrastate, cu acetat de uranil și apoi cu citrat de plumb. Grilele au fost examinate într-un microscop electronic Philips EM 208S operat la un voltaj de accelerare de 80 kV. A fost utilizat un sistem de achiziție a imaginilor compus dintr-o cameră video Veleta și un software, iTEM Olympus Soft Imaging System.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Markerul proliferativ Ki67

Expresia pozitivă a Ki67, marker al proliferării celulare la nivelul stromei mamare am identificat-o în celule non-fibroblastoide/non-telocitare; acest fapt poate fi corelat cu identificarea unor componente stem/progenitoare atât extrinseci, din surse extramamare, precum măduva osoasă, cât și intrinseci rezidente dormante.

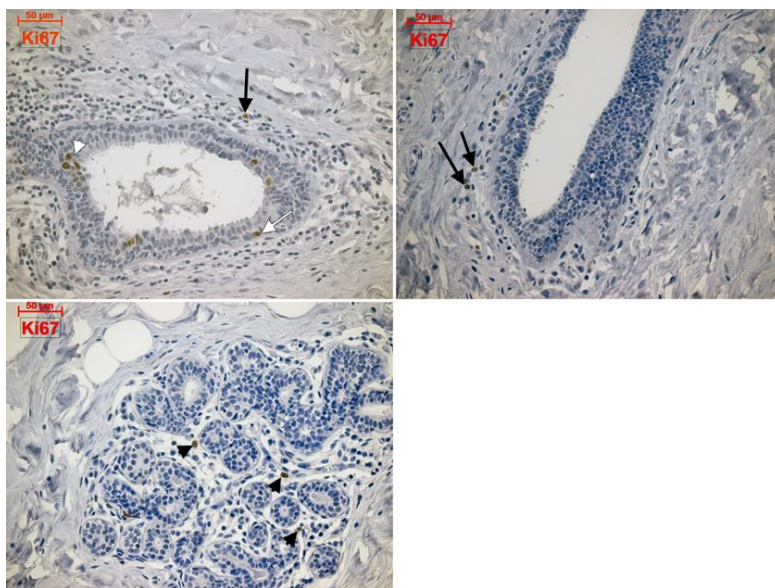


Fig. 0-1 – Expresia Ki67 este pozitivă în celule epiteliale, luminale (vârf de săgeată albă) și bazale (săgeată albă) și în celule stromale periductale (săgeata neagră) și intralobulare (vârfuri de săgeți negre).

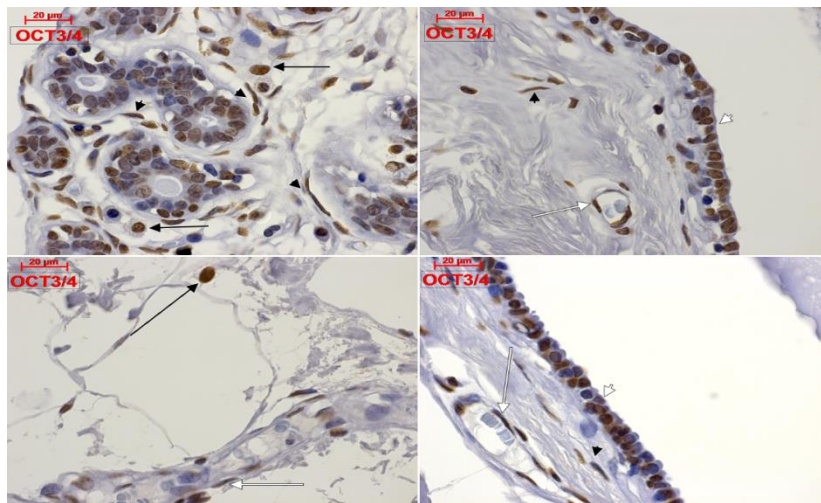
Celule endoteliale progenitoare la nivelul stromei mamare

În studiul lui Asahara, celulele progenitoare endoteliale derivate din celulele mononucleare circulante CD34+ participă în procesul vasculogenezei. Alte studii susțin existența unui alt tip de EPC cu originea la nivelul măduvei osoase, care ajung ulterior în circulația periferică, dar au morfologie și capacitate proliferativă diferită de cea a EPC descrise de Asahara. În același timp, există dovezi conform cărora celulele progenitoare adulte multipotente (MAPC), caracterizate de un imunofenotip specific CD34+, VE-caderină, AC133 și Flk1 pot reprezenta sursa celulelor progenitoare endoteliale circulante.

Oct-4, factor de transcripție cu rol în reglarea procesului de autoreînnoire a celulelor stem embrionare și implicit un marker al pluripotenței, a fost evidențiat la nivelul celulelor stem adulte, al celulelor stem canceroase iar recent și la nivelul

celulelor somatice. Oct-4 are capacitatea de a remodela fenotipul celulelor endoteliale la celule progenitoare endoteliale prin stimularea genelor responsabile cu menținerea stării stem și reducerea celor responsabile cu diferențierea celulară.

Astfel, evidențele aduse de mine, ale fenotipului Oct3/4-pozitiv al celulelor endoteliale, coroborate cu expresia acestui antigen și în celule perivasculare, pot indica faptul că celule endoteliale progenitoare ale stromei mamare pot rezulta din dediferențierea celor preexistente în pereții microvaselor rezidente, deci că nișa microvasculară este una stem, cu potențial în remodelarea la nivelul stromei mamare.



