

**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AL REPUBLICII MOLDOVA
INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE „NICOLAE TESTEMIȚANU”**

Cu titlu de manuscris

C.Z.U: 618.19-006.6-033.2(043.2)

FULGA VEACESLAV

**PROFILUL MOLECULAR AL CARCINOAMELOR
MAMARE INVAZIVE VERSUS METASTAZELE
LIMFONODALE CORESPONDENTE**

311.02 – ANATOMIE PATOLOGICĂ

Teză de doctor habilitat în științe medicale

Consultanți științifici:

Raica Marius

doctor, profesor universitar

Șaptefrați Lilian

doctor habilitat în științe medicale,
conferențiar universitar, 311.02 –
Anatomie patologică

Autorul:

Fulga Veaceslav

doctor în științe medicale,
conferențiar universitar

CHIȘINĂU, 2018

© Fulga Veaceslav, 2018

CUPRINS

| | |
|--|-----|
| ADNOTARE | 5 |
| LISTA ABREVIERILOR | 8 |
| INTRODUCERE | 9 |
| 1. PARTICULARITĂȚILE HISTOLOGICE ȘI MOLECULARE ALE CARCINOAMELOR MAMARE INVAZIVE DE TIP DUCTAL ȘI LOBULAR | 17 |
| 1.1 Impactul diagnosticului morfologic convențional asupra pronosticului și terapiei | 17 |
| 1.2 Clasificarea moleculară a carcinomului mamar: istoric, subtipuri, evoluție | 20 |
| 1.3 Epidemiologia chimiorezistenței la terapie și perspectivele terapiei personalizate | 34 |
| 1.4 Studiul comparativ al tumorii primare și metastazelor limfonodale. Importanța microambianței. | 41 |
| 1.5 Concluzii la capitolul 1 | 43 |
| 2. MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE | 45 |
| 2.1 Generalități referitor la obiectul de studiu | 45 |
| 2.2 Caracteristica materialului inclus în studiu | 45 |
| 2.3 Metodele de cercetare | 45 |
| 2.4 Analiza statistică | 59 |
| 2.5 Concluzii la capitolul 2 | 61 |
| 3. DINAMICA MARKERILOR IMUNOHISTOCHIMICI ÎN NORMĂ ȘI ÎN FUNCȚIE DE TIPUL, GRADUL HISTOLOGIC AL TUMORII, STATUSUL LIMFONODAL ȘI VÂRSTA PACIENTELOR | 62 |
| 3.1 Expresia markerilor utilizați în studiu în glanda mamară neafectată | 62 |
| 3.2 Dinamica receptorilor pentru ER și PR | 65 |
| 3.3 Stabilitatea receptorului HER2 în procesul metastatic | 81 |
| 3.4 Evoluția markerilor bazali CK5 și EGFR | 88 |
| 3.5 Evoluția markerului nuclear de proliferare Ki67 | 101 |
| 3.6 Dinamica markerilor apoptotici p53 și BCL2 | 110 |
| 3.7 Stabilitatea E-cadherinei în evoluția procesului metastatic | 123 |

| | |
|---|------------|
| 3.8 Evoluția receptorului pentru AR în microambianța limfonodală | 131 |
| 3.9 Analiza comparativă a expresiei receptorilor incluși în studiu: interrelațiile dintre toți markerii utilizați în funcție de tipul și gradul histologic al tumorii, vârsta pacienților | 135 |
| 3.10 Concluzii la capitolul 3 | 141 |
| 4. CARACTERISTICA SUBTIPURILOR MOLECULARE | 144 |
| 4.1 Incidența și dinamica subtipurilor prin prisma recomandărilor St Gallen, 2013 | 144 |
| 4.2 Stabilitatea profilului molecular al carcinomului mamar după implantare pe membrana corioalantoidă a oului embrionat | 163 |
| 4.3 Concluzii la capitolul 4 | 169 |
| 5. SINTEZA REZULTATELOR OBȚINUTE | 171 |
| CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI | 203 |
| BIBLIOGRAFIE | 205 |
| ANEXE | 225 |
| DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII | 259 |
| CURRICULUM VITAE AL AUTORULUI | 260 |

ADNOTARE

Fulga Veaceslav

„Profilul molecular al carcinoamelor mamare invazive versus metastazele limfonodale corespondente”

Teză de doctor habilitat în științe medicale, Chișinău, 2018

Structura tezei: introducere, 5 capitole, concluzii generale, recomandări, 280 surse bibliografice, 133 pagini de text de bază, 57 figuri, 70 tabele, 11 anexe. Rezultatele acestui studiu au fost reflectate în 51 lucrări științifice, inclusiv o monografie.

Cuvinte-cheie: carcinom mamar, markeri hormonal, HER2, CK5, EGFR, p53, BCL2, E-cadherin, subtipuri moleculare, metastaze limfonodale.

Domeniul de studiu: anatomie patologică.

Scopul lucrării: Studiul profilului molecular al carcinoamelor mamare invazive de tip ductal și lobular comparativ cu metastazele limfonodale axilare ipsilaterale, și evaluarea stabilității subtipului molecular în procesul de metastazare.

Obiectivele lucrării: Determinarea fenotipului molecular al tumorii în funcție de tipul și gradul histologic, statusul limfonodal, precum și evaluarea dinamicii receptorilor ER, PR, AR, HER2, CK5, EGFR, p53, BCL2 și E-cadherinei în procesul de metastazare al carcinomului mamar.

Noutatea și originalitatea științifică: Pentru prima dată s-a demonstrat instabilitatea markerilor ER, PR, AR, HER2, CK5, EGFR, p53, BCL2 și E-cadherinei în procesul de metastazare a carcinoamelor mamare ductal invaziv de tip NOS și lobular infiltrativ. Am stabilit în premieră că metastaza limfonodală are un fenotip imunohistochimic particular, diferit de tumoarea primară, ceea ce creează premise pentru reevaluarea concepțiilor contemporane de tratament.

Importanța teoretică și aplicativă a lucrării: Rezultatele acestui studiu pledează pentru examinarea imunohistochimică concomitentă a tumorii primare și metastazei în vederea stabilirii unui diagnostic și tratament personalizat.

Implementarea rezultatelor științifice: Rezultatele acestui studiu au fost aprobate ca valoare științifică și aplicativă pentru activitatea catedrelor și laboratoarelor de histologie, anatomie patologică și oncologie.

РЕЗЮМЕ

Фулга Вячеслав

„Молекулярный профиль инвазивных форм рака молочной железы в сравнение с соответствующими метастазами лимфоузлов”

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук, Кишинев, 2018

Структура диссертации: Введение, 5 глав, общие выводы, рекомендации, 280 библиографических источников, 133 страниц основного текста, 57 рисунков, 70 таблиц, 11 приложений. Результаты исследования опубликованы в 51 научных работ, в том числе одна монография.

Ключевые слова: рак молочной железы, гормональные маркеры, HER2, CK5, EGFR, p53, BCL2, E-cadherin, молекулярные подвиды, метастазы лимфоузлов.

Область исследования: патологическая анатомия.

Цель исследования: Изучение молекулярного профиля проточного и долькового раков молочной железы в сравнение с ипсилатеральными метастазами подмышечных лимфоузлов, а также оценка стабильности молекулярного подвида в процессе метастазирования.

Задачи исследования: Определение молекулярного фенотипа опухоли в зависимости от вида и степени злокачественности, состояния лимфоузлов, а также оценка динамики рецепторов ER, PR, AR, HER2, CK5, EGFR, p53, BCL2 и E-cadherin в процессе метастазирования рака молочной железы.

Новизна и оригинальность исследования. Впервые была доказана нестабильность маркеров ER, PR, AR, HER2, CK5, EGFR, p53, BCL2 и E-cadherin в процессе метастазирования проточного и долькового раков молочной железы. Было доказано, что метастазы лимфоузлов обладают особым иммуногистохимическим фенотипом, отличающимся от первичной опухоли, тем самым способствуя необходимости переоценки современных концепций лечения.

Практическая значимость: Результаты данного исследования подчеркивают необходимость сопутствующего иммуногистохимического анализа первичной опухоли и метастазов в виду персонализации диагностики и лечения.

Внедрение результатов: Полученные результаты оценены как научно-практически значимые и могут быть внедрены в деятельность гистологических, патологоанатомических, онкологических кафедр и лабораторий.

ANNOTATION

Fulga Veaceslav

„The molecular profile of invasive breast carcinomas versus correspondent lymph node metastases”

Thesis of Doctor of Medical Science, Chisinau, 2018

Thesis structure: Introduction, 5 chapters, general conclusions, recommendations, bibliography of 280 titles, 133 pages of main text, 57 figures, 70 tables, 11 annexes. Obtained results are published in 51 scientific papers, including one monograph.

Keywords: mammary carcinoma, hormonal markers, HER2, CK5, EGFR, p53, BCL2, E-cadherin, molecular subtypes, lymph node metastases.

Field of study: Pathology.

Purpose of study: Evaluation of molecular profile of ductal and lobular invasive mammary carcinomas in comparison with ipsilateral lymph node metastases, as well evaluation of molecular subtypes’ stability during metastatic process.

Objectives: Tumor’s molecular phenotype assessment in relation to histological grade and type, lymph nodes involvement, as well evaluation of ER, PR, AR, HER2, CK5, EGFR, p53, BCL2 and E-cadherin stability during metastatic development of breast carcinoma.

Scientific innovation: For the first time was demonstrated the instability of ER, PR, AR, HER2, CK5, EGFR, p53, BCL2 and E-cadherin markers during metastatic development of ductal type NOS and lobular invasive carcinomas. We set it up for the first time that lymph node metastasis has a particular immunohistochemical phenotype, distinct from primary tumor, which arguments the reevaluation necessity of modern concepts of treatment.

Theoretical significance and applied value of the work: The results of present work support the necessity of simultaneous immunohistochemical examination of primary tumor and metastasis, in reason of a personalized diagnostic and treatment evaluation.

Implementation of scientific results: The obtained results were approved to have a scientific and practical value for histological, pathological, oncological departments’ and laboratories’ activity.

LISTA ABREVIERILOR

| | |
|-----------|--|
| 5-NP | 5 – negative phenotype |
| ALDH1 | aldehyde dehydrogenase 1 |
| AR | androgen receptor |
| ASCO | American Society of Clinical Oncology |
| BCL2 | B-cell lymphoma 2 receptor |
| BRCA | breast related cancer antigens |
| CD | clone of differentiation |
| CDH1 | cadherin-1 gene |
| CK | cytokeratin |
| EGFR | epidermal growth factor receptor |
| EpCAM | epithelial cell adhesion molecule |
| ER | estrogen receptor |
| ESR1,2 | estrogen receptor gene 1, 2 |
| FOXA1 | forkhead box protein A1 |
| GCDFP | gross cystic disease fluid protein |
| HER2 | human epidermal growth factor receptor 2 |
| LNM | metastaza limfonodală |
| MaSC | mammary stem cells |
| mt | metastaza |
| NOS | no otherwise specified |
| NST | no special type |
| PR | progesteron receptor |
| St Gallen | reuniunea/consorțiul de la Saint Gallen |
| TDLU | terminal ductal-lobular unit |
| TGF | tumor grow factor |
| tm | tumoarea primară |
| TNF | tumor necrosis factor |
| TWIST1 | twist-related protein 1 |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța problemei

Cancerul mamar este o patologie care fascinează prin polimorfismul tabloului histologic, prin evoluția clinică extrem de complexă și impactul dramatic asupra structurii morbidității și mortalității oncologice. Clasificările histologice propuse de societățile morfologice internaționale reprezintă rezultatul realizărilor diagnostice clasice, însă care au un potențial pronostic limitat și oportunități clinice modeste. Această patologie manifestă particularități de rasă, sex, numărul de nașteri și areal geografic.

În pofida faptului că tipurile histologice de carcinom mamar sunt foarte bine descrise și o multitudine de criterii morfologice sunt propuse spre utilizare în diagnostic, acest tip de cancer rămâne a fi lider a mortalității în rândul populației feminine. Particularitățile histologice ale tumorii precum tipul morfologic, gradul și invazia limfovaculară, sunt utilizați ca markeri pronostici ai evoluției tumorale, însă fără un impact clar asupra terapiei. În lumina ultimelor realizări, unicul factor descris histologic, cu valoare pronostică unanim recunoscută este gradul de diferențiere a tumorii. Identificarea gradului histologic 3 servește drept recomandare pentru chimioterapie [97]. În baza celor expuse putem concluziona că definirea tratamentului doar în baza descrierilor morfologice predispune din start la eșec în majoritatea cazurilor. Astfel terapia toxică ar putea fi indicată încă multor femei cărora, probabil le-ar fi fost mai bine fără tratament și sunt încă multe paciente la care în pofida tratamentului realizat se dezvoltă recurențe [47].

Implementarea programelor de screening și profilaxie, precum și a noilor scheme de tratament a micșorat mortalitatea în cancerul mamar [116]. Însă rata mortalității și morbidității oricum plasează acest tip de cancer în topul afecțiunilor maligne. O explicație plauzibilă, ce poate servi drept scop pentru noi cercetări, este absența la moment a unei descrieri detaliate a eterogenității celulare a carcinomului mamar, evaluând concomitent alterațiile moleculare, compoziția celulară și sensibilitatea la tratament.

În prezent, tot mai multe rezultate, nu numai în cazul carcinomului mamar, pledează în defavoarea standardului tradițional de tratament «o doză pentru toți», deoarece această abordare nu i-a în calcul polimorfismul celular, histologic al tumorii, ceea ce implică presupune un eșec al tratamentului. Astfel se conturează necesitatea de a dezvolta un tratament personalizat pentru fiecare caz în parte. Cheia succesului în această terapie l-ar reprezenta utilizarea concomitentă a expresiei markerilor moleculari, caracteristici pentru fiecare tumoră și dezvoltarea medicamentelor ce au drept țintă acești receptori.

Modelul clasic, histologic s-a dovedit a avea o utilizare pronostică limitată și absolut lipsit de valoare predictivă, iar pictarea „portretului” molecular al tumorii a devenit o necesitate

stringentă a contemporaneității. Metodele moleculare au evidențiat inițial profilul genetic diferit, susținut apoi și de neomogenitatea receptorilor exprasați în cadrul aceluiași tip histologic. Primul „portret molecular” a fost realizat de Perou și coaut. (2000) [180]. În urma unei analize ample a garniturilor genetice, caracteristice fiecărui pacient în parte, autorii au delimitat 4 grupe distincte, astfel punând baza subtipurilor moleculare intrinseci.

Însă caracterizarea profilului genetic prin tehnici microarray s-a dovedit a fi costisitoare și laborioasă, motiv pentru care Goldhirsch și coaut. (2013) au propus identificarea imunohistochimică a receptorilor cu marker surogați [97]. Odată cu utilizarea diferitor markeri, subtipurile moleculare au putut fi diversificate [27, 213]. Prin aplicarea noilor metode și markeri, cancerul de sân va servi încontinuu drept câmp deschis pentru noi realizări științifice grație conținutului său celular eterogen.

La moment, profilul genetic relevă un grad înalt de eterogenitate moleculară în structura carcinomului mamar ductal invaziv, asociat cu variabilitatea evoluției clinice. Aproximativ 80% din paciente dezvoltă tumori hormon-pozitive. Statusul ER și PR este utilizat pentru a subdiviza tumorile în hormon-dependente și independente. Tumorile Luminale A, sunt caracterizate prin expresia marcată a genelor estrogen-reglatoare și markerilor moleculari ai receptorilor de ER, PR în asocieră cu celulele luminal diferențiate al epiteliului mamar. Aceste trăsături sunt mai puțin specifice pentru subtipul Luminal B și improprii pentru grupul hormon-negativ, caracterizat prin expresie marcată a genelor ce determină amplificarea proliferării celulare și respectiv, presupun un pronostic rezervat.

Korsching și coaut. (2002) au determinat că în tumorile glandei mamare co-există diferite celule maligne ce determină apariția subtipurilor de carcinom mamar [128]. Unele studii aduc argumente certe în favoarea co-existenței diferitor celulelor canceroase cu proprii caractere genetice și epigenetice, ce poartă caracter individual care diferă după capacitățile sale de metastazare. Mai mult, unele celule tumorale sunt non-metastatice. Aceste date conturează ideea și necesitatea studiului comparativ al profilului molecular al metastazei, presupunând diferențe fascinante pentru morfologi, periculoase pentru pacienți.

Recent, în urma triajelor clinice IBCSG 23-01 (International Breast Cancer Study Group trial 23-01) și ACOSOG Z0011 (American College of Surgeons Oncology Group Z0011) s-a depistat că, prezența micrometastazelor în noduri limfatici nu prezintă o indicație pentru intervenție axilară fiindcă, utilizarea chimioterapiei și/sau radioterapiei poate distruge celulele tumorale restante [88, 94]. Această concluzie vine în concordanță cu datele lui Perou (2000), potrivit căreia „programul molecular” al tumorii primare se menține și la nivelul metastazelor

[180]. Aceste date sugerează că, dacă profilul molecular al tumorii primare are o anumită valoare predictivă, aceasta automat i se va atribui și metastazei sale.

Împotriva acestor date servesc un șir de evidențe care subliniază că, profilul molecular al celulei metastatice nu este stabil în timp. Astfel Falck (2013) consideră că, fenotipul carcinomului nu este stabil pe parcursul evoluției, prezentând diferențe de subtip dintre tumoarea primară și metastaza limfonodală la 11% pacienți [77]. În supliment, Prat (2011) descrie că, carcinomul mamar este celular neomogen, iar unele celule, în special cu fenotip-stem ($CD44^+/CD24^-$) sunt mai rezistente la terapie și mai active la metastazare [190]. Un alt punct de vedere ce descrie instabilitatea moleculară a tumorii presupune că, odată cu blocarea receptorului ER, celula canceroasă drept răspuns de acomodare la tratament își schimbă calea pentru supraviețuire. Astfel drept răspuns la tratamentul efectuat s-au raportat un șir de cazuri de „shift” sau transfer a tumorii primare de la subtip ER^+ la $HER2^+$ și invers [54, 268]. În favoarea efectuării unor cercetări în acest domeniu vorbesc și rezultatele potrivit cărora tumorile tratate cu inhibitori de aromatază au dezvoltat mutații la nivel de genă-*ESR1*, care codifică regiunea de fixare (ligand-binding domain) a receptorului ER pentru estrogen și dezvoltă consecutiv rezistență la tratamentul hormonal [117, 140, 204, 244, 2013]. Important însă este faptul că, aceste mutații s-au determinat doar la nivelul metastazelor limfonodale (la 6 din 11 pacienți), în tumoarea primară fiind absente.

