

---

PhD THESIS SUMMARY

# The role of cancer stem cells in breast cancer and therapy response

---

PhD Student      **Oana Alexa Baldaşici**

---

PhD Supervisor   **Prof. Dr. Laurian Vlase**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# Contents

<b>Introduction.....</b>	<b>13</b>
<b>The current state of knowledge</b>	
<b>1. Breast cancer – current status and challenges.....</b>	<b>17</b>
1.1. Epidemiological statistics - The worldwide burden of breast cancer .....	17
1.2. Current therapeutic approaches in breast cancer .....	17
<b>2. Cancer stem cells- drivers of tumor heterogeneity, progression, and therapy resistance.....</b>	<b>20</b>
2.1. The role of cancer stem cells in tumor evolution and heterogeneity .....	20
2.2. The role of phenotypic plasticity in generating cancer stem cells in breast cancer .....	21
2.3. Mechanisms controlling self-renewal and differentiation in cancer stem cells.....	23
2.4. Cancer stem cells’ mechanisms of resistance to conventional therapies in cancer.....	24
2.5. The cross-talk between cancer stem cells and tumor microenvironment in driving tumor progression and therapy response.....	26
<b>3. Breast cancer miRNAs, novel biomarkers for prognosis and prediction.....</b>	<b>28</b>
3.1. The role of exosomal miRNAs in breast cancer therapy response .....	29
3.2. Exosomal miRNAs as biomarkers for breast cancer progression and metastasis.....	32
<b>Personal contribution</b>	
<b>1. Work hypothesis/ Objectives .....</b>	<b>39</b>
<b>2. Study 1. Exploring the associations between tumor CSCs and patients’ prognostic and therapy response.....</b>	<b>41</b>
2.1. Introduction .....	41
2.2. Objectives.....	42

2.3. <u>Materials and methods</u> .....	42
2.4. <u>Results</u> .....	43
2.5. <u>Discussion</u> .....	49
2.6. <u>Conclusions</u> .....	52
<b>3. <u>Study 2. Unraveling the molecular mechanisms underlying CSCs maintenance in breast tumors</u></b> .....	<b>54</b>
3.1. <u>Introduction</u> .....	54
3.2. <u>Objectives</u> .....	55
3.3. <u>Materials and methods</u> .....	55
3.4. <u>Results</u> .....	58
3.5. <u>Discussion</u> .....	65
3.6. <u>Conclusions</u> .....	68
<b>4. <u>Study 3. Circulating exosomal miRNAs as predictors of pathological response to neoadjuvant therapy in breast cancer patients</u></b> .....	<b>70</b>
4.1. <u>Introduction</u> .....	70
4.2. <u>Objectives</u> .....	72
4.3. <u>Materials and methods</u> .....	72
4.4. <u>Results</u> .....	75
4.5. <u>Discussion</u> .....	98
4.6. <u>Conclusions</u> .....	101
<b>5. <u>General conclusions</u></b> .....	<b>103</b>
<b>6. <u>Thesis originality and innovative contributions</u></b> .....	<b>105</b>
<b><u>References</u></b> .....	<b>107</b>

## KEYWORDS

Breast cancer; cancer stem cells; therapy response; tumor microenvironment; tumor immunity; liquid biopsy; biomarkers

## Introduction

The burden of breast cancer continues to be experienced at a global scale, with millions of new cases being diagnosed each year. Despite medical advances, hundreds of thousands of women still lose their lives due to metastatic disease and recurrence, and the number of cases is still growing.

Cancer stem cells (CSCs) have emerged as key players in tumor evolution and progression owing to their plasticity, immune evasion capabilities, and therapy resistance. Moreover, by acquiring invasion potential, they virtually act as tumor seeds, driving metastasis and recurrence.

Several attempts have been made to target CSCs in breast tumors in order to improve the patient's outcome. Although some clinical trials have achieved promising results, the eradication of CSCs in solid tumors is still a great challenge due to the complex mechanisms that govern CSCs biology and the implication of the tumor microenvironment in shaping the CSCs' niche and tumor progression. Growing evidence highlights the role of the stromal cells and immune cells in regulating the cancer cells' proliferation, drug sensitivity and invasive potential while also CSCs are able to shape their microenvironment leading to immune suppression and evasion.