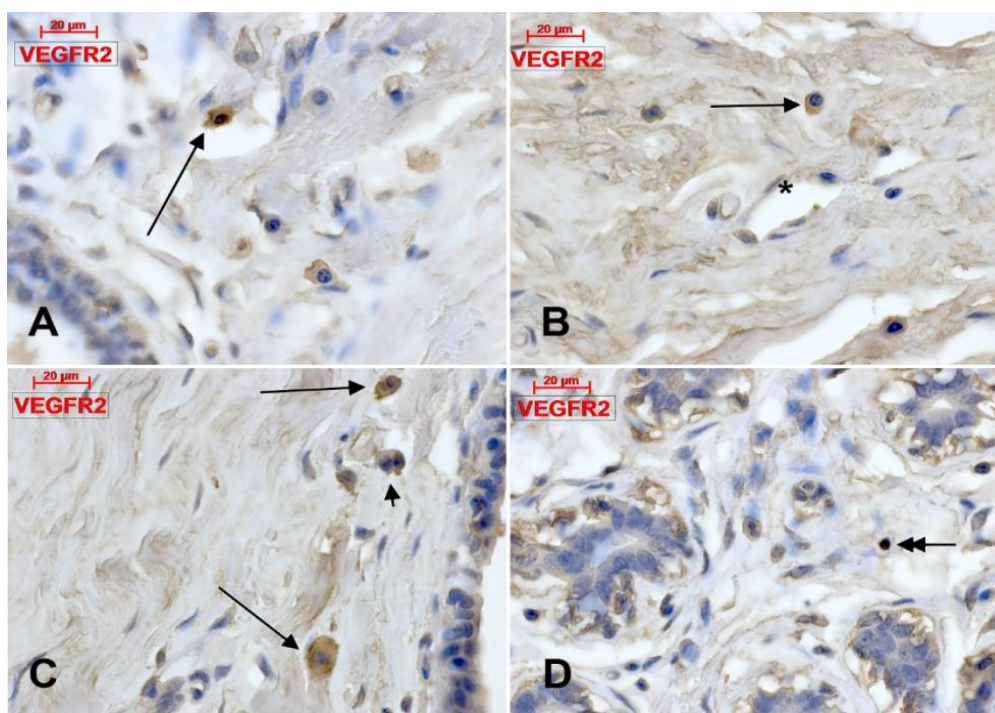
Imunoexpresia Oct-3/4 la nivelul țesutului mamar normal paratumoral este pozitivă în epiteliile ductale (vârfuri de săgeți albe) și acinare precum și în endoteliile microvasculare (săgeți albe) și în celule stromale izolate rotund-ovalare (săgeți negre) și fibroblastoide (vârfuri de săgeți negre).

Rolul nișei stem microvasculare în structurarea nișelor stem stromale mamare

În ultimii ani studiile au încercat să definească populațiile celulare având caracteristicile fenotipice și funcționale ale celulelor endoteliale. Un scenariu posibil este acela în care în sânge se găsesc rare celule endoteliale progenitoare, denumite celule endoteliale formatoare de colonii, sau progenitori endoteliali tardivi, care nu au origine din măduva osoasă și au capacitatea de a genera celule endoteliale fenotipic și funcțional competente ce pot fi încorporate în pereții neovaselor. Astfel de celule se găsesc în circulație dar și în pereții vasculari, precum celule rezidente în intima vasculară endotelială. Pe lângă acești progenitori se mai găsesc celule progenitoare hematopoietice care au capacitatea de a genera descendență monocitară care are *in vivo* acțiune pro-angiogenică dar care nu poate fi încorporată în pereții neovaselor.

Deși este binecunoscut faptul că celulele endoteliale și murale au origini diferite la nivelul majorității țesuturilor, Chen și colaboratorii (2016) au demonstrat că la nivelul cordului cele două linii celulare au origine comună, la nivelul aceleiași populații progenitoare. Deși numeroase studii au susținut originea lor în mezenchimul adiacent acum se cunosc numeroase alte surse celulare pentru pericite, cum ar fi creasta neurală pentru pericitele de la nivelul retinei, creierului sau timusului.

Deoarece sunt puține studii în literatură privind transdiferențierea celulelor endoteliale in vivo, se presupune că acest proces este unul destul de rar, condiționat de anumite situații. Există studii conform cărora celulele endoteliale pot exprima markeri precum α -SMA, indicând astfel fenomenul de tranziție endotelial-mezenchimală. În același timp celulele mezenchimale se pot diferenția în celule endoteliale, participând la procesul de neovascularizație din leziunile ischemice acute. Toate aceste date indică faptul că celulele endoteliale nu au rol numai în neovascularizație, dar prin capacitatea de diferențiere multiplă au un rol mult mai complex, fiind necesare studii suplimentare pentru a reuși identificarea celulelor mezenchimale rezultate în urma proceselor noi de transformare endotelial-mezenchimală de cele rezultate în timpul dezvoltării embrionare.



Imunomarcarea cu VEGFR-2 a țesutului mamar normal paratumoral. Sunt identificate celule stromale care exprimă antigenul respectiv (săgeți, A, B, C), unele având fenotip proliferativ (C:vârf de săgeată, D:săgeată cu vârf dublu).

Telocitele mamare

Un studiu recent a analizat “fibrocitele” CD34+ din stroma mamară glandulară, observând pierderea expresiei stromale a CD34 și achiziționarea expresiei SMA, ca factor favorizant al invazivității carcinoamelor mamare.

În cadrul aceluiași studiu au fost menționate o serie de lucrări despre fibrocitele circulante derivate din măduva osoasă, prima dată descrise de Bucala și colaboratorii, care se consideră că au rol în procesele reparatorii și prezintă un fenotip complex, hematopoietic, mezenchimal și stromal (CD34+/CD45+/vimentina și/sau collagen I, collagen III, alfa-SMA).

Diaz-Flores și colaboratorii au adus dovezi care susțin că fibroblastele/fibrocitele stromale CD34+, indiferent de denumirea primită anterior de la diferite echipe de cercetători, după ce pierd imunoexpresia pentru CD34, se comportă ca celule stem progenitoare mezenchimale, fiind capabile să regleze creșterea, maturarea și diferențierea celulelor învecinate, participând astfel la imunomodularea tisulară.

Deși telocitele sunt încă studiate cu interes și se consideră că pot fi atât celule rezidente cât și derivate din măduva osoasă, studiile actuale nu au luat considerare ipoteza conform căreia acestea nu sunt numai celule “doică” pentru celulele stem învecinate ci pot fi celule tranzitorii de amplificare (TAC), derivate din celule stem învecinate, teorie susținută de fenotipul CD34, c-kit +.

Această ipoteză este susținută de teoria conform căreia telocitele se comportă ca celule progenitoare, adică TAC.