În susținerea ideii de a cerceta comparativ tumoarea primară și LNM sunt și studiile de profil care sugerează că, microambianța tumorală are un rol important în comportamentul neoplasmului. Celulele canceroase și stromale interacționează reciproc, deseori în sinergism, prin crearea unui mediu favorabil pentru proliferare și angiogeneză. Acești factori în totalitate sporesc invazia vasculară și pot avea un impact direct asupra pronosticului. În plus, stroma din LNM este una total diferită de cea din glanda mamară, unde populația „băștinașă”, limfocitele pot influența imprevizibil deocamdată asupra metastazei. Drept exemplu servesc datele controversate despre limfocitele intratumorale. Având funcție de apărare, studiul de specialitate relevă o influență contrară opusă, de stimulare a progresiei tumorale [108]. Similar acestor date servesc rezultatele lui Muenst (2013), unde prezența limfocitelor este asociată cu un pronostic nefavorabil [161]. Contrar acestor date numărul crescut de T limfocite $CD8^+$ este asociat unui pronostic favorabil în cazul tumorilor ER negative, iar combinația limfocit $CD8^+$ - tumoare ER^+ este în defavoarea pacientei. Totodată, prezența în tumoare a infiltratului T citotoxic este considerat drept un factor predictiv pozitiv pentru chimioterapie [226].

Astfel, microambianța are o influență semnificativă în dezvoltarea tumorii. Marea majoritate a datelor curente indică rolul stimulator, protumoral a celulelor stromale. Este bine

studiată influența celulelor stromale asupra tumorii primare și practic absentează surse ce ar evidenția rolul ambianței limfonodale în evoluția tumorii. Mai mult și rezultatele privind stabilitatea moleculară a tumorii în procesul de metastazare sunt controversate. Nu sunt date exhaustive privind evoluția subtipului molecular al metastazei comparativ cu tumoarea primară. Existența transferului de profil molecular ar avea un impact pronostic și predictiv.

Scopul lucrării: Studiul profilului molecular al carcinoamelor mamare invazive de tip ductal și lobular comparativ cu metastazele limfonodale axilare ipsilaterale, și evaluarea stabilității subtipului molecular în procesul de metastazare.

Obiectivele lucrării:

- Determinarea fenotipului molecular al tumorii în funcție de tipul și gradul histologic, statusul limfonodal;
- Evaluarea dinamicii receptorilor hormoni pentru estrogeni (ER), progesteron (PR), androgeni (AR) și a markerilor HER2 (factorul uman de creștere epidermală 2), Ki67 (marker al proliferării) în procesul de metastazare;
- Determinarea expresiei E-cadherinei la evoluția metastazelor în dependență de tipul histologic și molecular al tumorii;
- Identificarea stabilității markerilor CK5 (citokeratina bazală) și EGFR (factorul de creștere epidermală 1) la metastazare;
- Evidențierea expresiei markerilor pro- (p53) și anti-apoptotic (BCL2) în evoluția metastatică a carcinomului mamar;
- Evaluarea stabilității subtipurilor moleculare în microambianța limfonodală.

Noutatea științifică a rezultatelor obținute

Problema științifică soluționată în teză constă în argumentarea științifică a gradului de stabilitate al profilului molecular al carcinomului mamar pe parcursul metastazării, ceea ce a condus la clarificarea tacticii de diagnostic, în vederea aplicării unui tratament personalizat. Rezultatele principial noi, expuse în continuare, conturează în premieră o nouă direcție științifică, ce definește rolul determinant al micromediului ambiant în evoluția tumorii.

Pentru prima dată am demonstrat că receptorii hormoni pentru ER, PR și AR nu sunt stabili pe parcursul metastazării, cu precizarea că receptorul pentru PR are o rată net superioară a instabilității față de ER, fapt ce poate explica rezistența și recurențele în terapia hormonală.

A fost demonstrat că receptorul HER2 nu este stabil pe parcursul metastazării în ambele tipuri de cancer studiate, preponderent fiind înregistrată pierderea acestuia după metastazare, astfel diminuând eficiența terapiei anti-HER2 în boala metastatică.

Am demonstrat pentru prima dată că citokeratina bazală CK5 este instabilă la metastazare, iar tipurile de transfer depind de tipul histologic al tumorii, fapt ce permite de a reevalua criteriile de diagnostic și tratament. Am determinat că markerul EGFR nu este constant expresat de celulele tumorale, iar cazurile de transfer implică exclusiv pierderea acestui receptor în microambianța nodului limfatic.

Am constatat că activitatea proliferativă a celulelor tumorale nu este stabilă, iar transferurile de scor a Ki67 sunt în funcție de tipul histologic al tumorii: carcinomul de tip NOS la metastazare își diminuează activitatea mitotică, iar tumorile lobulare intensifică gradul de proliferare.

Am stabilit că carcinoamele mamare de tip NOS și lobular sunt preponderent tumori p53 pozitive. Acest marker nu este stabil pe parcursul metastazării, iar transferurile de scor p53 mai frecvent înregistrate țin de pierderea expresiei p53 în ambianța limfonodală, indiferent de tipul histologic al tumorii. Am dovedit că markerul anti-apoptotic BCL2 nu este stabil pe parcursul metastazării, predominând cazurile de pierdere a acestuia în ambianța limfonodală. Cazurile de transfer au implicat numai tumori cu grad scăzut și moderat de diferențiere, afectând în special femeile de „după 49” ani.

Am demonstrat că expresia E-cadherinei din metastază diferă de valorile acesteia din tumoarea primară, iar transferurile de scor pot evolua cu achiziție sau pierderea acestui marker în sediul limfonodal.

Am stabilit că metastaza limfonodală are un fenotip imunohistochimic particular, diferit de tumoarea primară, ceea ce creează premise pentru reevaluarea tratamentului.

Am constatat că subtipurile moleculare nu sunt stabile la metastazarea tumorii, existând divergențe cauzate de tipul histologic al carcinomului. Tumorile Luminal A dezvoltate de carcinomul lobular spre deosebire de cel ductal sunt p53 pozitive. Subtipul HER2 nu este stabil pe parcursul metastazării tumorilor NOS, transferurile de subtip evaluând doar cu achiziționarea de receptori luminali, iar în cazul carcinomului lobular degradează în Basal-like. Subtipul Luminal B dezvoltat de carcinomul lobular invaziv spre deosebire de cel ductal nu expresează E-cadherina.

Pentru prima dată am demonstrat experimental instabilitatea profilului molecular al tumorilor după implantare pe membrana coriolarantoidă, evidențiind evoluția diferită a markerilor: ER și HER2 preponderent cu pierdere, PR stabil pozitiv, CK5 stabil negativ.

Această eterogenitate a celulelor tumorale, ne-a permis să susținem necesitatea continuării studiilor în acest domeniu, în vederea stabilirii de noi subtipuri moleculare.

Importanța teoretică și aplicativă a lucrării

În urma abordării multilaterale a problemei stabilității subtipului molecular al carcinomului mamar în cadrul progresiei metastatice a fost posibilă caracterizarea uni-momentană, morfologică și imunohistochimică a aceluiași tip histologic de tumori, diversificate după sediu. Lucrarea realizată constituie drept imbold pentru disciplinele medico-biologice de a revedea structura neoplaziilor în dependență de mediul microambiant. Diferențele menționate în teza dată impun revizuirea algoritmilor terapeutice existente. Rezultatele acestui studiu certifică necesitatea reevaluării tacticii de diagnostic și tratament a carcinomului mamar. Intru stabilirea unei conduite terapeutice personalizate subliniem necesitatea:

1. Efectuării examenului imunohistochimic paralel, de dorit concomitent, tumoarea primară – metastaza. Schimbul profilului molecular la metastazare are valoare pronostică și predictivă.
2. De a revedea și adapta algoritmele terapeutice în vigoare, cel puțin pentru markerii predictivi existenți, ER, PR și HER2.
3. De utilizat preferențial indicele de proliferare Ki67 în locul gradului de diferențiere drept marker al agresivității tumorale.
4. De a revedea rolul diagnostic al E-cadherinei în calitate de marker specific al tumorilor lobulare.
5. De a nota de rând cu subtipul molecular al tumorii markerii în baza căroră acesta a fost definit. Expresia CK5 de rând cu HER2 și/sau receptorii hormonali indică necesitatea reevaluării schemelor terapeutice aplicate și structura subtipurilor moleculare în vigoare.
6. De utilizat preferențial CK5 în definirea tumorilor Triplu negative.

Implementarea rezultatelor științifice: Datele obținute redefinesc rolul mediului microambiant în cadrul progresiei tumorale. Acest studiu servește drept imbold pentru disciplinele medico-biologice de a investiga stabilitatea profilului molecular în procesul de metastazare și al altor tipuri de neoplazii.

Lucrarea dată completează și diversifică profilul molecular al subtipurilor tumorale utilizate în practica oncologică și totodată pune în evidență, în premieră noi combinații de markeri. Rezultatele acestei lucrări indică necesitatea revizuirii algoritmilor de diagnostic și

tratament existente, cel puțin pentru carcinoamele mamare. În baza acestei lucrări oncologii pot diversifica cauzele rezistenței la terapie și apariția recurențelor tumorale. Rezultatele acestui studiu au fost prezentate și aprobate ca valoare teoretică, aplicativă pentru activitatea catedrelor și laboratoarelor de histologie, anatomie patologică, oncologie precum și la un șir de foruri științifice naționale și internaționale.

Aprobarea rezultatelor

Rezultatele obținute în urma investigațiilor efectuate și concepțiile de bază ale tezei au fost prezentate, comunicate și discutate în cadrul următoarelor reuniuni științifice:

- ✓ Conferințele științifice anuale ale colaboratorilor IP USMF „Nicolae Testemițanu” (Chișinău, Republica Moldova, 2013-2017);
- ✓ The ninth international conference of anticancer research (Sithonia, Grecia, 2014);
- ✓ Conferința științifico-practică a medicilor anatomo-patologi „Probleme actuale în patologie” (Chișinău, Republica Moldova, 2014);
- ✓ Al XIII-lea Simpozion Național de Morfologie Microscopică cu participare internațională (Craiova, România, 2015);
- ✓ II Scientific Conference „Fundamental and clinical medicine” (Kyiv, Ucraina, 2015);
- ✓ Euroregional Conference for PhD Students and Young Researchers in Biomedicine (Timișoara, România, 2015);
- ✓ International Scientific Conference „Actual issues of morphology” (Chișinău, Republica Moldova, 2015);
- ✓ Al XV-lea simpozion Național de Morfologie Microscopică cu Participare internațională (Oradea-Băile Felix, Romania, 2017);
- ✓ On-Line conference „Biological markers in fundamental and applied biology. From theory to practice” Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine (Brno, Cehia, 2018);

Teza a fost discutată și aprobată la ședința Catedrei de histologie, citologie și embriologie (proces verbal nr.14, din 14.06.2018), la ședința Seminarului științific de profil extern „Anatomie patologică” – UMF „Victor Babeș”, Timișoara, România (proces verbal din 28.06.2018) și la ședința Seminarului științific de profil 311. Anatomie și morfologie; 351 Medicină interdisciplinară (proces verbal nr.1, din 06.09.2018).

Sumarul compartimentelor tezei

Teza este expusă în limba română cu titlu de manuscris și constă din: introducere, 5 capitole, sinteza rezultatelor obținute, concluzii, recomandări practice și bibliografie. Lucrarea este expusă pe 261 pagini, conține 70 tabele, 57 figuri, 11 anexe. Indicele bibliografic include 280 surse de referință. Materialele tezei au fost publicate în 51 lucrări științifice, editate în reviste licențiate, culegeri de rezumate și materiale ale congreselor, simpozioanelor, conferințelor științifice, și include o monografie, 4 articole cu impact factor, 3 articole de sinteză, 5 articole fără coautori.

În capitolul „Introducere” a fost redată actualitatea temei, s-au evidențiat întrebările ce susțin importanța efectuării studiului în cauză. De asemenea s-au descris scopul și obiectivele lucrării, noutatea științifică a rezultatelor obținute, importanța teoretică și valoarea aplicativă a lucrării, aprobarea rezultatelor.

Capitolul 1 a fost dedicat particularităților histologice și moleculare ale carcinoamelor mamare invazive de tip ductal și lobular, cu evidențierea rolului pronostic și predictiv incert al diagnosticului morfologic, subtipurilor moleculare existente, originii celulare a carcinomului mamar și influența microambianței asupra celulelor tumorale.

În capitolul 2 au fost descrise amănunțit materialul de studiu și metodologia cercetării, evidențiind metodele utilizate: histologică, imunohistochimică, statistică. De asemenea a fost descrisă și partea experimentală, cultivarea tumorilor pe membrana corioalantoidă.

Capitolul 3 a fost dedicat dinamicii markerilor imunohistochimici (ER, PR, AR, HER2, CK5, EGFR, E-cadherin, Ki67, p53, BCL2) în normă și în funcție de tipul, gradul histologic al tumorii, statusul limfonodal și vârsta pacientelor. Capitolul a fost finalizat printr-o analiză comparativă amplă a expresiei receptorilor incluși în studiu, până și după metastazare.

În capitolul 4 au fost caracterizate subtipurile moleculare constituite în baza recomandărilor de la St Gallen, 2013. S-a evidențiat structura, eterogenitatea și stabilitatea subtipurilor în dependență de tipul, gradul histologic al tumorii, statusul limfonodal și vârsta pacientelor. Pentru certificarea instabilității profilului molecular, acest capitol a fost finalizat cu rezultatele studiului experimental „Stabilitatea profilului molecular al carcinomului mamar după implantare pe membrana corioalantoidă a oului embrionat”.

În sinteza rezultatelor obținute au fost confruntate rezultatele obținute din studiul curent cu datele existente în literatură. Au fost evidențiate și analizate aspecte anatomice, genetice, citologice, moleculare care ar sta la baza instabilității profilului molecular al carcinomului mamar.

1. PARTICULARITĂȚILE HISTOLOGICE ȘI MOLECULARE ALE CARCINOAMELOR MAMARE INVAZIVE DE TIP DUCTAL ȘI LOBULAR

1.1. Impactul diagnosticului morfologic convențional asupra pronosticului și terapiei

Definirea progresiei tumorale în cazul cancerului de sân n-a fost posibilă pentru lung timp datorită lipsei markerilor ce ar delimita clar hiperplazia tipică și atipică de o tumoare malignă. Carcinomul mamar a fost clasificat în subgrupe având ca bază tipul și gradul histologic [51, 70]. Această tumoare posedă multiple expresii morfologice, diversificate în subtipuri după gradul histologic și expresia receptorilor, ceea ce presupune după Weigelt și coaut. (2010a,b) etiologia diferită a acestor entități [257, 258].

Adenocarcinoamele mamare sunt caracterizate printr-o largă diversitate histologică. Inițial au fost definite 2 grupe de carcinom mamar: „in situ” și invaziv. Diferența dintre aceste grupe ține de integritatea membranei bazale, în cazul carcinomului invaziv celulele tumorale devastând-o. În cadrul carcinomului „in situ” se deosebesc subtipurile: comedo, cribriform, micropapilar, papilar și solid.

Tipurile invazive clasice, frecvent diagnosticate și studiate sunt carcinomul invaziv ductal (50-80%) de tip NST (of no special type), și lobular (5-15%) [71, 139]. Este de menționat, că inițial prin termenii de carcinom ductal și lobular s-a subînțeles histogeneza sau punctul de origine al tumorii în sistemul ductal mamar. Ipoteza potrivit căreia tipurile morfologice de cancer mamar au drept sursă domenii microanatomice distincte ale glandei mamare a fost contestată de Wellings și coaut. (1973, 1975), care au demonstrat că vasta majoritate a cancerelor invazive de sân, precum și presursorii „in situ”, au origine în unitatea terminală ductal-lobulară, indiferent de tipul histologic [261, 262]. Din punct de vedere histologic tipurile carcinomului mamar sunt definite în baza paternului arhitectural distinct, trăsăturilor celulare și în plus, a profilului imunohistochimic.

Tipurile speciale sunt determinate în 25%. După datele OMS (Organizația Mondială a Sănătății) sunt delimitate cel puțin 17 subtipuri (ductal/lobular, tubular, mucinos (coloid), medular, papilar și variațiile lor [72].

În raport cu vârsta Stalsberg și coaut. (1993) au determinat, că incidența carcinomului ductal invaziv este constantă, frecvența celui papilar și mucinos crește pe măsura îmbătrânirii, iar posibilitatea de a dezvolta un carcinom medular sau inflamator scade odată cu vârsta [232]. Incidența carcinomului lobular și tubular este în creștere până la 50 ani, după care rămâne constantă. O recentă corelație vârstă – tip histologic a fost determinată de Anderson și coaut. (2004), care au stabilit, că incidența carcinomului ductal, lobular, tubular, mucinos și papilar crește constant odată cu vârsta, iar tipurile medular și inflamator au incidență maximă la 50 ani,

stabilizată ulterior la acest nivel [9]. Mortalitatea cea mai înaltă se determină în cazul carcinomului inflamator, urmată pe locul 2 de tipul ductal invaziv [138]. Conform statusului hormonal, carcinoamele lobular, ductal/lobular și mucinos cel mai frecvent sunt ER⁺/PR⁺, iar comedo ER⁻.