Moreover, various factors, including non-coding RNAs tightly regulate the tumor-microenvironment cross-talk. Recent evidence demonstrated that microRNAs packed in exosomes are delivered from cancer to stromal and other tumor cells and to distant sites, being directly involved in the modulation of an aggressive phenotype, therapy resistance and the formation of the pre-metastatic niches.

Therefore, this thesis aims to bring new data regarding the breast cancer stem cells' role in therapy response, focusing on the tumor microenvironment and immune system's regulation of the stem cell niche. The research conducted in this thesis sheds light on the complex interplay between breast cancer stem cells, the tumor microenvironment, and the immune system. By understanding these interactions, new therapies may be developed to target breast cancer stem cells and improve patient outcomes.

The study's results suggest that immune activation signatures may serve as a useful tool for predicting patient prognosis and identifying those who may benefit from more aggressive treatment. Additionally, the potential of exosomal miRNAs as liquid biopsy biomarkers could provide a less invasive method for monitoring disease progression and treatment response. Overall, this thesis

provides new insights into the biology of breast cancer stem cells and their role in patient therapy response.

## CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The first part of the thesis, entitled *Current state of knowledge*, comprises 3 chapters that systematically present the most important and up-to-date aspects concerning the research theme.

The first chapter brings to attention the epidemiological status of breast cancer, represented by the reported values of incidence and mortality associated with this pathology globally, emphasizing its socio-economic impact. This chapter also provides general information on the therapeutic approach to breast cancer.

The second chapter briefly presents the biology of tumor stem cells and their role in the progression of breast cancer and in the development of resistance to conventional therapeutic schemes, also highlighting the attempts to target these cells by means of different compounds, evaluated in clinical trials.

In the third chapter, the new methods for predicting the prognosis and the response to therapy in breast cancer are presented, based on the evaluation of circulating microRNAs from the liquid biopsy, an innovative concept that has recently acquired a special interest in the scientific community.

This first part provides an overview of the topic addressed, also highlighting the unknowns and obstacles that oncology research faces in trying to identify new therapeutic targets in breast cancer.

## PERSONAL CONTRIBUTION

The second part of the thesis, called *Personal Contributions*, begins by presenting the general hypothesis and objectives that formed the basis of the experimental studies, being continued by the three experimental research studies.

The first study of the "Personal Contributions" section describes the development and implementation of the method for assessing the stem phenotype in primary breast tumors, by the mammosphere assay. Thus, by optimizing and implementing this test using biopsy samples from breast tumor tissue, three distinct tumor phenotypes were identified, namely: tumors with an increased capacity to generate mammospheres and therefore, an increased stem potential, tumors with a reduced capacity for generating mammosphere and

tumors devoid of mammosphere-generating capacity, having a low stemness potential. In the study, the association between the stem phenotype and clinicopathological data of the patients was evaluated, and the association between stem potential and tumor size was observed. At the same time, this study also represented the starting point for study 2, which investigated the molecular mechanisms associated with the stem cell phenotype in breast tumors.

Thus, in study 2, depending on the tumor stem phenotype, differences were identified in the activation of the signaling mechanisms involved in the anti-tumor immune response, the tumors with an accentuated stem potential having the lowest immune activation and the least represented lymphocytic infiltrate. These results indicate the importance of the immune system and the tumor microenvironment in regulating the stemness phenotype. Also, in study 2, genes involved in the activation of the immune system were identified, such as IFNG, CD40LG, CXCR5, TBX21 and IL2RG being under-expressed in tumors with an accentuated stem phenotype and being associated with the prognosis and survival of breast cancer patients.