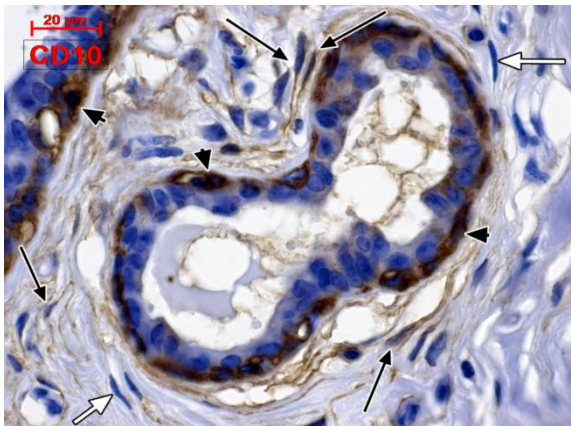
În studiul de față am găsit un imunofenotip CD34+ dar c-kit-, întărind ipoteza lui Diaz-Flores conform căreia aceste celule stromale au un comportament stem/progenitor după ce pierd expresia pentru CD34. Astfel, se pare că fenotipurile CD34, c-kit, se exclud reciproc la nivelul celulelor fibroblastoide stromale.

În cazul studiului actual, fenotipul CD34+ /c-kit negativ poate indica faptul că nu este vorba de celule de tip endotelial, HSC fiind deja excluse fiind vorba de un compartiment stromal. Totuși fenotipul mezenchimal stem/progenitor al celulelor fibroblastoide stromale mamare este susținut de rezultate recente ale altor studii, în cadrul cărora telocitele au exprimat CD29, un cunoscut marker specific MSC.

Experimente anterioare au demonstrat că telocitele sunt pozitive pentru vimentină iar negativitatea unor celule fibroblastoide pentru vimentină indică faptul

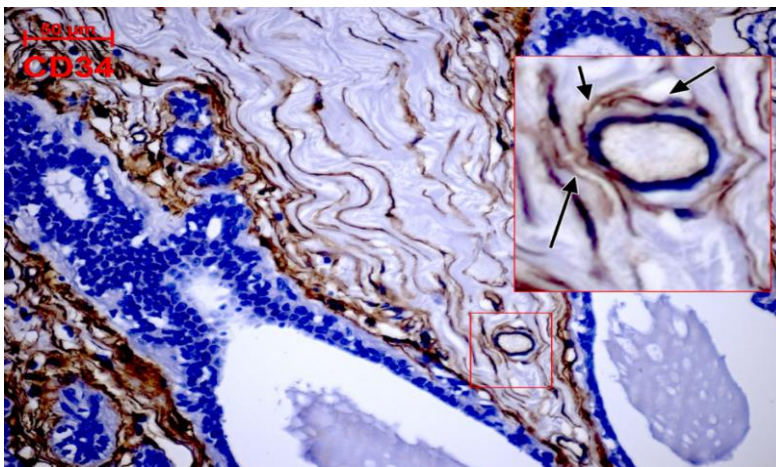
că celulele la care fac referire sunt rezidente în stroma mamară și nu fac parte dintre fibrocitele circulante.

În studiul prezent, expresia CD10 este una heterogenă comparativ cu expresia omogenă a CD34, indicând diferite stadii de achiziție a fenotipului MSC de către aceste celule. Celule CD10 pozitive sunt distribuite în jurul vaselor și a ductelor excretoare. Această observație este în concordanță cu cea a echipei de cercetători condusă de Kim, care a observat pe fetești umani că CD10 este exprimat de celulele stromale juxtaepiteliale.



Imunomarcarea cu CD10 a țesutului mamar normal. Celulele mioepiteliale ductale exprimă CD10 (vârfuri de săgeți). Celulele stromale intralobulare sunt fie CD10+ (săgeți negre) fie CD10- (săgeți albe).

O altă observație a studiului este prezența de celulele stromale CD34 pozitive care se dispun în multiple straturi perivascular sau în jurul ductelor excretorii și care realizează conexiuni cu celule stromale, de asemenea CD34 pozitive. Acestea sunt celule fibroblastoide (celulele „Veil” ale lui Majno) cu trăsături morfologice mezenchimale și cu potențial de celule stem mezenchimale iar prin evidențierea lor, teoria conform căreia nișa stem adultă este situată perivascular capătă consistență.



Imunomarcarea cu CD34 a țesutului mamar normal. Celule stromale fibroblastoide CD34+ (săgeți) sunt legate în serie. În situsurile microvasculare și capilare astfel de celule devin perivasculare (chenar, detaliu mărit).

Astfel, luând în considerare aspectul morfologic (forma fuziformă, prelungiri lungi, moniliforme, cu rol în realizarea conexiunilor celulare stromale) dar și imunoreactivitatea caracterizată de CD34+/CD10±/c-kit-/vimentină- a celulelor stromale intra- și interlobare, se poate considera că aceste celule sunt de fapt telocite, cu potențial MSC susținut de fenotipul imunohistochimic.

Stroma mamară la nivelul frontului tumoral – telocitele asociate carcinomului mamar

Tipurile celulare stromale recrutate la frontul tumoral sunt diverse: celule endoteliale vasculare, pericite, adipocite, fibroblaști și celule mezenchimale stromale derivate din măduva osoasă. În mod normal celulele stromale devin celule reactive în procese de vindecare și în procese inflamatorii; în anumite condiții celulele tumorale cooptează celulele stromale reactive și acestea se vor transforma în celule stromale asociate tumorii (*tumor-associated stromal cells*, TASCs). Există un interes clar pentru rolul interacțiunilor tumoră-stromă pe baza cărora are loc progresia tumorală iar fibroblaștii asociați carcinoamelor (*carcinoma-associated fibroblasts*, CAFs), care se găsesc frecvent în stroma carcinoamelor mamare și promovează tumorigeneza, includ de obicei un subset de miofibroblaști, care reprezintă o caracteristică a fibroblaștilor activați.

La nivelul micromediului tumoral au loc procese de transdiferențiere celulară, fie din celule stromale în alte celule stromale, fie din celule tumorale în celule stromale (transdiferențiere stromal-stromală și tumoral-stromală), cel mai frecvent citat exemplu fiind cel al transdiferențierii fibroblaștilor în miofibroblaști activați în decursul formării stromei reactive. Se descrie de asemenea transdiferențierea pericitelor în celule endoteliale sau în fibroblaști, ceea ce conduce la formarea de celule stromale asociate tumorilor. Pe de altă parte celulele canceroase au capacitatea de a se transdiferenția în celule stromale-like pentru a facilita progresia tumorală. Un studiu a identificat faptul că celule tumorale stem-like se pot diferenția în celule endoteliale pentru a întreține mimetismul vasculogenic.