Ellis I.O. (1992) a raportat că tipurile tubular, cribriform, mucinos de carcinom invaziv au un pronostic favorabil [70]. Pronosticul carcinomului lobular depinde de subtip. Astfel varianta mixtă, tubulo-lobulară și carcinomul invaziv papilar sunt asociate cu un pronostic general mai bun decât carcinomul ductal clasic [83]. Totodată, forma solidă a carcinomului lobular, carcinomul invaziv ductal clasic și carcinomul invaziv mixt ductal-lobular au un pronostic nefavorabil. După Li și coaut. (2005), mai agresive în evoluție la femeile în postmenopauză sunt tipurile invazive lobular și ductal/lobular [139]. Dat fiind faptul, că circa 80% din tipurile histologice întâlnite sunt ductal invazive clasice, 15% lobulare tipice și 4% mixte (ductal-lobulare) indică că în marea majoritate, diagnosticul morfologic stabilit drept carcinom mamar, are o valoare pronostică și predictivă nefavorabilă pentru pacient. Determinarea tipului histologic este recomandată de multiple consilii de specialitate, care dezvoltă algoritme și procedee de diferențiere. Însă există date care susțin, că diferențierea tipului invaziv în ductal și lobular nu are nici o valoare clinică [221, 260].

După Fritz și coaut. (2010), în pofida faptului că tipul lobular este mai frecvent întâlnit la persoanele în vârstă, iar celulele sale tumorale cu predilecție exprimă receptorii ER și PR, (în comparație cu tipul invaziv ductal, preponderent HER2⁺), aceeași autori au infirmat ipoteza privind căreia rata recurențelor locale la tipul lobular este mai mare. [86] Absența impactului clinic privind diferențierea acestor 2 subtipuri, a fost demonstrată și la nivel molecular, măsurând potențialul metastatic prin evaluarea markerilor pentru E-cadherină și TFGb [246]. Însă există și date contradictorii care subliniază capacitatea sporită de metastazare a carcinomului lobular grație inactivării genei CDH1. În scop diagnostic, absența E-cadherinei (codată de CDH1) certifică tipul lobular al tumorii [257]. Forma multicentrică a carcinomului, deși corelează cu statusul nodal, gradul histologic și dimensiunea tumorii, nu este considerată un factor de pronostic independent [178]. O altă deosebire dintre aceste 2 tipuri histologice ține de tratamentul aplicat. După Cristofanilli M. (2005), chimioterapia primară cu antraciclina și taxane este mai eficientă în formele lobulare, iar rezistența la tamoxifen este mai exprimată în subtipul lobular ER⁺, față de cel ductal ER⁺ [57, 118].

Gradul histologic reprezintă o evaluare a gradului de diferențiere (formarea de structuri tubulare, pleomorfismul nuclear) și activității proliferative (indicele mitotic) al tumorii, de fapt considerat de mulți morfologi un indice al agresivității carcinomului [70, 137]. Intru stabilirea

tacticii terapeutice, gradul histologic a fost încorporat în multiple algoritme de putere pronostică, precum NPI (Nottingham Prognostic Index) și Adjuvant! Online. Gradarea histologică s-a stabilit a avea o valoare pronostică, pacienții cu gradul G1 având o rată de supraviețuire mult mai mare comparativ cu G2 și G3. După Bassler R. (1984) rata medie de supraviețuire de 10 ani pentru G1 este de 45%, G2-27%, G3-18% [17]. Corelând tipul cu gradul histologic, s-a stabilit că gradul G3 mai frecvent se întâlnește în cazul carcinoamelor de tip medular, comedo, inflamator, iar tipurile tubular, papilar, mucinos sunt mai bine diferențiate (gradul G1 – G2) și mai rar dezvoltă metastaze[138]. Totuși eficiența utilizării gradării histologice este în mare măsură limitată de experiența morfopatologului [240].

Unul din factorii pronostici de semnificație majoră este considerat statusul limfonodal. Un argument în susținerea acestui factor este că rata de supraviețuire de 10 ani pentru pacienții cu metastaze limfonodale este de 25-30%, iar în lipsa acestora 75% [280]. Studii multiple au fost axate și pe numărul de metastaze limfonodale, creșterea cărora a determinat o corelație inversă cu rata de supraviețuire [215].

Un alt factor pronostic important s-a determinat a fi invazia vasculară a tumorii [185]. Acesta poate fi utilizat drept factor independent cu valoare predictivă și pronostică. Caracterul agresiv al tumorii este atribuit și la determinarea invaziei perineurale, iar depistarea necrozei tumorale prezice micșorarea timpului de supraviețuire și presupune dezvoltarea rezistenței la tratament [84]. După Rosen și coaut. (1989), rata recurențelor în cazul prezenței invaziei vasculare (sanguine și limfatice) este mai mare (38%) decât în lipsa acesteia (22%) [207]. Totodată, Neville și coaut. (1992) susține că invazia limfovasculară duce la creșterea recurențelor cu 15% în decurs de 5 ani, în ambele loturi de paciente, cu sau fără terapie adjuvantă [166]. Datele privind importanța pronostică a gradului de fibrozare a stromei în general și a elastozei în particular nu au găsit aplicație clinică.

În practica oncologică au fost definite 3 grupuri de risc privind posibilitatea recurențelor postoperatorii și sensibilitatea la terapia sistemică, decizionale și în selectarea tacticii terapeutice:

1. risc redus – paciente cu vârsta mai mare de 35, absența metastazelor, tumori sub 2 cm, G1, HER2 negative, în lipsa invaziei vasculare. Terapia hormonală este indicația de elecție.

2. risc intermediar – paciente la care nu s-au depistat metastaze, plus cel puțin unul din criteriile: vârsta sub 35 ani, tumori mai mari de 2 cm, G2-3, HER2 pozitive, cu invazie vasculară. O altă combinație ce definește acest grup este: 1-3 noduri limfatici cu metastaze și tumoare HER2⁺. Terapia hormonală este indicația de elecție, iar în cazul unui răspuns incert din partea tumorii, secvențial chimioterapie + terapie endocrină sau chimioterapie singură.

3. risc sporit – 1-3 noduri limfatici cu metastaze și tumoare HER2⁻ sau mai mult de 4 noduri limfatici metastazați. De elecție pentru acest grup este indicată secvențial chimioterapia + terapia endocrină sau chimioterapia singură.

Astfel, din particularitățile histologice ale carcinomului mamar au importanță clinică doar gradul de diferențiere al tumorii, prezența invaziei limfo-vasculare și a metastazei nodale. În lumina ultimelor realizări, unicul factor histologic, descris cu valoare pronostică unanim recunoscută este gradul de diferențiere a tumorii [97]. Identificarea gradului histologic 3 servește drept recomandare pentru chimioterapie. În concluzie, terapia toxică este indicată încă multor femei cărora, probabil le-ar fi fost mai bine fără tratament și sunt încă multe paciente la care în pofida tratamentului realizat se dezvoltă recurențele [47].

1.2. Clasificarea moleculară a carcinomului mamar: istoric, subtipuri, evoluție

Implementarea programelor de screening și profilaxie, precum și a noilor scheme de tratament a micșorat mortalitatea cauzată de cancerul mamar. Însă rata actuală a incidenței și mortalității oricum plasează acest tip de cancer în topul afecțiunilor maligne. O explicație plauzibilă este absența la moment a unei descrieri detaliate privind eterogenitatea biologică a carcinomului mamar, studiind simultan alterațiile moleculare, compoziția celulară și sensibilitatea la tratament.

Dat fiind faptul că, modelul histologic are utilizare pronostică limitată și absolut lipsit de valoare predictivă, „portretul” molecular al tumorii devenise o necesitate stringentă a medicinei. Procedeele moleculare au evidențiat inițial profilul genetic diferit, susținut apoi și de neomogenitatea receptorilor expresați în cadrul aceluiași tip histologic. Primul „portret molecular” a fost realizat de Perou și coaut. (2000), care au analizat paternul expresiei genetice prin utilizarea ARN-ului a 65 tumori de la 42 pacienți [180]. Analizând subseturile genetice intrinseci, caracteristice fiecărui pacient în parte, autorul a delimitat după profilul molecular al celulelor tumorale 4 grupe distincte. Acestea în continuare au fost denumite subtipuri moleculare intrinseci [180, 227].

Inițial subtipurile moleculare au fost separate în grupe în baza expresiei ER:

1. ER negative: a. Basal-like, b.ERBB2 (sau HER2⁺), c. Normal-like.
2. ER pozitive: a. Luminal sau pozitive pentru estrogen receptor.

Descoperirea devenise și mai incitantă, când Sorlie și coaut. (2003) au evidențiat valoarea pronostică diferită a fiecărui subtip, iar subtipul Luminal a fost divizat în Luminal A și B [217, 228, 263]. Grație paternului său molecular specific (ER⁻, PR⁻, HER2⁻) subtipul Basal-like a fost supradenumit inițial și Triplu-negativ. La moment însă subtipul Triplu-negativ are caracteristici

de grup și include cel puțin 4 variante distincte: Basal-like (sau core-basal), 5-NP (cu fenotip cinci negativ), Claudin-low și Apocrin-like [65, 111, 148, 189, 194, 196].

Meta-analiza vastă a expresiei genice pe 2833 cazuri de carcinom mamar a confirmat datele lui Perou și coaut. (2000), stimulând astfel studiul în practica clinică a semnăturilor genice [180, 265]. La moment sunt comercializate 2 teste genomice, Oncotype DX și MammaPrint. Ambele teste stau la baza triajelor clinice TAI-LORx (Trial Assigning Individualized Options for Treatment), MINDACT (Microarray in Node-Negative Disease May Avoid Chemotherapy) și RxPONDER (Rx for Positive Node, endocrine Responsive Breast Cancer) [36, 229].

Secvențierea genomului însă nu a primit o răspândire largă, motivul fiind eseurile laborioase și costurile prea înalte pentru practica cotidiană. Astfel s-au delimitat circa 50-semnături genice, capabile de a diagnostica subtipurile moleculare prin procedura de qRT-PCR (quantitative real time PCR). Rezultatele primite în baza studiului acestor clustere genice (denumit încă PAM50) s-au dovedit a avea un potențial predictiv net superior variabilelor clinice clasice (precum dimensiunea tumorii, statusul limfonodal, gradul histologic). În special, în cazurile ER⁺ și metastaz negative, sensibilitatea la tratament a constituit 94% [175]. Studiul genetic al tumorilor mamare se dezvoltă în continuare, determinând apariția multiplelor teste și proceduri cu rol pronostic și predictiv, precum aCGH (array-based comparative genomic hybridization), MALDi (matrix-assisted laser desorption/ionization), ca variantă a spectrometriei în masă și profilarea epigenetică, care are la bază modificarea histonelor și metilarea ADN-ului [113, 199, 208].

Deși expresia genică este considerată drept „etalonul de aur” în definirea subclaselor moleculare, s-au propus scheme de clasificare bazate pe utilizarea markerilor imunohistochimici, capabile a fi utilizate în practica cotidiană. Astfel de comun acord, în delimitarea subclaselor sunt utilizați markerii receptorilor hormonal ER, PR, citokeratinele bazale (CK5) și luminale (CK8/18), expresia receptorului HER2/neu și receptorul nuclear Ki67, drept marker cantitativ al proliferării celulare [97].

Subtipurile moleculare. În comparație cu conceptul clasic histologic, realizările contemporane privesc carcinomul mamar drept un grup de entități nozologice, ce afectează același organ și aceeași unitate anatomică. Acestea pot fi deosebite după factorii de risc, prezentare clinică, caracteristicile morfologice, răspunsul la terapie [257, 258].

În dendrograma subtipurilor propuse de Perou și coaut. (2000) se disting 2 clase majore de tumori: ER⁺ și ER⁻ [180]. Contemporan la tumorile ER pozitive se referă subtipurile Luminal A și B, la cele ER negative – HER2⁺, Basal-like și Normal-like.

Exprimarea receptorilor pentru estrogeni (în special α) pe suprafața celulelor în ierarhia celulă stem-celulă diferențiată este foarte importantă fiindcă, estrogenul reprezintă principalul agent stimulator de proliferare. La șoarece celulele stem sunt considerate drept ER negative [12]. La oameni, receptorii ER au fost determinați la stadiul de precursor comitat, caracterizat drept populație longevivă, cu activitate mitotică obișnuit diminuată [51]. Există presupunerea precum că, aceste celule la rândul lor au funcția de control al diferențierii celulelor mamare lumenale și mioepiteliale prin factori paracrini precum ar fi amfiregulina [264].

Importanța grupării după spectrul hormonal este dictată de necesitățile clinice. Astfel, pacientele în premenopauză, cu carcinom ER pozitiv beneficiază de tratament hormonal bazat pe tamoxifen cel puțin 5 ani [59]). Dezvoltarea rezistenței la tratament în cazurile ER pozitive servește drept indicație pentru utilizarea chimioterapiei.

Pentru pacientele cu tumori hormon-independente (cu ER, PR negativi) de elecție e considerată chimioterapia [69]. La femeile tinere sub 35 ani cu subtipul triplu negativ, tumoarea este mai sensibilă la terapia neoadjuvantă cu antracicline și taxane. Chimioterapia adjuvantă s-a dovedit a fi mai eficientă în cazurile ER⁻, absența recurențelor în decurs de 5 ani fiind determinată la femeile în premenopauză în 13,2% carcinoame ER⁻ și în 7,6% ER⁺. La femeile în postmenopauză, efectul chimioterapiei este mai mic, cu predilecție acționând tot în cazurile ER⁻ (9,6%) față de ER⁺(4,9%). Studiile adiacente au subliniat că, această rată de distribuție între cazurile ER⁺ și ER⁻ nu corelează cu agentul chimioterapeutic, iar la aplicare preoperatorie (terapie neoadjuvantă) efectul citotoxic este de circa 4 ori mai eficient în cazurile ER⁻ [20, 99]. Mortalitatea la femeile cu carcinom ER⁺ este constantă de-a lungul timpului, iar în grupul ER⁻ inițial înaltă, după 7-10 ani diminuează la valori mai mici comparativ cu primul grup [20, 27].

Subtipurile moleculare utilizate în practica oncologică. Pentru utilizare în practica cotidiană, sunt propuse și detaliat examinate 4 subtipuri: Luminal A, Luminal B/Ki67^{înalt}, Luminal B/HER2⁺, Basal-like [97]. Deși Parker și coaut. (2009) consideră că, subtipurile evidențiate în baza markerilor ER, PR, HER2 și Ki67 nu corespund întocmai subtipurilor intrinseci evaluate genetic, utilizarea tehnicilor imunohistochimice are o justificare economică și practică. [175] O comparație recentă a rezultatelor triajului ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) care utilizează în diagnostic procedeele genetice OncotypeDx™ și a rezultatelor obținute în urma aplicării markerilor imunohistochimici (ER, PR, HER2 și Ki67) au demonstrat o coincidență perfectă [58].

Subtipul Luminal A. Este cel mai frecvent subtip determinat, circa 40% [73]. Acest subtip poate fi caracterizat imunohistochimic drept ER și/sau PR pozitiv, HER2 negativ, cu un indice de proliferare scăzut, determinat în baza evaluării numerice a markerului Ki67. Valoarea <14% a

acestui servește drept barem de delimitare a valorilor înalte/diminuate pentru Ki67, iar gradul histologic 3 nu este echivalentul lui Ki67>14% [41, 97]. Această valoare (< 14%) se consideră că, cel mai bine corelează cu definiția Luminal A din punct de vedere al expresiei genice. Similar și pentru valoarea numerică a celulelor PR pozitive, tumoarea fiind considerată PR⁺ dacă mai mult de 20% din celule expresează receptorul dat [97, 188]. Aceasta însă este în contradicție cu recomandările ASCO (American Society of Clinical Oncology), conform căreia tumoarea poate fi considerată ER⁺, PR⁺ dacă cel puțin 1% din celule exprimă markerul receptorilor hormoni [105]. În unele studii de profil mai pot fi întâlniți markeri pozitivi improprii acestui subtip. Astfel, în 8% cazuri acest subtip s-a asociat și cu receptori pozitivi, caracteristici tipului Basal-like, cum ar fi CK5 și EGFR, fapt ce a influențat negativ pronosticul pacientelor [27]. În plus, expresia acestor markeri necesită aplicarea testelor genetice (nu tocmai ușor de accesat) pentru a delimita subtipul Luminal A de Basal-like.

Tratamentul de elecție propus pentru acest subtip este terapia endocrină. Drept indicații pentru asocierea citostaticelor de comun acord sunt considerate gradul histologic 3 al tumorii și metastaze în 4 și mai multe noduri limfatici. Vârsta sub 35 ani este considerată drept indicație la chimioterapie de 50% oncologi [97]. La femeile în postmenopauză, cu risc sporit de recurențe sunt indicați inhibitorii de aromatază și tamoxifenul. Subtipul Luminal A de rând cu Luminal B/HER2⁻ are cea mai înaltă rată de 5 ani supraviețuire – 75% [73]. Paradoxal, însă conform datelor recente subtipul Luminal A și B au cel mai înalt risc de metastazare limfonodală [277].

Subtipul Luminal B. Este considerat un subtip ER pozitiv, la care ceilalți parametri imunohistochimici, precum PR, Ki67 și HER2 nu corespund definiției de Luminal A [97]. Acest subtip este descris în circa 20% și divizat contemporan în:

1. Luminal B/HER2⁻ – corespunde definiției clasice după Perou și coaut. (2000) [180]: ER⁺, HER2⁻ plus cel puțin una din următoarele caracteristici – Ki67 mai mare de 14%, PR negativ sau mai mic de 20%. Tratamentul include terapia hormonală și citostatice, preferențial antraciline.

2. Luminal B/HER2⁺ este definit imunohistochimic precum ER pozitiv, HER2⁺ (supraexpresat și/sau amplificat), la orice valoare a lui Ki67 și PR. Tratamentul recomandat este mai frecvent combinat, indicând citostatice+tratament anti-HER2+terapie endocrină [97]. Pronosticul în acest subtip este mai rezervat în comparație cu primele două, fiind apropiat subtipului HER2⁺.

Subtipul HER2 pozitiv. HER2/neu este o proto-oncogenă care codifică sinteza unei proteine de 185 kDa, membră a familiei de receptori transmembranari tirozin-kinasici [157]. Fiind activată, această enzimă dimerizează și prin diferite căi de semnalizare inhibă apoptoza,

stimulând într-un final proliferarea celulară. În 1987 Slamon a determinat că amplificarea acestei gene corelează cu diminuarea ratei de supraviețuire [223].