Study 3 addresses the issue of identifying biomarkers for therapy response prediction in liquid biopsy samples from breast cancer patients. This study evaluated the expression of circulating microRNAs in plasma and tumor tissue of patients and investigated their association with the response to neoadjuvant therapy. Thus, 4 circulating microRNAs with a predictive role for the neoadjuvant therapy response in breast cancer were identified, namely miR-21-5p, miR-146a-5p, miR-24-3p and miR-26a-5p. Also, the expression of circulating microRNAs was also evaluated in relation to the stem phenotype of breast tumors, with the aim of identifying biomarkers for this phenotype, but no significant association was observed between the expression level of the tested microRNAs and the tumor stem cell phenotype.

## **General conclusions**

Breast cancer continues to represent an important health issue worldwide, given the high incidence and mortality among female patients. The ongoing efforts done to address this issue are still challenged by the tumors' heterogeneity, the lack of targeted therapy options for a subset of breast cancers and the development of therapy resistance in initially responsive patients. Moreover, early dissemination and recurrence further complicates the clinical management.

CSCs have emerged as a cellular subpopulation with enhanced tumorigenicity and self-renewal abilities, being pivotal players in tumor recurrence and metastasis. However, due to their plasticity, CSCs are difficult to identify and isolate from solid

tumors using standard, immunophenotyping approaches. Our results, employing functional evaluation methods, revealed that breast tumors show different CSCs enrichment and it is associated with tumor size, indicating the potential role of CSCs in breast cancer progression. Moreover, the CSCs phenotype observed in breast biopsies was associated with divergent tumor microenvironment landscapes, being associated with an impaired immunity at the tumor site.

Transcriptomic evaluation of breast biopsies highlighted the importance of IFN $\gamma$  mediated activation of immune responses in regulating the CSCs functionality in breast tumors and the associations between low IFNG, CXCR5, TBX21, IL2RG and CD40LG expression levels and CSCs enrichment, tumor size, stage and metastatic status of breast cancer patients. Also, higher expression levels of these molecules were associated with a better survival in the TCGA cohort, suggesting their potential role as prognosis predictors.

Additionally, circulating miRNAs represent valuable biomarkers for prognosis and prediction. The evaluation of exosomal miRNAs in plasma samples from breast cancer patients revealed differentially expressed miRNAs associated with response to neo-adjuvant therapy. MicroRNAs miR-21-5p, 221-3p, 146a-5p and 26a-5p were significantly associated with the Miller-Payne pathological response after neo-adjuvant therapy. Of them, miR-21-5p, 146a-5p and 26a-5p also acted as independent predictors of response to neo-adjuvant therapy, highlighting their role as potential biomarkers.

## **Thesis originality and innovative contributions**

The originality of this thesis is given by its main objective, which is the exploration of CSCs phenotype in breast cancer and their implication for patients' prognosis and therapy response.

To our knowledge, there is no other study that functionally evaluated, through mammosphere assay, the CSCs enrichment in tumor biopsies from a large cohort of breast cancer patients (>100 patients included in the study). In the first study, our results revealed different levels of CSCs enrichment in breast cancer biopsies and their association with tumor size. These results indicate that CSCs enrichment from primary biopsy pieces is attainable *in vitro* and opens new avenues towards a more personalized approach in designing therapeutic strategies for breast cancer patients.

Although the immune suppressive and immune evasion capabilities of CSCs have been reported before, most of the studies relied on stabilized cancer cell lines. While harder to obtain, primary cells represent the golden standard of research aiming to develop personalized medicine. By using primary cells obtained from fresh tissue biopsies, our study brings new information regarding the CSCs functionality and the tumor microenvironmental features of each patient, creating a personalized signature. Moreover, our results are supported by the current literature data which shows that

patients displaying genomic signatures associated with CSCs enrichment and impaired immune response tend to progress towards a worse outcome.

Another aspect of innovation is given by the identification of differentially expressed genes associated with the CSCs phenotype in breast tumors and their clinical relevance as potential prognosis biomarkers.

Moreover, the originality of the third study consists in the evaluation of exosomal miRNAs in breast cancer plasma samples, as potential biomarkers for neo-adjuvant therapy response. Our results led to the identification of novel miRNA biomarkers (miR-21-5p, 221-3p, 146a-5p and 26a-5p) associated with the pathological response to neo-adjuvant therapy in breast cancer. These exosomal miRNAs have not been previously associated with the therapy response in breast cancer and represent promising new biomarkers with translational potential, that might support the efforts towards a more personalized clinical management.



