

UNIVERSITATEA “OVIDIUS” DIN CONSTANȚA  
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ  
DOMENIUL DE DOCTORAT MEDICINĂ

**TEZA DE DOCTORAT**

**CONCORDANȚA ASPECTELOR CLINICO-MORFOPATOLOGICE ȘI  
IMUNOHISTOCHIMICE CU SUBTIPURILE MOLECULARE ALE  
CARCINOMULUI MAMAR INVAZIV**

**REZUMAT**

**Conducător de doctorat  
PROF. UNIV. DR. MARIANA AȘCHIE**

**Student -doctorand  
CRISTEA (BĂLȚĂTESCU) GABRIELA IZABELA**

**Constanța  
2014**

## CUPRINS

|                                           |    |
|-------------------------------------------|----|
| Cuvânt înainte.....                       | i  |
| Cuprins.....                              | ii |
| Lista abrevierilor utilizate în text..... | 1  |
| Introducere .....                         | 3  |

### Partea întâi

#### STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

##### Capitolul I – Elemente de embriologie, anatomie, histologie și fiziologie a glandei mamare

|                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------|-----------|
| I.1. Dezvoltarea embriologică a glandei mamare.....            | 6         |
| I.2. Aspecte anatomice ale glandei mamare .....                | 7         |
| I.3. Aspecte histologice și fiziologie ale glandei mamare..... | 9         |
| <b>Bibliografie selectivă.....</b>                             | <b>14</b> |

##### Capitolul II – Epidemiologia și patogeniza cancerului glandei mamare

|                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| II.1. Epidemiologia cancerului mamar.....                                | 15        |
| II.2. Factorii etiologici implicați în dezvoltarea cancerului mamar..... | 16        |
| <b>Bibliografie selectivă.....</b>                                       | <b>21</b> |

##### Capitolul III – Aspecte histopatologice și stadializarea carcinoamelor mamare invazive

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| III.1. Clasificarea histopatologică OMS a carcinoamelor mamare .....                | 23        |
| III.2. Forme histopatologice de carcinom mamar in situ și carcinomul microinvaziv.. | 25        |
| III.3. Forme histopatologice de carcinom mamar invaziv .....                        | 30        |
| III.4. Stadializarea cancerului mamar .....                                         | 33        |
| III.5. Factori morfopatologici cu rol prognostic și predictiv.....                  | 35        |
| <b>Bibliografie selectivă .....</b>                                                 | <b>37</b> |

##### Capitolul IV – Aspecte imunohistochimice în carcinoamele mamare invazive

|                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------|-----------|
| IV.1. Biomarkeri cu importanță prognostică și predictivă ..... | 39        |
| IV.2. Biomarkeri utili în diagnosticul histopatologic .....    | 45        |
| <b>Bibliografie selectivă .....</b>                            | <b>49</b> |

##### Capitolul V – Clasificarea moleculară a carcinoamelor mamare invazive

|                                                                                    |           |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| V.1. Clasificarea moleculară intrinsecă.....                                       | 54        |
| V.2. Clasificarea moleculară pe baza criteriilor imunohistochimice „surogat” ..... | 65        |
| <b>Bibliografie selectivă.....</b>                                                 | <b>67</b> |

### Partea a doua

#### CONTRIBUȚII PERSONALE

##### Capitolul VI – Motivația, scopul și obiectivele studiului doctoral

|                                                      |           |
|------------------------------------------------------|-----------|
| VI.1. Motivația studiului doctoral .....             | 73        |
| VI.2. Scopul și obiectivele studiului doctoral ..... | 74        |
| <b>Bibliografie selectivă.....</b>                   | <b>75</b> |

##### Capitolul VII – Material și metodă

|                                               |    |
|-----------------------------------------------|----|
| VII.1. Pacienți și metode .....               | 77 |
| VII.1.1. Descrierea desenului de studiu ..... | 77 |

|                                                                                                |                                                                                                                                                              |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| VII.1.2.                                                                                       | Criterii de eligibilitate și de excludere a cazurilor incluse în studiu.....                                                                                 | 77         |
| VII.2.                                                                                         | Prelucrarea materialului histopatologic.....                                                                                                                 | 78         |
| VII.3.                                                                                         | Examenul imunohistochimic.....                                                                                                                               | 82         |
| VII.3.1.                                                                                       | Examenul imunohistochimic și biomarkeri utilizați.....                                                                                                       | 82         |
| VII.3.2.                                                                                       | Metode de cuantificare a expresiei imunomarkerilor.....                                                                                                      | 84         |
| VII.4.                                                                                         | Determinarea amplificării genei <i>HER2neu</i> prin hibridizarea in situ cu cromogen .....                                                                   | 87         |
| VII.5.                                                                                         | Criterii imunohistochimice „surogat” pentru definirea subtipurilor moleculare                                                                                | 90         |
| VII.6.                                                                                         | Prelucrarea și analiza statistică a datelor.....                                                                                                             | 91         |
|                                                                                                | <b>Bibliografie selectivă.....</b>                                                                                                                           | <b>92</b>  |
| <br><b>Capitolul VIII – Rezultate și discuții pe baza studiului clinico-morfologic, imuno-</b> |                                                                                                                                                              |            |
| <b>histochimic și citogenetică moleculară</b>                                                  |                                                                                                                                                              |            |
| VIII.1.                                                                                        | Rezultate și discuții pe baza studiului clinico-morfopatologic .....                                                                                         | 96         |
| VIII.2.                                                                                        | Rezultate și discuții pe baza studiului imunohistochimic și molecular .....                                                                                  | 146        |
| VIII.2.1                                                                                       | Evaluarea imunohistochimică a receptorilor hormonal (ER și PR)....                                                                                           | 146        |
|                                                                                                | Evaluarea expresiei imunohistochimice a oncoproteinei <i>HER2neu</i>                                                                                         |            |
| VIII.2.2                                                                                       | și/sau amplificarea genei <i>HER-2/neu</i> prin hibridizarea in situ cu cromogen .....                                                                       | 154        |
| VIII.2.3                                                                                       | Evaluarea imunohistochimică a biomarkerului Ki67 .....                                                                                                       | 160        |
| VIII.2.4                                                                                       | Evaluarea imunohistochimică a expresiei oncoproteinei p53 .....                                                                                              | 163        |
| VIII.2.5                                                                                       | Evaluarea expresiei imunohistochimice a biomarkerilor bazali (CK5/6 și EGFR).....                                                                            | 165        |
|                                                                                                | <b>Bibliografie selectivă .....</b>                                                                                                                          | <b>169</b> |
| <br><b>Capitolul IX Rezultate și discuții pe baza subtipurilor moleculare</b>                  |                                                                                                                                                              |            |
| IX.1.                                                                                          | Încadrarea moleculară a cazurilor conform criteriilor de diagnostic imunohistochimic „surogat” .....                                                         | 177        |
| IX.2.                                                                                          | Evaluarea cazurilor încadrate în subtipul molecular luminal A.....                                                                                           | 178        |
| IX.3.                                                                                          | Evaluarea cazurilor încadrate în subtipul molecular luminal B .....                                                                                          | 194        |
| IX.4.                                                                                          | Evaluarea cazurilor încadrate în subtipul molecular <i>HER2</i> pozitiv (non-luminal) .....                                                                  | 214        |
| IX.5.                                                                                          | Evaluarea cazurilor încadrate în subtipul TNP .....                                                                                                          | 227        |
| IX.6.                                                                                          | Corelații între subtipurile moleculare și principalii factori clinico-morfopatologici și imunohistochimici cu stabilirea supraviețuirii pe termen scurt..... | 243        |
| IX.6.1.                                                                                        | Corelații între subtipurile moleculare și principalii factori clinico-morfopatologici și imunohistochimici .....                                             | 243        |
| IX.6.2.                                                                                        | Supraviețuirea și subtipuri moleculare.....                                                                                                                  | 258        |
|                                                                                                | <b>Bibliografie selectivă.....</b>                                                                                                                           | <b>261</b> |
| <br><b>Capitolul X – Concluzii .....</b>                                                       |                                                                                                                                                              |            |
| <b>Bibliografie generală .....</b>                                                             |                                                                                                                                                              |            |
| <b>Iconografie.....</b>                                                                        |                                                                                                                                                              |            |
| <b>Anexa Tabel sinoptic al cazurilor de carcinom mamar invaziv incluse în studiu .....</b>     |                                                                                                                                                              |            |

### **Lista abrevierilor utilizate în text**

ABC - Complex Avidină-Biotină  
aCGH - Hibridizarea genomică comparativă prin tehnologia microarray  
ADH - Acina mușchiului neted.  
ADH - Hiperplazia ductală atipică  
ADN - Acid Deoxiribonucleic  
AJCC - American Joint Committee on Cancer  
AR – Receptori androgenici  
ARN - Acid ribonucleic  
CDI – Carcinom ductal invaziv  
CDIS – Carcinom intraductal (in situ)  
CEA – Antigen carcino-embrionar.  
c-erbB2 - Receptorul pentru factorul de creștere a epidermal 2 uman  
CISH – Hibridizare in situ cu cromogen  
CK – Citocheratină  
CLI – Carcinom lobular invaziv.  
CLIS - Carcinom lobular in situ  
CM - Carcinom mamar  
Cox2 – Ciclooxygenaza 2  
EGFR - Receptorul pentru factorul de creștere a epidermal uman 1  
EMA - antigenul membranar epitelial  
ENS - Enolaza neuron specifică  
ER - Receptori estrogenici  
FISH – Hibridizare in situ cu fluorescență  
GCDFP -15 – Proteina lichidului fibrozei chistice 15  
HCL - Acid clorhidric  
HE - Hematoxilină-eozină  
HER 2neu – Receptorul pentru factorul de creștere a epidermal 2 uman  
IHC – Examen imunohistochimic  
LSAB - Metoda “Labeled Streptavidin Biotin”  
LumA – luminal A  
LumB – luminal B  
OMS – Organizația Mondială a Sănătății  
PAP - Peroxidază-Antiperoxidază  
PAS- Acid Periodic Schiff  
PR – Receptori progesteronici  
SMA - Actina mușchiului neted  
SMM-HC – Miozina mușchiului neted lanț greu  
TNP – Triplu negativ  
TTF1 – Factorul de transcripție tiroidian 1  
VEGF – Factorul de creștere endotelial  
VG – van Gieson

**CUVINTE CHEIE: carcinom mamar invaziv, subtipuri moleculare, examen imunohistochimic hibridizare in situ cu cromogen**

## INTRODUCERE

La nivel mondial cancerul rămâne în continuare o problemă majoră de sănătate și, în ciuda eforturilor uriașe de dezvoltare a metodelor de screening, de depistare precoce și de tratament eficace a afecțiunilor maligne, numărul victimelor acestei maladii este în continuă creștere. Astfel, dacă în 2008 incidența cancerului a fost de 12,7 milioane, cu o rată a deceselor de 7,6 milioane, conform datelor publicate de GLOBOCAN 2008, pentru 2012 se constată o incidență de 14,1 milioane, din care cancerul mamar se înregistrează cu 1,7 milioane (ocupând locul doi după cel pulmonar), și o rată a mortalității de 8,2 milioane, aproximativ jumătate din aceste cazuri fiind întâlnite în țările mai puțin dezvoltate economic, iar cele mai frecvente cauze fiind cancerul pulmonar, hepatic și gastric [1]. În acest context mondial, Europa se caracterizează de asemenea printr-o creștere a incidenței cancerului de la 3,2 milioane de cazuri noi pe an în 2008, la 3,45 milioane în 2012 (cu excepția cazurilor de cancer cutanat non-melanocitare) cu 53% pentru sexul masculin și 47% la sexul feminin, iar rata deceselor de la 1,7 milioane pentru 2008, la 1,75 milioane în 2012 (56% pentru sexul masculin și 44% pentru sexul feminin), conform datelor prezentate de Agenția Internațională a Organizației Mondiale a Sănătății pentru Cercetare în Domeniul Cancerului din Lyon, Franța [2,3]. Dintre toate tipurile de cancer, pentru sexul feminin, numărul cazurilor de cancer mamar a înregistrat în 2012 cea mai mare creștere la nivel mondial, cu 1,7 milioane de cazuri noi (cu 20% mai mult față de 2008) și 522 000 decese (cu 14% mai mult față de 2008), fiind principala cauză de deces la sexul feminin [1]. În România, raportările efectuate în 2012, plasează cancerul mamar la sexul feminin pe o poziție „fruntașă” în 2012, ca și în majoritatea țărilor din Europa, atât la incidența cazurilor noi de cancer mamar, cu 89 800 de cazuri, cât și la numărul de decese, fiind înregistrate 32 400, în creștere față de 2008 [4]. Se impun în continuare eforturi sporite de cercetare în domeniul patologiei maligne mamare, ca și în celelalte patologii, având drept scop reducerea morbidității și mortalității cancerului mamar.

Clasificarea histopatologică actuală, diseminată prin publicațiile OMS din 2003 și apoi din 2012, cuprinde 20 de tipuri principale și 18 subtipuri speciale/ rare și este recunoscută și acceptată la nivel mondial, fiind unul dintre cei mai importanți factori de prognostic alături de alți factori (gradul histopatologic, stadializarea pTNM, dimensiunea maximă a tumorii, statusul limfoganglionilor axilari, expresia imunohistochimică a ER și a PR, supraexpresia sau amplificarea oncogenei HER2neu) a căror valoare prognostică și/sau terapeutică a fost demonstrată în timp de numeroase cercetări și trialuri clinice. Totuși există și mici dezavantaje, având în vedere că marea majoritate a cazurilor de CM (cca. 75%) sunt cuprinse în categoria CDI-NST, clasă histopatologică care deși prezintă trăsături morfologice similare se caracterizează totuși printr-o mare variabilitate a comportamentului biologic și a răspunsului terapeutic[5]. Această constatare este demonstrată încă din 1998, când s-a observat că doar 30% din paciențele cu carcinom mamar care au fost tratate prin chimioterapie sau hormonoterapie au avut un beneficiu real, restul de 70% ar fi putut supraviețui și fără aceste tratamente [6, 7]. De asemenea, celelalte forme histopatologice (CLI, CM mixt sau alte forme rare, incluse în categoria „subtipuri speciale”), sunt reprezentate de un procent mic de cazuri și oferă informații prognostice și predictive limitate, necesitând studii suplimentare care să elucideze mecanismele moleculare complexe implicate în carcinogeneză.

Dezvoltarea tehnicilor moleculare și genetice performante de tip „high-throughput” din ultimele decenii împreună cu utilizarea metodelor analitice complexe de interpretare a datelor au permis analiza a numeroase gene extrase dintr-o singură probă și dezvoltarea unui nou sistem de clasificare a carcinomului mamar, bazat pe modificările transcriptomice[8, 9, 10] și genomice (modificări ale numărului de copii ADN) [11, 12]. Astfel clasificarea moleculară a carcinoamelor mamare propusă inițial de Perou et al[8] și Sorlie et al [9] pe baza modificărilor genetice este în

continuă perfecționare cu dezvoltarea mijloacelor de investigare și a numeroaselor studii retro- și prospective.

Necesitatea descoperirii mecanismelor ce conduc la un comportament biologic grav al leziunilor tumorale impun cercetări aprofundate, ample care să cuprindă eșantioane mari, reprezentative de populație. Dar acest „avânt” este frânat de costurile enorme pe care tehnicile de citogenetică moleculară le presupun precum și de dificultatea de a fi aplicate pe un număr mare de pacienți, a condus la definirea acestor subtipuri moleculare intrinseci pe baza expresiei imunohistochimice a patru biomarkeri. Astfel Consensul de la St Gallen din 2011 și 2013 [13,14] a stabilit și a definit 4 subtipuri moleculare: luminal A, luminal B (cu două subtipuri LumB – HER2pozitiv și LumB – HER2negativ), HER2pozitiv și triplu negativ (TNP), fiecare dintre acestea caracterizându-se prin expresia unui set unic de gene, cu implicații prognostice și predictiv distincte. Primele două sunt asociate cu un prognostic mai bun și cu răspuns favorabil la terapia hormonală în contrast cu tumorile încadrate în subtipul HER2 pozitiv și TNP, ce se caracterizează printr-un comportament biologic agresiv, cu absența răspunsului la hormonoterapie sau chiar și chimioterapie. Viabilitatea examenului imunohistochimic drept metodă “surogat” pentru profilul genic molecular a fost dovedită de studii precedente, acest lucru facilitând caracterizarea clinico-morfologică a subtipurilor moleculare pentru diferite eșantioane de populații, obținându-se uneori rezultate diferite.

Studiul actual este structurat în două părți, repartizate în 10 capitole. Prima parte cuprinde date din literatura de specialitate referitoare la embriologia, anatomia, histo-fiziologia glandei mamare, precum și epidemiologia sau aspecte histopatologice ale cancerului mamar. De asemenea sunt sintetizate cele mai recente informații referitoare la toxonomia moleculară a CM. Partea a doua, structurată în cinci capitole, se referă la contribuțiile proprii în studiul clinico-morfopatologic, imunohistochimic și molecular al carcinoamelor mamare.

## **CONTRIBUȚII PERSONALE**

### **Capitolul VI - Motivația, scopul și obiectivele studiului doctoral**

#### **VI.1. Motivația studiului doctoral**

Morfologic și biologic CM este o afecțiune heterogenă ce include numeroase subtipuri [15]. Clasificarea OMS a CM, cunoscută și acceptată pe plan mondial, este indispensabilă pentru stabilirea unui diagnostic histopatologic corect care să traseze principalele direcții de conduită terapeutică. Cu toate acestea, s-a constatat că acest sistem de încadrare a CM nu este suficient, existând numeroase situații în care, leziuni tumorale maligne cu același aspect morfologic au prezentat un comportament biologic diferit [5]. Aceste situații de discordanță în ceea ce privește prognosticul și capacitatea de a prezice răspunsul favorabil sub tratament a leziunilor tumorale, similare din punct de vedere al prezentării clinice și a caracteristicilor morfologice și imunohistochimice, au condus la necesitatea dezvoltării unei noi toxonomii a CM care să ofere informații suplimentare ce permit personalizarea protocolului terapeutic [16, 17]. Astfel, cercetările genetice și moleculare efectuate pentru cancerul mamar în ultimul deceniu au condus la conturarea unei nou sistem de încadrare a CM ce se bazează pe modalitatea de expresie genică și a alterării numărului de copii ADN. Acestea completează diagnosticul histopatologic și identifică pacienții cu prognostic rezervat sau care ar putea beneficia de posibile tratamente țintite. Cele patru clase moleculare principale stabilite în urma Consorțiului St. Gallen din 2013 sunt reprezentate de luminal A, luminal B (cu două subtipuri: luminal B-HERnegativ și luminal B-HERpozitiv), HER2 pozitiv și TNP [14].