Fenotipul mioid al telocitelor peritumorale

Un concept din biologie indică faptul că un status diferențiat al unei celule specializate necesită un input reglator continuu și astfel poate prezenta o plasticitate

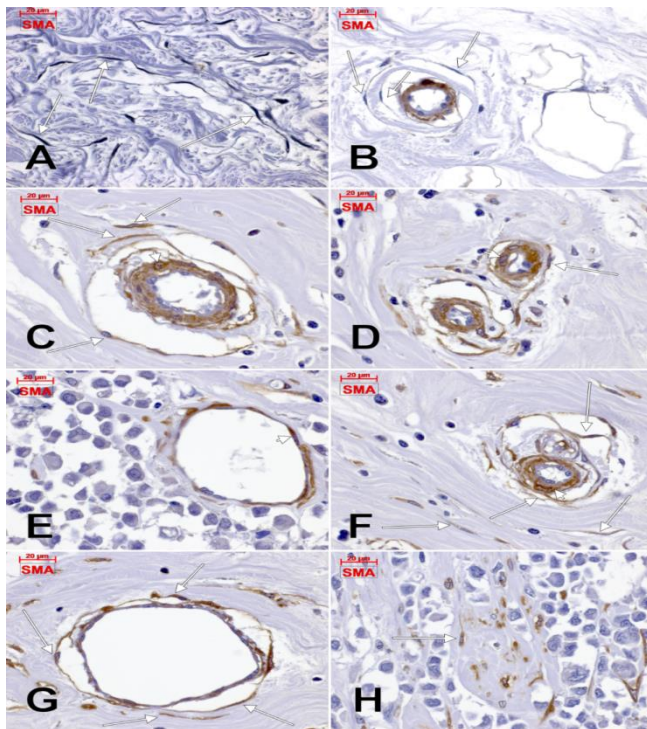
remarcabilă. A fost demonstrat faptul că genele mioide pot fi activate în celule care inițial nu au prezentat un fenotip mioid.

De aceea a fost realizat un studiu al expresiei comparative a α -SMA în celulele mioepiteliale ale glandei mamare umane și miofibroblaștii stromei reactive din cancere mamare. Astfel, a fost apreciată expresia α -SMA, lanțului greu de miozină din mușchiul neted, integrinei $\alpha 1$, calponinei, caldesmonului cu greutate moleculară mare și a patru markeri epiteliali, dintre care a făcut parte citokeratina 17. Toți markerii au fost exprimați concomitent în celulele mioepiteliale. Celulele luminale au exprimat doar markerii epiteliali. Miofibroblaștii stromali au exprimat toți markerii mioizi enumerați aici, cu excepția caldesmonului.

Tranziția epitelial-mezenchimală (EMT) este un proces prin care fenotipul celular epitelial este modificat odată cu pierderea desmozomilor și joncțiunilor adherens prin transformarea filamentelor intermediare din citokeratine în vimentină cu rol în progresia tumorală. Am identificat în cercetările mele expresia CK7 în celulele epiteliale luminale; acest lucru este comun, deoarece se cunoaște faptul că sunt citokeratine luminale, markeri ai diferențierii glandulare, precum CK7, CK8 și CK18, și citokeratine bazale, markeri ai celulelor progenitoare și ai celulelor primitive din liniile de diferențiere glandulară și mioepitelială, precum CK5, CK14 și CK17. Faptul că în stroma normală mamară nu am identificat expresia CK7 poate reprezenta un criteriu de excludere al unui proces de transformare epitelial-mezenchimală de tip patologic, susținând fenotipul structural normal asumat de mine pentru țesutul respectiv.

Alfa-SMA este de asemenea prezentă în celule stem și precursori ale acestora precum și în celulele stem mezenchimale și în celulele musculare netede derivate din mezenchim, miofibroblaste și pericite.

Alfa-SMA este de asemenea un marker care evidențiază tranziția epitelial-mezenchimală. Diverse studii susțin faptul că miofibroblastele alfa-SMA pozitive reținute în stroma peritumorală, dețin un rol major în progresia și metastazarea carcinoamelor mamare.



Expresia mamară stromală a α -SMA. A: celule stromale cu morfologie telocitară localizate la distanță de frontul tumoral nu exprimă α -SMA (săgeți).

B: celule perivasculare ale stromei mamare normale nu exprimă α -SMA (săgeți).

C, D, F: expresia pozitivă a α -SMA în stroma peritumorală este identificată în pericite (vârf de săgeată) și în celule cu morfologie telocitară (săgeți), perivasculare și stromale (înglobate în colagen).

E: la marginea frontului tumoral este identificată expresia endotelială a α -SMA (vârf de săgeată).

G: telocite perivasculare (săgeți) exprimă α -SMA.

H: telocit α -SMA-positiv în stroma tumorală (săgeată).

Telocitele CD34- și celulele stem mezenchimale, componente stromale peritumorale

A fost realizat un studiu complex care a comparat CAF cu fibroblaștii stromei mamare normale și prin analiza markerilor de suprafață s-a observat că aceștia sunt aproape identici atât la CAF cât și la fibroblaștii normali, observându-se diferențe doar în privința CD105.

Astfel, expresia redusă a CD105 în fibroblaști poate conduce la speculații privind compoziția și originea stromei tumorale la indivizi cu agresivități diferite ale tumorii. Din această perspectivă trebuie privită și evidența pe care am prezentat-o, cea a fenotipului CD34-negativ al celulelor cu morfologie telocitară de la nivelul stromei peritumorale a unui carcinom mamar de tip lobular invaziv, G3, pT2, cu profil molecular de triplu negativ, bazal-like. Telocitele sunt celule fibroblastoide care în stroma mamară normală exprimă consistent CD34, iar lipsa expresiei CD34 la frontul tumoral nu face altceva decât să susțină corelația acestui fenotip CD34 cu agresivitatea demonstrată diagnostic a tipului de cancer mamar. Pe de altă parte trebuie să discut aici fenotipul CD34 din perspectiva nișelor stem stromale, având în vedere observații recente ale cercetătorilor spanioli care susțin faptul că celulele stromale care exprimă CD34, denumite inconsecvent fie ca fibroblaști, fie ca telocite,

fie ca fibrocite, reprezintă o rezervă tisulară de celule și o resursă importantă de MSC.