---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# Rolul celulelor stem tumorale în răspunsul la terapie în cancerul mamar

---

PhD Student **Oana Alexa Baldașici**

---

PhD Supervisor **Prof. Dr. Laurian Vlase**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# Cuprins

<b>Introducere .....</b>	<b>13</b>
<b>Stadiul actual al cunoașterii</b>	
<b>1. Cancerul mamar – statusul curent și provocările .....</b>	<b>17</b>
1.1. Statistici epidemiologice - Povara mondială a cancerului mamar.....	17
1.2. Abordări terapeutice actuale în cancerul mamar .....	17
<b>2. Celulele stem tumorale – factori care conduc la eterogenitatea tumorii, progresia și rezistența la terapie .....</b>	<b>20</b>
2.1. Rolul celulelor stem tumorale în evoluția și eterogenitatea tumorii .....	20
2.2. Rolul plasticității fenotipice în generarea de celule stem tumorale în cancerul de sân .....	21
2.3. Mecanisme care controlează auto-reînnoirea și diferențierea celulelor stem tumorale.....	23
2.4. Mecanismele de rezistență ale celulelor stem tumorale la terapiile convenționale în cancer .....	24
2.5. Comunicarea dintre celulele stem canceroase și micromediul tumoral în stimularea progresiei tumorii și a răspunsului la terapie .....	26
<b>3. MiRNA-uri în cancerul de sân, noi biomarkeri pentru prognostic și predicție.. .....</b>	<b>28</b>
3.1. Rolul miARN-urilor exosomale în răspunsul la terapie în cancerul de sân .....	29
3.2. MiRNA-urile exosomale ca biomarkeri pentru progresia și metastazarea cancerului de sân .....	32
<b>Contribuția personală</b>	
<b>1. Ipoteza de lucru/ Obiective .....</b>	<b>39</b>
<b>2. Studiul 1. Explorarea asocierilor dintre celulele stem tumorale și prognosticul și răspunsul la terapie al pacienților .....</b>	<b>41</b>
2.1. Introducere.....	41
2.2. Obiective.....	42
2.3. Materiale și metode .....	42

2.4. Rezultate.....	43
2.5. Discuții.....	49
2.6. Concluzii.....	52
<b>3. Studiul 2. Explorarea mecanismelor moleculare care stau la baza menținerii CSC în tumorile mamare.....</b>	<b>54</b>
3.1. Introducere.....	54
3.2. Obiective.....	55
3.3. Materiale și metode.....	55
3.4. Rezultate.....	58
3.5. Discuții.....	65
3.6. Concluzii.....	68
<b>4. Studiul 3. MiARN-urile exosomale circulante ca predictorii ai răspunsului patologic la terapia neoadjuvantă la pacientele cu cancer de sân.....</b>	<b>70</b>
4.1. Introducere.....	70
4.2. Obiective.....	72
4.3. Materiale și metode.....	72
4.4. Rezultate.....	75
4.5. Discuții.....	98
4.6. Concluzii.....	101
<b>5. Concluzii generale.....</b>	<b>103</b>
<b>6. Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei.....</b>	<b>105</b>
<b>Referințe.....</b>	<b>107</b>

## CUVINTE CHEIE

Cancer de sân; celule stem tumorale; răspuns la terapie; micromediul tumoral; imunitate anti-tumorală; biopsie lichidă; biomarkeri

## Introducere

Povara cancerului de sân continuă să fie experimentată la scară globală, milioane de cazuri noi fiind diagnosticate în fiecare an. În ciuda progreselor medicale, sute de mii de femei își pierd în continuare viața din cauza bolii metastatice și a recurenței, iar numărul cazurilor este în continuare în creștere. Celulele stem canceroase/tumorale (CSC) au apărut ca jucători cheie în evoluția și progresia tumorii datorită plasticității lor, capacităților de evaziune imună și rezistenței la terapie. Mai mult, prin dobândirea potențialului de invazie, celulele stem tumorale practic acționează ca semințe pentru diseminare, conducând la metastaze și recidive.