Deși valoarea informațiilor aduse de aceste cercetări este inestimabilă, totuși studiile pe loturi mari de pacienți ce urmăresc corelațiile cu aspectele clinico-patologice și alți biomarkeri cunoscuți și dovediți cu rol prognostic și predictiv sunt reduse pe plan european, implicit și în

România unde pentru zona dobrogeană lipsesc, constituind un argument puternic în demersul acestui studiu doctoral.

## **VI. 2. Scopul și obiectivele studiului doctoral**

**Scopul studiului actual** constă în identificarea subtipurilor moleculare ale carcinoamelor mamare, folosind criterii imunohistochimice „surogat” bazate pe un pannel primar de patru biomarkeri (ER, PR, HER2neu, KI67), cu stabilirea corelațiilor cu principalii factori cinci – morfologici și imunohistochimici precum și cu implicațiile asupra supraviețuirii generale pe termen scurt.

**Obiectivele studiului doctoral** constau în:

- analiza clinico-morfopatologică a cazurilor incluse în studiu
- analiza expresiei imunohistochimice a biomarkerilor utilizați pentru evaluarea cazurilor incluse în studiu.
- încadrarea cazurilor în clasele moleculare și caracterizarea lor morfo-imunohistochimică.
- analiza statistică a datelor obținute.

## **Capitolul VII MATERIAL ȘI METODĂ**

### **VII. 1.1. Descrierea desenului de studiu**

Cercetările personale s-au bazat pe o analiză retrospectivă a carcinoamelor mamare operate și diagnosticate în clinica de chirurgie a Spitalului Clinic Județean de Urgență „Sf. Andrei” Constanța, pe o perioadă cuprinsă între 01.01.2008 și 31.12.2013, și care au beneficiat de examen histopatologic complet în serviciul clinic de anatomie patologică a aceluiași spital. Realizarea studiului retrospectiv a avut drept bază atât registrul unic din cadrul acestuia cât și baza de date informatizată a Spitalului Clinic Județean de Urgență „Sf. Andrei” Constanța, din care au fost reținute principalele date clinice (vârstă, sex, sediul anatomic al tumorilor, data diagnosticului), aspecte anatomo-patologice reprezentate de tipul specimenelor tisulare (țesut mamar sau ganglionar), diagnosticul histopatologic, gradul și stadiul pTNM al CM, complicațiile ce au survenit pe perioada de urmărire a pacienților.

Din 927 cazuri internate, diagnosticate și tratate chirurgical în cei 6 ani luați în studiu și tratate în cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență „Sf. Andrei” Constanța (639 - sex feminin, 33 – sex masculin) s-a selectat un lot principal ce a cuprins un număr de 293 de carcinoame mamare, reprezentând cazurile pentru care diagnosticul histopatologic a fost realizat pe țesut mamar și/sau ganglionar, iar în cazul tumorilor cu examen extemporaneu, confirmarea prin examen histopatologic a pieselor incluse la parafină a fost obligatorie. Toate cazurile din acest lot principal au beneficiat de analiza imunohistochimică, folosind un pannel obligatoriu, principal, reprezentat de patru biomarkeri (ER, PR, HER2neu, Ki67), la care s-au adăugat și alți imunomarkeri fie cu rol complementar în rafinarea diagnosticului histopatologic sau a subtipurilor moleculare (CK5/6, EGFR, E-cadherină, Sinaptofizină, ENS, Cromogranină, SMA) fie cu rol prognostic și predictiv (p53).

Din acest lot principal s-a ales un lot secundar alcătuit din 239 de CM ce au aparținut sexului feminin diagnosticate în perioada de timp 01.01.2008 – 31.12.2012 și la care urmărirea postoperatorie s-a putut efectua pe o perioadă minimă de supraveghere de 15 luni. Analiza acestui lot secundar de paciente s-a realizat cu scopul de a stabili impactul pe care-l prezintă încadrarea tumorilor mamare în subtipuri specifice moleculare și prognosticul pe termen scurt.

### **VII. 1.2. Criterii de eligibilitate și de excludere**

**Criterii de eligibilitate**

1. Cazurile înregistrate în cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență „Sf. Andrei” Constanța care au beneficiat de tratament chirurgical.
2. Cazurile confirmate din punct de vedere histopatologic cu diagnosticul de carcinom mamar invaziv.
3. Cazurile cu examen imunohistochimic alcătuit dintr-un pannel de anticorpi obligatoriu (ER, PR, HER 2 neu, Ki67).

**Criterii de excludere**

1. Cazurile în care diagnosticul histopatologic a fost reprezentat de un alt tip de tumoră malignă a glandei mamare.
2. Cazurile în care diagnosticul histopatologic sau/și imunohistochimic au stabilit prezența carcinomului mamar “*in situ*” asociat sau nu cu carcinom microinvaziv
3. Cazurile cu diagnosticul de CM la care s-a efectuat tumorectomie sau lumpectomie într-un alt spital și pentru care datele clinico-patologice nu au fost accesibile sau care au beneficiat de chimioterapie înainte de efectuarea mastectomiei radicale.
4. Cazurile cu pannel imunohistochimic primar incomplet.
5. Cazurile confirmate cu diagnosticul de boală Paget fără componentă de carcinom mamar invaziv.

**VII.2. Prelucrarea materialului histopatologic**

Cazurile studiate au fost evaluate atât din punct de vedere macroscopic, microscopic, imunohistochimic cât și prin citogenetică moleculară. Pentru realizarea acestui studiu au fost analizate speciemenle chirurgicale obținute prin mastectomie, sectorectomie, tumorectomie. Piese chirurgicale au fost supuse mai întâi examenului macroscopic. Ulterior, piesele au fost prelucrate prin etape succesive până la stadiul de preparat histopatologic. După fixarea în soluție de formaldehidă 10% timp de 24 de ore, fragmentele de țesut au fost incluse în blocuri și deshidrate în soluție de acetona pentru următoarele 24 de ore. Secțiunile, cu grosimea cuprinsă între 4 și 6 micrometri au fost întinse pe lame, iar pentru depașinare au fost introduse în alcool metilic. Lamele astfel obținute au fost supuse colorării cu ajutorul coloranților Hematoxilin-Eozină și van Gieson. Procedul a fost finalizat cu clarificarea preparatului și montarea lamei. Preparatele microscopice astfel obținute au fost examinate la un microscop Nikon E600.

Studiul imunohistochimic s-a realizat pe blocurile de parafină din care s-au efectuat secțiunile necesare prelucrării histopatologice clasice cu hematoxilină-eozină. Prin secționarea acestora la microtom, la trei nivele, s-au obținut secțiuni seriate cu o grosime de 4μ care au fost aplicate pe lame tratate cu substanță adezivă (polilizină). În continuare, metoda imunohistochimică En Vision (Dako) de amplificare polimerică s-a folosit ca tehnică de lucru, aceasta fiind o metodă indirectă în doi timpi, iar ca și cromogen s-a folosit diaminobenzidine – DAB (DAKO). Aceste reacții imunohistochimice s-au finalizat prin vizualizarea antigenelor investigate în brun (colorație nucleară, citoplasmatică sau membranară, în funcție de antigenul investigat). Pentru realizarea controlului calității s-a efectuat fie controlul extern pozitiv și negativ (pe secțiuni normale sau patologice), fie controlul intern pozitiv. (Tabel nr. 1).

**Tabel nr.1.** Markerii imunohistochimici utilizați (sursa, clona, diluții)

| Anticorp primar                        | Clona               | Diluție  | Antigen retrieval     | Control pozitiv |
|----------------------------------------|---------------------|----------|-----------------------|-----------------|
| <b>Biomarkeri primari, obligatorii</b> |                     |          |                       |                 |
| <b>ER</b>                              | Anticorp monoclonal | Ready to | EnVision™ FLEX Target | Cancer          |

| Anticorp primar                                                                   | Clona                                              | Diluție       | Antigen retrieval                                      | Control pozitiv           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------|--------------------------------------------------------|---------------------------|
| <b>PR</b>                                                                         | de iepure 1D5                                      | use           | Retrieval Solution, high PH                            | mamar                     |
|                                                                                   | Anticorp monoclonal de șoarece -PgR 636            | Ready to use  | EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, high PH      | Cancer mamar              |
| <b>HER2neu</b>                                                                    | Imunoglobulină de iepure HercepTest                | Ready to use  | Epitope Retrieval Solution supplied by HercepTest™ kit | Cancer mamar              |
| <b>Ki-67</b>                                                                      | Anticorp monoclonal de șoarece MIB-1               | Ready to use  | EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, high PH      | Limbă                     |
| <b>Biomarkeri secundari, cu rol în diagnostic sau cu rol prognostic/predictiv</b> |                                                    |               |                                                        |                           |
| <b>P53</b>                                                                        | Anticorp monoclonal de șoarece DO-7                | Ready to use  | EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, high PH      | Carcinom mamar            |
| <b>EGFR</b>                                                                       | Anticorp monoclonal de șoarece EGFR.113            | Ready to use  | Proteinase K                                           | Carcinom scuamos cervical |
| <b>Ck5/6</b>                                                                      | Anticorp monoclonal de șoarece clona D5/16 B4      | Ready to use  | EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, high PH      | Limbă                     |
| <b>Ecadherina</b>                                                                 | Anticorp monoclonal de șoarece clona NCH 38        | Ready to use  | EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, high PH      | Tesut mamar normal        |
| <b>Cromogranin A</b>                                                              | polyclonal rabbit                                  | Ready to use  | DakoCytomation Target Retrieval Solution, high PH      | Tesut cerebral            |
| <b>Synaptophysin</b>                                                              | Anticorp monoclonal de șoarece, clona SY38         | Ready to use  | DakoCytomation Target Retrieval Solution, high PH      | Tesut cerebral            |
| <b>Neuron-specific enolase NSE</b>                                                | Anticorp monoclonal de șoarece clona BBS/NC/VI-H14 | Diluție 1:100 | DakoCytomation Target Retrieval Solution, high PH      | Tesut cerebral            |
| <b>SMA</b>                                                                        | Clona 1A4                                          | Ready to use  | EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, high PH      | Glanda salivară           |

Vendor - Dako, Denmark

#### VII.4. Determinarea amplificării genei *HER2neu* prin hibridizarea in situ cu cromogen (CISH)

Cazurile în care examenul imunohistochimic de evidențiere a supraexpresiei oncoproteinei HER2 neu s-au scondat cu un scor HercepTest equivoc (2+), s-au analizat mai departe pentru amplificarea genei *HER2neu* s-au *c-erbB-2*, proto-oncogenă localizată pe cromozomul 17 (17q11.2-21), în special prin tehnica de hibridizare in situ cu cromogen (CISH) sau cu fluorescență (FISH), numeroase studii demonstrând o concordanță mare între CISH sau FISH, cu valori de la 85% [18] la 100% [19, 20]. Pentru detecția genei *HER2neu* prin hibridizare cromogenică in situ s-a utilizat kit-ul ZytoDot SPEC HER2 Probe Kit de la ZytoVision. Astfel, starea amplificării genei *HER2*, evaluarea și cuantificarea pot fi vizualizate în contextul morfologiei țesutului înconjurător (Tabel nr 2).

**Avantajele** metodei CISH față de FISH:

1. posibilitatea examinării la microscopul optic obișnuit
2. identificarea amplificării genei HER- 2/neu în contextul morfologiei CM
3. semnale permanente ce pot fi arhivate și analizate oricând este necesar
4. pret mai mic pentru reactivi
5. mai facil de evaluat ca FISH

**Tabel nr. 2** Criterii pentru evaluarea și cuantificarea statusului genei *HER-2/neu*

|                                                             |                                                                                          |
|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Amplificarea genei <i>HER-2/neu</i> cu nivel crescut</b> | >10 copii sau un grup mare de amplificare per nucleu în peste 50% din celule canceroase. |
|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|

|                                                            |                                                                                                                 |
|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Amplificarea genei <i>HER-2/neu</i> cu nivel scăzut</b> | 5–10 copii sau un grup mare de amplificare per nucleu în peste 50% din celulele canceroase                      |
| <b>Absența amplificării genei <i>HER-2/neu</i></b>         | 1–5 puncte ale genei <i>HER-2/neu</i> prezente per nucleu în >50% din celulele carcinomatoase în zona selectată |

## VII.5. Criterii imunohistochimice surogat pentru definirea subtipurilor moleculare

| Subtipuri moleculare intrinseci | Subtipuri moleculare folosind criterii imunohistochimice „surogat” |                                                                                                                                 |
|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Luminal A                       | <b>Luminal A –like</b>                                             | ER și PR* pozitiv + HER2 negativ + index Ki67 mic**                                                                             |
|                                 | <b>Luminal B-like (HER2 negativ)</b>                               | ER pozitiv + HER2 negativ și cel puțin una din următoarele criterii: index Ki67 mare sau expresia redusă sau negativă pentru PR |
| Luminal B                       | <b>Luminal B-like (HER2 pozitiv)</b>                               | ER pozitiv<br>Supraexpresia sau amplificarea HER2neu<br>Orice index Ki67 sau expresie a PR                                      |
| Supraexpresia <i>cerb-B2</i>    | <b>HER 2 pozitiv (enrich, non-luminal)</b>                         | Supraexpresia sau amplificarea HER2neu<br>Expresia ER și PR negativă                                                            |
| Basal-like                      | <b>Triplu negativ (ductal)</b>                                     | Expresia ER și PR negativă; HER2 negativ                                                                                        |

\* Pentru definirea subtipului luminal A, valoarea expresiei PR trebuie să fie mai mare de 20% [21].

\*\*Valoarea de cut-off pentru Ki67 este de 14% [14, 20].

## VII.6. Prelucrarea și analiza statistică a datelor

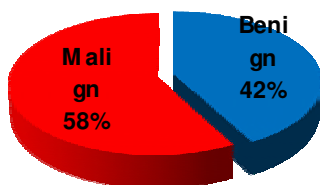
Prelucrarea statistică a datelor clinice, morfopatologice, imunohistochimice precum și rezultatele tehnicilor moleculare s-a realizat folosind platforma statistică SPSS (Pachet Statistic pentru Științe Sociale; *eng* - Statistical Package for the Social Sciences). Analiza statistică descriptivă a furnizat informații referitoare la medie și mediană pentru variabilele continue și proporții sau rate pentru variabilele calitative. Stabilirea corelațiilor dintre subtipul molecular al CM și principalii factori clinico-patologici sau imunohistochimici s-a realizat cu ajutorul diferitelor teste statistice, fie de tip parametric (atunci când variabilele dependente au avut o distribuție normală) sau tip non-neparametric atunci când condiția de normalitate nu era satisfăcută. Astfel, s-au utilizat următoarele metode statistice: testul **ANOVA** (one way analysis of variance) pentru variabilele continue (vârstă, diametrul maxim al tumorii); testul **Chi-pătrat** a analizat corelațiile cu variabilele categorice, **testul Fisher** s-a utilizat atunci când condițiile de efectuare a testului Chi pătrat nu au fost îndeplinite (peste 20 % din celule cu valoare mai mică decât 5); testul **Kruskal-Wallis** a realizat corelațiile cu variabilele de tip ordinal. Pentru estimarea corelațiilor dintre două variabile s-au utilizat **coeficienții de corelație**: coeficientul Pearson sau Spearman ( $r_s$ ).

**Analiza supraviețuirii generale pe termen scurt** s-a realizat pentru un subgrup de pacienți înrolați în studiu pe o perioadă de 5 ani și la care perioada de supraveghere după diagnostic s-a realizat pe o perioadă de cel puțin 15 luni. Curbele de supraviețuire s-au obținut cu ajutorul metodei **Kaplan-Meier**, iar pentru a analiza diferențele de supraviețuire între clasele moleculare, din punct de vedere statistic, s-a utilizat testul **Log-rank**. Analiza multivariată a modelului lui **Cox de regresie proporțională a hazardelor** s-a folosit cu scopul de a stabili asocierile dintre timpul de supraviețuire și variabilele independente (vârstă, sex, subtipul histopatologic, gradul) precum și pentru a obține intervalul de confidențialitate 95%.

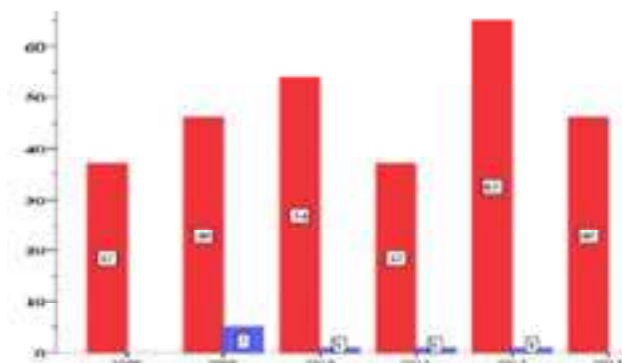
Analiza statistică s-a realizat folosind metoda ipotezelor non-direcționate (two-tails), iar pragul de semnificație statistică s-a considerat ca fiind în valoare mai mică de 0.05; valorile cuprinse între 0.05 și 0.07 s-au considerat cu valoare semnificativ statistică intermediară, iar valori de  $p = 0.00$  s-au raportat ca  $p < 0.01$  [40].

### VIII.1. Rezultate și discuții pe baza studiului clinico-morfopatologic

În perioada 01.01.2008 – 31.12.2013, în cadrul Serviciului Clinic de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Județean de Urgență „Sf. Ap Andrei” Constanța au fost diagnosticate prin examen anatomopatologic complet un număr de 927 de tumori benigne și maligne mamare, ce au inclus ambele sexe. Carcinoamele mamare (in situ și invazive) au predominat, înregistrând o frecvență de 58% (Fig. nr. 1), dar cu un raport dintre sexe disproporționat, cel feminin „dominând” spectrul leziunilor maligne ale glandei mamare cu un procentaj de 95%.