Conservarea expresiei CD34 se corelează cu un potențial proliferativ crescut, demonstrat prin expresia Ki67.

Expresia mamară a p120 în celulele stromale

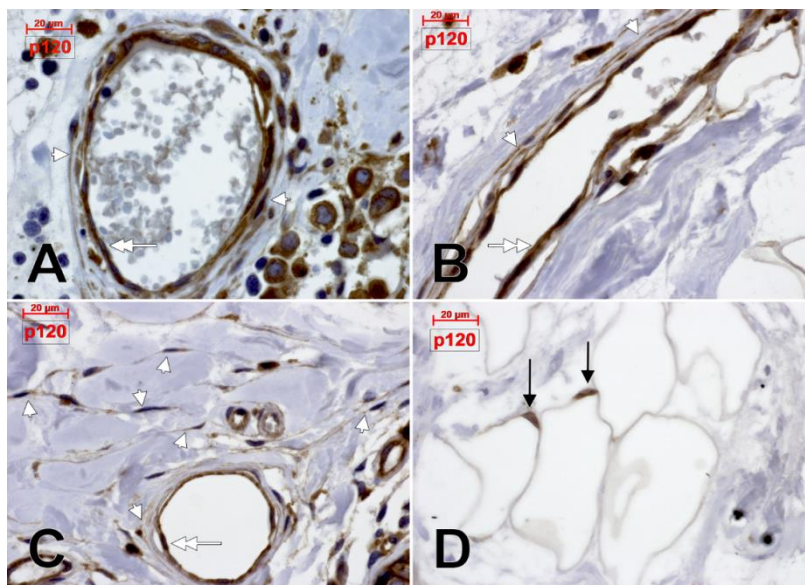
Caderinele epiteliale (E-caderine) dețin un rol esențial în morfogeneza și menținerea homeostaziei țesuturilor epiteliale, inclusiv la nivelul epiteliului glandular mamar. Catenina p120 reglează adeziunea intercelulară prin menținerea caderinelor pe suprafața celulară, în absența ei acestea fiind internalizate și degradate.

Independent de interacțiunea cu caderinele, p120 are capacitatea de a promova capacitatea invazivă a tumorilor. Pierderea E-caderinei și supraexpresia caderinelor mezenchimale favorizează transformarea epitelial-mezenchimală.

O expresie crescută a p120 a fost observată la nivelul fibroblastelor unde a indus apariția unui fenotip dendritic prin stimularea ramificării proceselor citoplasmice. Astfel expresia pozitivă a cateninei p120 pe care am identificat-o în celulele fibroblastoide/telocitare de la nivelul stromei mamare poate fi corelată cu morfologia prelungirilor citoplasmice respective.

VE-caderina este o proteină cu rol joncțional intercelular specific vasculară, care intervine în menținerea barierei endoteliale și în angiogeneză, a cărei funcție este reglată de VEGF. În faza inițială a angiogenezei, în care celulele endoteliale migrează, acestea trebuie menținute într-un stadiu mezenchimal, fapt care se realizează prin fosforilarea specifică a zonei C-terminale din structura VE-caderinei care împiedică interacțiunea cu p120 și implicit formarea barierei celulare endoteliale. Astfel, lipsa expresiei cateninei p120 corelată cu expresia altor markeri specifici poate fi asociată cu EPC, în timp ce expresia p120 în endoteliu microvascular și capilare, cum am evidențiat și pe preparatele mele, este justificată prin interacțiunea cateninei cu VE-caderina.

Există și alte studii care susțin implicarea factorului p120 în diferențierea celulelor stem murinice prin implicarea în reglarea nivelurilor proteinelor Oct4, Nanog și Sox-2. Aceste caracteristici ale cateninei p120 pot explica, însă în parte, expresia Oct3/4 în stroma mamară, așa cum a rezultat din studiile mele.



Expresia p120 în stroma peritumorală este pozitivă în telocite perivascularare și stromale (vârfuri de săgeți), celule endoteliale (săgeți cu vârf dublu) și în adipocite (săgeți negre). În (A) se identifică un posibil proces de recrutare tumoral-stromală.

Expresia nestinei în celule stromale

Mendez-Ferrer și colaboratorii au adus numeroase evidențe conform cărora MSC derivate din măduva osoasă exprimă nestină, marker cu ajutorul căroră acestea pot fi izolate. Astfel, existența MSC nestin-pozitive, cu dispoziție perivasculară dar și a EPC nestin+ întăresc teoria conform căreia celulele nestin+ sunt implicate în angieneză. Sunt studii ce susțin faptul că subtipul de MSC umane CD146+ de la nivelul măduvei osoase care coexprimă PDGFR-alfa, CD51 și nestină dețin un rol esențial pentru expansiunea HSC.

Expresia CD133 în celulele stromale mamare

CD133 (Prominina-1) este un membru al familiei glicoproteinelor transmembranare descris prima dată ca antigen specific pentru identificarea celulelor progenitoare hematopoietice CD34+. Ulterior s-a descoperit rolul său în identificarea și izolarea celulelor stem canceroase (CSC). Celulele cu fenotip CD133+, CD31+ au fost clasificate ca celule progenitoare derivate din măduva osoasă (BMDPC).