Au fost făcute mai multe încercări de a viza CSC în tumorile mamare pentru a îmbunătăți rezultatul pacientului. Deși unele studii clinice au obținut rezultate promițătoare, eradicarea CSC în tumorile solide este încă o mare provocare datorită mecanismelor complexe care guvernează biologia CSC și a rolului micromediului tumoral în modelarea nișei stem și în progresia tumorală. Datele acumulate în urma cercetărilor evidențiază rolul celulelor stromale și ale celulelor imune în reglarea proliferării celulelor stem canceroase, a sensibilității la medicamente și a potențialului invaziv, iar în același timp, CSC-urile sunt capabile să-și modeleze micromediul, ducând la suprimarea și evaziunea imună. Mai mult decât atât, diverși factori, inclusiv ARN-urile necodificatoare, reglează în mod dinamic dialogul dintre tumoră și micromediu. Dovezi recente au demonstrat că microARN-urile împachetate în exozomi sunt livrate de celulele tumorale cu agresivitate crescută către celulele stromale și alte celule tumorale precum și către alte organe, fiind direct implicate în modularea unui fenotip agresiv, rezistența la terapie și formarea nișelor pre-metastatice.

Prin urmare, această teză își propune să aducă noi date cu privire la rolul celulelor stem în cancerul de sân și în răspunsul la terapie, concentrându-se pe micromediul tumoral, pe reglarea sistemului imunitar și a nișei de celule stem. Cercetarea efectuată în această teză pune în lumină interacțiunea complexă dintre celulele stem ale cancerului de sân, micromediul tumoral și sistemul imun. Prin înțelegerea acestor interacțiuni, pot fi dezvoltate noi terapii pentru a viza celulele stem în tumorile mamare, cu scopul de a îmbunătăți rezultatele pacientului.

Rezultatele studiului sugerează că semăturile moleculare de activare imună pot servi ca un instrument util pentru precizarea prognosticului pacientului și identificarea celor care ar putea beneficia de un tratament mai agresiv. În plus, potențialul miARN-urilor exosomale ca biomarkeri din biopsia

lichidă ar putea oferi o metodă mai puțin invazivă pentru monitorizarea progresiei bolii și a răspunsului la tratament. În general, această teză oferă noi perspective asupra biologiei celulelor stem ale cancerului de sân și asupra rolului acestora în răspunsul la terapia pacientului.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Prima parte a tezei, intitulată *Stadiul actual al cunoașterii*, cuprinde 3 capitole care prezintă în mod sistematic cele mai importante și de actualitate aspecte referitoare la tema de cercetare.

Primul capitol aduce în atenție statutul epidemiologic al cancerului de sân, reprezentat de valorile raportate ale incidenței și mortalității asociate acestei patologii la nivel global, subliniind impactul socio-economic al acesteia. Acest capitol oferă, de asemenea, informații generale despre abordarea terapeutică a cancerului de sân.

Al doilea capitol prezintă pe scurt biologia celulelor stem tumorale și rolul acestora în progresia cancerului de sân și în dezvoltarea rezistenței la schemele terapeutice convenționale, evidențiind și încercările de a viza aceste celule prin intermediul diferiților compuși, evaluați până acum în trialuri clinice.

În al treilea capitol sunt prezentate noile metode de predicție a prognosticului și răspunsului la terapie în cancerul de sân, bazate pe evaluarea microARN-urilor circulante din biopsia lichidă, un concept inovator care a căpătat recent un interes deosebit în comunitatea științifică.

Această primă parte oferă o imagine de ansamblu asupra subiectului abordat, evidențiind, de asemenea, necunoscutele și obstacolele cu care se confruntă cercetările oncologice în încercarea de a identifica noi ținte terapeutice în cancerul de sân.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

A doua parte a tezei, denumită *Contribuția personală*, începe prin prezentarea ipotezei generale și a obiectivelor care au stat la baza studiilor experimentale, fiind continuată de cele trei studii de cercetare experimentală.