Contemporan, subtipul HER2⁺ (sinonim HER2 supraexpresat sau ErbB2) este determinat în 10-15% cazuri. Este caracterizat prin expresia în abundență a receptorului HER2, care în 80% cazuri este asociată de amplificarea genei HER2 (HER2 amplicon pe cromozomul 17q12). Tipic pentru acest subtip este și mutația de genă Tp53. În restul cazurilor (20%), expresia pozitivă a HER2 este frecvent asociată cu receptorii ER și PR pozitivi, incluzând tumorile date în subtipul Luminal B-HER2⁺. Subtipul HER2⁺ se caracterizează clinic ca unul agresiv, cu recurențe frecvente și pronostic nefavorabil. Determinarea celulelor tumorale HER2⁺, contemporan este privită drept o indicație pentru utilizarea herceptinei (sau trastuzumab), indiferent dacă carcinomul este ER⁺ sau ER⁻, în combinație cu citostatice [10, 97]. Rata de 5 ani supraviețuire este de 50% [73].

Subtipul Basal-like. Este unul din cele mai studiate subtipuri, fiind denumit „Basal-like” datorită celulelor sale neoplazice care din abundență expresează gene/receptori uzual determinate în normă în celulele mamare bazale și mioepiteliale: citokeratinele cu greutate moleculară înaltă (CK5, 14, 17), P-cadherina, caveolinele 1 și 2, nestina, receptorul EGFR (factorul epidermal de creștere), CD44 [1, 101, 125, 167, 176, 195, 248]. Este important că, în procesul de tumorigeneză acest subtip poate achiziționa markeri atipici. Impropiu, dar rareori, acest subtip exprimă caracteristici epitelului luminal, precum citokeratinele 8/18 și cKit-ul (CD117), ultimul fiind frecvent întâlnit și în subtipurile luminale ER negative. În 6-29% cazuri acest subtip este și ER și PR pozitiv, iar în 9-13% poate fi și HER2⁺ [167, 190, 227]. Aceste date, au servit drept bază pentru a concluziona că subtipul Basal-like își are origine nu numai de la celula stem bipotentă, dar și de la predecesorii luminali [15, 100, 259]. Asocierea markerilor luminali și bazali este cauza apariției în literatura de specialitate a subtipului BasoLuminal [120].

Intru confirmarea diagnosticului este recomandat pe lângă receptorii hormonal și HER2 de utilizat CK5 și EGFR, care sunt caracteristic pozitivi pentru acest subtip [190]. Metoda dată (five marker method sau Core basal group) are o sensibilitate de 76% și 100% specificitate [167]. Însă, după Badve și coaut. (2011) în 18-40% cazuri carcinomul Basal-like definit după profilul genetic nu are un fenotip histochimic caracteristic acestui tip și invers 8-29% din carcinoamele Bazal-like, definite cu markeri pentru Triplu-negativ, nu coincid cu profilul genetic [15].

Definiția imunohistochimică a acestui subtip a evaluat pe parcurs, precum:

1. absența expresiei ER, PR și HER2 [180, 227];
2. expresia a uneia sau mai multe citokeratine bazale (CK5/6, CK14, CK17) [167]. Pragul de limită pentru a considera tumoarea CK5 pozitivă este >1% de celule pozitiv marcate. De

menționat că, markerul CK5 este mai sensibil în comparație cu CK5/6 în determinarea citokeratinelor bazale [24];

3. absența expresiei ER și HER2 în concordanță cu expresia pozitivă a CK5/6 și/sau EGFR [145, 167]. De menționat, că EGFR pozitiv s-a determinat în 54% cazuri în concordanță cu CK5/6 pozitiv și în 11% cazuri cu CK5/6 negativ. Prezența acestui marker (EGFR) este asociată unui pronostic nefavorabil, indiferent de statusul limfonodal;

4. absența expresiei ER, PR și HER2 în concordanță cu expresia pozitivă CK5/6 și/sau EGFR [42];

5. Definiția contemporană a subtipului Basal-like, recomandată pentru practica oncologică este: ER și PR negativ, HER2 absent [97].

Carcinoamele Basal-like în marea majoritate histologic pot fi ductal invazive de tip NST, medulare, metaplastice, secretorii, mioepiteliale sau carcinoame cistice adenoide. Relativ recent s-a determinat că rareori și celule tumorale în carcinomul lobular invaziv pot expresa citokeratina CK5/6 [76]. Subtipul Basal-like deseori se caracterizează printr-un grad histologic G3 (în 91% cazuri), un indice mitotic înalt, zone centrale de necroză, infiltrate limfocitare pronunțate, arii cu metaplazie [87, 145, 191, 200, 247]. După frecvența dezvoltării acest subtip prevalează la femeile tinere de origine africană și hispanică [38, 49, 197]. Particularitățile morfologice și imunohistochimice a acestui subtip sunt foarte asemănătoare cu tumorile derivate din culturi celulare cu mutații BRCA1 și p53 [153]. Tratamentul este bazat pe chimioterapie. Subtipul Basal-like este diagnosticat în 15-20% cazuri. Rata maximă a recurențelor se înregistrează la 3 ani, rata de 5 ani supraviețuire este de 68%, iar 65% din paciente nu dezvoltă metastaze în decursul acestor 5 ani.

Subtipuri moleculare în stadiu de cercetare

Subtipul Triplu negativ. Profilul imunohistochimic de la prima definire nu s-a schimbat, fiind caracterizat drept ER⁻, PR⁻ și HER2 negativ [180, 227, 228]. Inițial acest subtip a fost considerat drept sinonim al Basal-like. Prin utilizarea markerilor adiționali, la moment acest subtip este structurat din Basal-like, Cinci negativ (cu fenotip 5-NP) și Claudin-low. O serie de subtipuri, derivate din Triplu-negativ sunt în stadiul de descifrare genetică, precum Basal-like 1, Basal-like 2, Imunomodulator, Mezenchimal, Mezenchimal stem-like, Luminal-androgen receptor [135]. Conform autorilor, fiecărui subtip îi este caracteristic un anumit set de gene. Astfel Basal-like1 și 2, exprimă genele frecvent implicate în ciclul celular și sinteza factorilor de creștere. Subtipul Imunomodulator are la bază kitul genetic caracteristic celulelor imune, iar Mezenchimal și Mezenchimal stem-like, genele responsabile de motilitatea și diferențierea

celulară. Diferențierea ultimelor 2 subtipuri are la bază expresia diminuată a genelor de proliferare în subtipul Mezenchimal stem-like.

Subtipul Luminal-androgen receptor este caracterizat de supraexpresia ER, PR de rând cu receptorul pentru androgeni (AR). Unele clasificări/recomandări practice contemporane încă utilizează termenul de Triplu-negativ drept sinonim al Basal-like [97]. Tipic triplu-negativ, cu caracteristici histologice și genetice deosebite este considerat carcinomul cistic adenoid.

Subtipul Normal-like. Profilul molecular al acestui subtip include semnături genetice proprii fibroadenomei și mostrelor de glandă mamară în normă, țesutului adipos și matricei extracelulare, expresând în abundență laminina și integrina alpha 7 [179]. Expresia histologică frecventă este celularitatea diminuată (<50%). Tumorile acestui subgrup nu sunt încă bine definite, existând suspiciunea că, sunt de fapt un artefact de colectare și contaminare masivă a tumorii cu țesut normal [175]. După unii cercetători [111, 180, 227, 228] acesta se referă la carcinoamele ER negative, există însă și rezultate contradictorii, evidențiind tumorile date în grupul predominant ER-pozitiv [114, 144, 175]. Înregistrat în 10-15% cazuri, acest subtip exprimă CD36, alcool dehidrogenaza de tip 2, glicerol-3-fosfat dehidrogenaza, lipoprotein lipaza A, vimentină, TWIST1 [227]. Ultimii 2 markeri, vimentina și TWIST1, precum și fenotipul celulelor CD24⁻/CD44⁺ frecvent întâlnit sugerează sursa sa bazală-stem. În pofida sursei sale nediferențiate, subtipul Normal-like de rând cu Luminal A este asociat cu un pronostic favorabil, iar rata de 5 ani supraviețuire atinge 94%. [144].

Subtipul Molecular apocrin. A fost denumit grație expresiei apocrine a celulelor în preparatele histologice: citoplasmă eozinofilă, cu granulație fină, nuclei și nucleoli relativ mari. Aceste tumori frecvent au un caracter agresiv în evoluție, un grad histologic G3, prezintă invazie limfovasculară și metastaze timpurii. Diagnosticul este afirmativ în cazul dacă celulele apocrine constituie cel puțin 90% [72]. Rata acestor tumori constituie până la 4%, iar riscul de îmbolnăvire crește odată cu vârsta. Prezența fenotipului histologic specific însă nu este asigurat și de profilul imunohistochimic specific. Astfel în studiul efectuat de Lehmann-Che și coaut. (2013) tabloul histologic specific a fost determinat în doar 7% cazuri diagnosticate molecular ca molecular apocrine [136]. Acest subtip este asemănător după profil cu HER2⁺, însă specific îi este supraexpresia receptorului pentru androgeni (AR) [66, 79]. De menționat că, AR⁺ este determinat în circa 70% carcinoame mamare, deseori asociindu-se cu receptorii ER și PR pozitivi [253]. Însă după datele relatate de Celis și coaut. (2009) una din caracteristicile moleculare a acestui subtip este receptorul estrogenic negativ [39]. În tumorile hormon-independente acest receptor este determinat în circa 30%, creând dificultăți de diagnostic diferențial cu subtipurile Basal-like și HER2⁺ [173]. Activarea genomului pe secvența AR este

cauza rezistenței la hormonoterapie în cazurile ER⁺, iar supraexpresia adiacentă a HER2 în 50% cazuri rațional indică utilizarea în tratament a trastuzumabului [66, 79]. În comparație cu subtipul Molecular apocrin, Basal-like este exclus datorită absenței în 100% cazuri a expresiei AR, HER2 și GCDFP1. După Niemeier și coaut. (2010), pentru a diagnostica acest subtip este suficientă una din combinațiile de markeri: ER(-)/PR(-) /HER2(+)/AR(+) sau ER(-)/PR(-)/HER2(-)/AR(+) [168]. Însă Lehmann-Che și coaut. (2013) consideră că, afirmarea acestui subtip în baza determinării imunohistochimice a markerului AR nu este suficientă, din motivul expresiei acestuia în doar 58% cazuri de subtip Molecular aprocrin, justificat prin teste genetice [136]. Aceste date corelează cu rezultatele anterioare prezentate de Doane și coaut. (2006) [66]. Collins L.C. (2011) a determinat supraexpresia AR în 70% carcinoame mamare, iar Loibl S. (2011) susține că majoritatea sunt tumori luminale cu grad histologic diminuat [52, 147].

Conform autorilor, profilul imunohistochimic a acestor tumori trebuie completat cu markeri suplimentari și poate fi caracterizat drept ER⁻ (în 93% cazuri), PR⁻ (97%), AR⁺ (58%), FOXA1⁺ (90%) (Forkhead box protein A1), HER2⁺ (67%), GCDFP1⁺(57%), EGFR⁻(70%) CK5/6⁻ (89%), CK17⁻ (95%) [136]. Specificitatea markerului FOXA1 (factor ce facilitează recrutarea ER și AR) este limitată din motivul expresiei pozitive a acestuia în 30% de carcinom Basal-like. Nu este strict specific nici markerul GCDFP15 (produs ce rezultă în urma acțiunii AR asupra genei PIP- prolactin induced protein), determinat pozitiv în ambele grupe de carcinom, hormon-dependent și independent. Recent Lehmann B.D. (2011) a descris un nou subtip „Luminal androgen receptor pozitiv” în componența grupului Triplu-negativ [135]. Caracteristica imunofenotipică a acestuia însă este identică cu a subtipului Molecular apocrin. Aceasta indică că subtipul dat încă nu este clar definit ca entitate nozologică, iar aplicarea în practică este prea timpurie.

Subtipul „Interferon-rich”. Acest subtip este derivat al grupului Triplu-negativ, caracterizat în surplus și prin supraexpresia genelor reglate de interferon, cum ar fi STAT1 [114]. Are un pronostic relativ mai bun în comparație cu subtipurile Basal-like și HER2⁺ [239].

Subtipul „Claudin-low”. Herschkowitz și coaut. (2007) au comparat profilul genetic al carcinomului mamar uman cu tumorile derivate la șoareci genetic modificate [111]. Astfel a fost determinat un subtip intrinsec, potențial nou, caracteristic căruia îi sunt expresia diminuată a Claudin-genelor, necesare în definirea joncțiunilor strânse și adeziunilor celulare. Nivelul expresiei genelor răspunzătoare de proliferare este slab pronunțat, poziționând acest subtip între Basal-like, HER2⁺, Luminal B pe de o parte și Luminal A, Normal-like pe de alta. Aceasta a sugerat clasificarea tumorii date în categoria de „slow cycling tumors” (tumori cu ciclu celular încetinit) [189]. De menționat că majoritatea tumorilor corespondente la șoareci erau cu

deficiențe genetice BRCA1 și p53. De la descoperire, acestui subtip i s-au atribuit particularități transcriptomice caracteristice pentru un cancer derivat din celule stem [110, 111]. Actual, profilul molecular este definit precum ER⁻, PR⁻, HER2⁻, CDH1^{low/-}, CLDN^{low/-}, CK8/18⁻, CK5/6⁻, E-cadherin⁻, frecvent CD44⁺. Important e faptul că în 15-25% cazuri acest subtip este și ER și PR pozitiv [190]. Componentul infiltrativ limfocitar bine dezvoltat este susținut de prezența în abundență a markerilor proprii B și T limfocitelor, precum CD4 și CD79a. De rând cu Claudina, component necesar joncțiunilor intercelulare, acest subtip pierde și E-cadherina. Aceste caracteristici genetice ar induce presupunerea că subtipul Claudin-low histologic corespunde carcinomului lobular invaziv. Morfologic însă paternul este mai frecvent ductal invaziv, metaplastic și medular, însoțit de infiltrate limfocitare abundente și grad histologic G3 [189].

După Perou și coaut. (2011), subtipurile intrinseci reflectă celulele mamare oprite în diferențierea sa epitelială la un anumit stadiu [181]. Astfel, conform autorilor subtipul Claudin-low este tumoarea, celulele căreia manifestă cea mai mare similaritate cu celulele stem mamare. În favoarea acestei presupuneri pledează faptul că, subtipul Claudin-low de rând cu cel Normal-like expresează în abundență aldehyd dehidrogenaza 1 (ALDH1), caracteristică celulelor stem mamare normale și tumorale [93, 201]. Datele experimentale susțin că, acest tip de carcinom conține în abundență și celule stem CD44^{high}/CD24^{low/-}. Analizând genomul acestor celule, s-a determinat semnătura genetică responsabilă de inițierea creșterii tumorale, care prin surprindere conține multiple gene proprii celulelor mezenchimale, precum ZEB2 și TWIST1. Expresia ultimei (TWIST1) în abundență este considerată drept cauza represiei E-cadherinei [55, 181]. Sursa sa de origine precoce (celula stem) este un impediment în diagnosticul diferențial a acestui subtip cu tumorile stromale.

Frecvența acestui carcinom este de 12-14% [190]. Ignorarea acestuia în practica cotidiană rezultă prin rata mai mare a subtipului Basal-like. Pronosticul pentru acest subtip este mai nefavorabil în comparație cu Luminal A sau are aceleași valori ca și în cazul Luminal B, HER2 și Basal-like [190]. Tratamentul este limitat la chimioterapie. Datele preliminare privind sensibilitatea la terapia adjuvantă plasează acest subtip intermediar, între Basal-like și subtipurile Luminale [189].

Subtipul cu fenotip 5-negativ (5-NP). Profilul molecular al acestui subtip include: ER, PR, HER2, CK5/6 și EGFR negativi. Supraviețuire de 5 ani ating 50% din paciente [73]. În pofida faptului că acest subtip a fost reprezentat în majoritate de tumori G2, autorul susține că, pronosticul în cazul 5-negativ este mai rezervat decât în subtipul Basal-like. Aceasta însă este în contradicție cu rezultatele publicate anterior [27, 42]. Cel mai probabil, în viitor la utilizarea

markerilor adiționali acest subtip va fi clasificat în subtipuri adiționale din care cauză este denumit adițional „neclasificat”, denumire inițial atribuită și subtipului Normal-like.

Diferențierea carcinomului mamar în subtipurile moleculare Luminal A, Luminal B/HER2⁺, Luminal B/HER2⁻ și Basal-like are și neajunsuri, care îi limitează utilizarea clinică:

- din toate subtipurile propuse, la moment doar diagnosticul de Basal-like (core basal) are o valoare predictivă;

- metodele utilizate de diverse grupuri de cercetare în delimitarea subtipurilor nu sunt ajustate, standardizate, prezentând divergențe în modelarea cercetărilor și taxonomie. Astfel 25% din tumorile ER⁺ în clinică sunt reevaluate și catalogate drept non-luminale în urma procedurilor genetice [175].

- un șir de profiluri moleculare sunt încă în stadiul de cercetare, altele, precum Normal-like pe cale de a fi excluse;

- dat fiind faptul că, diferențierea carcinomului întrunește multiple stadii, clasificarea carcinomului mamar după profilul hormonal este bi-modală (ER^{+/-}) și nu reflectă toate subtipurile posibile;

- pragul de definire a tumorii drept pozitivă/negativă în funcție de numărul celulelor ER, PR imunomarcate variază în limite largi (1-20%). Aceasta permite comutarea subtipului din grupul ER⁺ în ER⁻, astfel schimbând ușor subtipul și esențial pronosticul și tratamentul;

- subtipurile nu sunt stabile. Fiecare subtip este bine definit imunohistochimic, însă de rând cu calitățile clasice sunt și excepții, nu tocmai în favoarea dezvoltării nozologice a subtipurilor moleculare.