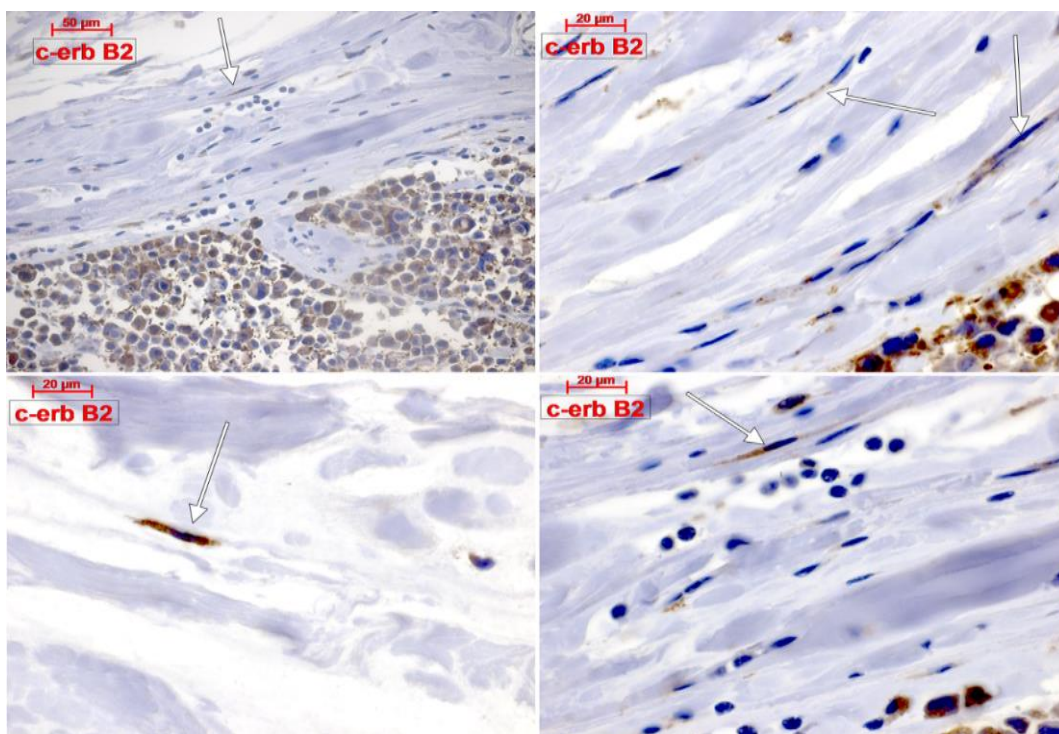
Celulele stromale CD133+ ar putea fi plasmocite activate. Consider astfel că trebuie eliminată posibilitatea aceasta prin marcarea cu CD79a.

Expresia stromală a c-erbB-2

Supraexpresia HER2 la nivelul celulelor tumorale a fost asociată cu fenomenul de tranziție epitelial-mezenchimală și cu creșterea potențialului

oncogenic. În același timp, celulele stem mezenchimale cu origine la nivelul măduvei osoase, ajung în țesuturile periferice unde sunt folosite în procesele de reparație tisulară, iar printre noii markeri specifici ai acestora se numără și PDGFR-beta sau HER-2/c-erbB-2 (CD340).

Am identificat în stroma mamară normală atât celule fibroblastoide/telocitare, cât și celule izolate, rotunde sau ovalare, unele dintre acestea ultime prezentând figuri mitotice. Rezultatele acestea indică posibilitatea ca celule stem/progenitoare stromale să exprime c-erbB-2. Originea extramamară a acestora poate fi luată în considerare însă nu pot exclude posibilitatea expresiei unui marker cunoscut ca specific epitelial în celule stromale.

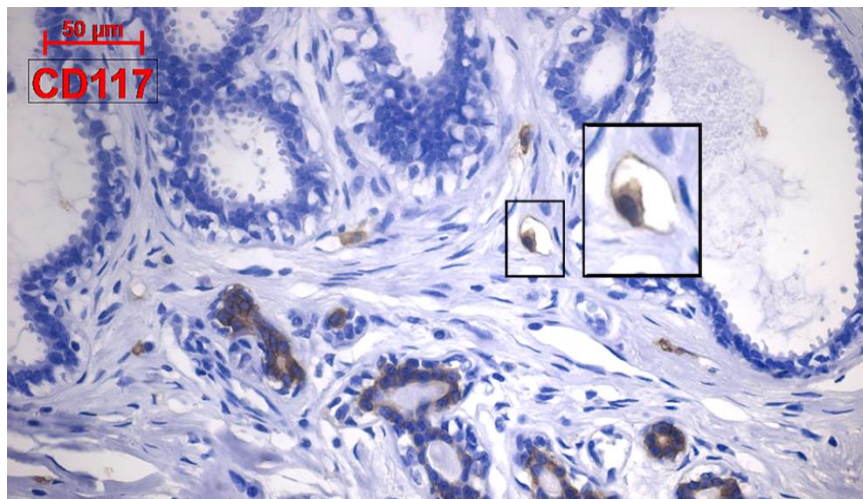


Expresia c-erb-B2 în stroma peritumorală este pozitivă în celule cu morfologie telocitară (săgeți).

Formarea de neovase în stroma mamară

Am identificat rețele stromale mamare consistente care au prezentat expresia pozitivă a CD34, însă au fost negative pentru CD31. Pe de altă parte, expresia CD31 a fost pozitivă în celule ale liniei mieloide din stroma mamară precum și în capilarele născânde mamare, acestea din urmă exprimând de asemenea c-kit, ceea ce a susținut faptul că vasculogeneza mamară se bazează pe linii HSC/monocitare extramamare. Fenotipul CD34-/CD31+/c-kit+/VEGFR-2 pe care l-am identificat indică precursori endoteliali, ceea ce face ca telocitele CD34+ să rămână corelate cu componenta non-

endotelială a stromei mamare. Componenta stromală CD31- trebuie corelată cu lipsa potențialului vasculogenic, după cum a reieșit și din experimente care, pe de altă parte, au demonstrat faptul că, cancerul mamar induce vasculogeneza postnatală în condiții *in vivo*.



Imunomarcarea cu CD117/c-kit a stromei mamare normale paratumorale identifică, pe lângă expresia epitelială a receptorului c-kit, și expresia acestuia în capilarele născânde (chenar, detaliu mărit).