**Fig. nr. 1** Proportia tumorilor maligne și benigne ale glandei mamare pe perioada studiului

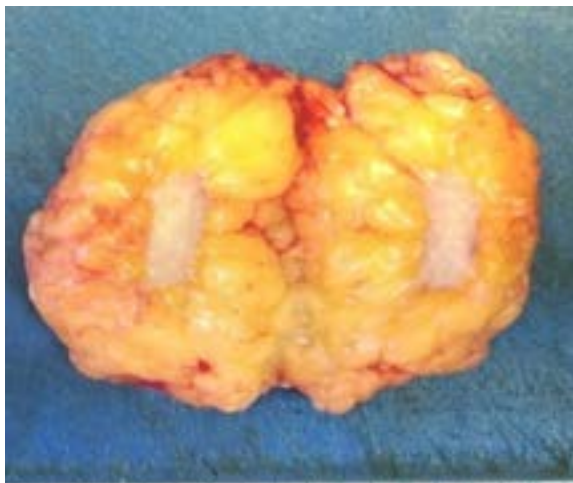


**Fig. nr. 2** Ponderele cazurilor în funcție de anul de diagnostic și genul feminin/masculin

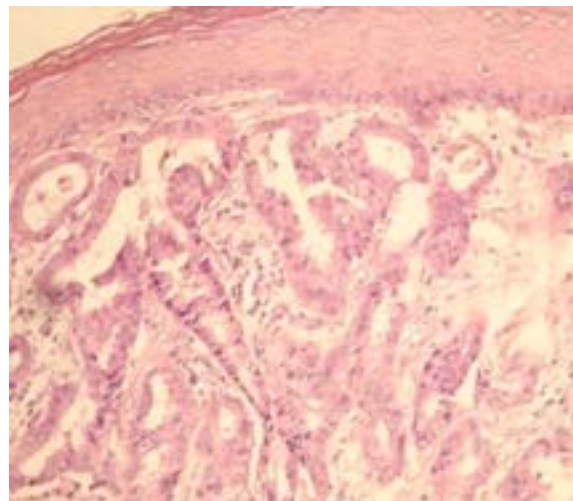
Dintre acestea, pe baza criteriilor de eligibilitate, în studiul prezent s-au inclus 293 de cazuri dintre care 285 cazuri (97,3%) aparțin sexului feminin, restul fiind observate la sexul masculin (8 cazuri). Analiza cazurilor în funcție de anul de includere în studiu și gen (Fig. nr. 2) al lotului principal de pacienți, relevă un vârf al cazurilor pentru sexul feminin în anul 2012, cu o frecvență de 22,8%, fiind urmată de cea înregistrată în anul 2010 cu 18,9% din cazuri.

Vârsta medie a pacientelor din lotul studiat este de  $60,55 \pm 11,4$  ani (28 - 87), majoritatea (80%) având un status hormonal postmenopauzal, iar pentru sexul masculin vârsta medie înregistrată este de  $63,8 \pm 1,2$  ani (58 - 78ani), mai mare decât cea observată la sexul feminin. Diferența dintre diametrul mediu al leziunilor tumorale ce aparțin sexului feminin de  $2,69 \pm 1,9$ cm (1cm – 14 cm) nu diferă de cea obținută pentru cazurile ce aparțin sexului masculin  $2,71 \pm 1,2$ cm (2-5cm).

Din punct de vedere al **clasificării histopatologice** s-a remarcat o gamă mare, pentru ambele sexe, a CDI-NST cu o frecvență de 67,0% din cazurile de CM invaziv identificate la genul feminin și 87,5% din cele observate la sexul masculin. Cu o proporție de 7,2% (19/293) s-au identificat cazurile de carcinom mixt, majoritatea fiind compuse din CDI-NST și CLI. Formele morfopatologice speciale s-au observat cu o pondere mult mai redusă decât CDI-NST, acestea fiind reprezentate de: CLI - 19 cazuri; carcinom mucinos pur și carcinom cribriform invaziv fiecare cu câte 10 cazuri; carcinom cu trăsături medulare - 6 cazuri; carcinom metaplastic - 7 cazuri; carcinom adenoid-chistic și carcinom tubular, fiecare cu câte 3 cazuri; carcinom cu trăsături neuroendocrine -2 cazuri, carcinom cu diferențiere apocrină, carcinom cu celule clare și carcinom secretor cu câte un 1 caz (Fig. nr 3 - 21) . Din punct de vedere al gradului de diferențiere tumorală s-a înregistrat cu o frecvență crescută de 58% pentru formele moderat diferențiate (Fig. nr 22), iar asocierea cu componentă de carcinom in situ (Fig. nr 23) s-a remarcat în proporție de 57,1%, aspect morfologic frecvent constatat în literatura de specialitate, cu până 80% cazuri raportate [22,23].



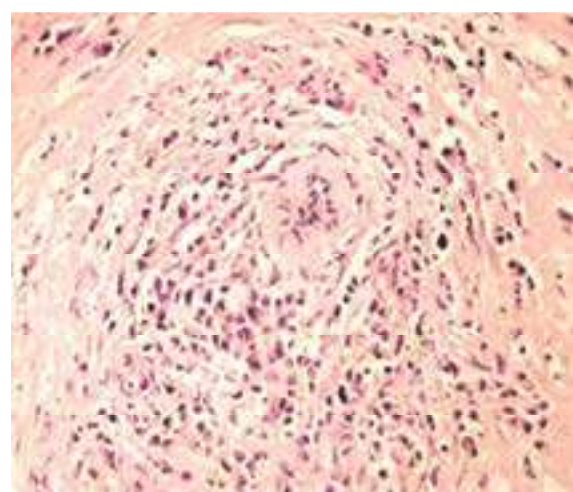
**Fig. nr. 3** CDI- NST –Aspect macroscopic – leziune tumorală nodulară, cu contur stelat, consistență crescută (Caz nr. 144, Original)



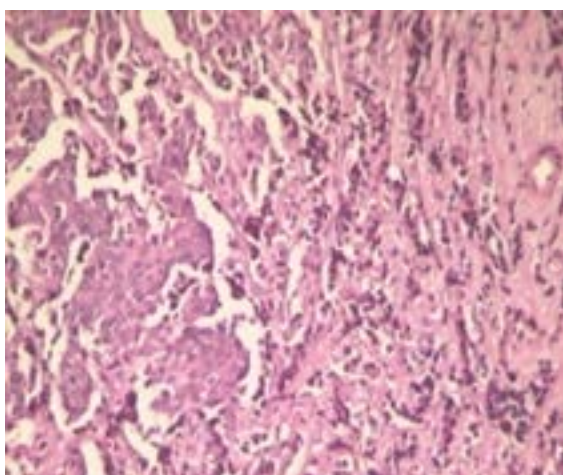
**Fig. nr. 4** CDI NST bine diferențiat G1– aspect microscopic (HE 4x, Caz nr. 262, original)



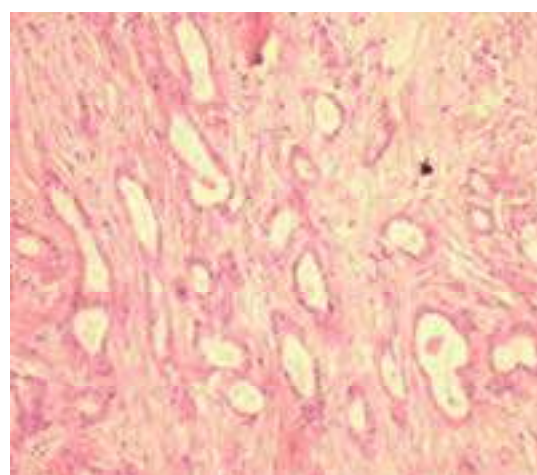
**Fig. nr. 5** Leziune tumorală imprecis delimitată, de aspect solid cu margini infiltrative la periferie, culoare albicios-cenușie (Caz nr 226,original)



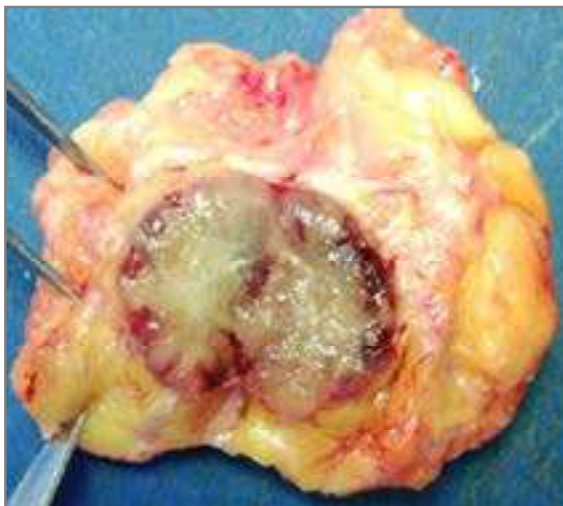
**Fig. nr. 5** CLI clasic - celule tumorale, discoezive, cu dispoziție în șiruri concentrice „targetoid” în jurul unui duct normal (HE 4x, Caz nr. 226, original)



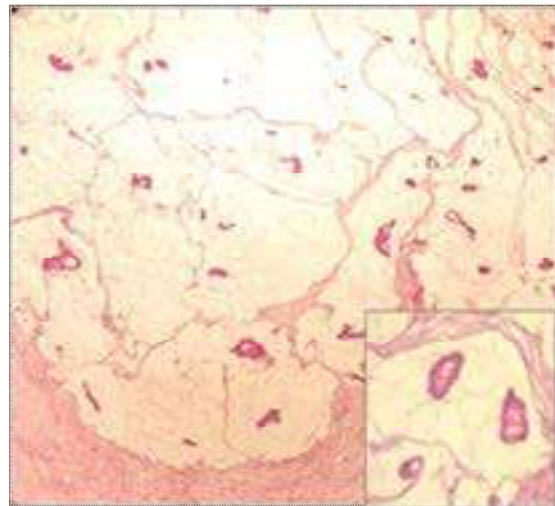
**Fig. nr. 6** Carcinom mixt – proliferare epitelială malignă cu pattern mixt: CDI –NST și CLI (HE 10x, Caz nr.131, original)



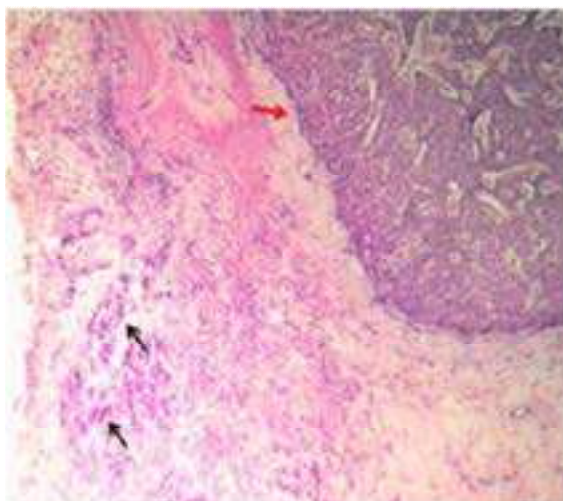
**Fig. nr. 7** Carcinom tubular invaziv – structuri tubulare, de formă rotundă sau ovalară, contur angulat, dispuse într-o stromă dezmozoplazică (HE 4x, Caz nr. 81, original)



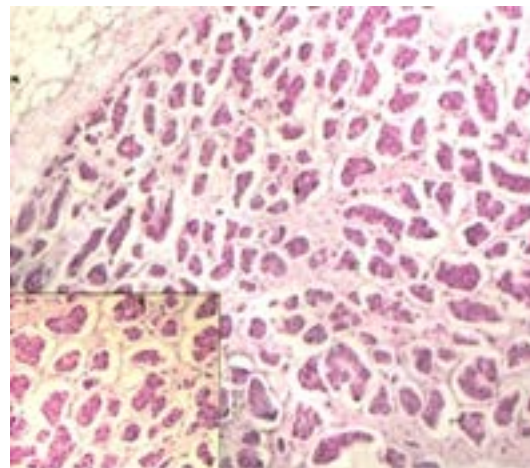
**Fig. nr. 8** Carcinom mucinos- aspect macroscopic- leziune nodulară, aspect translucid, cenușiu albicios, consistență medie (Caz nr 138, original)



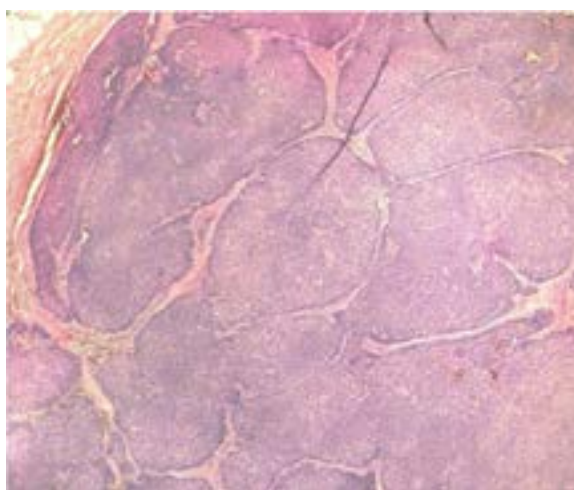
**Fig. nr. 9** Carcinom mucinos pur infiltrativ-hipocelular (tip A): (HE, 4x, casetă HE 10x, Caz nr. 138, original)



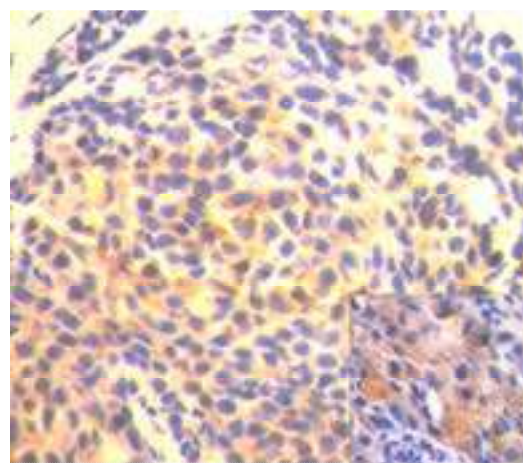
**Fig. nr. 10** Carcinom papilar intraductal de tip solid (→) asociat cu CDI-NST, G3 (→) (HE, 4x, caz nr. 283, original)



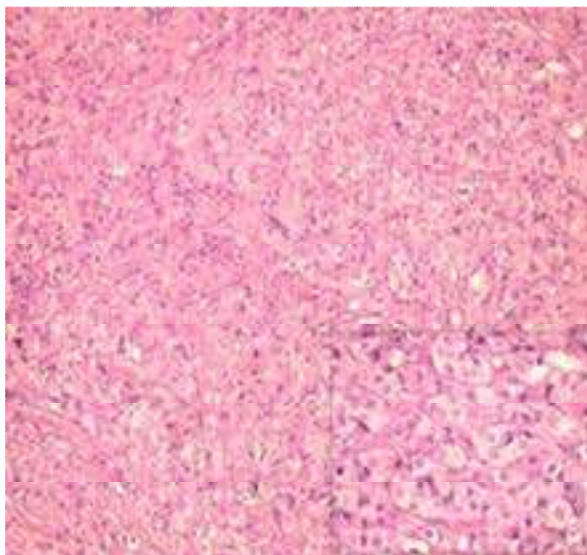
**Fig. nr. 11** Carcinom micropapilar invaziv – (HE 4x, în casetă HE 10x, caz nr. 293, original)



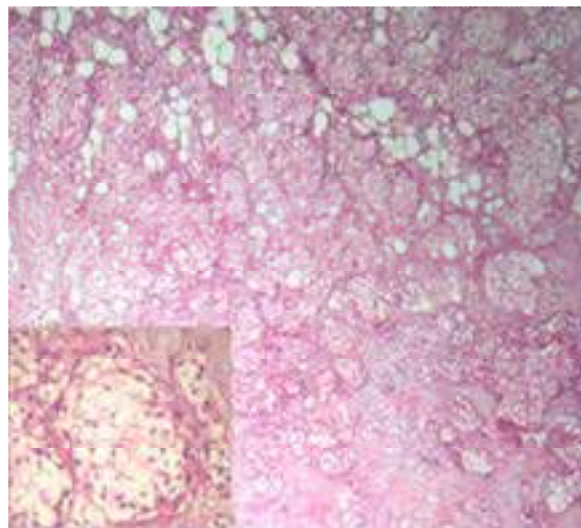
**Fig. nr. 12** Carcinom. neuroendocrin bine diferențiat, cu pattern solid – (HE, 4x, original, caz nr . 88)



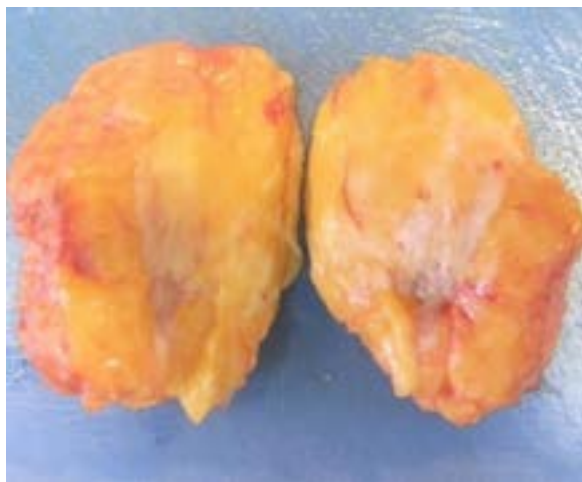
**Fig. nr. 13** Imunomarcaj pozitiv la nivel citoplasmatic pentru sinaptofizină (IHC 10x, în casetă 20x, caz nr . 88, original)



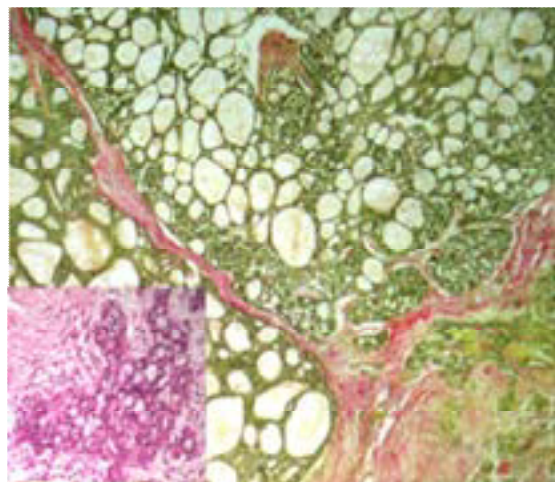
**Fig. nr. 14** Carcinom apocrin infiltrativ – (HE 4x, în casetă HE 20x, caz nr. 177, original)