O altă clasificare a subtipurilor moleculare este prezentată de Blows și coaut. (2010) (Fig.1.1.). Astfel carcinomul mamar, similar viziunii clasice a lui Perou C.M. (2000) este divizat în baza expresiei receptorilor ER și PR, în luminal (hormon-dependent, ER⁺, PR⁺) și non-luminal (hormon-independent, ER⁻, PR⁻) [180]. La următoarea etapă ambele subgrupe sunt cercetate la expresia receptorului HER2, evidențiind cazurile pozitive și negative. La etapa a 3 sunt evaluați receptorii CK5/6 și EGFR, divizând cazurile în basal pozitive și negative. Conform acestei viziuni se deosebesc 8 subtipuri de carcinom:

1. Luminal/HER2⁻/basal⁻ – acesta corespunde subtipului Luminal A. În cercetarea dată acest subtip a constituit 92% din totalitatea cazurilor subgrupului Luminal/HER2⁻.

2. Luminal/HER2⁻/basal⁺ – în acest subtip se încadrează tumorile care de rând cu hormon-receptorii prezintă și unul din receptorii proprii celulelor bazale. Aici perfect se încadrează cele 6-29% excepții a subtipului Basal-like clasic prezentate mai sus [167, 190, 227]. În studiul dat, frecvența acestui subgrup a constituit 8% [27].

3. Luminal/HER2⁺/basal⁻ – descrierea imunofenotipică corespunde subtipului Luminal B/HER2⁺ clasic.

4. Luminal/HER2⁺/basal⁺ – acest subtip prezintă receptori din toată linia de diferențiere mamară.

5. Non-Luminal/HER2⁺/basal⁻ – echivalent după descriere cu subtipul clasic HER2⁺. După autor constituie 6% din cazuri.

6. Non-Luminal/HER2⁺/basal⁺ – acest subtip este constituit din celule cu receptorii Core basal și HER2 pozitivi. Aici se încadrează cele 9-13% cazuri inexplicabile de Sorlie (2001) pentru subtipul Basal-like [227].

7. Non-Luminal/HER2⁻/basal⁺ – este echivalentul subtipului Basal-like, expresând doar CK5/6 și EGFR. Din totalul (16%) cazurilor grupului Non-luminal-HER2⁻ (sinonim triplu negativ în varianta clasică) acesta constituie 58%, iar din tot lotul de studiu –9%.

8. Non-Luminal/HER2⁻/basal⁻ – corespunde subtipului 5-NP (toți cinci markeri sunt negativi). În subgrupa Non-luminal-HER2⁻ acesta constituie 42%, iar din cohorta totală –7%.

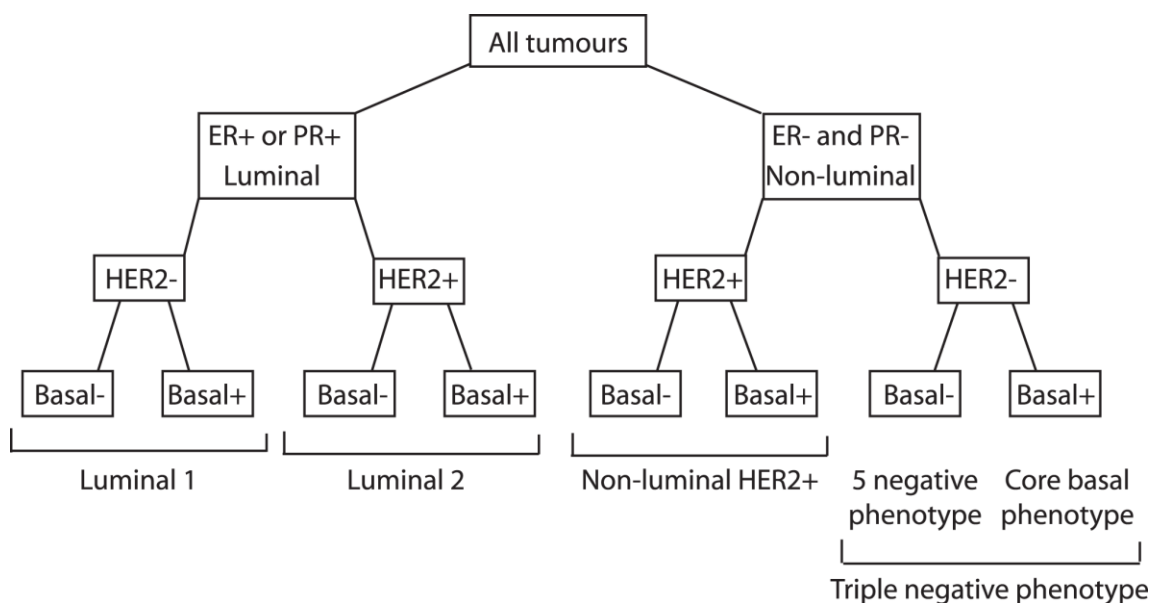


Fig.1.1. Clasificarea subtipurilor de carcinom mamar în dependență de profilul imunohistochimic (Blows, 2010) [27].

Acest concept de clasificare a subtipurilor moleculare privește procesul de diferențiere a epiteliului mamar ca unul dinamic, iar procesul de carcinogeneză poate surveni la oricare din ele. Un neajuns al acestei clasificări este absența estimării ratei de proliferare a celulelor tumorale apreciată în grupul Luminal cu markerul Ki67.

Originea carcinomului mamar. Un șir de rezultate presupun, că clasificarea histologică a carcinomului reflectă în special diferențierea tumorală și nu histogeneza [100, 101, 159, 279].

Adepii divizării moleculare a carcinomului mamar subliniază implicarea histogenetică a noii clasificări. Sorlie și coaut. (2001) au sugerat că, subtipurile Luminale și Bazale de carcinom derivă corespunzător din celulele mamare luminale și bazale [227]. Astfel s-a delimitat o nouă direcție de studiu, axată pe determinarea sursei de dezvoltare a carcinomului mamar [252]. Deși ipoteza privind existența celulelor stem canceroase mamare există de mai multe vreme, izolarea și caracterizarea acestora a fost posibilă relativ recent [233]. Teoria dată (*cancer stem cell theory*) declară că, în tumoare există un grup mic de celule responsabile pentru inițierea și proliferarea tumorii, în rest tot componentul celular al tumorii are un potențial tumorigen diminuat. Altfel spus, doar o mică populație celulară din carcinomul mamar are capacitatea de a se autoreînnoi și reconstitui în totalitate tumoarea primară [202].

Originea celulară a celulelor canceroase mamare nu este încă bine determinată, fiind propuse 2 ipoteze. Prima susține că, eterogenitatea carcinomului mamar este rezultatul diferitor tipuri de oncogene, activate în celula stem mamară. Astfel, activarea oncogenei X va rezulta cu subtipul Bazal, a oncogenei Y – subtipul ErbB2, oncogenei Z – subtipul Claudin-low, tumor supresor X – Luminal A, tumor supresor Y – Luminal B.

A 2-a teorie presupune dezvoltarea celulelor tumorale din progenitorii celulari pe parcursul diferențierii. Celula mamară stem este presupusa sursa pentru subtipul Bazal și Claudin-low, celula progenitoare Luminal-comitată poate dezvolta subtipurile Luminale și ErbB2. Celula progenitoare mioepitelial-comitată ar putea să dezvolte varianta Claudin-low.

Corelând rezultatele analizelor genetice, transcriptomice s-au determinat un șir de particularități comune pentru carcinoamele ductal invaziv tip NST de grad G1, lobular invaziv, tubular, cribriform și tubulo-lobular, deoarece:

1. Au aceeași prezentare clinică, în pofida descrierii histologice diferite;
2. Au aceeași grupă de leziuni preinvazive (precum hiperplaziile atipice, carcinoamele in situ);
3. Au imunofenotip similar: obișnuit sunt ER și PR pozitive, nu expresează HER2;
4. Au același patern de aberații genetice: deleții la 16q, cuplate cu surplusuri 1q și 16p, grație translocațiilor cromozomiale dezechilibrate;

Aceste date au servit drept bază de a susține că, formele histologice sus-numite au drept origine același grup de progenitori – low grade breast neoplasia family (familia neoplaziei mamare de grad diminuat) [2, 3].

O altă ipoteză ține de transformarea malignă a celulei stem mamare normale (MaSC). Existența MaSC a fost presupusă și ulterior dovedită în multiple cercetări [127, 141, 218]. S-a izolat o clasă de celule CD44^{high}/CD24^{low/-}, capabile de a genera tumori la implantarea a cel puțin

200 celule la șoarece imun-compromis. Această activitate tumorigenă se păstra și după multiple pasaje [6]. În contrast, celulele canceroase la care absentează semnătura CD44^{high}/CD24^{low/-} nu erau capabile de a genera tumori la orice populație numerică. Balic și coaut. (2006) au determinat celule cu astfel de fenotip în măduva osoasă a pacientelor cu cancer mamar, sugerând că, CD44^{high}/CD24^{low/-} este un marker al activității metastatice sporite [16]. Numeric această populație constituie 0,6-5% din totalul celulelor tumorale și este caracterizată prin rată sporită de proliferare și motilitate celulară înaltă [6, 220].

Semnătura genică a celulelor cu astfel de fenotip a corelat surprinzător atât cu rata totală de supraviețuire, cât și cu perioada de absență a recurențelor. Astfel s-a presupus că, cuantificarea celulelor stem mamare canceroase ar avea o valoare pronostică [143]. Izolarea cantitativă prin citometrie de flux a celulelor stem mamare a fost posibilă cu descoperirea enzimei intracelulare aldehiddehidrogenaza 1 (ALDH1), drept marker specific celulelor stem. Ginestier și coaut. (2007) susțin că, celulele stem ALDH1⁺ cu fenotip CD44^{high}/CD24^{low/-} posedă un potențial tumorigen crescut [93]. Determinarea celulelor ALDH1⁺ s-a dovedit a fi de importanță practică, tumorile cu astfel de patern fiind asociate cu grad histologic 3 și pronostic nefavorabil. Mai mult, subtipurile bazale, care sunt în special triplu-negative conțin un număr net superior de celule stem mamare canceroase față de alte subtipuri [174, 201]. Neumeister și coaut. (2010) au determinat recent că, coexpresia ALDH1, CD44 și citokeratinelor pledează pentru un pronostic nefavorabil [165]. Tumorile ALDH1⁺ sunt relativ rezistente la chimioterapia secvențială cu paclitaxel și epirubicină, iar rata numerică a acestor celulelor chiar crește după terapia neoadjuvantă [237].

Drept marker prospectiv al MaSC poate fi considerat și CD49f, nivelul sporit al căruia în carcinomul mamar corelează cu rata de supraviețuire redusă. Utilizând 2 markeri de suprafață EpCAM și CD49f, Lim și coaut. (2009) au determinat 3 populații celulare derivate MaSC în glanda mamară normală [141]:

1. MaSC/celule bipotente, cu fenotip CD49f^{high}/EpCAM⁻;
2. Celule progenitoare luminal-comitate, caracterizate după markeri ca CD49f⁺/EpCAM⁺;
3. Celule mature ER⁺/luminale cu fenotip CD49f⁻/EpCAM⁺.

Autorii au demonstrat că, celulele progenitoare luminal-comitate sunt foarte asemănătoare după profilul genetic cu tumorile mamare Basal-like. Mai mult, această subpopulație a prezentat o expansiune aberantă a mutațiilor BRCA1, prezența cărora denotă un risc sporit (80%) de dezvoltare a neoplasmului. După Prat și coaut. (2010), comparând ierarhia de dezvoltare a epitelului glandular mamar cu subtipurile carcinomului, cel mai aproape de MaSC/bipotente este subtipul Claudin-low [189]. Utilizând dubla imunofluorescență cu pancitokeratină, drept

marker epitelial și vimentina în calitate de marker mezenchimal, s-a determinat o colorare dublă în 85% din subtipurile Claudin-low și Basal-like. Aceasta a permis autorilor să susțină că, celulele tumorale din subtipurile menționate sunt de natură epitelială cu proprietăți mezenchimale reziduale.

Celula progenitoare luminal-comitată este presupusa sursă de dezvoltare pentru Basal-like și HER2⁺, subtipurile luminales având drept sursă celulele mature ER⁺/luminales. Mai puțin este cunoscut, în această ierarhie, despre celulele mioepiteliale. Visvader J.E. (2009) susține că precursorul celulei mioepiteliale derivă din celula MaSC/bipotentă înainte ca aceasta să devină luminal comitată, fără a evidenția careva corelații cu subtipul Claudin-low [252].

După Creighton C.J. (2012) dezvoltarea diverselor subtipuri moleculare e posibilă pe 2 căi [56]:

A. Modelul „evoluției liniare” – mutațiile genetice secvențiale pot conduce la dediferențierea treptată a celulei luminales până la subtipul Basal-like;

B. Modelul „căilor distincte de progresie” – o celulă luminală normală este convertită într-un subtip anumit datorită unei mutații specifice (Fig.1.2.).

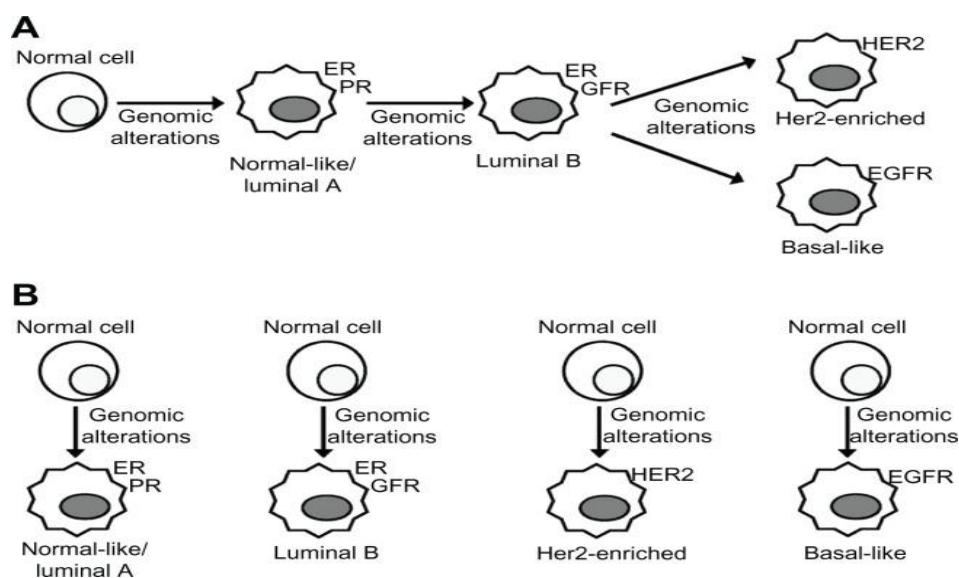


Fig.1.2. Originea subtipurilor moleculare de carcinom mamar, după Creighton C.J. (2012) [56].

Aberațiile genetice și subtipurile moleculare. Tumorigeneza este un proces multistadial ce include diferite alterații genetice, calitative și cantitative, precum și alterări epigenetice, cum ar fi metilarea ADN-ului și modificarea proteinelor histone. Studiile în domeniu caracterizează carcinomul mamar drept foarte eterogen la nivel de genom, iar cercetările bazate pe hibridizarea genomului au demonstrat diferențe genetice între subtipurile moleculare. Depleția la cromozomul 16q este considerată drept eveniment precoce în gradul histologic G1. Astfel

Roylance și coaut. (1999) au demonstrat absența brațului lung al cromozomului 16 în 65% carcinoame ductal invazive G1, ER⁺ și în 16% G3, ER negative [209]. Acest patern al depleției a stat la baza concluziei precum că, majoritatea tumorilor G1 nu progresează pe parcursul evoluției bolii în G3, fiindcă aceasta necesită restabilirea materialului genetic pierdut. Depleția dată este specifică în majoritate carcinomului lobular infiltrativ și ductal invaziv G1. Un surplus de material genomic la nivelul cromozomului 6 (6p21-p25) a fost citat drept caracteristic tumorilor ER⁻ și subtipurii Basal-like [19]. Faptul că, profilul genetic presupune și un anumit subtip molecular este demonstrat de Sorlie T. (2003), punând în evidență mutațiile BRCA1 mai frecvent în tipul Basal-like și BRCA2 în cele luminales [228]. Lim E. (2009) însă contestă, susținând că mutațiile BRCA1 sunt mai curând specifice celulelor progenitoare comitate, decât celulelor stem bazale [141]. După Prat A. (2011) mutațiile BRCA1 sunt cel mai frecvent înregistrate în subtipul Basal-like (67%), posibile în 22% de Claudin-low, 5,5% în HER2⁺ și 5,5% în subtipul Normal-like [190].

Mutațiile TP53 sunt frecvent întâlnite în grupul ER⁻, în special în 90% de Triplu-negativ și 50% din subtipurile Molecular apocrin [136].

1.3. Epidemiologia chimiorezistenței la terapie și perspectivele terapiei personalizate

Incidența cancerului mamar în lume a înregistrat în ultimii 4 ani o creștere de circa 20%, iar mortalitatea de 14%. În 140 de țări ale lumii (din 184) această tumoare reprezintă cel mai frecvent tip de cancer diagnosticat la femei, care are și cea mai mare rată (16%) în structura mortalității. Cancerul de sân ocupă locul 2 în Republica Moldova, după cel colorectal, înregistrând cote de circa 12% din totalul tumorilor maligne diagnosticate. Multipli factori de risc au fost identificați, precum vârsta, statusul socioeconomic, arealul geografic, stilul de viață, anamneza eredocolaterală agravată, radiația ionizantă, densitatea țesutului osos, nivelul sporit de IGF-1 și prolactină, precum și utilizarea contraceptivelor [62, 67, 115]. În pofida multiplelor realizări, terapia de succes rămâne a fi o provocare pentru contemporaneitate.

Tratamentul cancerului de sân include procedee chirurgicale, tratament sistemic și radioterapie. Tratamentul sistemic contemporan include agenți citotoxici, hormonali și imuni, indicați în componența terapiei adjuvante și neoadjuvante.

Tratamentul adjuvant este recomandat pacientelor cu risc semnificativ de recurențe după rezecția chirurgicală primară a tumorii și nodurilor limfatici axilari, în scopul de a diminua posibilitatea dezvoltării micrometastazelor. Multiplele studii au demonstrat că, acest tip de terapie crește cu circa 11% rata supraviețuirii de 10 ani la pacientele aflate în premenopauză și 3% la cele în postmenopauză. Antracilinele sunt administrate cu predilecție, iar suplimentarea

cu taxane crește rata supraviețuirii în cazurile „lymph-node” pozitive [109]. Asocierea hormonoterapiei aduce un beneficiu la circa 2/3 paciente cu tumori hormon-pozitive. Tamoxifenul este drogul de elecție administrat pacientelor în premenopauză, iar inhibitorul aromatazei, anastrozolul s-a dovedit a fi mai efectiv în postmenopauză [33].