Primul studiu al secțiunii „Contribuția personală” descrie dezvoltarea și implementarea metodei de evaluare a fenotipului stem în tumorile primare de sân, prin testul mamosferei. Astfel, prin optimizarea și implementarea acestui test folosind probe de biopsie din țesutul tumoral mamar, au fost identificate

trei fenotipuri tumorale distincte și anume: tumori cu o capacitate crescută de a genera mamosfere și deci, un potențial stem crescut, tumori cu o capacitate redusă de generare a mamosferelor și tumori lipsite de capacitate de generare a mamosferelor, având un potențial stem scăzut. În cadrul studiului, a fost evaluată asocierea dintre fenotipul stem și datele clinicopatologice ale pacienților și s-a observat asocierea dintre potențialul stem și dimensiunea tumorii. Totodată, acest studiu a reprezentat și punctul de plecare pentru studiul 2, care a investigat mecanismele moleculare asociate cu fenotipul celulelor stem în tumorile mamare.

Astfel, în studiul 2, în funcție de fenotipul stem tumoral, s-au identificat diferențe în activarea mecanismelor de semnalizare implicate în răspunsul imun antitumoral, tumorile cu potențial stem accentuat având cea mai scăzută activare imună și cel mai puțin reprezentat infiltrat limfocitar. Aceste rezultate indică importanța sistemului imun și a micromediului tumoral în reglarea fenotipului stemness. De asemenea, în studiul 2 au fost identificate gene implicate în activarea sistemului imun, precum IFNG, CD40LG, CXCR5, TBX21 și IL2RG ca fiind subexprimate în tumorile cu fenotip stem accentuat și fiind asociate cu prognosticul și supraviețuirea pacientelor cu cancer de sân.

Studiul 3 abordează problema identificării biomarkerilor pentru predicția răspunsului la terapie în probele de biopsie lichidă de la pacienții cu cancer de sân. Acest studiu a evaluat expresia microARN-urilor circulante în plasmă și în țesutul tumoral al pacienților și a investigat asocierea acestora cu răspunsul la terapia neoadjuvantă. Astfel, au fost identificate 4 microARN-uri circulante cu rol predictiv pentru răspunsul la terapia neoadjuvantă în cancerul de sân, și anume miR-21-5p, miR-146a-5p, miR-24-3p și miR-26a-5p. De asemenea, expresia microARN-urilor circulante a fost evaluată și în raport cu fenotipul stem al tumorilor mamare, cu scopul de a identifica biomarkeri pentru acest fenotip, dar nu s-a observat o asociere semnificativă.

## Concluzii generale

Cancerul mamar continuă să reprezinte o problemă importantă de sănătate la nivel mondial, având în vedere incidența ridicată și mortalitatea în rândul pacienților de sex feminin. Eforturile continue depuse pentru a aborda această problemă sunt îngreunate de eterogenitatea tumorilor, de lipsa opțiunilor de terapie țintită pentru unele subtipuri de cancere de sân și de dezvoltarea

rezistenței la terapie la pacienții inițial receptivi. Mai mult, diseminarea precoce și recurența complică și mai mult managementul clinic.

CSC-urile au apărut ca o subpopulație celulară cu tumorigenitate și abilități de auto-reînnoire crescute, fiind jucători esențiali în recurența tumorală și metastazare. Cu toate acestea, din cauza plasticității lor, CSC-urile sunt dificil de identificat și izolat din tumorile solide folosind abordări standard de imunofenotipizare. Rezultatele noastre, folosind metode de evaluare funcțională, au arătat că tumorile mamare diferă în ceea ce privește abundența CSC-urilor și este aceasta asociată cu dimensiunea tumorii, indicând rolul potențial al CSC-urilor în progresia cancerului de sân. Mai mult, fenotipul CSC observat în biopsiile mamare a fost asociat cu divergențe în ceea ce privește componența micromediului tumoral, fiind asociat cu o imunitate afectată la locul tumorii.