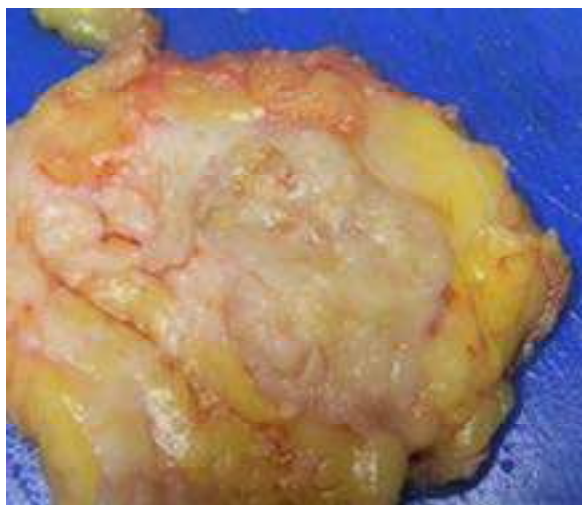
**Fig. nr. 15** Carcinom cu celule clare, bogat în glicogen – (HE 4x, casetă HE 20x, caz nr. 236 original)



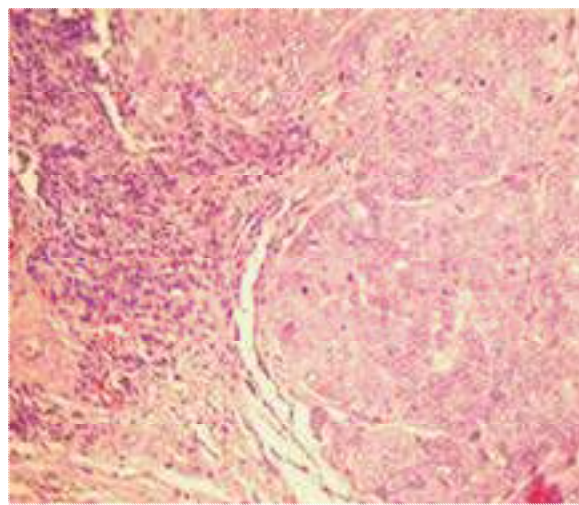
**Fig. nr. 16** Carcinom adenoid-chistic – aspect macroscopic: (caz. nr. 136, original)



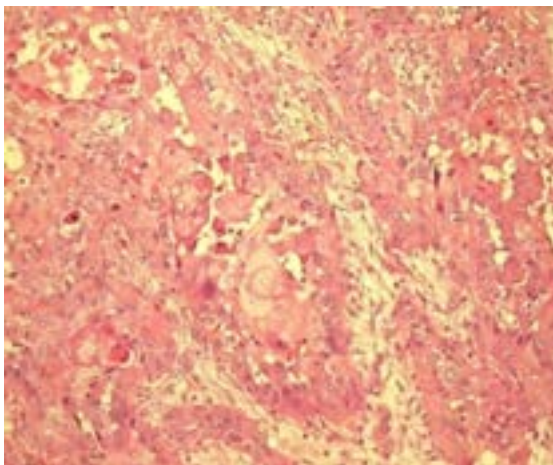
**Fig. nr. 17** Carcinom adenoid-chistic (VG 4x, în casetă HE 10x, caz nr. 288, original)



**Fig. nr. 18** Carcinom medular – aspect macroscopic- leziune nodulară, aspect solid, lbicios-cenușie, consistență fermă (caz nr. 178, original)



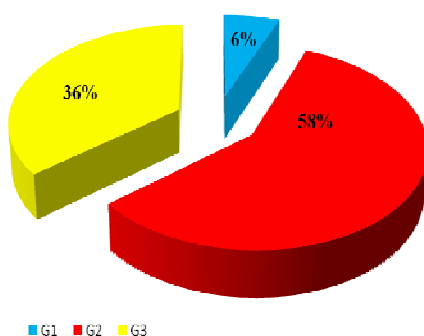
**Fig. nr. 19** Carcinom medular invaziv: placarde de celule tumorale maligne cu aspect sincițial, (HE, 4x, caz nr. 178, original)



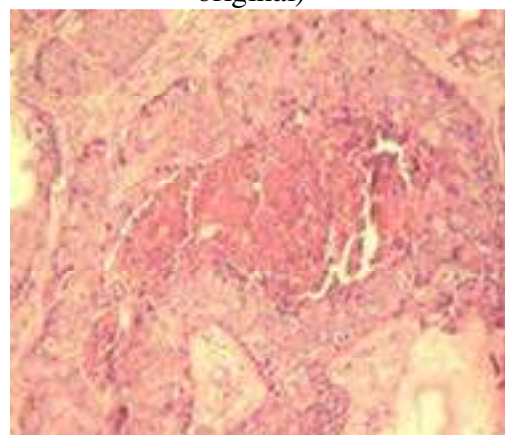
**Fig. nr. 20** Carcinom metaplastic cu celule scuamoase - (HE 10x, caz nr. 237, original)



**Fig. nr. 21** Carcinom metaplastic cu celule fuziforme (HE 4x), a căror natura epitelială este demonstrată prin imunomarcaj pozitiv pentru CK5/6 (în casetă IHC 10x) (caz nr.287, original)

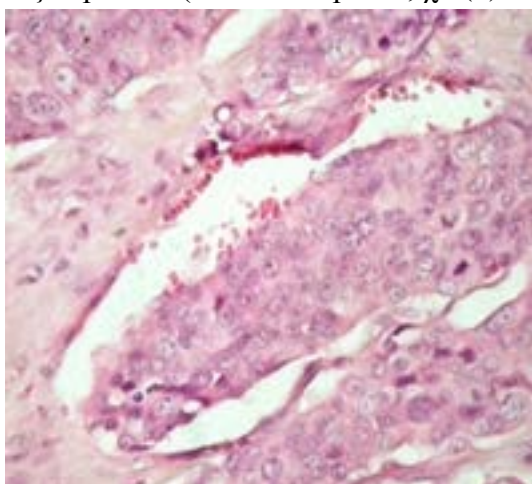


**Fig. nr.22** Distribuția cazurilor cu diagnosticul morfopatologic de CDI-NST în funcție de gradul histopatologic

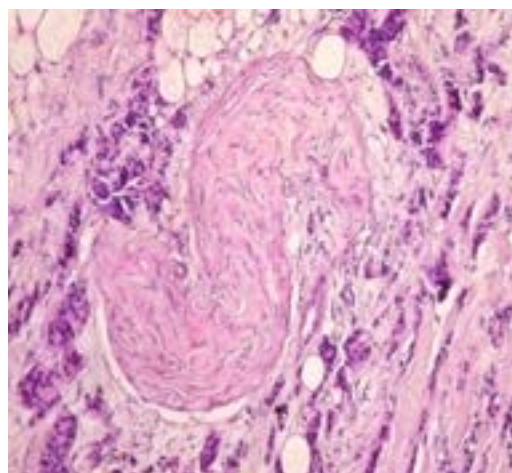


**Fig. nr. 23** Carcinom ductal in situ – comedocarcinom (HE 4x, Caz nr 163, original)

Invazia angiolimfatică peritumorală (Fig. nr.24), care constituie deasemenea un factor de prognostic independent la fel ca și gradul histopatologic, a fost remarcată în studiul actual în proporție de 30,0% cazuri. Invazia perineurală (Fig. nr.25) s-a regăsit în 17,7% din cazuri, fără a se indentifica vreo asociere semnificativ statistic cu gradul histopatologic sau cu dimensiunea tumorală. Totuși s-a observat o asociere importantă cu invazia limfovaculară, cu un nivel al corelației pozitiv (Testul Chi pătrat;  $\chi^2$  (2) = 21,7;  $p < 0,0001$ ; Spearman  $r = -0,347$ ,  $p < 0,0001$ ).



**Fig. nr.24.** CDI-NST, G3. Embol tumoral intravascular (HE 20x, Caz. nr.154, original)

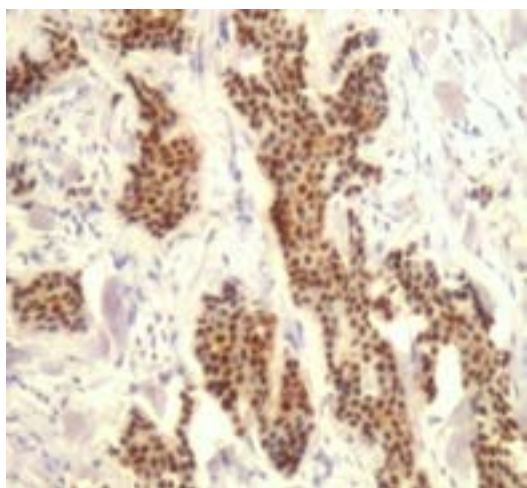


**Fig. nr. 25** CDI-NST, G3. Învazie perineurală de celule tumorale epiteliale maligne (HE 20x, Caz. nr.170, Original)

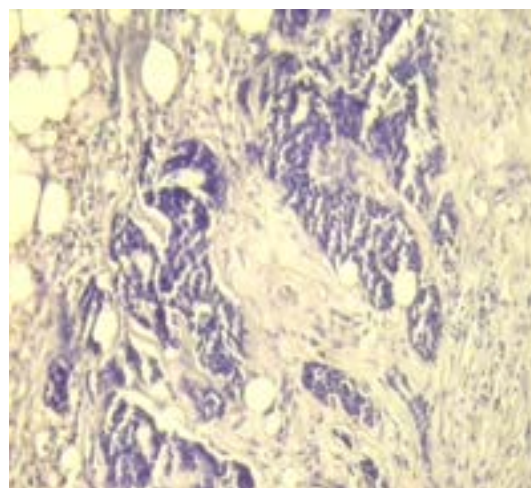
## VIII.2. Rezultate și discuții pe baza studiului imunohistochimic și molecular

### VIII.2.1. Evaluarea imunohistochimică a receptorilor hormonal (ER și PR)

În studiul prezent o expresie negativă s-a observat în 21,8% cazuri pentru ER și 24,9% pentru PR, remarcându-se un imunomarcaj pozitiv la ER pentru toate cazurile de sex masculin și în 77,5% pentru sexul feminin, niveluri mai mari față de cea pentru PR. Pentru lotul nostru de cazuri din cazurile cu imunomarcaj nuclear pozitiv pentru ER 84,8% din cazuri s-a observat o expresie înaltă a ER, de peste 10% (Fig. nr. 26), restul fiind reprezentate de absența unui imunomarcaj nuclear (Fig. nr. 27). Expresia PR de obicei indică o funcționare corectă a căilor de semnalizare ER- $\alpha$  și este activat de hormonul progesteronic, fiind implicat ca și ER în reglarea anumitor funcții celulare, incluzând proliferarea [24].



**Fig. nr. 26** Examen imunohistochimic - ER  
Imunomarcaj nuclear pozitiv în peste 90% din  
celulele tumorale (IHC 10x, caz nr. 98,  
original)

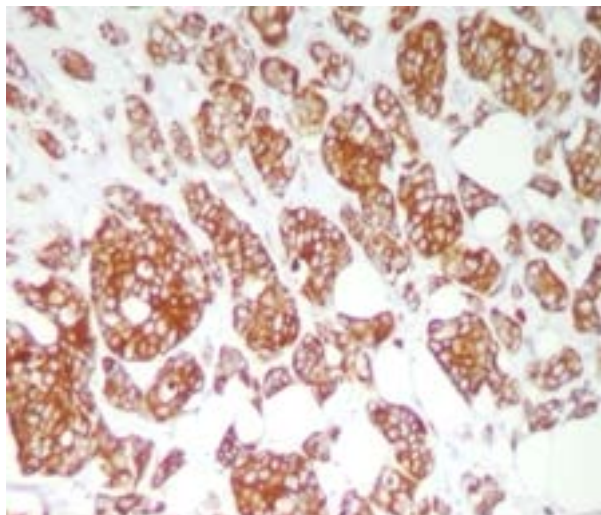


**Fig. nr.27** Examen imunohistochimic - ER  
imunomarcaj nuclear negativ la nivelul  
celulelor tumorale (IHC 4x, caz nr. 221,  
original)

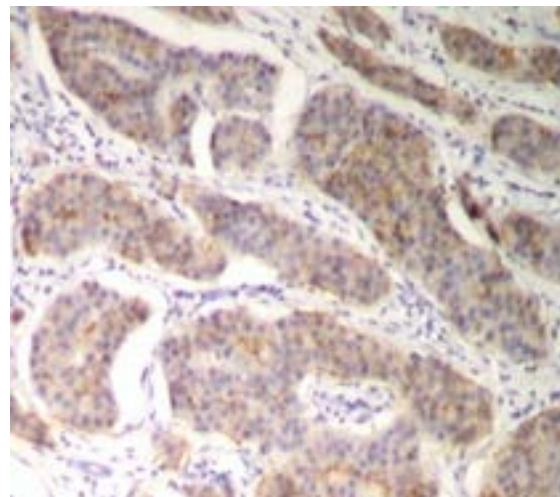
### VIII. 2.2. Evaluarea expresiei imunohistochimice a oncoproteinei HER2neu și/sau amplificarea genei *HER-2/neu* prin hibridizarea in situ cu cromogen

În studiul prezent cuantificarea imunohistochimică a oncoproteinei HER2/neu s-a realizat pentru toate cazurile, din care în 20,8% s-a observat supraexpresia acesteia, obținându-se un scor pozitiv de IHC 3+ (Fig. nr. 28), iar pentru 63,1% din cazuri s-a observat absența supraexpresiei obținându-se un imunomarcaj de 1+ sau 0 (Fig. nr.29, 30). Pentru 16,0% din cazuri s-a observat un scor echivoc 2+ (Fig. nr. 31), rezultat care a necesitat cuantificarea suplimentară a amplificării genei *HER-2/neu* prin CISH. Astfel din cele 47 de cazuri la care s-a efectuat determinarea amplificării genei *HER2/neu* în 42,6% s-a observat o expresie normală a genei *HER2/neu* (Fig. nr.32), iar în 57,4% s-a remarcat amplificarea acesteia (Fig. nr. 33). În urma evaluării amplificării genei *HER2/neu* pentru cazurile cu rezultat imunohistochimic echivoc, statusul HER2neu pozitiv s-a observat în 30% din cazuri.

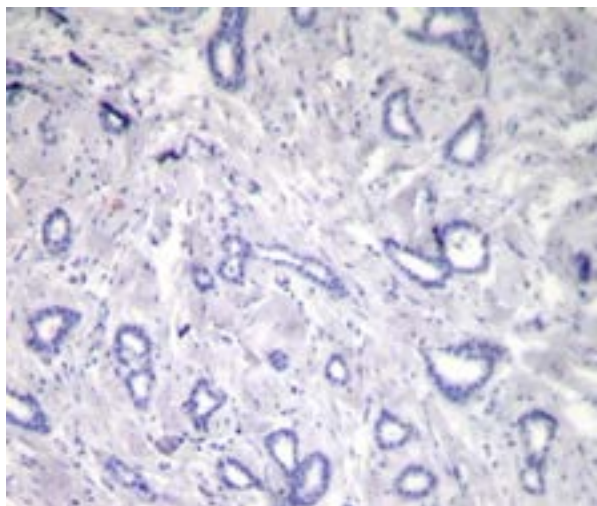
Distribuția cazurilor în funcție de **diagnosticul histopatologic** pune în evidență frecvența mare a cazurilor cu diagnosticul histopatologic de CDI-NST (85,2%), dintre care în două situații s-a observat asocierea dintre boala Paget și CDI-NST, fiind secondate, la o distanță mare de carcinoamele mixte cu 5,7% din cazuri.



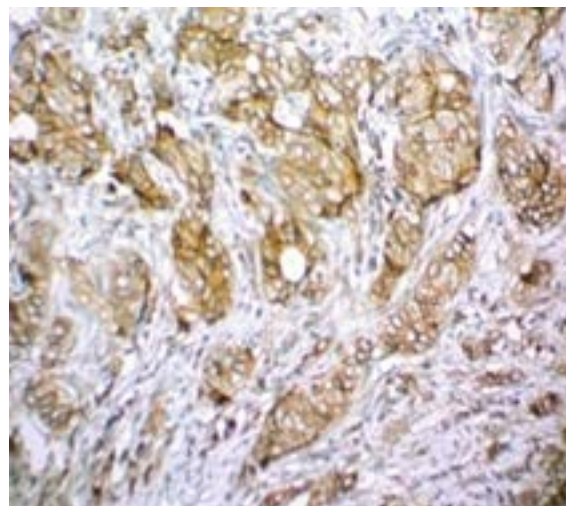
**Fig. nr. 28** Examen imunohistochimic HER2/neu – scor IHC 3+ (IHC 10x, caz nr.281, original)



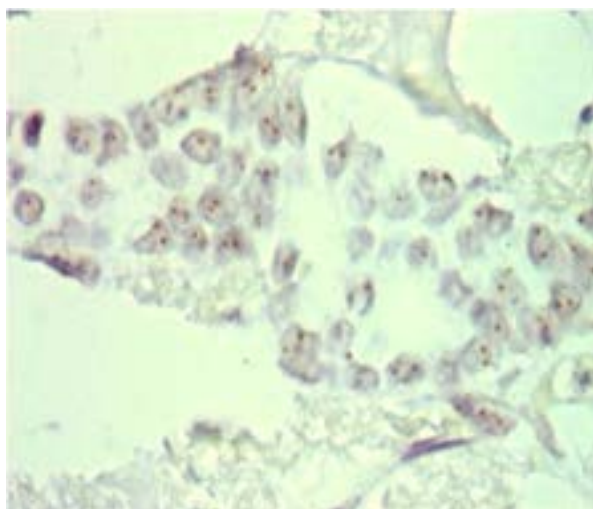
**Fig. nr. 29** Examen imunohistochimic HER2/neu – scor IHC 1+(negativ (IHC 4x,caz nr. 210, original)



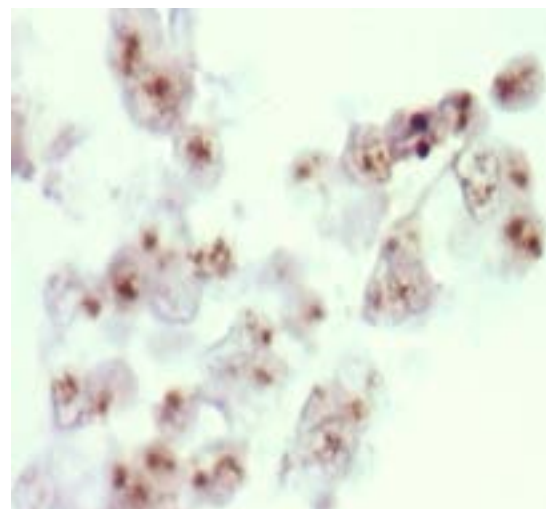
**Fig.nr.30** Examen imunohistochimic HER2/neu, scor IHC 0 (negativ)- (IHC 4x, caz nr. 193, original)



**Fig. nr. 31** Examen imunohistochimic HER2/neu – scor IHC 2+ (echivoc)- (IHC 10x, caz nr.198, original)



**Fig. nr.32** CISH - expresie normală a genei *HER2/neu* (Ob 40x, Caz nr. 245, original)



**Fig. nr.33** CISH - amplificare înaltă a genei *HER2/neu* (Ob 40x, caz nr. 202, original)

**VIII.2.3.Evaluarea imunohistochimică a biomarkerului Ki67**s-a efectuat pentru toate cazurile incluse în studiu, obținându-se un index negativ pentru 10,6% (31/293) din cazuri și o valoare

crescută pentru 34,1% din cazuri. Diferența de 162 de cazuri (55,3%) s-a caracterizat printr-un index de proliferare nucleară scăzut ( $<20\%$ ), aceste cazuri fiind preponderente.