Terapia sistemică neoadjuvantă este considerată drept standard de tratament pentru cazurile avansate, inclusiv pentru cele cu un component inflamator pronunțat. Răspunsul la terapia neoadjuvantă, în tumoarea primară și în metastaze corelează cu rata de supraviețuire [82]. Rata răspunsului pozitiv (rata remisei patologice complete) la terapia neoadjuvantă variază în limitele 6-15% la utilizarea antraciclinelor și circa 30% în cazul taxanilor [18, 33, 112]. După Goldhirsch și coaut. (2003) terapia neoadjuvantă nu are careva avantaje față de cea adjuvantă, grație absenței datelor comparative privind rata de supraviețuire [97].

Astfel utilizarea terapiei sistemice paliative în carcinomul mamar este una provocătoare. Circa 5% din cazurile noi au metastaze dezvoltate, iar la 30% din cazurile tratate au fost înregistrate recurențe [116, 186]. Procesul metastatic odată dezvoltat, micșorează drastic rata de vindecare. Astfel, supraviețuirea de 5 ani s-a raportat la doar 20% paciente, iar media duratei de supraviețuire constituie 1-2 ani [37]. Chimioterapia este indicată la circa 60% din paciente cu cancer mamar incipient, reducând cu 1/3 riscul metastazelor la distanță [53].

Descoperirile recente în tehnologiile moleculare pot fi considerate drept bază pentru dezvoltarea a unei noi viziuni în managementul tumorilor, denumită medicină personalizată. Aceasta descifrează biologia tumorilor prin analiza structurii genomului în scopul descoperirii grupelor de risc, precum și alegerea unui tratament efectiv, cu incidență minimă a reacțiilor adverse. Dezvoltarea acestei ramuri nu numai că influențează direct cercetarea și practica clinică, dar promovează integrarea cunoștințelor teoretice și practice spre binele pacientului. Astfel, medicina personalizată are următoarele sarcini:

1. evaluarea șanselor pentru o persoană de a dezvolta cancer și selectarea strategiilor de screening pentru diminuarea acestui risc;
2. alegerea unui tratament mai potrivit cu diminuarea riscului de dezvoltare a reacțiilor adverse;
3. de a prezice riscul recurențelor.

Răspunsul la un anumit medicament deseori este foarte diferit chiar și în grupe bine ajustate, după criterii de vârstă, statusul hormonal și profilul molecular. Divergențele au la bază mecanisme farmacocinetice și farmacodinamice individuale fiecărui pacient. Farmacogenomica, ramură a medicinei personalizate, are ca scop determinarea acestor particularități prin studiul genomului, evidențiind posibilitatea apariției rezistenței la tratament și evitarea acesteia astfel

maximalizând beneficiul terapeutic [236]. Cea mai frecventă variație genomică determinată, este polimorfismul uninucleotidic și interesează un singur nucleotid, A, T, C sau G, observată la doi pacienți diferiți sau pe cei doi cromozomi omologi ai unui individ. Tehnologia modernă „DNA microarrays” este capabilă să determine aceste variații cu acuratețe, catalogându-le apoi în calitate de markeri cu funcție predictivă [219].

Medicina personalizată are ca scop nu numai selecția tratamentului adecvat, dar presupune și o putere predictivă în apariția rezistenței la anumit tratament a unui pacient anumit. Sunt propuse un șir de teste genetice, precum:

1. Mammostrat – un test multigenic, capabil de a prezice apariția recurențelor precoce la prescrierea tratamentului hormonal pacientelor în postmenopauză, tumori hormon-dependente, fără metastaze.

2. MammaPrint – un test ce evaluează expresia a 70 de gene, implicate în ciclul celular, invazie, metastazare, angiogeneză. Acest test este destinat pacientelor tinere, delimitând 2 grupe: cu risc minor și risc major de dezvoltare a metastazelor la distanță.

3. OncotypeDX – un test de diagnostic bazat pe studiul a 21 gene, ce prevede calcularea scorului de recurențe RS (recurrence scor) ca un indicator cu valoare pronostică în tumori ER pozitive, fără metastaze. Evidențierea pacientelor cu risc sporit presupune folosirea precoce a chimioterapiei, pacientelor cu risc minor sugerând doar terapie hormonală.

4. CompanDX – este un test diagnostic capabil de a prezice posibilitatea și timpul de metastazare după tratament chirurgical sau biopsie.

Astfel, definiția clasică „o doză pentru toți, o doză la tot” decenii aplicată în farmacologie și practica clinică s-a dovedit a fi ineficace în carcinomul mamar [230]. În pofida realizărilor tehnice rata medie a efectului pozitiv în cancer este evaluată la doar 25%. Aceasta sugerează concluzia că 75% din pacienți pe lângă problemele de sănătate cauzate de boală vor avea de suferit și din cauza efectelor adverse, deseori toxice, dezvoltate la dozele sporite ale medicamentelor. În plus, și aspectul economic, în relația cost-eficiență nu este tocmai în favoarea tratamentului clasic.

Medicina personalizată își propune de a structura subseturi eterogene de pacienți în baza unui răspuns similar la tratamentul efectuat. Un postulat fundamental al medicinei personalizate este „tratament potrivit, la timp potrivit, persoanei potrivite”. Această definiție poate fi aplicată în lumina ultimelor realizări genetice, delimitând factori de valoare pronostică și predictivă.

Un factor pronostic este asociat cu o influență semnificativă statistică asupra supraviețuirii generale, fie a supraviețuirii pentru o anumită perioadă a vieții pacientului fără semne clinice de boală. Un exemplu clasic este numărul de noduri limfatici invadați, un număr mare fiind asociat

cu o supraviețuire redusă. Însă acest factor are un impact minim privind alegerea tacticii terapeutice, incapabil totodată de a prezice și răspunsul la tratament. De-a lungul anilor decizia de a efectua un tratament sistemic a avut la bază un șir de factori, precum dimensiunile tumorii, gradul și tipul histologic, invazia limfovasculară, vârsta, etnia, factori buni pentru perioada dată, ineficienți la etapa contemporană.

Un factor predictiv este definit ca orice variabilă asociată unui anumit răspuns, pozitiv sau negativ, după o anumită terapie. Un exemplu de factor predictiv elocvent este prezența la suprafața celulelor tumorale a receptorilor hormonal, ER și PR, fapt ce permite indicarea hormonoterapiei. Există și factori a căror valoare are semnificație atât pronostică, cât și predictivă. Drept exemplu servește statusul hormonal ER, PR și expresia receptorului HER2. Demonstrat e faptul, că pacientele cu tumori hormon-pozitive au o rată de supraviețuire mai mare, decât cele cu ER⁻ și PR⁻ [98]. Pe de altă parte, cercetările randomizate au demonstrat eficiența tamoxifenului la prezența receptorilor hormonal [69]. Asemănător este descris și statusul tumorilor HER2 pozitive, având pe de o parte semnificație pronostică nefavorabilă, care totodată are și rol predictiv în răspuns la terapia țintită cu blocanți ai factorului de creștere epidermal.

Astfel realizările contemporane sugerează utilizarea în diagnostic și tratament a profilurilor moleculare, genetice proprii fiecărui pacient, iar în cazul carcinomului mamar terapia personalizată poate fi structurată în bază ultimelor realizări conform [45, 121]:

1. Prezența mutațiilor BRCA1, BRCA2, CDH1, CHEK2, PTEN, p53, ATM. Depistarea acestor aberații genetice este asociată cu un risc sporit de dezvoltare a carcinomului. Însă datele contemporane nu presupun o terapie țintită. În asemenea cazuri este indicată o supraveghere mai riguroasă a potențialelor paciente în vederea depistării tumorii la stadii precoce. Prezența mutațiilor BRCA1/2 este considerată drept contraindicație a procedurii chirurgicale „breast-conserving therapy” [97].

2. Expresia pozitivă a receptorului hormonal ER. Terapia țintită include:

a. Modulatorii selectivi ai receptorului ER, care își exercită funcția prin blocarea receptorului dat, ceea ce previne influența stimulatorie, proliferativă a estrogenului asupra celulei tumorale. Tamoxifenul este cel mai frecvent utilizat. Este un pro-medicament, metabolizat de citocromul P450 în 2 metaboliți activi: 4-hydroxi tamoxifen (4OH-TAM) și 4-hidroxi-N-desmetil-tamoxifen (sau endoxifen). Inactivarea acestor metaboliți are loc datorită citocromului CYP2D6. Polimorfismul uninucleotidic determinat include variații alelice ce determină nivel diminuat de citocrom P450, și în consecință nivel scăzut de metaboliți activi, fie mutații ce sporesc activitatea CYP2D6, la fel micșorând efectul terapeutic. Intru evitarea unui tratament

inutil cu modulatori ER, este propus testul AmpliChip CYP450, capabil să determine circa 27 variante de gene CYP2D6 (codifică citocromul P450), implicate în dezvoltarea rezistenței la tratament hormonal.

O altă cauză de rezistență la tamoxifen este domeniul ESR1/ESR2 ce codifică ținta acestui medicament, receptorul ER. Discutabil este rolul deleției ER d5, determinată atât în carcinom, cât și în glanda mamară intactă. A fost determinat că, recurențele timpurii, la 1 an de la începutul tratamentului sunt asociate cu expansiunea clonală a celulelor tumorale ce posedă deleții ER d5 [89]. Drept cauză a rezistenței la tamoxifen este și amplificarea genetică a Cyclin D1 și PAK1 (p21-activated kinase 1) implicate în activarea expresiei receptorului ER, precum și supraexpresia p53 [150]. Aceste amplificări corelează cu riscul crescut de recurențe și micșorarea ratei de supraviețuire, în special la pacientele în premenopauză [118, 124].

b. Antagoniști ai receptorului ER. Fulvestrant (sau Faslodex) are drept indicație carcinomul mamar metastatic, la femeile în postmenopauză, la ineficiența terapiei antiestrogenice cu alte preparate.

c. Inhibitori mTor. Everolimus (sau Afinitor), este indicat în carcinomul metastatic avansat, HER2 negative, la femeile în postmenopauză, în combinație cu Exemastan sau la ineficiența Anastrozolului și Letrosolului.

Drept țintă a inhibitorilor de aromatază servește enzima din familia citocromoxidazelor, codificată de gena CYP19A1, denumită și gena-aromataza. Expresia acesteia variază în limite largi în funcție de etnie. Activitatea sporită a aromatazei necesită creșterea dozei de inhibitori, astfel sporind riscul apariției reacțiilor adverse musculoscheletale [103]. Nu este încă complet definită tactica terapeutică a tumorilor hormon-pozitive în postmenopauză. Dacă tratamentul a fost început cu inhibitori de aromatază, este recomandat ca după 2 ani să fie schimbată pe tamoxifen și invers, inhibitorii sunt recomandați să substituie tamoxifenul după 5 ani în cazurile metastaz-pozitive.

3. Supraexpresia HER2/neu sau tumorile HER2 pozitive. HER2 face parte din familia HER de tirozin-kinaze, clasificate în: HER1 (sau EGFR), HER2, HER3, HER4. Blocarea lui HER2 la nivel de genă și/sau receptor, blochează proliferarea și induce apoptoza. În tumori HER2⁺ sunt indicați:

a. Anticorpi monoclonali umanizați:

- Trastuzumab (Herceptin), are drept țintă domeniul extracelular HER2, astfel prevenind activarea acestuia. Este indicat în combinație cu citotoxicele în terapia adjuvantă și a metastazelor. Din păcate, nu toate cazurile HER2⁺ răspund la tratament cu trastuzumab. Mai mult, tumorile metastatice inițial sensibile, deseori devin rezistente. Combinarea trastuzumabului

și lapatinibului face posibil de a evita dezvoltarea rezistenței [26]. Amplificarea genei HER2 se determină în 10% cazuri carcinom ER⁺, ce presupune utilizarea de rând cu tratamentul hormonal și a Herceptinei. Însă, astfel de tumori (ER⁺-HER2⁺) se caracterizează prin incidența înaltă a recurențelor. Studiile HERA și PHARE nu au elucidat careva beneficii la schimbarea duratei de tratament, astfel cura de 12 luni fiind de comun acceptată [97, 187].

- Trastuzumab-emtansin (T-DM1), este un anticorp conjugat cu Mertansin, un agent inhibitor de sinteză de microtubuli. Este indicat în tratamentul carcinomului metastatic, anterior tratat cu trastuzumab și/sau taxani.

- Pertuzumab (Perjeta), fixându-se de domeniul extracelular HER2, previne dimerizarea acestuia. Are drept indicație carcinomul metastatic HER2⁺, în combinație cu Trastuzumab și Docetaxel, cu condiția lipsei unui tratament anti-HER2 sau citostatic antecedent.

b. Inhibitori de tirozin-kinază. Lapatinib (sau Tykerb) este mai efektiv în combinație cu Capecitabin în carcinomul metastatic HER2⁺, rezistent la antraciline, taxani și Trastuzumab. Acționează asupra domeniului intracelular al receptorului HER2.

4. Carcinomul metastatic, avansat, cu inflamație și subtipurile triplu negative au drept indicație chimioterapia. Agenții utilizați cu predilecție sunt taxanii și antracilinele, urmați de alcaloizii de Vinca și derivații de platină.

Tratamentul personalizat contemporan, în funcție de subtipurile moleculare, acceptabil în practica cotidiană poate fi divizat, precum [97]:

1. Luminal A: terapia endocrină este considerată de elecție pentru acest subtip. Însă, asocierea cel puțin a unuia din următorii factori, precum vârsta sub 35 ani, gradul histologic 3, metastaze în 4 noduri și mai mulți, recomandă combinarea citostaticelor. Dat fiind faptul că, aceste tumori sunt deseori refractare la chimioterapie, nu există o opinie unanim acceptabilă privind agentul citotoxic de elecție.

2. Luminal B. În cazurile HER2⁻ – terapie hormonală în combinație cu chimioterapia, în HER2⁺ – asocierea de citotoxice (în special antraciline, în cel puțin 6 cicluri) + anti-HER2 + tratament hormonal.

3. HER2⁺. În pofida faptului că acest subtip este bine definit molecular, tratamentul nu este unificat. Astfel, dacă pentru unii prezența supraexpresiei sau amplificării HER2 este indicație absolută pentru terapie anti-HER2, există opinii ce iau în considerație și dimensiunea tumorii mai mare de 5 mm în combinație cu HER2⁺. Tactica terapeutică include anti-HER2+citotoxice+tratament hormonal. În chimioterapie sunt recomandate ca bază taxanii, apoi antracilinele.

4. Basal-like: tratament citotoxic, bazat pe antraciline și taxani.

Din cele expuse rezultă că, medicina personalizată în carcinomul mamar poate fi considerată la moment în faza sa incipientă de dezvoltare. Un șir de studii corelează fenotipurile moleculare și beneficiile diverselor combinații de agenți terapeutici, dar sunt încă în faza evaluărilor clinice (MINDACT, TAILOR, RxPONDER). Dat fiind natura multifactorială a acestui carcinom, sunt propuse un șir de medicamente „țintite” asupra diverselor mecanisme moleculare [133, 155, 210].

Grație rolului important al angiogenezei în dezvoltarea, invazia și metastazarea tumorii sunt propuse un șir de medicamente capabile de a bloca această proprietate a neoplasmului. Categoriile de droguri cu efect anti-angiogenic sunt:

1. inhibitori de metaloproteinaze matriceale: Marimastat, BAY 12-9566, CGS27023 A;
2. cu acțiune asupra factorilor endoteliali: Bevacizumab, SU5416, Angiozyme, Suramin;
3. inhibitori ai proliferării și migrării celulelor endoteliale: Antiintegrin avb3 Mab, TNP-470;
4. inhibitori tirozin-kinazici: SU011248 (Sunitinib Malate), PTK787/ZK (Vatalanib);
5. agenți cu diverse mecanisme de acțiune: Endostatina, Talidomidul, Inhibitori COX-2 (Celecoxib), Antiestrogeni.

Unul din cei mai promițători agenți contemporani este Bevacizumabul, un anticorp monoclonal cu acțiune asupra factorului de creștere a endoteliului vascular VEGF-A. Utilizarea *solo* a acestuia în tratamentul carcinomului metastatic a fost raportată inițial cu 9,3% răspuns pozitiv, iar în combinație cu Vinorelbina în 31% a stopat progresia tumorii. Asocierea cu Capecitabina în tumorile refractare la antraciclina și taxani a determinat un răspuns pozitiv la circa 19% pacienți, însă s-a asociat cu reacții adverse frecvente precum hipertensiunea, proteinuria, trombembolii [210]. Aceleași reacții au fost înregistrate și la combinație cu Paclitaxel, unde la 28% pacienți tumoarea a fost sensibilă la tratament [155].

Studiile *in vitro* au raportat nivelul crescut de HIF-1 α (hypoxia-inducible factors1 α) și VEGF în culturile celulare mamare HER2⁺ [133]. Presupunerea că, HER2 este implicat în reglarea VEGF sugerează combinarea Bevacizumabului și Trastuzumabului în tratamentul subtipului HER2⁺.

Colaborarea receptorilor VEGF-EGFR este considerată una din cauzele rezistenței la tratament anti-EGFR, iar combinația acestuia cu Bevacizumab ar presupune evitarea dezvoltării tumorilor refractare la tratament [50]. Însă expresia VEGF nu este o indicație obligatorie pentru terapia anti-angiogenică cu Bevacizumab. Demonstrat e faptul, că acționând în calitate de mitogen, VEGF este esențial în fazele precoce ale carcinogenezei, fenotipul vascular al tumorii în stadiile avansate fiind susținut de FGFb, TGFb-1 (transforming growth factor beta-1), PLGF

(placenta growth factor), PDEGF (platelet derived endothelial growth factor), ținte potențiale noi în terapia carcinomului mamar [275].

O altă „țintă” de viitor este țesutul adipos, considerat drept sursă de celule stem și sinteză locală de estrogeni. Un șir de glitazone (Rosiglitazon, Pioglitazon) stimulează expresia adiponectinei, cunoscută drept adipokină cu efect antiproliferativ asupra celulelor tumorale [274].