Cercetări ultrastructurale ale nișei stem mamare

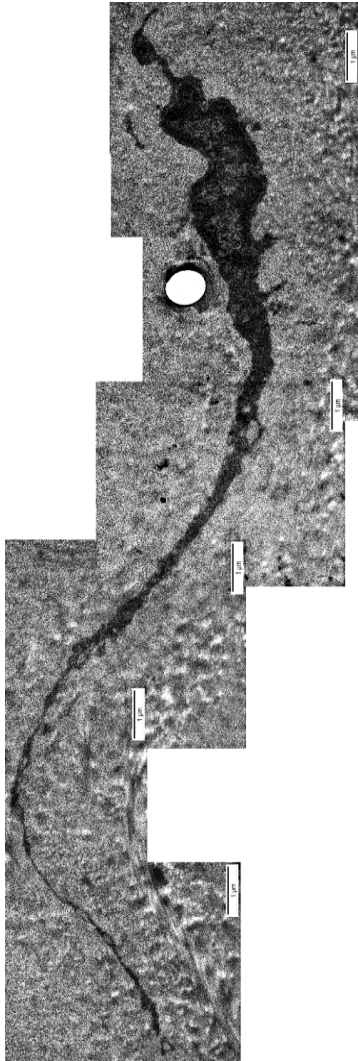
Numeroase studii recente susțin că la nivelul aceluiași organ există diferite subtipuri de telocite caracterizate de imunofenotipuri diferite. Acest lucru se poate datora și faptului că nu există criterii ferme de diagnostic morfologic al telocitelor în microscopia optică. În schimb există criterii pentru identificarea lor în microscopia electronică, unde sunt identificate după prelungirile lungi, subțiri și moniliforme denumite telopode .

Rezultatele publicate până în prezent sugerează că cel puțin un subtip de telocite există la nivelul diferitelor nișe stem, cu rol activ în menținerea homeostazei tisulare.

Subiectul rămâne însă deschis pentru cercetare și se naște întrebarea dacă telocitele reprezintă o formă de celule stem/progenitoare mezenchimale.

Gherghiceanu și Popescu au aprofundat studiul ultrastructural al ILCL mamare și au descris prezența caveolelor, mitocondriilor, reticulului endoplasmatic, filamentelor, microtubulilor și ocazional a laminei bazale întrebându-se în acel studiu dacă aceste ILCL mamare nu sunt de fapt celule progenitoare.

Studii recente au reluat studiul fenotipului imunohistochimic al telocitelor mamare și au identificat rețele telocitare stromale CD34+, focal CD10+ dar c-kit-, fenotip mai degrabă hematopoietic decât mezenchimal.

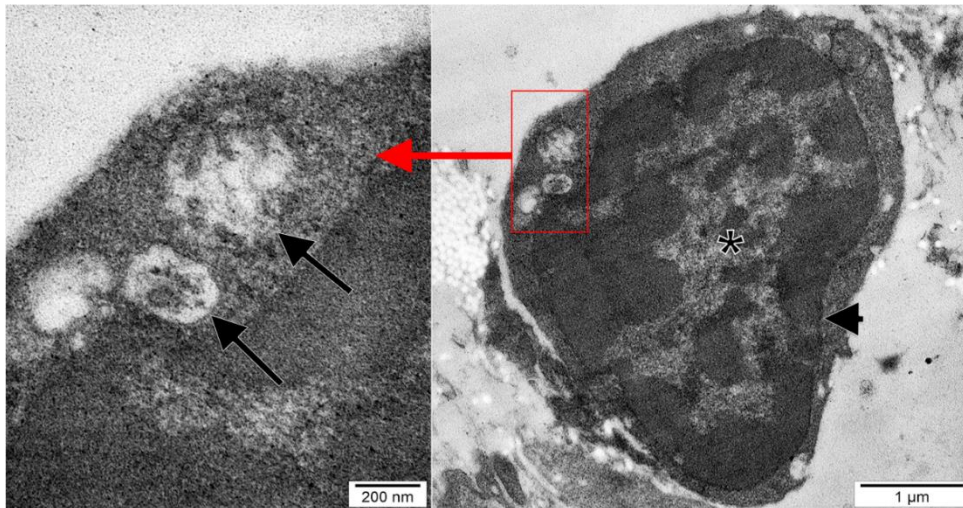


Celulă stromală mamară nediferențiată cu morfologie telocitară.

În microscopia electronică de transmisie am identificat celule stromale fuziforme înglobate în collagen. Acestea au apărut precum celule de talie mică, de [1.4-2.9] / [7.05-9.02] micrometri, cu prelungiri celulare lungi și subțiri, de 15-17 micrometri, având calibru neregulat, îndeplinind toate criteriile morfologice pentru a fi diagnosticate precum telopode. Aceste celule au prezentat o cantitate redusă de citoplasmă, cu nucleu heterocromatinic, cu cromatină dispusă în grămezi. De asemenea am identificat câteva mitocondrii și benzi de filamente intermediare, fără a observa alte organite specifice celulelor diferențiate sau entități plasmalemale

specifice, precum caveolele. Am considerat aceste celule precum celule stem/stromale mezenchimale dormante (MSC) cu telopode, deci telocite stem.

Am identificat de asemenea celule stem dormante în diferite faze ale ciclului celular, lipsite însă de prelungiri celulare. De asemenea, în stroma perivasculară am identificat, de regulă la nivelul microvaselor, telopode cu dispoziție concentrică.



Țesut mamar paratumoral. Microscopie electronică de transmisie. O celulă stromală mamară este identificată în decursul prometafazei. Separarea centrozomilor (chenar, panelul stâng, săgeți), lipsește anvelopa nucleară (vârf de săgeată, panelul din dreapta) iar cromatina condensată () se aliniază cu planul central al celulei.*

Teoria centrozomilor formulată de Bovari, care susține faptul că numărul de centrozomi dictează numărul de poli fusiformi, este parțial acceptată întrucât nu toate celulele au centrozomi, în schimb toate celulele se organizează într-un pattern fusiform în timpul diviziunii celulare. Din acest punct de vedere, faptul că am identificat astfel de celule, prezentând telopode, susține faptul că un subset de telocite, cel puțin în stroma mamară, sunt în fapt celule stem.

Subseturi de telocite cu potențial stem/progenitor

Recent a fost documentat rolul telocitelor cu expresia pozitivă a CD34 în reparația tisulară; s-a considerat rolul TC dormante CD34- ca celule de susținere (*nurse cells*) ale celulelor stem (după cum a rezultat prin cercetări la nivelul tegumentului, cordului, aparatului respirator și altor organe) și au fost avute în vedere caracteristicile TC activate CD34+ și modificările expresiei CD34 și α -SMA. A rezultat astfel rolul TC CD34+ precum celule progenitoare și precum resurse importante de fibroblaști și de miofibroblaști în țesutul de granulație, fibroză și în stroma tumorală.