**VIII.2.4.Evaluarea imunohistochimică a oncoproteinei P53** - aduce informații suplimentare referitoare la caracteristicile moleculare ale unei tumori precum și datorită existenței unei legături direct proporționale cu prognosticul și cu prezicerea la tratament. În studiul actual imunomarcajul p53 a fost evaluat în 222 de cazuri, dintre acestea 33,1% au evidențiat o reacție pozitivă

#### **VIII.2.5.Evaluarea imunohistochimică a biomarkerilor de tip bazali (EGFR și CK5/6)**

Expresia imunohistochimică pentru EGFR a fost evaluată în 133 de cazuri din care s-a remarcat un răspuns pozitiv pentru 39,1% din cazuri. Acest procent este mai mare decât rezultatele obținute de Tsutui et al și Walker et al care au demonstrat în studiile lor o frecvență a expresiei EGFR de 36%, dar în literatura de specialitate sunt menționate și valori mai reduse, de până la 7% din cazurile de CM [19, 25]. Studiul efectuat de Lv et al a demonstrat existența unei corelații pozitive între supraexpresia proteinei EGFR și amplificarea genei *EGFR* ce se asociază cu un prognostic prost [27]

Expresia imunohistochimică a CK5/6 este analizată în 45,4% din cazuri, un imunomarcaj pozitiv fiind indentificat pentru 39,1% din acestea, valoare ce se suprapune peste datele raportate de studii similare în care menționează o frecvență a cazurilor cu imunomarcaj pozitiv pentru CK5/6 variabilă, de la 22% la 51 % [28, 29].

### **Capitolul IX. Rezultate și discuții asupra subtipurilor moleculare**

#### **IX.1. Încadrarea moleculară conform criteriilor de diagnostic imunohistochimic “surogat”**

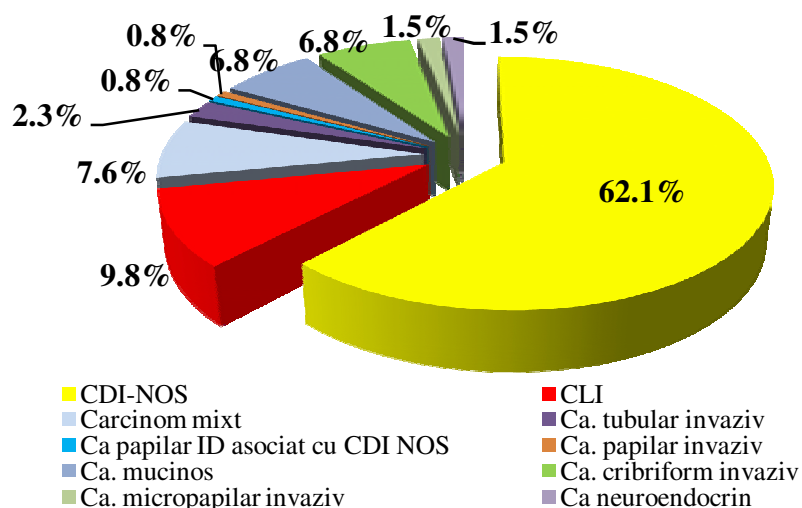
Analiza cazurilor în funcție de expresia markerilor imunohistochimici din pannel-ul de anticorpi obligatoriu (ER, PR, Ki67, HER2neu) coroborată cu aplicarea criteriilor de clasificare a subtipurilor moleculare cele mai recente, propusă de Consorțiul St Gallen (2013) [14] a evidențiat o frecvență crescută a cazurilor cu imunofenotip de tip luminal (luminal A și luminal B - 78,5 % din cazuri), față de subtipurile bazale și triplu negative (non-luminale) reprezentate de 21.5% din cazuri. Dintre acestea ponderea cazurilor de gen masculin a fost redusă, cu doar 8 cazuri, toate încadrate în subtipurile luminale, iar pentru genul feminin cea mai mare frecvență a cazurilor s-a înregistrat în subtipul molecular luminal A.

#### **IX.2. Evaluarea cazurilor de carcinom mamar subtip molecular luminal A**

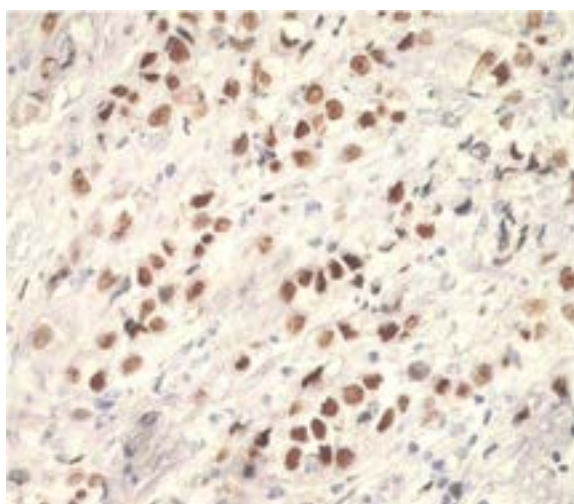
În cadrul lotului principal de pacienți incluși în studiu, subtipul molecular luminal A a reprezentat cea mai mare pondere, cu 135 de pacienți dintre care sexul feminin cu o frecvență 97,8% și cu o vârstă medie de  $61.5 \pm 11.6$  ani, iar sexul masculin cu o pondere de 3cazuri și o vârstă medie de  $58,3 \pm 0.58$ . Studii similare au consemnat valori diferite pentru media vârstei din cadrul subtipului molecular luminal A, genul feminin, de la 47,4% [30] la 61,4 ani [31], rezultatul studiului nostru încadrându-se în această variație. Din punct de vedere a distribuției cazurilor în funcție de grupele de vârstă s-a evidențiat, pentru ambele genuri, o frecvență crescută a cazurilor cuprinse în categoria de vârstă 51- 60 de ani, cu un procentaj de 32,6% mult mai mare comparativ cu distribuția cazurilor în aceeași categorie de Spitale et al , care au obținut un procent de 19,1% [32].

**Studiul morfologic** al cazurilor din subgrupul luminal A a evidențiat, din punct de vedere al formelor histopatologice conform clasificării OMS, o pondere mare a cazurilor cu diagnosticul de CDI – NST fiind indentificae 84 cazuri, urmate de cazurile cu formele morfologice de de CLI – 13 cazuri și de carcinom mixt 10 cazuri (Fig. nr.34-42). Cu o frecvență mai mică s-au consemnat forme histopatologice speciale, rare: carcinom tubular invaziv (2,2%), carcinom cribriform invaziv (6,7%), carcinom mucinos pur (6,7%), carcinom papilar intraductal cu componentă invazivă de CDI NST (0,7%) și carcinom neuroendocrin (1,5%). Dintre acestea,

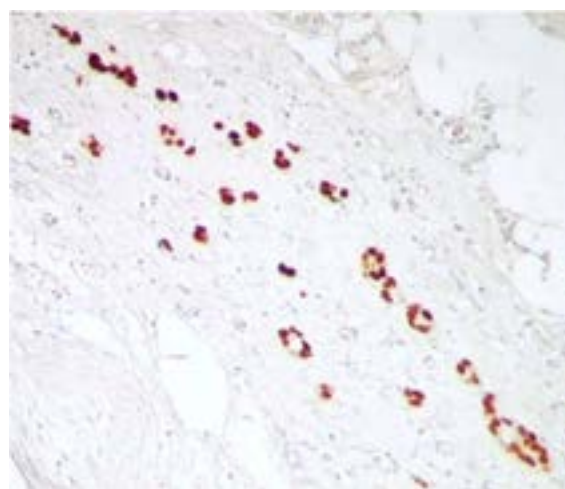
cazurile ce aparțin genului masculin sunt reprezentate, din punct de vedere al diagnosticului histopatologic, de două cazuri de CDI-NST și un caz de carcinom cribriform invaziv.



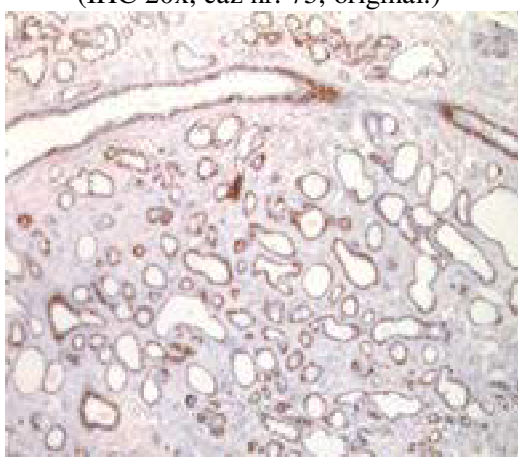
**Fig. nr. 34** Distribuția subtipurilor lumA pentru sexul feminin în funcție de forma histopatologică a CM



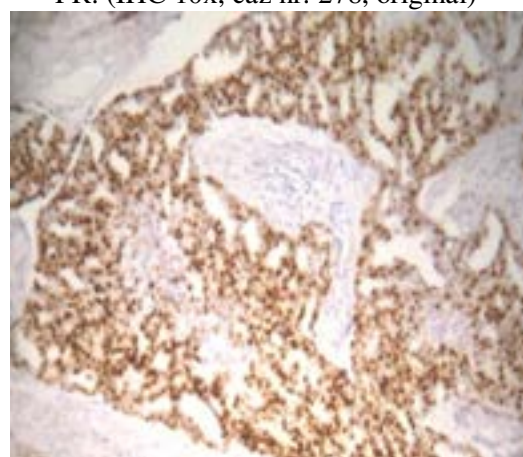
**Fig. nr. 35** Subtip molecular luminal A –CLI pleomorf – imunomarcaj intens pozitiv pentru RE (IHC 20x, caz nr. 75, original.)



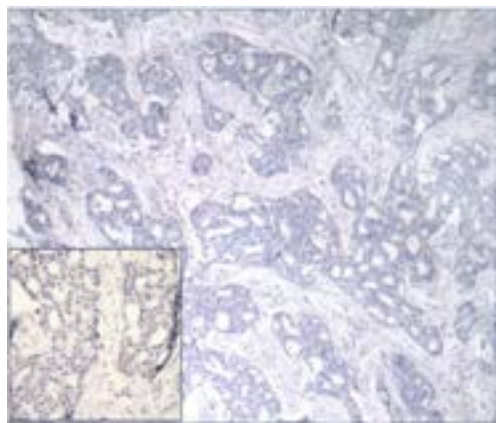
**Fig. nr.36** Subtip molecular luminal A – CLI-subtip tubulo-lobular: imunomarcaj intens pozitiv pentru PR. (IHC 10x, caz nr. 278, original)



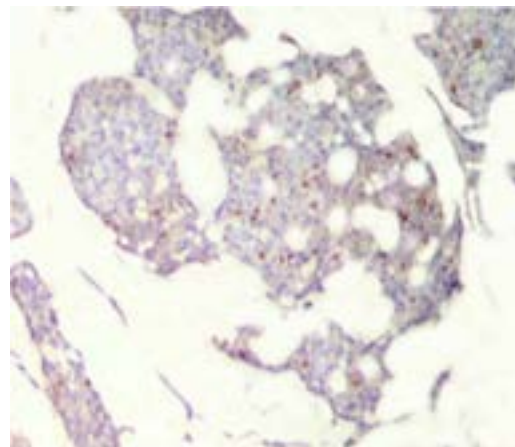
**Fig. nr.37** Subtip luminal A –carcinom tubular infiltrativ – imunomarcaj nuclear pozitiv pentru RE în proporție 90% (IHC 4x, caz nr.174, original).



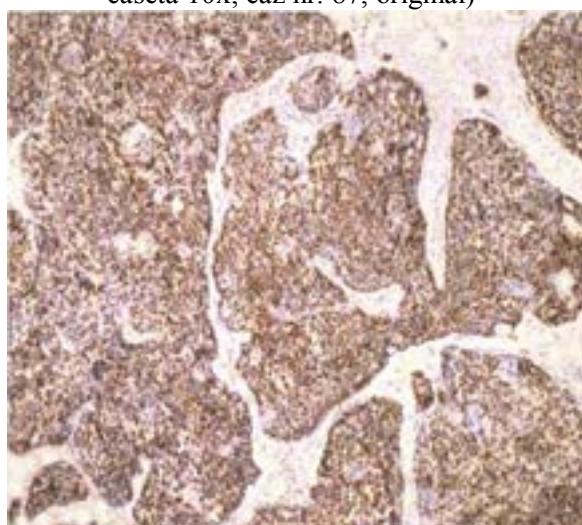
**Fig. nr.38** Subtip molecular luminal A –carcinom cribriform invaziv: imunomarcaj nuclear pozitiv în proporție de 90% pentru PR (IHC 10x, caz nr.140, original)



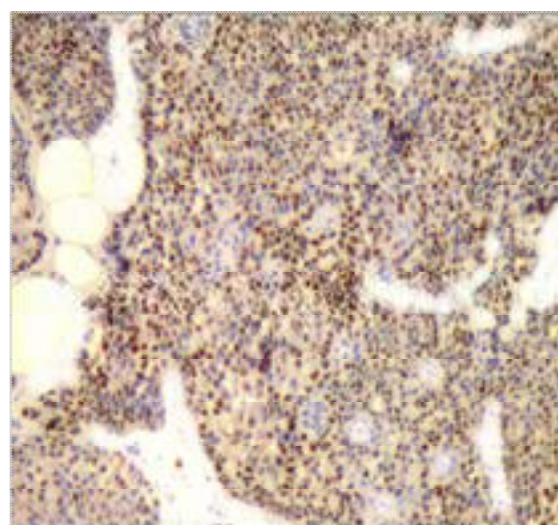
**Fig. nr.39** Subtip molecular luminal A –carcinom cribriform invaziv: imunomarcaj membranal negativ pentru HER2 (IHC 4x); casetă – absența imunomarcajului nuclear pentru Ki67 (IHC4x, casetă 10x; caz nr. 87, original)



**Fig. nr. 40** Subtip molecular luminal A – carcinom mucinos pur: imunomarcaj nuclear slab pozitiv pentru Ki67 (IHC 10x; caz nr. 85, original)



**Fig. nr. 41** Subtip luminal A – carcinom neuroendocrin solid. Imunomarcaj nuclear intens, difuz pentru ER (IHC 4x, caz nr. 88, original)



**Fig. nr. 42** Subtip luminal A – carcinom neuroendocrin solid. Imunomarcaj nuclear intens, difuz pentru PR (IHC 4x, caz nr. 88, original)

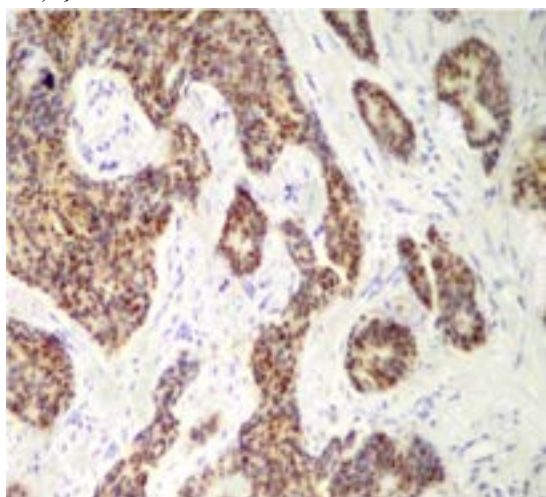
Evaluarea imunomarcajului pentru **oncoproteina p53** a evidențiat o frecvență crescută a cazurilor pozitive pentru CM moderat sau slab diferențiat (52,9% versus 41,2%) fără a se evidenția o asociere semnificativ statistic. Deasemenea nu s-a remarcat nicio asociere semnificativ statistic între statusul nodular și expresia imunohistochimică a oncoproteinei p53 (testul Chi pătrat  $\chi^2(1)=1,491$ ;  $p=0.297$ ).

### IX. 3. Evaluarea cazurilor de carcinom mamar subtip molecular luminal B

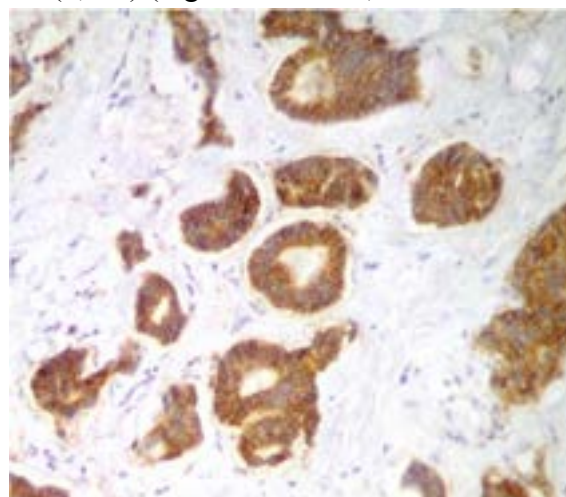
Cazurile de carcinom mamar încadrate în subtipul luminal B pe baza expresiei markerilor imunohistochimici “surogat”, au reprezentat un procent de 32,4% (95 de cazuri), ocupând locul doi în cadrul clasificării moleculare. Acest rezultat este în concordanță cu cele semnalate în literatura de specialitate deși frecvența acestui subtip molecular prezintă variații mari, de la 6,9% [33] la 34 % [30]. În studiu efectuat de Engström et al pe un lot de 909 CM, prevalența cazurilor luminal B –HER2negativ înregistrată a fost de 27,4% iar cea pentru luminal B-HER2 pozitiv a fost de 7,7%, similar cu un alt studiu efectuat de Xue et al care, pe un lot de 5809 de pacienți, a obținut un procent de 30,4% pentru primul subgrup și 13,1% pentru cel de-al doilea [34, 35]. Aceste rezultate diferă de cele obținute în studiul actual în care se observă o inversare a raportului dintre cele două subtipuri moleculare Luminal B, cu o prevalență a cazurilor luminal B-HER2

negativ de 11,9%, iar pentru luminal B-HER2pozitiv de 20,9%, ceea ce demonstrează marea heterogenitate a acestui subtip molecular.