Deși EGFR (HER1) nu este un receptor specific celulelor bazale/stem, acest marker este frecvent utilizat în delimitarea subtipurii Basal-like de alte fenotipuri triplu-negative. Expresia înaltă a acestui receptor a încurajat utilizarea acestuia drept „țintă” a Cetuximabului, un anticorp monoclonal umanizat, precum și a inhibitorilor de tirozin-kinază, Gefitinib și Erlotinib [167]. În subtipurii Basal-like, asociat cu mutații BRCA promițător sună rezultatele utilizării combinate a BSI-201 (PARP inhibitor) cu Gemcitabina/Carboplatina.

1.4. Studiul comparativ al tumorii primare și metastazelor limfonodale. Importanța microambianței.

Carcinomul mamar este o entitate nozologică, constituită din subtipuri, care în pofida sursei comune sunt histologic și molecular foarte variate. În intenția de a defini fiecare tumoare, majoritatea studiilor sunt axate pe structurarea detaliată a sursei, a tumorii primare. După cum a fost menționat anterior, unul din indicii de importanță pronostică, furnizat de diagnosticul morfologic clasic rămâne a fi statusul limfonodal, numărul de noduri afectați corelând cu pronosticul nefavorabil. Recent, în urma triajelor clinice IBCSG 23-01 (International Breast Cancer Study Group trial 23-01) și ACOSOG Z0011 (American College of Surgeons Oncology Group Z0011) s-a concluzionat, că prezența micrometastazelor în noduri limfatici santinelă nu este o indicație pentru intervenție axilară, fiindcă utilizarea chimioterapiei și/sau radioterapiei postoperatoriu va distruge celulele tumorale restante [88, 94]. Această concluzie are la bază afirmația lui Perou și coaut. (2000), potrivit căreia „programul molecular” al tumorii primare se menține și la nivelul metastazelor [180]. Altfel spus, dacă profilul molecular al tumorii primare are o anumită valoare predictivă, aceasta automat se va atribui și metastazei sale.

Pe de altă parte există un șir de evidențe care subliniază, că profilul molecular al celulei metastatice nu este stabil în timp. Astfel Falck și coaut. (2013) consideră că, fenotipul carcinomului nu este stabil pe parcursul evoluției, prezentând diferențe de subtip între tumoarea primară și metastaza limfonodală la 11% pacienți [77]. Însăși Prat și Perou (2011) au descris, că carcinomul mamar este celular neomogen, iar unele celule, în special cu fenotip-stem (CD44⁺/CD24⁻) sunt mai rezistente la terapie și mai activ metastatic [190].

Un alt punct de vedere ce descrie instabilitatea moleculară a tumorii presupune că, odată cu blocarea receptorului ER, celula canceroasă drept răspuns de acomodare la tratament își schimbă calea pentru supraviețuire. Astfel au fost raportate un șir de cazuri de „shift” – transfer a tumorii de la subtip ER⁺ la HER2⁺ și invers, drept răspuns la tratamentul efectuat [54, 268].

La pacienții cărora s-a administrat tratament bazat pe inhibitori de aromatază recent s-au descris mutații la nivel de genă-ESR1, care codifică domeniul de fixare (ligand-binding domain) a receptorului pentru estrogeni și dezvoltă rezistență la tratament hormonal [117, 140, 204, 244]. Important însă este faptul că, aceste mutații s-au determinat doar la nivelul metastazelor limfonodale (la 6 din 11 pacienți), în tumoarea primară fiind absente.

În contextul eterogenității carcinomului mamar studiile de profil sugerează că, microambianța tumorală are un rol important în comportamentul neoplasmului. Celulele tumorale și stromale interacționează reciproc în favoarea creării unui mediu favorabil pentru proliferare, angiogeneză, stimulează formarea de proteaze necesare în degradarea țesuturilor adiacente. Acești factori în totalitate sporesc invazia vasculară și au un impact direct asupra pronosticului.

Stroma carcinomului mamar aparent pare a fi diferită de stroma glandei mamare în normă. Clasic, leziunile stromale sunt descrise prin alterări a stromei laxe, bogate în acid hialuronic, și a stromei intercelulare dense, abundentă în collagen și laminină. Studiile recente prezintă că structura matricei extracelulare variază în dependență de subtipul molecular și are o valoare clinică importantă. În baza a 26 gene stromale, Finak și coaut. (2008) au propus un factor predictiv (stroma-derived prognostic predictor) capabil de a separa carcinoamele mamare în grupuri după rata de supraviețuire, independent de alți markeri cu valoare pronostică [81]. Pe de altă parte, Farmer și coaut. (2009) au descris, că expresia a 50 de gene stromale nu corelează cu pronosticul, însă supraexpresia genelor stromale are o valoare predictivă în favoarea chimiorezistenței la tratament neoadjuvant cu 5-fluorouracil, Epirubicină și Cyclophosphamid [78].

După Weber F. (2006), microambianța tumorală nu numai că are semnificație genetică diferită în funcție de fenotipul carcinomului, dar și promovează transformările neoplazice [256]. Amin și coaut. (2006) consideră că rolul patofiziologic în tumorogeneză a ambianței este evident grație numărului local major de adipocite și fibroblaste, considerate drept sursă locală de estrogeni [8]. Această concluzie este susținută și de datele epidemiologice, care prezintă obezitatea drept unul din factorii de risc pentru dezvoltarea carcinomului mamar. Un șir de alți factori solubili, generic denumiți adipokine (leptina, adiponectina, TNF- α , interleukina 6), sintetizate de țesutul adipos sunt implicate endocrin, paracrin și autocrin în interacțiunile tumoro-

stromale, prin modularea proliferării, apoptozei și angiogenezei [90, 249, 270]. Obezitatea corelează și cu apariția rezistenței la tratament cu tamoxifen la pacientele în postmenopauză [269].

Un rol major în tumorigeneză îl au și fibroblastele. Evaluând răspunsul transcripțional a fibroblastelor normale și din leziune, Chang și coaut. (2005) au selectat un grup de gene denumit „wound-response signature” [40]. Prezența acestei semnături genetice în tumoare, corelează cu metastaze frecvente și micșorarea ratei de supraviețuire, indiferent de subtipul molecular.

Macrofagele, celule frecvent întâlnite în stroma mamară au un rol definit de multiple cercetări în favoarea progresiei neoplasmului. Astfel, influxul de macrofage în tumoare este asociat de O'Brien J. (2009) cu un pronostic nefavorabil [171]. După Xuan și coaut. (2014) numărul sporit de macrofage în stroma tumorală corelează pozitiv cu dimensiunea tumorii, prezența metastazei limfonodale, apariția rezistenței la tratament și obezitatea [269]. Macrofagele intratumorale promovează procesul metastatic prin secreția factorilor proangiogeni (precum VEGF) și supresează răspunsul imun mediat T-celular [170].

Un rol controversat a fost atribuit limfocitelor intratumorale. Studiile au demonstrat că având funcție de apărare, ele exercită o influență contrară opusă, de stimulare a progresiei tumorale [108]. După Muenst și coaut. (2013), prezența limfocitelor este asociată cu un pronostic nefavorabil [161]. Aceste rezultate corelează cu datele clasice, unde evoluția carcinomului inflamator este caracterizată drept una agresivă. Comparând profilul numeric al subpopulațiilor limfocitare în tumoarea primară și noduri limfatici neafecțați nu s-au determinat diferențe cantitative, la ambii poli prevalând numeric T helperii CD4⁺. Contrar, la dezvoltarea metastazelor în noduri limfatici domină T supresorii CD8⁺. Conform datelor literaturii, numărul crescut de T limfocite CD8⁺ este asociat unui pronostic favorabil în cazul tumorilor ER negative, iar combinația limfocit CD8⁺- tumoare ER⁺ este în defavoarea pacientei. Totodată, prezența în tumoare a infiltratului T citotoxic este considerat de unii autori drept un factor predictiv pozitiv pentru chimioterapie [226].

1.5. Concluzii la capitolul 1

1. Cancerul de sân este o problemă de importanță majoră în sănătatea publică mondială. Tratamentul clasic al carcinomului mamar, bazat mai mult pe statistică, în care aspectul histologic clasic al tumorii are doar o valoare pronostică și nu una predictivă, servește drept imbold pentru studiul complex al unei serii vaste de markeri celulari.
2. Managementul pacientelor cu carcinom mamar este încă ghidat de particularitățile clinicopatologice, de indici histopatologici, cu funcție pronostică, precum dimensiunea

tumorii, gradul histologic, prezența metastazelor limfonodale și invazia limfo-vasculară. În pofida multiplelor cercetări în domeniul geneticii, doar 3 markeri (ER, PR și HER2) au semnificație predictivă și sunt de comun acord utilizați în definirea tacticii terapeutice.

3. Receptorii pentru estrogeni, progesteron sunt indici predictivi în terapia endocrină, iar markerul HER2 (receptor la factorul de creștere epidermal uman 2) drept țintă moleculară anti-HER2. Acești markeri sunt implementați în practica oncologică în combinație cu alți receptori în calitate de ghiduri (drept exemplu St Gallen, 2013), fie sunt incluși în algoritme multivariabile (precum Adjuvant!Online).
4. Carcinomul mamar este o entitate nozologică eterogenă, caracterizată prin aberații genetice și mecanisme intra/extracelulare specifice, grupate în subtipuri moleculare intrinseci, imunohistochimic identificabile. Tratamentul contemporan se axează pe identificarea subtipurilor moleculare, iar delimitarea acestora este faza incipientă de realizare a unui tratament personalizat în carcinomul mamar.
5. Multe date ale literaturii sunt contradictorii, datorită eterogenității histologice și genetice a carcinomului mamar, a originii celulare variate, a structurii moleculare a subtipurilor care nu întocmai corespunde rezultatelor imunohistochimice. Un alt factor este și numărului mic de markeri aprobați pentru diagnostic. Deși unele scheme de tratament au fost publicate drept eficiente, nu există încă potențial teoretico-practic suficient pentru realizarea terapiei individualizate.
6. În pofida multiplelor studii, cât și rezultatelor chimioterapiei de durată, circa 30% din pacienți diagnosticați cu forme precoce de carcinom mamar dezvoltă recurențe în evoluția bolii, cota majoră revenind cazurilor cu metastaze limfonodale dezvoltate. Rezistența la tratament este multifactorială, deseori imprevizibilă, cel mai probabil datorat multiplelor subtipuri de carcinom mamar.
7. Rezultatele privind stabilitatea moleculară a tumorii în procesul de metastazare sunt controversate. Nu sunt date exhaustive referitor la evoluția subtipului molecular al metastazei comparativ cu tumoarea primară. Existența schimbului de profil molecular la metastazare are o valoare pronostică și predictivă majoră.
8. Microambianța are o influență substanțială în dezvoltarea tumorii. Marea majoritate a datelor indică rolul stimulator, pro-tumoral al celulelor stromale. Este bine studiată influența celulelor stromale asupra tumorii primare și practic absentează surse ce ar evidenția rolul ambianței limfonodale în evoluția metastazelor.

2. MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE

2.1. Generalități referitor la obiectul de studiu

Implementarea programelor de screening și profilaxie, precum și a noilor scheme de tratament a micșorat mortalitatea cauzată de cancerul mamar. Însă rata înaltă a incidenței și mortalității oricum plasează acest tip de cancer în topul afecțiunilor maligne. O explicație plauzibilă este absența la moment a unei descrieri detaliate privind eterogenitatea celulară a carcinomului mamar, care ar reflecta simultan profilul molecular și componența celulară. În plus, la momentul definirii scopului și obiectivelor acestui studiu nu existau date exhaustive, concludente referitor la influența microambianței limfonodale asupra profilului molecular al metastazelor de carcinom mamar. În calitate de ipoteză că metastazele ar putea fi diferite de tumoarea primară au servit evidențele clinico-patologice, care au semnalat caracterul agresiv al carcinoamelor cu infiltrat limfocitar.

Lucrarea a fost realizată la Catedra de histologie, citologie și embriologie, având în calitate de consultanți științifici: Șaptefrați Lilian, dr. hab. șt. med., conferențiar universitar (specialitatea 311.02 – Anatomie patologică) și Raica Marius, dr., profesor universitar (UMF „Victor Babeș”, Timișoara, România).

2.2. Caracteristica materialului inclus în studiu

În calitate de obiect de studiu a servit materialul biologic (tumoarea primară și metastaza limfonodală) prelevat postoperatoriu în incinta IMSP Institutul Oncologic din RM pe parcursul anilor 2013-2014 de la 161 paciente cu vârsta cuprinsă între 33-86 ani. Au fost selectate cazurile diagnosticate cu carcinom mamar invaziv de tip ductal NST sau lobular, fără chimio- sau radioterapie premergătoare. Cazurile control (n=18) au fost prelevate în incinta Centrului de Medicină Legală din RM, de la femei aparent sănătoase, cu vârsta 22-84 ani, decedate accidental. Caracteristica detaliată a materialului biologic prelevat, după tipul și gradul histologic este redată în Tabelul 2.1.

2.3. Metode de cercetare

Procesarea primară a materialului biologic a fost identică la toate speciemenele. Țesuturile prelevate au fost fixate timp de 24-48 ore în formalină tamponată 10%, PH 7,2-7,4. Materialul a fost inclus în *Paraplast High Melt* (Leica Biosystems). Intru evitarea divergențelor posibile legate de procesarea materialului, tumoarea primară și metastaza limfonodală au fost incluzionate în același bloc (Fig.2.1). Secțiunile seriate (realizate cu microtomul *Shandon, HM355S Automatic Microtome*, Thermo Scientific, USA) cu grosimea de 3-5 microni au fost etalate pe lame silanate (S3003, Dako, Denmark).

Tabelul 2.1. Caracteristica materialului biologic: numărul de cazuri examinate morfologic și imunohistochimic.

| Tipul carcinomului | | Grad | HE | ER | PR | AR | Ki67 | HER2 | CK5 | EGFR | BCL2 | p53 | E-cadh |
|-----------------------|---------------------|------|-------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Ductal invaziv | | G1 | 6 | 6 | 6 | 0 | 6 | 6 | 6 | 2 | 5 | 5 | 6 |
| | | G2 | 90 | 90 | 90 | 8 | 69 | 90 | 86 | 37 | 50 | 52 | 87 |
| | | G3 | 47 | 47 | 47 | 7 | 41 | 47 | 45 | 30 | 39 | 40 | 45 |
| Lobular invaziv | | G1 | 2 | 2 | 2 | - | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | | G2 | 6 | 6 | 6 | 1 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | | G3 | 10 | 10 | 10 | - | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| CAM* | Tumoarea primară | 22 | 22 | 22 | - | 22 | 22 | 22 | 22 | - | - | - | - |
| | Metastaza | 22 | 22 | 22 | - | 22 | 22 | 22 | 22 | - | - | - | - |
| Norma | | | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 |
| Total | | | 223 | 223 | 223 | 34 | 196 | 223 | 217 | 107 | 130 | 133 | 174 |
| | | | 1881 | | | | | | | | | | |

*CAM – implant pe membrana corioalantoidă, E-cadh – E-cadherin.

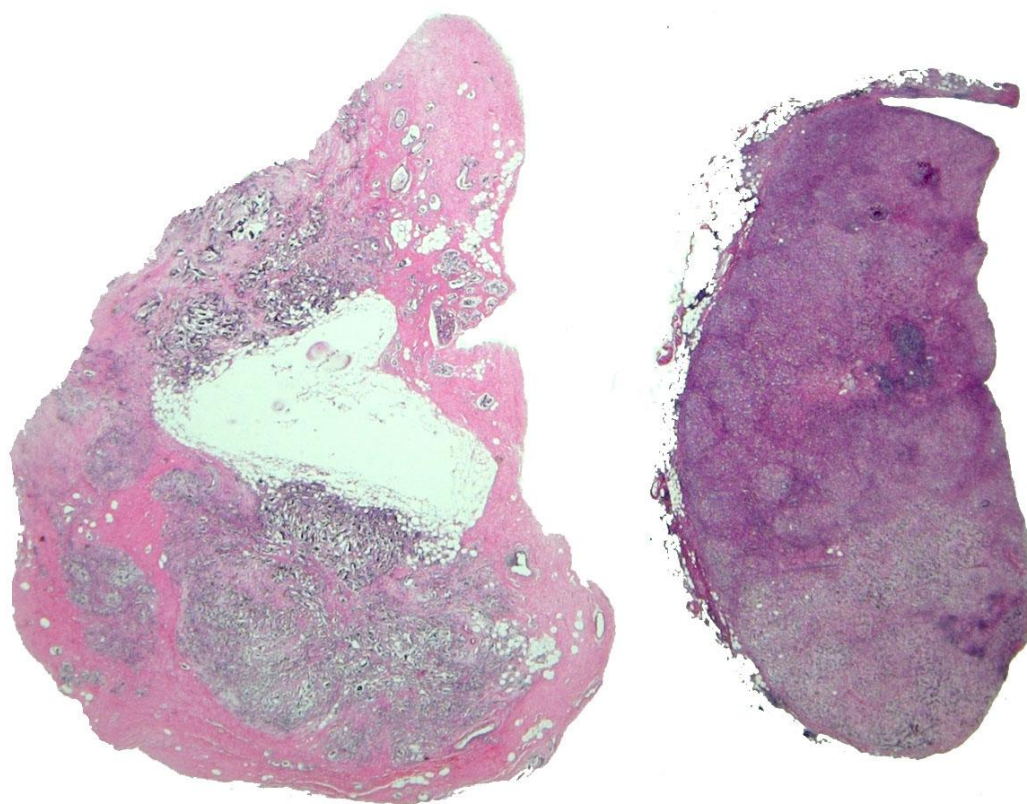


Fig.2.1. Amplasarea concomitentă pe lamă a tumorii primare și metastazei sale limfonodale, HE, x10.