Evaluarea transcriptomică a biopsiilor de sân a evidențiat importanța activării mediate de IFN $\gamma$  a răspunsurilor imune în reglarea funcționalității CSC în tumorile mamare și asocierile dintre nivelurile scăzute de expresie a IFNG, CXCR5, TBX21, IL2RG și CD40LG și abundența CSC-urilor, dimensiunea, stadiul tumorii și metastazarea bolnavilor de cancer mamar. De asemenea, nivelurile mai ridicate de expresie ale acestor molecule au fost asociate cu o supraviețuire mai bună în cohorta TCGA, sugerând rolul lor potențial ca predictorii de prognostic.

În plus, miRNA-urile circulante reprezintă biomarkeri valoroși pentru prognostic și predicție. Evaluarea miARN-urilor exosomale din probele de plasmă de la pacienții cu cancer de sân a evidențiat un set de miARN-uri exprimate diferențial asociate cu răspunsul la terapia neo-adjuvantă. MicroARN-urile miR-21-5p, 221-3p, 146a-5p și 26a-5p au fost asociate semnificativ cu răspunsul patologic Miller-Payne după terapia neo-adjuvantă. Dintre aceștia, miR-21-5p, 146a-5p și 26a-5p au acționat și ca predictorii independenți ai răspunsului la terapia neo-adjuvantă, subliniind rolul lor ca potențiali biomarkeri.

## **Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei**

Originalitatea acestei teze este dată de obiectivul ei principal, care este explorarea fenotipului CSC în cancerul de sân și implicarea acestuia în prognosticul și răspunsul la terapie al pacienților.

Din cunoștințele noastre, nu există alte studii care să evalueze funcțional, prin testul mammosferei, îmbogățirea CSC în biopsii tumorale de la o cohortă mare de pacienți cu cancer de sân (>100 de pacienți incluși în studiu). În primul studiu, rezultatele noastre au evidențiat diferite niveluri de îmbogățire a CSC în biopsiile de cancer de sân și asocierea lor cu dimensiunea tumorii. Aceste rezultate indică faptul că evaluarea funcționalității CSC din piese de biopsie primară este realizabilă *in vitro* și deschide noi căi către o abordare mai personalizată în proiectarea strategiilor terapeutice pentru pacienții cu cancer de sân.

Deși capacitățile de supresie și de evaziune imună ale CSC au fost raportate anterior, majoritatea studiilor s-au bazat pe linii tumorale stabilizate. Deși mai greu de obținut, celulele primare reprezintă standardul de aur al cercetării care vizează dezvoltarea medicinei personalizate. Prin utilizarea celulelor primare obținute din biopsii de țesut proaspăt, studiul nostru aduce noi informații cu privire la funcționalitatea CSC și caracteristicile micromediului tumoral ale fiecărui pacient, creând o semnătură personalizată. Mai mult, rezultatele noastre sunt susținute de datele din literatura de specialitate care arată că pacienții care prezintă semnături genomice asociate cu îmbogățirea CSC și cu răspunsul imun afectat tind să progreseze spre un rezultat mai rău.

Un alt aspect al inovației este dat de identificarea genelor exprimate diferențial asociate cu fenotipul CSC în tumorile mamare și relevanța lor clinică ca potențiali biomarkeri de prognostic.

Mai mult, originalitatea celui de-al treilea studiu constă în evaluarea miARN-urilor exosomale din probele de plasmă din cancerul de sân, ca potențiali biomarkeri pentru răspunsul patologic la terapia neo-adjuvantă. Rezultatele noastre au condus la identificarea de noi biomarkeri de tip microARN (miR-21-5p, 221-3p, 146a-5p și 26a-5p) asociați cu răspunsul patologic la terapia neo-adjuvantă în cancerul de sân. Aceste microARN-uri exosomale nu au fost asociate anterior cu răspunsul terapeutic în cancerul de sân și reprezintă noi biomarkeri cu potențial translațional, care ar putea sprijini eforturile către un management clinic mai personalizat.