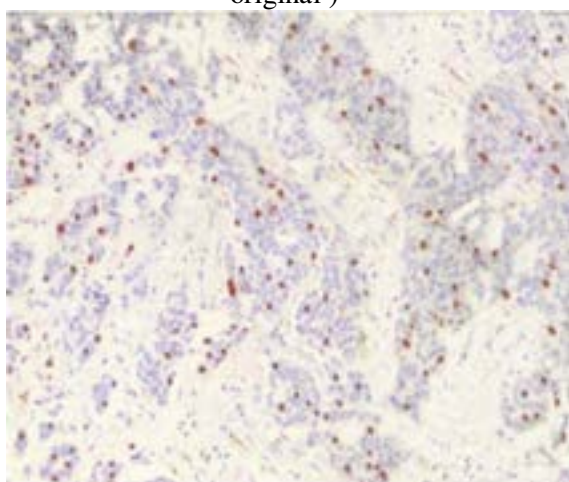
**Evaluarea morfologică** a cazurilor de CM subtip luminal B a evidențiat o frecvență crescută a cazurilor de CDI-NST (75,8%), pe următoarele locuri aflându-se carcinomul invaziv mixt (8,4%), urmate de CLI și carcinom papilar indraductal cu componentă invazivă de CDI NST, fiecare cu o frecvență de 6,3%. Diferența a fost reprezentată de un caz de carcinom mucinos pur (1,1%) și două cazuri de carcinom invaziv micropapilar (2,1%) (Figura nr. 43-46).



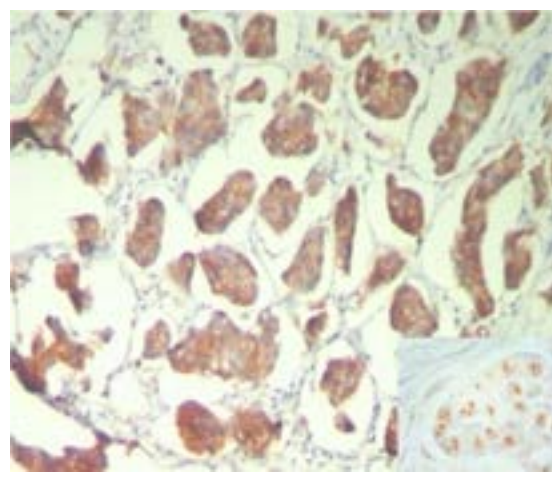
**Fig. nr.43** Subtip molecular luminal B-HER2pozitiv – CDI-NST, G2: imunomarcaj nuclear intens pozitiv pentru ER (IHC 10x, caz nr.268, original )



**Fig. nr.44** Subtip molecular luminal B - HER2pozitiv – CDI-NST, G2- HER2 (Scor IHC 3+) (IHC 10x, caz nr.268,original)



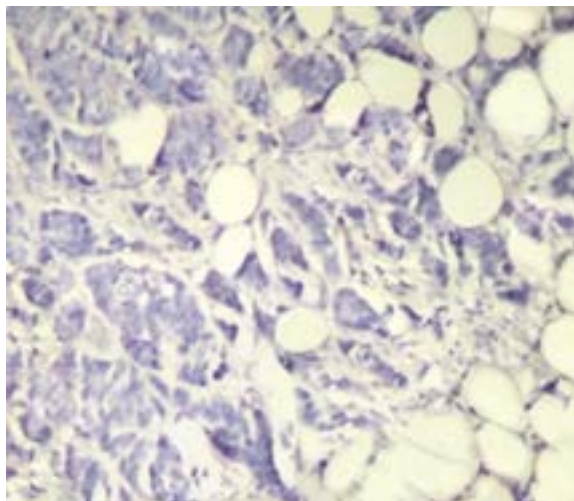
**Fig. nr.45** Subtip molecular luminal B-HER2pozitiv – CDI-NST, G2: imunomarcaj nuclear pozitiv pentru Ki67 (Index Ki67 înalt).(IHC 10x, caz nr.268, original)



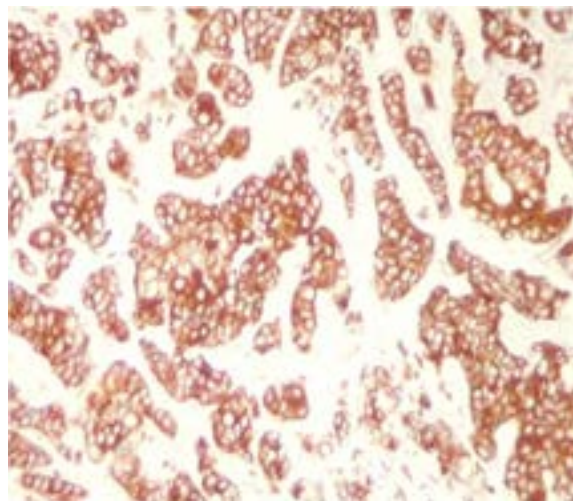
**Fig. nr. 46** Subtip molecular luminal B - carcinom micropapilar invaziv: HER2 neu -scor IHC 2+ în casetă – amplificare înaltă pentru oncogena *HER2neu* (IHC 10x, în casetă CISH 40x, caz nr. 247, original)

#### **IX. 4. Evaluarea cazurilor încadrate în subtipul molecular HER2-pozitiv (non-luminal)**

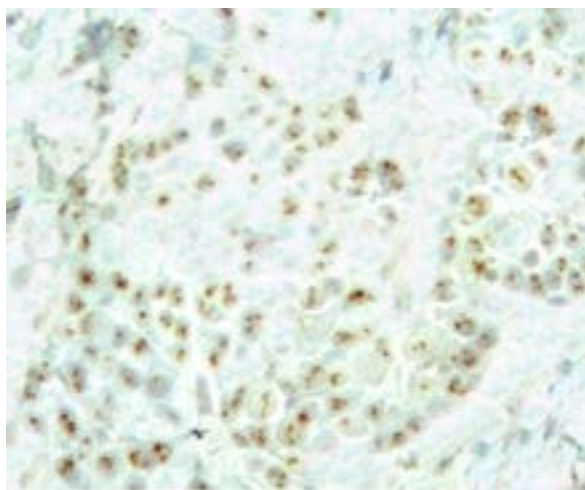
Subtipul molecular HER2-pozitiv ocupă ultimul loc din punct de vedere al frecvenței în lotul principal de pacienți investigați, cu un procent de 9,6% și cu număr absolut de 28 de cazuri. În cadrul acestui subgrup toate cazurile aparțin genului feminin cu o vârstă medie de  $58,71 \pm 10,5$  ani, cele mai multe paciente fiind incluse în categoria 61-70 de ani (46,4%). Prin analiza morfologică a cazurilor încadrate în subtipul molecular s-a remarcat o frecvență crescută de 78,6% a cazurilor cu forma histopatologică de CDI-NST (22/28) urmată de asocierea dintre Boala Paget și CDI-NST cu o pondere 3 cazuri. Carcinomul mixt, carcinomul cu celule clare bogat în glicogen și carcinomul apocrin infiltrativ au fost fiecare reprezentate de câte un caz (Fig. nr. 47-50)



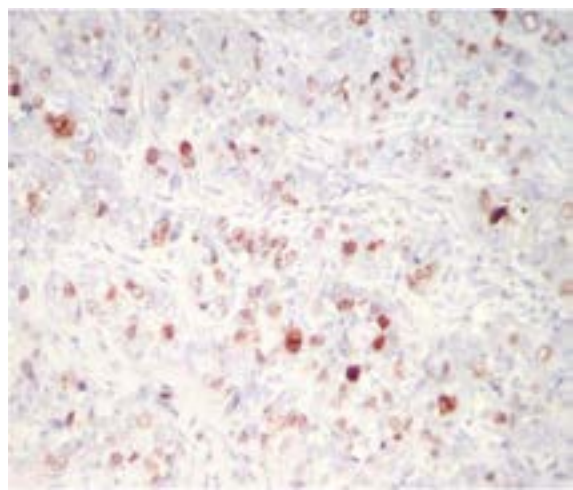
**Fig. nr. 47** Subtip molecular HERpozitiv- CDI-NST slab diferențiat. Imunomarcaj negativ pentru ER. (IHC 4x, caz. nr. 289, original)



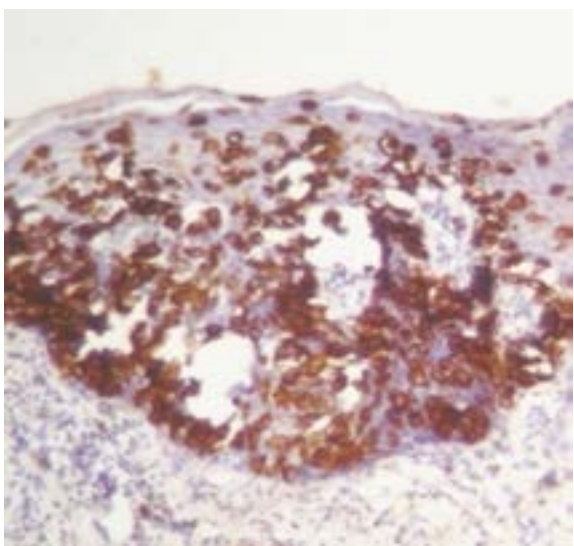
**Fig. nr. 48** Subtip molecular HERpozitiv- CDI-NST slab diferențiat. IHC -HER2neu – scor 3+ (IHC 10x, caz. nr. 289, original)



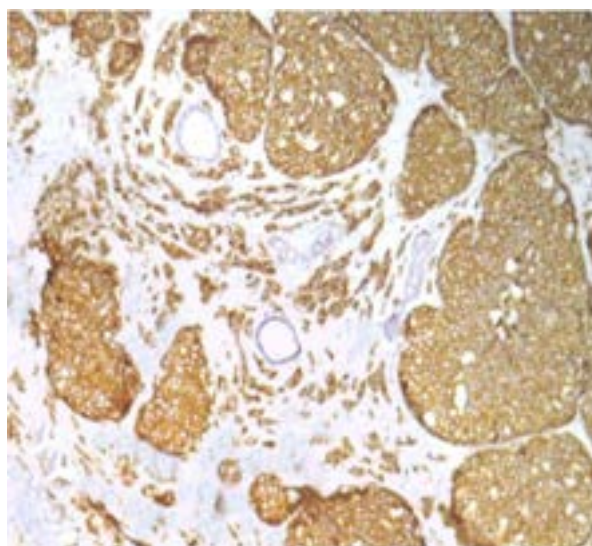
**Fig. nr. 49** Subtip molecular HER2 pozitiv –CDI NST, moderat diferențiat cu amplificare înaltă a genei *HER2/neu*. (CISH, 20x, caz nr. 213, original )



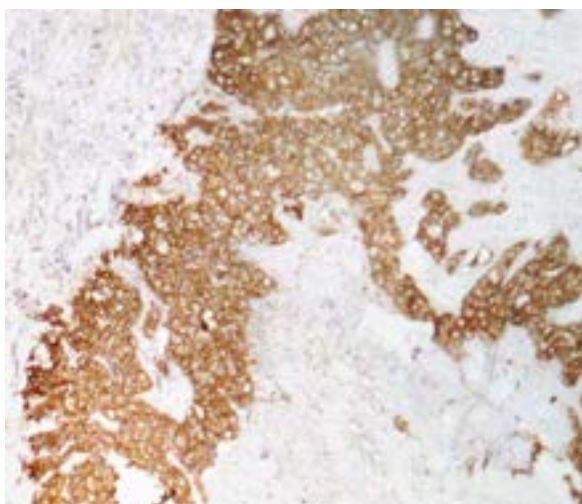
**Fig. nr. 50** Subtip molecular HERpozitiv- CDI-NST slab diferențiat. Imunomarcaj intens pozitiv pentru Ki67 (IHC 4x, caz nr. 265, original)



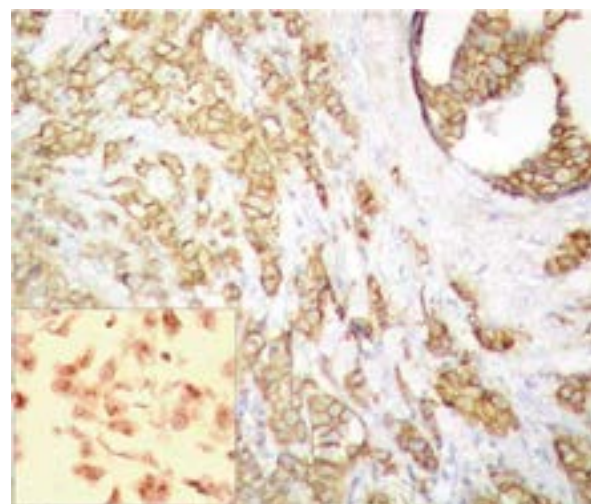
**Fig. nr. 51** Subtip molecular HER2 pozitiv – boală Paget - imunomarcaj intens pozitiv pentru HER2neu la nivelul celulelor tumorale (IHC 10x, caz nr. 222, original)



**Fig. nr. 52** Subtip molecular HER2 pozitiv –boală Paget asociată cu CDI-NST - imunomarcaj intens pozitiv pentru HER2 (scor 3+) atât la nivelul componentei in situ cât și a componentei invazive (IHC 4x, caz nr. 222, original)



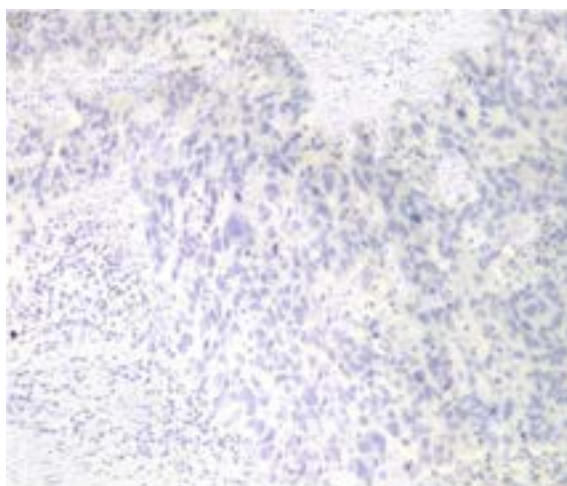
**Fig. nr.53** Subtip molecular HER2pozitiv – forma histopatologică de carcinom ce celule clare. Imunomarcaj intens pozitiv pentru HER2 neu – scor 3+ (IHC 10x, caz nr.236, original)



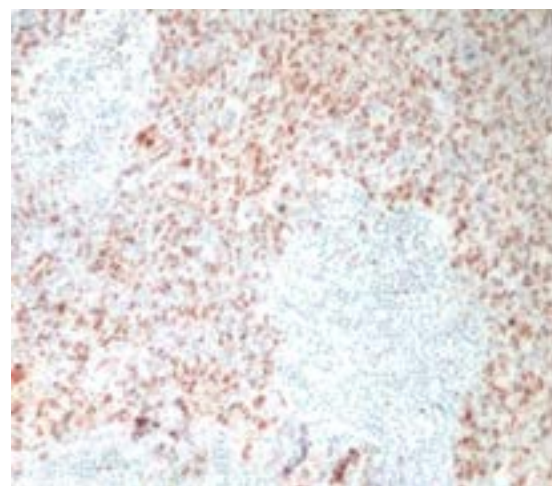
**Fig. nr.54** Subtip molecular HER 2pozitiv- carcinom apocrin infiltrativ. scor IHC 2+ pentru HER2neu; casetă -amplificarea genei *HER2neu*(IHC 4x, casetă CISH 20x, caz nr.177, original)

#### IX.5. Evaluarea cazurilor de carcinom mamar încadrate în subtipul molecular TNP

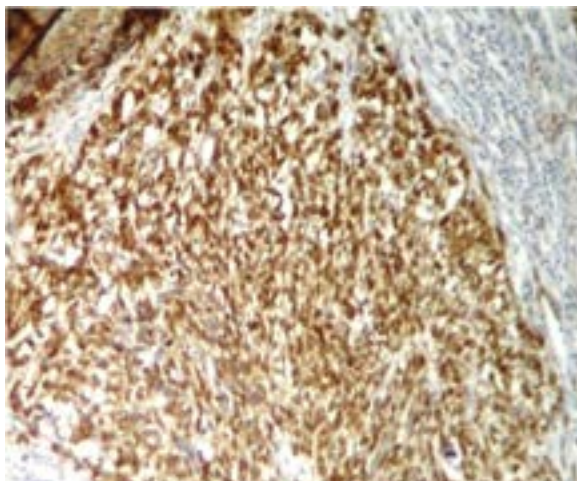
Cancerul mamar - subtipul molecular TNP, corespondentul imunohistochimic pentru subtipul molecular intrinsec *basal-like*, reprezintă una dintre cele mai controversate clase a clasificării moleculare și care a surescitat interesul cercetătorilor prin caracterul particular al acestuia, determinat de marea heterogenitate la nivel transcriptomic și molecular, modificările genetice fiind mult mai numeroase decât în celelalte subtipuri moleculare [11,12]. Prin evaluarea formelor histopatologice întâlnite în acest subtip molecular s-a putut remarca frecvența crescută a CDI-NST cu 48,6% din cazuri. Deasemenea se observă încadrarea în acest subtip molecular a tuturor cazurilor incluse în prezentul studiu cu diagnosticul histopatologic de carcinom metaplastic, ce a înregistrat o pondere de 7 cazuri, carcinom medular (6 cazuri), carcinom adenoid – chistic (3cazuri) și carcinom secretor (1 caz) (Fig. nr. 55- 58)



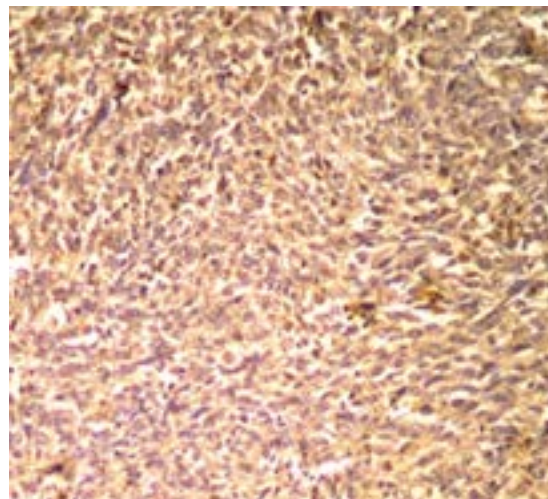
**Fig. nr.55** Subtip molecular TNP –carcinom medular invaziv: imunomarcaj negativ pentru cerBb2 (IHC 10x, caz nr.289, original )



**Fig. nr.56** Subtip molecular TNP –carcinom medular invaziv: imunomarcaj nuclear intens pozitiv pentru p53 (IHC 10x, caz nr.289, original )



**Fig. nr. 57** Subtip molecular TNP – Carcinom metaplastic cu celule fuziforme: imunomarcaj intens pozitiv pentru p53 (IHC 10x, caz nr.287, original)



**Fig. nr.58** Subtip molecular TNP – Carcinom metaplastic cu celule fuziforme: imunomarcaj pozitiv pentru CK5/6 (IHC 10x, caz nr. 287, original)

#### IX.6.1. Corelații între subtipurile moleculare și principalii factori clinico-morfopatologici și imunohistochimici

Toxonomia moleculară a CM oferă informații importante asupra mecanismelor carcinogenezei implicate în apariția, progresia, metastazarea și rezistența la tratament, cu valoare prognostică și predictivă în curs de validare, fiind necesare studii prospective și retrospective care să includă eșantioane reprezentative pentru populația respectivă. Folosirea markerilor imunohistochimici surogat a facilitat analiza subtipurilor moleculare pentru un număr mai mare de cazuri decât cel folosit în primele studii. De aceea, un prim pas pentru înțelegerea acestor subtipuri moleculare constă în stabilirea corelațiilor cu aspectele clinico-morfologice și imunohistochimice specifice fiecărui subtip. Astfel, evaluarea imunohistochimică a celor patru anticorpi principali (ER, PR, Ki67 și HER2neu) s-a realizat pentru 285 de paciente, subtipul luminal A fiind preponderent cu 43,6% urmat de subtipul luminal B cu un procent de 31,6% și subtipul TNP cu 12,3%, corelațiile dintre principalii factori clinico-morfologici și imunohistochimici cu clasele moleculare sunt redate în Tabelul nr.3.