Pericitele și celulele perivasculare – nișa stem universală a țesutului adult

Pericitele se găsesc la nivel capilar, cu localizare abluminală în marea majoritate a organelor. Ceea ce a fost trecut cu ușurință cu vederea în studiile privind celulele stromale și pericite este detaliul morfologic – și pericitele pot fi considerate celule cu telopode; această observație este puternic susținută de studiul lui Göritz și colab.(2011) care au identificat două tipuri de pericite, iar tipul A, plasat stromal și nu în localizare murală microvasculară, corespunde morfologic, în microscopia electronică de transmisie, telocitelor. Grupul Péault a publicat numeroase studii, în jurnale cu cotație mare, prin care susține cu dovezi certe faptul că pericitele pot fi considerate celule cu potențial atât MSC cât și HSC. Versatilitatea pericitelor este indicată și prin studii care demonstrează că pericitele sunt capabile să inhibe proliferarea celulelor endoteliale *in vitro*, mediată prin activarea TGF- β . Pare să existe o corelație inversă între proliferarea endotelială și gradul de acoperire al pericitelor. Există dovezi că stimulii angiogenici ar stimula transformarea pericitelor intramurale în extramurale iar evidențele subseturilor de telocite reprezentate de progenitori endoteliali conduc la un concept de tipul „*subseturi de telocite, endoteliale și pericitare, construiesc neovase în stroma conjunctivă*”, ceea ce susține versatilitatea fenotipică a telocitelor. Se susține astfel ideea că pericitele activate, mitotice, care se pot prezenta în microscopia electronică de transmisie precum telocite stem, sau pot apare precum rețele α -SMA pozitive sau telocite α -SMA pozitive în imunohistochimie, au rol activ în angiogeneza germinativă.

CONCLUZIILE TEZEI DE DOCTORAT

1. Compartimentul stromal al glandei mamare trebuie considerat ca având o componentă normală, cu rol în remodelarea fiziologică a glandei mamare, și o componentă patologică, reprezentată de stroma peritumorală și cea tumorală.
2. În centrul atenției anatomo-patologiei stă nișa epitelială mamară de la nivelul căreia derivă numeroase tipuri și subtipuri de carcinoame mamare, țesuturi apreciate ferm și strict prin diverse combinații sau modele imunofenotipice.
3. Nișa stem stromală sau mezenchimală trebuie considerată precum o nișă mamară accesorie însă indispensabilă atât remodelării glandulare fiziologice cât și ca facilitator al progresiei și invaziei tumorale a țesutului mamar încă indemn.
4. Imunohistochimic, modelele fenotipice moleculare ale celulelor stromale cu morfologie fibroblastoidă/telocitară, pot face distincția dintre stroma normală și stroma invadată tumoral, prin switch-ul fenotipic $CD34+/\alpha\text{-SMA-}$ (normal) > $CD34-/\alpha\text{-SMA+}$ (peritumoral). Telocitele asociate carcinoamelor cu fenotip $\alpha\text{-SMA}$ pot corespunde miofibroblaștilor, ca forme activate de fibroblaști, ceea ce recomandă reevaluarea telocitelor $\alpha\text{-SMA}$ pozitive, și nu doar la nivel mamar, ca specii celulare stromale reactive.
5. Morfologia prin care sunt definite telocitele nu poate exclude tipuri celulare cunoscute și investigate de multă vreme, precum fibroblaștii și pericitele; din acest punct de vedere telocitele perivasculare pot reprezenta, deopotrivă, fie piesele soliste ale nișei stem perivasculare a adultului, fie precursori sau, dimpotrivă, derivate, ale pericitelor. Nu în ultimul rând morfologia telocitară poate corespunde și progenitorilor endoteliali. Confuzia privind subseturile de telocite trebuie diminuată prin studii viitoare, eventual în imunoelectron microscopie, metodă ce poate indica fenotipul molecular al telocitelor, dar care încă nu a fost utilizată cu acest scop.
6. Deși am definit-o precum auxiliară, nișa stromală este indispensabilă menținerii homeostaziei tisulare a glandei mamare și, pe de altă parte, influențează progresia tumorilor. Nișa stromală este o nișă heterogenă, cu

posibilități de aport de celule stem/progenitoare din diverse surse, intrinseci intramamare și extrinseci extramamare.

7. Progenitorii endoteliali și celulele stem hematopoietice, și chiar mezenchimale, cu origine în măduva osoasă, pot popula pe cale circulatorie glanda mamară și pot interveni în procese de neovascularizație care, pe de altă parte, se realizează atât prin angiogeneză cât și prin vasculogeneză adultă.
8. Nișa perivasculară poate contribui la neovascularizație și poate alimenta stroma mamară cu celule mezenchimale stem-like.
9. Transformarea endotelial-mezenchimală la nivelul microvaselor mamare, obiectivată prin dediferențierea celulelor endoteliale la un fenotip stem, poate oferi suport atât neovascularizației cât și tipurilor celulare stromale rezidente non-imune, ceea ce include posibilitatea ca telocite mamare să derive din endotelii dediferențiate. Dediferențierea endotelială trebuie privită independent de existența sau nu a unui proces tumoral la nivelul glandei mamare.
10. Deși transformarea epitelial-mezenchimală tinde a deveni, în urma numeroaselor cercetări, un proces asociat oricărui tip epitelial, nu am obținut evidențe suficiente care să indice un rol major al acestui tip de transdiferențiere la nivelul țesutului mamar studiat.
11. Din ce în ce mai multe studii indică faptul că telocitele nu doar aparțin micromediului din nișele stem ci chiar, cel puțin subseturi ale acestora, sunt celule progenitoare. Am adus în studiile mele evidențe indiscutabile ale unui nou subtip de telocite, telocitele-stem, celule dormante, nediferențiate, care în funcție de reacția stromală și compoziția în factori de creștere, pot interveni în procese de regenerare/reparație mamară.