**Tabel nr. 3** Corelații dintre subtipuri moleculare și principalele caracteristicile clinico-morfologice și imunohistochimice

|                              | Luminal A<br>n (%) | Luminal B<br>n (%) | HER2<br>pozitiv<br>n (%) | TNP<br>n (%) | Toate<br>cazurile<br>n(%) | p                            |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|--------------|---------------------------|------------------------------|
|                              | 132 (46,3)         | 90 (31,6)          | 28 (9,8)                 | 35 (12,3)    | 285                       |                              |
| <b>Vârsta (ani)</b>          |                    |                    |                          |              |                           |                              |
| Media ± DS                   | 61.57±11,6         | 61.62±11.01        | 58.71±10,5               | 55.43±11.3   | 60.55±11,4                | <b>0,022*</b>                |
| Amplitudinea                 | 28 – 87            | 35 – 83            | 33 – 72                  | 32 – 82      | 28 - 87                   |                              |
| <b>Categorii de vârstă</b>   |                    |                    |                          |              |                           |                              |
| <50 ani                      | 19 (14.4)          | 14 (15.6)          | 5 (17.9)                 | 10 (28.6)    | 48 (16.8)                 | <b>0,071<sup>&amp;</sup></b> |
| 50-69 ani                    | 74 (56.1)          | 51 (56.7)          | 19 (67.9)                | 20 (57.1)    | 164 (57.4)                |                              |
| ≥70 ani                      | 39 (29.5)          | 25 (27.8)          | 4 (14.3)                 | 5 (14.3)     | 73 (25.6)                 |                              |
| <b>Status hormonal n (%)</b> |                    |                    |                          |              |                           |                              |
| Premenopauză                 | 21 (15.9)          | 16 (17.8)          | 6 (21.4)                 | 14 (40.0)    | 57 (20.0)                 | <b>0,026<sup>§</sup></b>     |

|                                                         | Luminal A<br><i>n (%)</i> | Luminal B<br><i>n (%)</i> | HER2<br>pozitiv<br><i>n (%)</i> | TNP<br><i>n (%)</i> | Toate<br>cazurile<br><i>n(%)</i> | <i>p</i> |
|---------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------|----------------------------------|----------|
|                                                         | 132 (46,3)                | 90 (31,6)                 | 28 (9,8)                        | 35 (12,3)           | 285                              |          |
| Postmenopauză                                           | 111 (84.1)                | 74 (82.2)                 | 22 (78.6)                       | 21 (60.0)           | 228 (80.0)                       |          |
| Diametrul maxim tumoral (cm)                            |                           |                           |                                 |                     |                                  |          |
| Media±SD                                                | 2.38±1.5                  | 2.90±1,8                  | 3.21±2.0                        | 3.82±2.5            | 2.80±1,9                         | 0,0001*  |
| Amplitudinea                                            | 1 - 10                    | 1 - 9                     | 1 - 11                          | 1 -14               | 1 - 14                           |          |
| <2cm                                                    | 25 (18.9)                 | 11 (12.2)                 | 2 (7.1)                         | 2 (5.7)             | 40 (14.0)                        | 0,0007&  |
| 2 – 5cm                                                 | 99 (75.0)                 | 63 (70.0)                 | 22 (78.6)                       | 26 (74.3)           | 210 (73.7)                       |          |
| ≥5 cm                                                   | 8 (6.1)                   | 16 (17,8)                 | 4 (14,3)                        | 7 (20.0)            | 35 (12.3)                        |          |
| Lateralitatea                                           |                           |                           |                                 |                     |                                  |          |
| Stâng                                                   | 63 (47,7)                 | 44 (48,9)                 | 15 (53,6)                       | 15 (42,9)           | 137 (48,1)                       | 0,928§   |
| Drept                                                   | 68 (51,5)                 | 46 (51,1)                 | 13 (46,4)                       | 20 (57,1)           | 147 (51,6)                       |          |
| Bilateral                                               | 1 (0,8)                   | 0 (0,0)                   | 0 (0,0)                         | 0 (0,0)             | 1 (0,4)                          |          |
| Multicentricitatea/multifocalitatea                     |                           |                           |                                 |                     |                                  |          |
| Da                                                      | 13 (9,8)                  | 13 (14,4)                 | 2 (7,1)                         | 7 (20,0)            | 35 (12,3)                        | 0,291§   |
| Nu                                                      | 119 (90,2)                | 77 (85,6)                 | 26 (92,9)                       | 28 (80,0)           | 250 (87,7)                       |          |
| Localizare                                              |                           |                           |                                 |                     |                                  |          |
| CSE                                                     | 82 (62,1)                 | 57 (63,3)                 | 12 (42,9)                       | 15 (42,9)           | 166 (58,2)                       | 0,171§   |
| CSI                                                     | 16 (12,1)                 | 11 (29,7)                 | 5 (17,9)                        | 5 (14,3)            | 37 (13,0)                        |          |
| CII                                                     | 12 (9,1)                  | 4 (4,4)                   | 2 (7,1)                         | 6 (17,1)            | 24 (8,4)                         |          |
| CC                                                      | 16 (12,1)                 | 8 (8,9)                   | 7 (25,0)                        | 6 (17,1)            | 37 (13,0)                        |          |
| CIE                                                     | 3 (2,3)                   | 5 (5,6)                   | 1 (3,6)                         | 0 (0,0)             | 9 (3,2)                          |          |
| CE,CC,CI                                                | 3 (2,3)                   | 5 (5,6)                   | 1 (3,6)                         | 3 (8,6)             | 12 (4,2)                         |          |
| Diagnostic histopatologic                               |                           |                           |                                 |                     |                                  |          |
| CDI NST                                                 | 82 (62,1)                 | 68 (75,6)                 | 27 (96,4)                       | 16 (45,75)          | 193 (67,7)                       | 0,0001§  |
| CLI                                                     | 13 (9,8)                  | 6 (6,7)                   | 0                               | 0                   | 19 (6,7)                         |          |
| Ca mixt                                                 | 10 (7,6)                  | 7 (7,8)                   | 1 (3,6)                         | 1 (2,9)             | 19 (6,7)                         |          |
| Grup I                                                  | 27 (20,5)                 | 9 (10,0)                  | 0                               | 0                   | 36 (12,6)                        |          |
| Grup II                                                 | 0                         | 0                         | 0                               | 18                  | 18 (100)                         |          |
| Grad histopatologic Nottingham (Elston-Ellis modificat) |                           |                           |                                 |                     |                                  |          |
| GI-GII                                                  | 111 (84,1)                | 64 (71,1)                 | 13(46.4)                        | 8 (22,9)            | 196 (62,1)                       | 0,0001§  |
| G III                                                   | 21 (15,9)                 | 26 (28,9)                 | 15 (53,6)                       | 27 (77,1)           | 89 (31,2)                        |          |
| Invazie angiolimfatică peritumorală                     |                           |                           |                                 |                     |                                  |          |
| Prezent                                                 | 31 (23,5)                 | 40 (44,4)                 | 8 (28,6)                        | 7 (20,0)            | 86 (30,2)                        | 0,004§   |
| Absent                                                  | 101 (76,5)                | 50 (55,6)                 | 20 (71,4)                       | 28 (80,0)           | 199 (69,8)                       |          |
| Necroza tumorală                                        |                           |                           |                                 |                     |                                  |          |
| Da                                                      | 8 (6,1)                   | 21(23,3)                  | 5 (17,9)                        | 13 (37,1)           | 47 (16,5)                        | 0,0001§  |
| Nu                                                      | 124 (93,9)                | 69 (76,7)                 | 23 (82,1)                       | 22 (62,4)           | 238 (83,5)                       |          |
| Fibroza centrală                                        |                           |                           |                                 |                     |                                  |          |
| Prezent                                                 | 1 (0,8)                   | 4(4,4)                    | 3(10,7)                         | 8 (22,9)            | 17 (6,0)                         | 0,0001§  |
| Asent                                                   | 131 (99,2)                | 86 (95,6)                 | 25 (89,3)                       | 27 (77,1)           | 268 (94,0)                       |          |
| Intensitatea infiltratului inflamator limfocitar        |                           |                           |                                 |                     |                                  |          |
| Absent                                                  | 109 (82,6)                | 46 (51,1)                 | 14 (50,0)                       | 13 (37,1)           | 182 (64,1)                       | 0,0001&  |
| Redus                                                   | 18 (13,6)                 | 30 (33,3)                 | 9 (32,1)                        | 10 (28,6)           | 66 (23,2)                        |          |
| Moderat                                                 | 4 (3,0)                   | 3 (3,3)                   | 1 (3,6)                         | 1 (2,9)             | 9 (3,2)                          |          |
| Accentuat                                               | 1 (0,8)                   | 11 (12,2)                 | 4 (14,3)                        | 11 (31,4)           | 27 (9,5)                         |          |
| Statusul limfoganglionilor regionali                    |                           |                           |                                 |                     |                                  |          |
| pozitiv                                                 | 62 (52,5)                 | 62 (73,8)                 | 20 (76,9)                       | 26 (83,9)           | 170 (65,6)                       | 0.005§   |
| negativ                                                 | 56 (47,5)                 | 22 (26,2)                 | 6 (23,1)                        | 5 (16,1)            | 89 (34,4)                        |          |

|                                  | Luminal A<br><i>n (%)</i> | Luminal B<br><i>n (%)</i> | HER2<br>pozitiv<br><i>n (%)</i> | TNP<br><i>n (%)</i> | Toate<br>cazurile<br><i>n(%)</i> | <i>p</i>                |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
|                                  | 132 (46,3)                | 90 (31,6)                 | 28 (9,8)                        | 35 (12,3)           | 285                              |                         |
| absent                           | 14                        | 6                         | 2                               | 4                   | 26                               |                         |
| Stadiul pT                       |                           |                           |                                 |                     |                                  |                         |
| pT1                              | 72 (54,5)                 | 31 (34,4)                 | 7 (25,0)                        | 5 (14,3)            | 115 (40,4)                       | 0,0001 <sup>&amp;</sup> |
| pT2                              | 44 (33,3)                 | 29 (32,2)                 | 12 (42,9)                       | 15 (42,9)           | 100 (35,1)                       |                         |
| pT3                              | 4 (3,0)                   | 4 (4,4)                   | 0                               | 3 (8,6)             | 11 (3,9)                         |                         |
| pT4                              | 12 (9,1)                  | 26 (28,9)                 | 9 (32,1)                        | 12 (34,3)           | 59 (20,7)                        |                         |
| Stadiul pN                       |                           |                           |                                 |                     |                                  |                         |
| pN0                              | 60 (50,5)                 | 22 (26,2)                 | 5 (19,2)                        | 5 (16,1)            | 92 (35,2)                        | 0,0001 <sup>&amp;</sup> |
| pN1                              | 36 (30,0)                 | 18 (21,4)                 | 5 (19,2)                        | 5 (16,1)            | 64 (24,5)                        |                         |
| pN2                              | 21 (17,5)                 | 28 (33,3)                 | 8 (30,8)                        | 13 (41,9)           | 70 (26,8)                        |                         |
| pN3                              | 3 (2,5)                   | 16 (19,0)                 | 8 (30,8)                        | 8 (25,8)            | 35 (13,4)                        |                         |
| pNx                              | 12                        | 6                         | 2                               | 4                   | 24                               |                         |
| Stadiul pTNM                     |                           |                           |                                 |                     |                                  |                         |
| Stadiul I                        | 44 (36,7)                 | 14 (16,3)                 | 3 (11,5)                        | 2 (6,1 )            | 63 (23,8)                        | 0,0001 <sup>&amp;</sup> |
| Stadiul II                       | 46 (38,3)                 | 22 (26,7)                 | 4 (15,4)                        | 8 (21,2)            | 80 (30,2)                        |                         |
| Stadiul III                      | 30 (25,0)                 | 37 (41,9)                 | 17 (65,4)                       | 14 (45,5)           | 98 (37,0)                        |                         |
| Stadiul IV                       | 0                         | 13(15,1)                  | 2 (7,7)                         | 9 (27,3)            | 24 (9,1)                         |                         |
| pTNMx                            | 12                        | 4                         | 2                               | 2                   | 20                               |                         |
| Asocierea componentei in situ    |                           |                           |                                 |                     |                                  |                         |
| Prezent                          | 93 (70,5)                 | 58 (64,4)                 | 18 (64,3)                       | 15 (42,9)           | 184 (64,6)                       | 0,027 <sup>§</sup>      |
| Absent                           | 39 (29,5)                 | 32 (35,6)                 | 10 (35,7)                       | 20 (57,1)           | 101 (35,4)                       |                         |
| Status PR                        |                           |                           |                                 |                     |                                  |                         |
| Negativ                          | 0 (0,0)                   | 10(11,1)                  | 28 (100)                        | 35 (100)            | 73 (25,6)                        | 0,0001 <sup>&amp;</sup> |
| Pozitiv 1-10%                    | 2 (1,5)                   | 34 (37,8)                 | 0 (0,0)                         | 0 (0,0)             | 36 (12,6)                        |                         |
| Pozitiv ≥ 10%                    | 130 (98,5)                | 46 (51,1)                 | 0 (0,0)                         | 0 (0,0)             | 176 (61,8)                       |                         |
| Status ER                        |                           |                           |                                 |                     |                                  |                         |
| Negativ                          | 0(0,0)                    | 1(1,1)                    | 28(100)                         | 35(100)             | 64(22,5)                         | 0,0001 <sup>&amp;</sup> |
| Pozitiv 1-10%                    | 5(3,8)                    | 27 (30,0)                 | 0(0,0)                          | 0(0,0)              | 32 (11,2)                        |                         |
| Pozitiv ≥ 10%                    | 127 (96,2)                | 62 (68,9)                 | 0(0,0)                          | 0(0,0)              | 189 (66,3)                       |                         |
| Imunomarcaj/amplificarea HER2neu |                           |                           |                                 |                     |                                  |                         |
| Pozitiv                          | 0 (0,0)                   | 57 (63,3)                 | 28 (100)                        | 0 (0,0)             | 85 (29,8)                        | 0,0001 <sup>§</sup>     |
| Negativ                          | 132 (100)                 | 33 (36,7)                 | 0 (0,0)                         | 35 (100)            | 200 (70,2)                       |                         |
| Index Ki67                       |                           |                           |                                 |                     |                                  |                         |
| Negativ                          | 17 (12,9)                 | 10 (11,1)                 | 2 (7,1)                         | 2 (5,7)             | 31 (10,2)                        | 0,0001 <sup>§</sup>     |
| Pozitiv <14%                     | 115 (87,1)                | 28 (31,1)                 | 12 (42,9)                       | 3 (8,6)             | 158 (55,4)                       |                         |
| Pozitiv ≥14%                     | 0 (0,0)                   | 52 (57,8)                 | 14 (50,0)                       | 30 (85,7)           | 96 (33,7)                        |                         |
| Imunomarcaj P53                  |                           |                           |                                 |                     |                                  |                         |
| Negativ                          | 61 (75,3)                 | 49 (64,5)                 | 10 (41,7)                       | 1 (3,0)             | 121 (56,5)                       | 0,0001 <sup>§</sup>     |
| Pozitiv                          | 20 (24,7)                 | 27 (35,5)                 | 14 (58,3)                       | 32 (97,0)           | 93 (43,5)                        |                         |
| Absent                           | 51                        | 14                        | 4                               | 2                   | 71                               |                         |
| Imunomarcaj EGFR                 |                           |                           |                                 |                     |                                  |                         |
| Pozitiv                          | 10 (20,0)                 | 8 (20,0)                  | 11 (52,4)                       | 21(72,4)            | 50(35,7)                         | 0,0001 <sup>§</sup>     |
| Negativ                          | 40 (80,0)                 | 32 (80,0)                 | 10 (47,6)                       | 7 (27,6)            | 90 (64,3)                        |                         |
| Absent                           | 82                        | 50                        | 7                               | 6                   | 140                              |                         |
| Imunomarcaj CK5/6                |                           |                           |                                 |                     |                                  |                         |
| Pozitiv                          | 11 (23,9)                 | 12 (30,0)                 | 6 (33,3)                        | 21 (77,8)           | 50 (38,2)                        | 0,0001 <sup>§</sup>     |
| Negativ                          | 35 (76,1)                 | 28 (70,0)                 | 12 (66,7)                       | 6 (22,2)            | 81 (61,8)                        |                         |

|        | Luminal A<br><i>n (%)</i> | Luminal B<br><i>n (%)</i> | HER2<br>pozitiv<br><i>n (%)</i> | TNP<br><i>n (%)</i> | Toate<br>cazurile<br><i>n(%)</i> | <i>p</i> |
|--------|---------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------|----------------------------------|----------|
|        | 132 (46,3)                | 90 (31,6)                 | 28 (9,8)                        | 35 (12,3)           | 285                              |          |
| Absent | 86                        | 50                        | 10                              | 8                   | 154                              |          |

\* - Testul ANOVA; & - testul Kruskal-Wallis; § - testul Chi pătrat

### IX. 6.2. Supraviețuirea și subtipuri moleculare

Stabilirea ratei supraviețuirii generale (OS) pe termen scurt s-a realizat pentru 239 de cazuri ce au aparținut sexului feminin, diagnosticate într-un interval de 5 ani și cu o perioadă medie de urmărire de 42 de luni (15 - 74). În cadrul acestui lot de pacienți 9,6% de pacienți au decedat din cauza CM, iar distribuția subtipurilor moleculare este reprezentată de 46,9% pentru luminal A, 29,7% pentru luminal B (10,9% luminalB-HER2negativ și 18,8% luminal B-HER2pozitiv) 10,5% pentru HER2pozitiv iar 13,0% din cazuri au revenit subtipului molecular TNP. Această distribuție a cazurilor este similară celei obținute în cadrul lotului principal de pacienți, fără a exista diferențe semnificativ statistic.

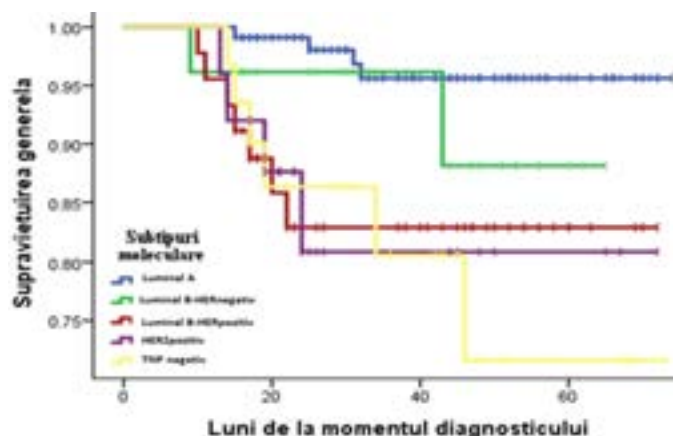


Fig. nr. 59 Curba de supraviețuire Kaplan-Meier pentru subtipurile moleculare

OS pentru toate cazurile analizate a stabilit o rată de supraviețuire generale, pentru întreg lotul de pacienți, de 90,4%, iar pentru fiecare subtip molecular în parte s-au obținut următoarele rate de supraviețuire: 96,4% - luminalA, 92,3% - luminal B-HER2negativ, 84,4%- luminalB-HER2pozitiv, 84,0% - HER2pozitiv și 80,6% pentru TNP. Astfel, se remarcă subtipul molecular TNP cu cea mai scăzută rată de supraviețuire, fiind urmat de subtipurile cu status HER2 pozitiv (subtipul molecular HER 2 pozitiv și Luminal B- HER pozitiv) iar cea mai bună rată de supraviețuire se observă pentru cazurile care sunt încadrate în subtipul molecular Luminal A (Fig. nr. 59), aceste diferențe fiind semnificativ statistic (testul Log Rank,  $p = 0,01$ ).

Dintre factorii clinico -morfologici ce influențează nefavorabil prognosticul în eșantionul nostru de pacienți și cu un impact semnificativ statistic se remarcă diametrul maxim tumoral de peste 2 cm, prezența invaziei angiolimfatice, indentificarea CM slab diferențiate, prezența metastazelor limfoganglionare regionale în mai mult de 3 noduli, prezența invaziei limfovaskulare peritumorale, stadii avansate de boală, expresia oncoproteinei p53 și o rată de proliferare nucleară mare obiectivizată printr-un indexKi67.

## CAPITOLUL X - CONCLUZII

Studiul clinico-statistic s-a efectuat pe un lot de 293 de pacienți cu diagnosticul de carcinom mamar invaziv și cu examen imunohistochimic complet pentru un panel alcătuit din patru

biomarkeri (ER, PR, HER2neu, Ki67) în intervalul de timp 2008 – 2013, care s-a finalizat prin următoarele concluzii:

1. **Distribuția cazurilor** în funcție de anii de studiu a remarcat o creștere constantă cu un „vârf” al numărului de cazuri noi diagnosticate și analizate pentru anul 2012, sexul feminin dominând spectrul leziunilor maligne (97,3%) în comparație cu genul masculin reprezentat de doar 8 cazuri.

2. **Analiza morfologică** a evidențiat preponderența cazurilor cu diagnosticul de carcinomul ductal invaziv, ne-specific (CDI-NST) cu 67,6%, pe locul doi indentificându-se formele mixte de carcinom mamar cu un procent de 7,2% din cazuri. Diferența este reprezentată de forme speciale sau rare ale carcinomului mamar invaziv, dintre care se remarcă carcinomul lobular invaziv cu cea mai mare pondere - 19cazuri (6,5%). Formele moderat diferențiate au înregistrat cel mai mare procent de 58%, iar asocierea cu o componentă in situ s-a observat în 57,1% din cazuri.

3. **Analiza imunohistochimică** a permis indentificarea expresiei receptorilor hormonalți cu o frecvență de 78,2% pentru ER și 74,7% pentru PR. Supraexpresia oncoproteinei HER2neu s-a remarcat în 20,8% din cazuri, iar un scor echivoc s-a obținut pentru 16,0% din cazuri. Cuantificarea expresiei biomarkerului de proliferare nucleară Ki67 a condus la obținerea unui index de peste 14% pentru 31,1%, din cazuri din care 56,0% au prezentat forme histopatologice cu grad scăzut de diferențiere. Un imunomarcaj pozitiv pentru oncoproteina p53 s-a obținut în 33,1% peste 70% din acestea asociindu-se cu grad histopatologic scăzut, diametrul tumoral de peste 5cm și cu status limfoganglionar pozitiv.

4. **Amplificarea genei HER2/neu** s-a evaluat pentru 47de cazuri prin tehnica de citogenetică moleculară CISH, evidențiindu-se un nivel crescut de amplificare în 40,4% din cazuri și scăzut pentru 17,0%. Per total, statusul HER2pozitiv s-a indentificat cu o pondere de 88 de cazuri, între cele două metode de evaluare existând cu o bună corelație.

5. **Clasificarea moleculară** pe baza markerilor imunohistochimici „surogat” a demonstrat o frecvență crescută a subtipului luminal A cu 46,1%, urmat de luminal B cu o frecvență de 32,4%. Diferența a fost reprezentată de subtipul molecular TNP cu 11,9% și HER2pozitiv cu 9,6%, ce au aparținut în totalitate genului feminin, în contrast cu cel masculin indentificat numai în subtipurile moleculare de tip luminal.

6. **Subtipul molecular luminal A** a înregistrat o medie a vârstei la momentul diagnosticului de 61,5 ani, ponderea cea mai mare a cazurilor regăsindu-se în decada a 5-a și a -6-a, cu o valoare medie a diametrului tumoral de 2,2cm. Forma histopatologică de CDI-NST a constituit 62,1% din cazuri, restul fiind caracterizate de forme speciale ale CM dintre am remarcat o majoritate a cazurilor de CLI (9,6%) sau de carcinom mucinos (6,8%) incluse în studiu, precum și de toate cazurile cu diagnosticul de carcinom neuroendocrin (2 cazuri), carcinom cribriform (10 cazuri) și carcinom tubular invaziv (3 cazuri) care se asociază cu un prognostic bun. Asocierea cu o componentă in situ s-a înregistrat într-un procent ridicat de 68,9% iar invazia limfovaculară peritumorală s-a observat în 38,6 % din cazuri. Statusul nodular negativ a constituit 45,3% din cazuri, iar 27,5% s-au încadrat în categoria pN1. Expresia oncoproteinei p53 s-a obținut în 17 cazuri, din care 52,9% pentru formele moderat diferențiate și 41,2% slab diferențiate.

7. **Subtipul molecular luminal B** reprezintă un grup heterogen de CM alcătuit din 95 cazuri ce cuprinde două forme: luminalB-HER2negativ cu o frecvență de 11,9% din toate cazurile incluse în studiu și luminal B-HERpozitiv cu 20,9% din cazuri. Vârsta medie a pacienților din acest subtip molecular este similară celei din subtipul luminal A, iar media diametrul maxim tumoral este de 2,8cm, fără a se identifica diferențe semnificative între cele două forme ale subtipului molecular. Formele histopatologice rare încadrate în acest subtip sunt reprezentate de carcinom micropapilar(2,1%), CLI (6,3%), Carcinom papilar intraductal asociat cu CDI-NST (6,4%). Formele histopatologice moderat diferențiate au constituit majoritatea cazurilor, iar

prezența metastazelor în peste patru limfoganglionilor regionali a fost remarcată într-un procent de 70,8% fapt ce contribuie la asocierea cu un prognostic grav. Din punct de vedere al stadiului tumoral cel mai mare procentaj de 44% s-a obținut pentru stadiul IV, urmat de stadiul de stadiul II cu 24%. Cuantificarea expresiei oncoproteinei p53 a condus la evidențierea unor diferențe semnificativ statistic între cele două subgrupuri, subtipul luminal B – HER2pozitiv având ponderea cea mai mare a cazurilor cu imunomarcaj pozitiv de 24 cazuri.

8. **Subtipul molecular HER2pozitiv**s-a caracterizat printr-o medie a diametrului maxim tumoral de 3,11 cm, mai mare decât a subtipurilor luminales și cu o preponderență a cazurilor pentru decada a șasea. Dintre formele histopatologice speciale se remarcă încadrarea în acest subtip a tuturor cazurilor de boală Paget asociată cu CDI-NST (3cazuri), carcinom apocrin (1 caz) și carcinom cu celule clare (un caz). Din punct de vedere al gradului histopatologic au predominat formele slab diferențiate (57,1%), iar stadiul III tumoral a fost cel mai frecvent întâlnit (60,7%). Supraexpresia oncoproteinei p53 s-a obținut într-un procent de 58,3% iar în 50% din cazuri s-a observat un index Ki67 ridicat.

9. **Subtipul molecular TNP** s-a caracterizat printr-o frecvență crescută a cazurilor din decada a 4-a de viață, majoritatea leziunilor tumorale (74,3%) având dimensiuni mari, de peste 2 cm iar 77,1% au fost reprezentate de CM slab diferențiate. Formele histopatologice speciale ce s-au încadrat în totalitate în această categorie sunt reprezentate de carcinomul metaplastic (7cazuri), carcinomul medular (6 cazuri), carcinomul adenoid-chistic (3 cazuri) și carcinomul secretor (un caz). Dintre caracteristicile morfologice semnificative pentru subtipul molecular TNP s-au remarcat: necroza tumorală de tip geografic, tumori slab diferențiate cu dispoziție de tip sincițial și infiltrat inflamator abundent peri- și intratumoral, fibroza centrală. Din punct de vedere al imunofenotipului, acest subtip molecular s-a caracterizat printr-o expresie crescută a oncoproteinei p53 și a indexului KI67. Analiza suplimentară a biomarkerilor de bazal (EGFR, CK5/6) a evidențiat expresia acestora într-un procent relativ similar (37,4% versus 36,6%) fapt ce a permis o mai bună indentificare a acestor cazuri.

10. **Stabilirea corelațiilor** dintre subtipurile moleculare a evidențiat diferențe înalt semnificativ statistic ( $p \leq 0,0001$ ) cu următoarele trăsături morfopatologice: diametrul maxim tumoral, forma histopatologică, gradul morfologic, invazia angiolimfatică, indexul ki67, expresia imunohistochimică pentru EGFR și CK5/6. Deasemenea s-au remarcat diferențe între clasele moleculare și în ceea ce privește statusul hormonal ( $p = 0,026$ ), vârsta medie ( $p = 0,045$ ), statusul limfoganglionar ( $p = 0,005$ ) și asocierea componentei in situ ( $p = 0,027$ ).

11. **Analiza supraviețuirii generale (OS) pe termen scurt** s-a realizat pentru 239 de paciente, cu o perioadă medie de follow-up de 42 de luni (minim 15 luni - maxim 74 luni) obținându-se pentru întreg eșantionul o rată de supraviețuire de 90,4%. Deasemenea s-a remarcat o rată de supraviețuire redusă pentru subtipul molecular TNP de 80,6%, iar cea mai bună rată s-a indentificat în cadrul subtipului luminal A (92,3%) și subtipul molecular luminal B- HERnegativ cu 92,3%. Cu rate aproximativ egale de supraviețuire de 84,4%- 84,0% -s-au obținut pentru subtipul luminalB-HER2pozitiv și respectiv HER2pozitiv. Aceste diferențe s-au dovedit a fi semnificative statistic ( $p = 0,01$ ).

12. **Studiul actual complex care a întrunit datele morfopatologice, imunohistochimice și moleculare ale carcinoamelor mamare invazive pe un eșantion reprezentativ demonstrează marea heterogenitate a carcinoamelor mamare în care clasificarea moleculară bazată pe cuantificarea a patru biomarkeri (ER, PR, KI67, HER2neu) are un rol prognostic important, fiind complementar cu principalii factori clinico-morfologici și imunohistochimici.**

## Bibliografie selectivă

1. <http://www.iarc.fr>
2. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010; 46(4):765–81.
3. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer* 2013; 49: 1374–1403.
4. Steliarova-FE, O’Callaghan M, Ferlay J, Masuyer E, et. al. European cancer observatory: cancer incidence, mortality, prevalence and survival in Europe. Version 1.0 (September 2012) European Network of Cancer Registries, International Agency for Research on Cancer. disponibil la <http://eco.iarc.fr>.
5. Alizadeh AA, Ross DT, Perou CM et al: Towards a novel classification of human malignancies based on gene expression patterns. *J Pathol* 2001; 195:41-52.
6. Early Breast Cancer Trialists’ Collaborative Group: Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of randomised trials. *Lancet*.1998; 352, 930–942.
7. Early Breast Cancer Trialists’ Collaborative Group: tamoxifen for early breast cancer: an overview of randomised trials. *Lancet* 1998; 351, 1451–1467.
8. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747–752.
9. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS* 2001; 98 (19):10869-10874.
10. Sørlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 8418-8423.
11. Bergamaschi A, Kim YH, Wang P, et al: Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45:1033- 1040.
12. Chin K, DeVries S, Fridlyand J, et al: Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiology. *Cancer Cell* 2006, 10: 529-541.
13. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ. Panel members, Strategies for subtypes – dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Oncol* 2011; 22(8):1736–1747
14. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 2013; 24: 2206–2223.
15. Reis-Filho JS, Simpson PT, Gale T, Lakhani SR: Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol* 2005; 205:248–254.
16. Oakman C, Bessi S, Zatarana E, Galardi F, Biganzoli L, Di Leo A: Recent advances in systemic therapy new diagnostics and biological predictors of outcome in early breast cancer. *Breast Cancer Res* 2009; 11:205-208.
17. Rose ANN, Siegel PM: Emerging therapeutic targets in breast cancer bone metastasis. *Future Oncol* 2010; 6:55–74.
18. Gupta D, Middleton LP, Whitaker MJ, Abrams J. Comparison of fluorescence and chromogenic in situ hybridization for detection of HER-2/neu oncogene in breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol* 2003, 119: 381-387.

19. Bhargava R, Gerald WL, Li AR, Pan Q, Lal P, Ladanyi M and Chen B. EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Modern Pathology* 2005; 18, 1027–1033.
20. Bauer K, Parise C, Caggiano V: Use of ER/PR/ HER2 subtypes in conjunction with the 2007 St Gallen Consensus Statement for early breast cancer. *BMC Cancer* 2010; 10:228 -232.
21. Prat A, Cheang MC, Martin M et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol* 2013; 31: 203–209.
22. Rosen PP, ed. Rosen's Breast Pathology. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2009; 198-131.
23. Tavassoli FA, Devilee P, eds. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon, France: IARC Press 2003; 89-106.
24. Jacobsen BM, Richer JK, Sartorius CA, Horwitz KB. Expression profiling of human breast cancers and gene regulation by progesterone receptors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003;8:257-268.
25. Tsutsui S, Kataoka A, Ohno S, et al: Prognostic and predictive value of epidermal growth factor receptor in recurrent breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8:3454-3460.
26. Walker RA, Dearing SJ: Expression of epidermal growth factor receptor mRNA and protein in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 53:167-176.
27. Lv N, Xie X , Ge Q, Wang X et al. Epidermal growth factor receptor in breast carcinoma: association between gene copy number and mutations. *Diagn Pathol.* 2011 Dec 2;6:118.
28. Ivković-Kapicel T, Panjković M, Nikolić I et al. Expression of cytokeratins 5/6 and cytokeratin 17 in invasive breast carcinoma. *Vojnosanit Pregl.* 2012 Dec;69(12):1031- 8.
29. Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, et al. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res* 2005;11:5175-5180.
30. Pracella D, Bonin S, Barbazza R, Sapino A, Castellano I, Sulfaro S, Stanta G. Are Breast Cancer Molecular Classes Predictive of Survival in Patients with Long Follow-Up? *Hindawi* 2013, 35 (6):595–605.
31. AlSaeed EF, Al Ghabbban ARJ and Tunio MA. The Prognostic Significance of the Luminal A, Luminal B, Basal and Her 2Neu Subtypes of Breast Cancer in Saudi Women. *The Open Breast Cancer Journal*, 2013; 5, 16-22.
32. Spitale A, Mazzola P, Soldini D, Mazzucchelli L, Bordoni A. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland, *Ann Oncol*, 2009, 20(4):628–635.
33. Munirah MA, Siti-Aishah MA, Reena MZ, Sharifah NA, et al. Identification of different subtypes of breast cancer using tissue microarray. *RJME* 2011, 52(2):669–677.
34. Engstrøm MJ, Opdahl S, Hagen AI et al . Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2013 140:463–473.
35. Xue C, Wang X, Peng R, Shi Y et al. Distribution, clinicopathologic features and survival of breast cancer subtypes in Southern China. *Cancer Sci* 2012; 103:1679–1687.