2.3.1. Metoda histologică. Toate secțiunile au fost colorate inițial prin metoda clasică, cu hematoxilină-eozină utilizând hematoxilină *Harris* (HHS32, SigmaAldrich) și eozină *CS701* (Dako, Denmark). În lotul cu patologii mamare s-a determinat tipul și gradul histologic al carcinomului, prezența metastazelor în noduri limfatici axilari ipsilaterali. Gradarea histopatologică am realizat-o folosind sistemul Scarff-Bloom-Richardson, recomandat de OMS (2003), care include [72]:

A. formarea structurilor tubulare (ca expresie a diferențierii glandulare):

1. în majoritatea tumorii (>75%)- 1 punct
2. în 10-75% suprafață – 2 puncte
3. mai puțin de 10% sau absent – 3 puncte

B. Pleomorfismul nuclear:

1. nuclei mici, cu variații minime de formă și mărime – 1 punct
2. nuclei cu variație moderată de mărime și formă – 2 puncte
3. nuclei cu variație marcată de mărime și formă – 3 puncte

C. Figuri mitotice (la obiectiv Plan Fluor 40x/0,75 WD-0,44) - media calculată la 10 câmpuri):

1. până la 5 mitoze în câmpul de vedere – 1 punct
2. 6-10 mitoze – 2 puncte
3. mai mult de 11 mitoze – 3 puncte

Gradarea carcinomului (suma A+B+C):

G1 (tumoare înalt diferențiată) – 3-5

G2 (tumoare cu grad mediu de diferențiere) – 6-7

G3 (tumoare slab diferențiată) – 8-9

2.3.2. Metoda imunohistochimică. Toate procedeele de deparafinare, demascare și vizualizare s-au efectuat automat, utilizând *Leica Bond-Max* (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) autostainer: deparafinarea în 2 băi de *Bond Dewax Solution* (cod AR9222) a 5 minute fiecare, urmată de 3 băi în alcool de 100%, 90% și 70% de 2 minute fiecare, finisate cu rehidratare de 5 minute în apă. Pentru blocarea activității peroxidazei endogene secțiunile au fost tratate timp de 5 minute cu Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution (S2023, Dako). Contracolorarea nucleilor s-a efectuat cu hematoxilină *Mayer*, modificată după *Lille* (HMM500, ScyTek Laboratories, Inc.). Ulterior piesele histologice au fost deshidratate manual în serii crescute de alcool etilic (70-100%), clarificate cu xilen și montate. Pentru montarea pieselor am folosit soluția *Leica CV Mount* (Leica Biosystems, cod 14046430011). Descrierea detaliată a

anticorpilor utilizați, precum și a sistemelor de demascare și vizualizare este redată în Tabelul 2.2.

Tabelul 2.2. Caracteristica anticorpilor, sistemele de demascare și vizualizare utilizate în studiu

| | Structura depistată /Clona anticorpilor | Sursa/timp de incubare/diluția | Sistemul de demascare antigenică/timp incubare | Sistemul de vizualizare/timp incubare |
|-----|---|---|--|---|
| 1. | Er/6F11 (cod PA0151) | Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK/15 min/RTU | *Bond Epitope Retrieval Solution1, (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK)/20 min/RTU | *Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), 15 min/RTU |
| 2. | Pr/16 (cod PA0312) | | | |
| 3. | Multi-cytokeratin/ (AE1/AE3) (cod PA0909) | | | |
| 4. | EGFR/ EGFR.25 (cod EGFR-384-R-7-CE) | | | |
| 5. | AR/AR441 | Dako Glostrup Denmark/30 min/1:75 | *Dako EnVision™ Flex Target Retrieval Solution, High pH/20 min/ diluat 1:50 pe apă distilată | *Dako Real™ EnVision™ Detection Kit,/30 min |
| 6. | HER2 / Polyclonal rabbit anti-human c-erbB-2 oncoprotein (cod A0485) | Dako Glostrup Denmark /30 min/1:800 | *Dako EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH/20 min/97 °C | |
| 7. | Ki67/K2 (cod PA0230) | Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK/15 min/RTU | *Bond Epitope Retrieval Solution2, (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK)/20 min/RTU | *Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), 15 min/RTU |
| 8. | CK5/ XM26 (cod PA0468) | | | |
| 9. | E-cadherin /36B5 (cod PA0387) | | | |
| 10. | p53/DO-7 (cod PA0057) | Novocastra, Newcastle Upon Tyne, UK/15 min/RTU | | |
| | | Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK/15 min/RTU | | |

Tabelul 2.2. Continuare.

| | Structura depistată /Clona anticorpilor | Sursa/timp de incubare/diluția | Sistemul de demascare antigenică/timp incubare | Sistemul de vizualizare/timp incubare |
|-----|---|---|--|---|
| 11. | Bcl2 /(<i>bcl-2/100/D5</i>) (cod PA0117) | Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK/15 min/RTU | *Bond Epitope Retrieval Solution2, (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK)/20 min /RTU | *Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), 15 min/RTU |

**Bond Epitope Retrieval Solution1* (cod AR9961) – sistem de demascare prin încălzire, având la bază tampon citrat cu pH6.0; *Bond Epitope Retrieval Solution2* (cod AR9640) – sistem de demascare prin încălzire, bazat pe soluție de EDTA pH9.0; *Bond Polymer Refine Detection System* (cod DS9800) – sistem polimeric complex de vizualizare, care include DAB (3,3'-diaminobenzidină tetrahidroclorid hidrat) în calitate de cromogen; *Dako EnVision™ Flex Target Retrieval Solution, High pH* (cod K8004) – sistem de demascare prin încălzire, având la bază soluție tampon Tris/EDTA pH9.0; *Dako EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH* (cod K8005) – sistem de demascare prin încălzire, cu bufer citrat pH6.1; *Dako Real™ EnVision™ Detection Kit* (cod K5007, modificare K5007Env) – sistem polimeric complex (dextran+peroxidază) de vizualizare, include DAB (3,3'-diaminobenzidină tetrahidroclorid hidrat) în calitate de cromogen.

2.3.3. Metode de cuantificare. Cuantificarea celulelor marcate cu ER, PR, AR și Ki67 a fost efectuată în baza metodei semiautomate propuse de Suciu și coaut. (2014) [235]. Această metodă constă în cuantificarea a cel puțin 10 câmpuri la obiectiv x40 cu cel mai înalt număr de celule tumorale marcate (sau cel puțin 1000 celule tumorale total), finalizată prin evaluarea mediei în procente. Intru ușurarea evaluării numerice, câmpurile tumorale s-au fotografiat, iar imaginile au fost inversate în programul *NIS-elements D2.30* (Nikon Instruments Europe BV) (Fig.2.2, 2.3).

Cuantificarea am efectuat-o la microscopul *Nikon Eclipse 80i*, cu cameră video ajustată *Nikon DS-Fi1* (Nikon Instruments Europe BV). Imaginile de ansamblu au fost obținute la stereomicroscopul *AxioZoom.V16*, obiectiv *PlanNeoFluar Z1x/0,25*, cu cameră video *AxioCam MRc* (Carl Zeiss, Germany).

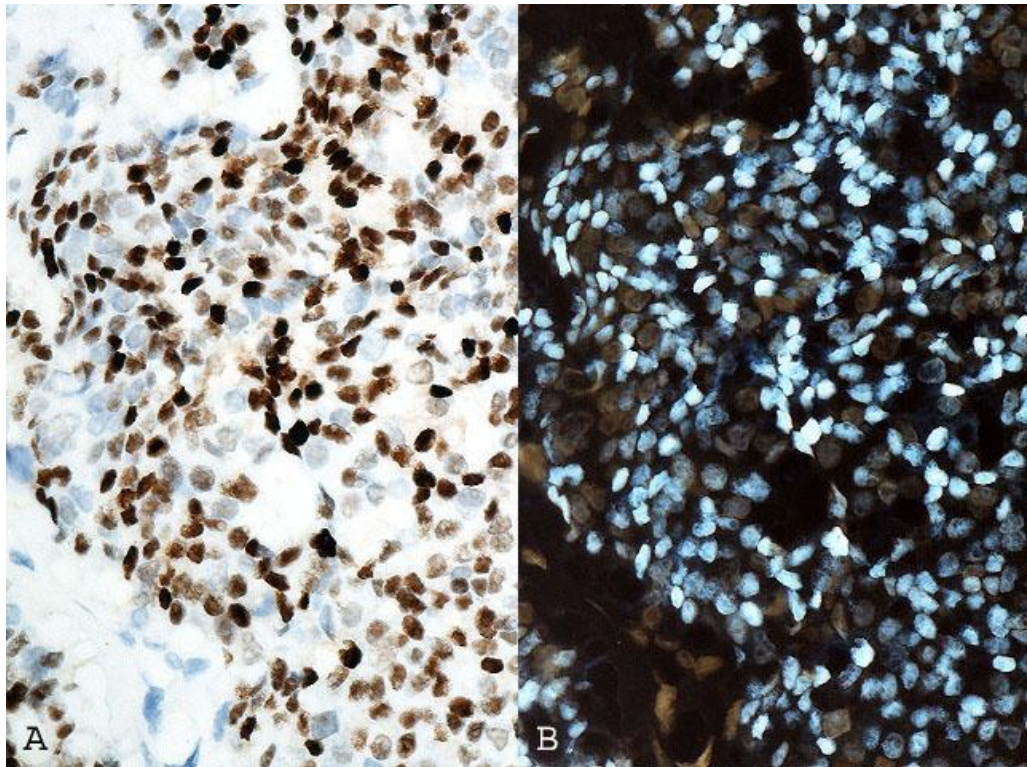


Fig.2.2. Carcinom mamar invaziv ductal de tip NST. Celule tumorale marcate la receptorul pentru progesteron, contracolorare cu hematoxilină *Lille* (A); aceleași celule inversate în programul *NIS-elements D2.30* (B), x400

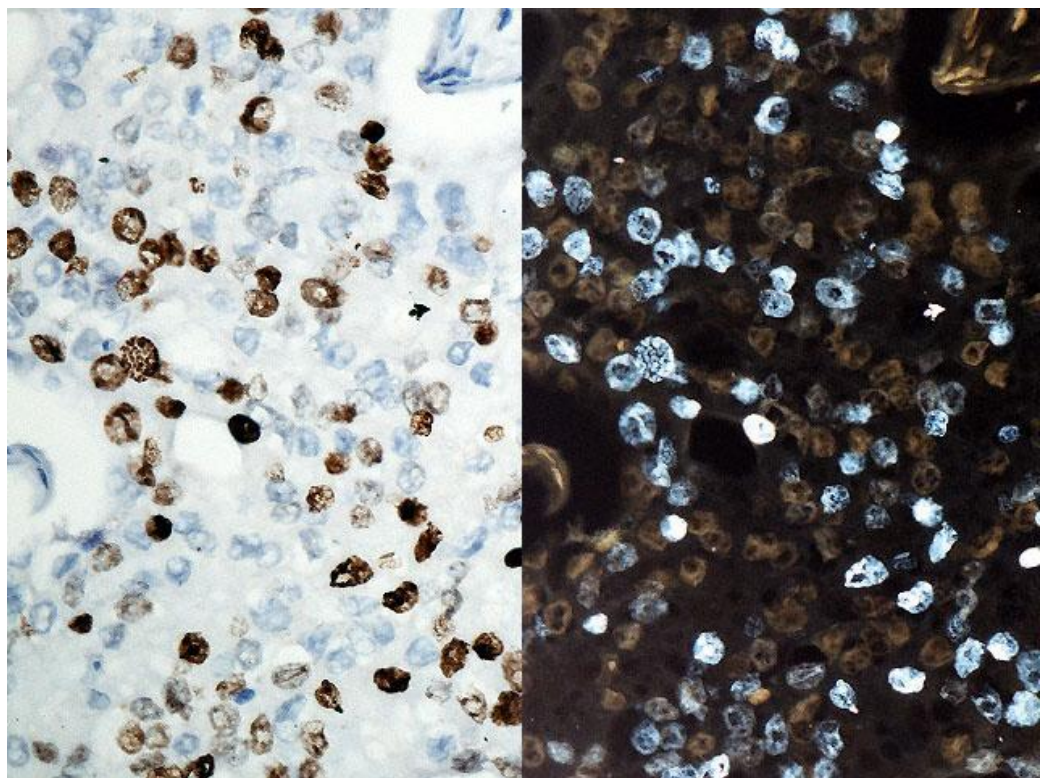


Fig.2.3. Carcinom invaziv ductal de tip NST, grad G3. Celulele marcate cu Ki67 constituie 61%. Contracolorare cu hematoxilină *Lille* și imagine inversată, x400.

Scorificarea expresiei anticorpilor. Evaluarea numerică a markerilor hormonal pentru ER, PR și AR s-a finalizat prin calcularea scorului Allred, care a inclus combinarea procentului de celule imunomarcate cu intensitatea colorării nucleare, după cum urmează [7]:

A. Proporția celulelor pozitive:

0 celule colorate – scor „0”

<1% celule ER⁺ (sau PR⁺, AR⁺) – scor „+1”

1-10% celule ER⁺ (sau PR⁺, AR⁺) – scor „+2”

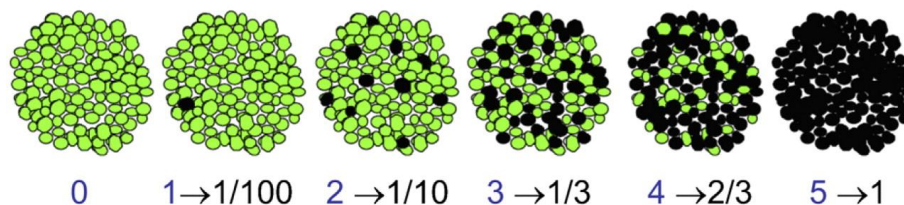
11-33% celule ER⁺ (sau PR⁺, AR⁺) – scor „+3”

34-66% celule ER⁺ (sau PR⁺, AR⁺) – scor „+4”

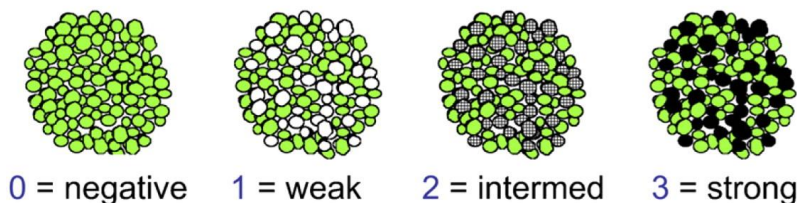
66-100% celule ER⁺ (sau PR⁺, AR⁺) – scor „+5”

B. Intensitatea colorării: 0 – absența colorării nucleare; 1 – patern nuclear slab perceptibil; 2 – colorare moderată; 3 – colorare intensă.

A Proportion Score (PS)



B Intensity Score (IS)



Allred Score = PS + IS (range 0-8)

Fig.2.4. Ilustrarea grafică a metodei de calculare propusă de Allred și coaut. (1998) [7].

Scorul Allred (suma A+B) a fost apoi echivalat unui grad de la 0 la +3: **0** – absența colorării (pentru scorul Allred 1, 2); **+1** – la scorul Allred 3-4; **+2** – la scorul Allred 5-6; **+3** – la scorul Allred 7-8 (Fig.2.4, 2.5) [7].

Markerul pentru AR (clona AR441) a pus în evidență receptorul steroid nuclear NR3C4, activat prin legarea a unuia dintre hormonii androgeni, testosteron sau 5 α -dihidrotestosteron (Fig.2.6). În baza recomandărilor AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting din 2013, AR este propus în calitate de al patrulea marker obligatoriu (alături de ER, PR, HER2) în caracterizarea cancerului mamar [105].

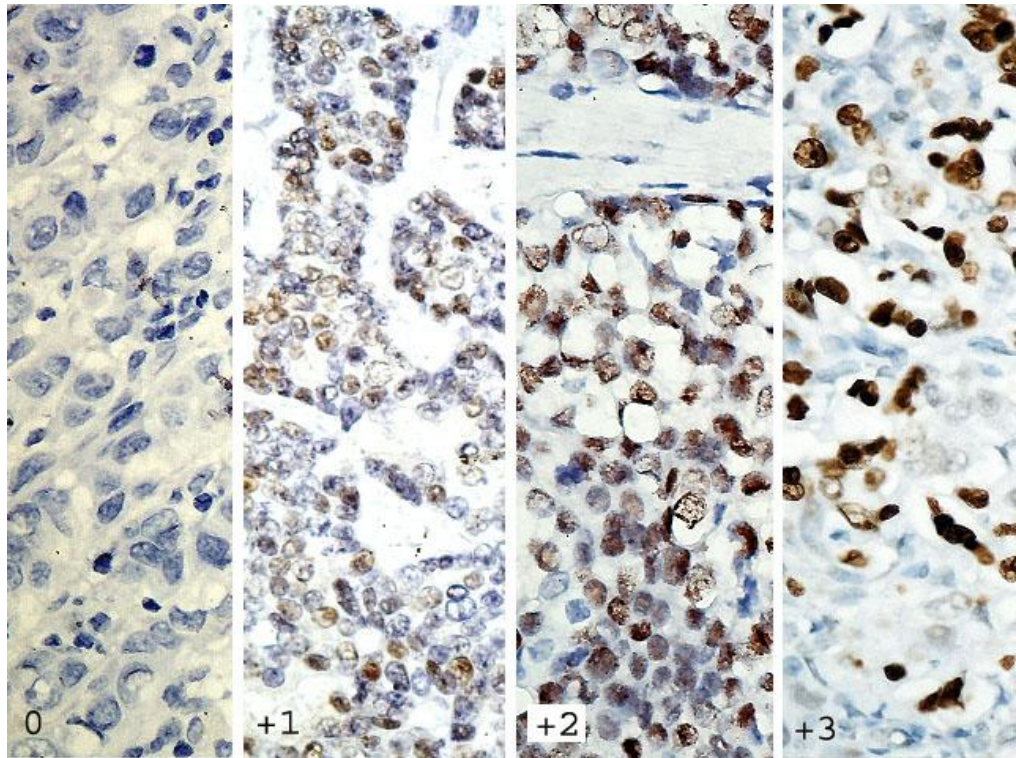


Fig.2.5. Carcinoame mamare invaziv ductale, tip NST. Scorificarea (0, +1, +2, +3) celulelor tumorale marcate nuclear cu *Anti-Pr/16* după Allred. Contracolorare cu hematoxilină *Lille*, x400.

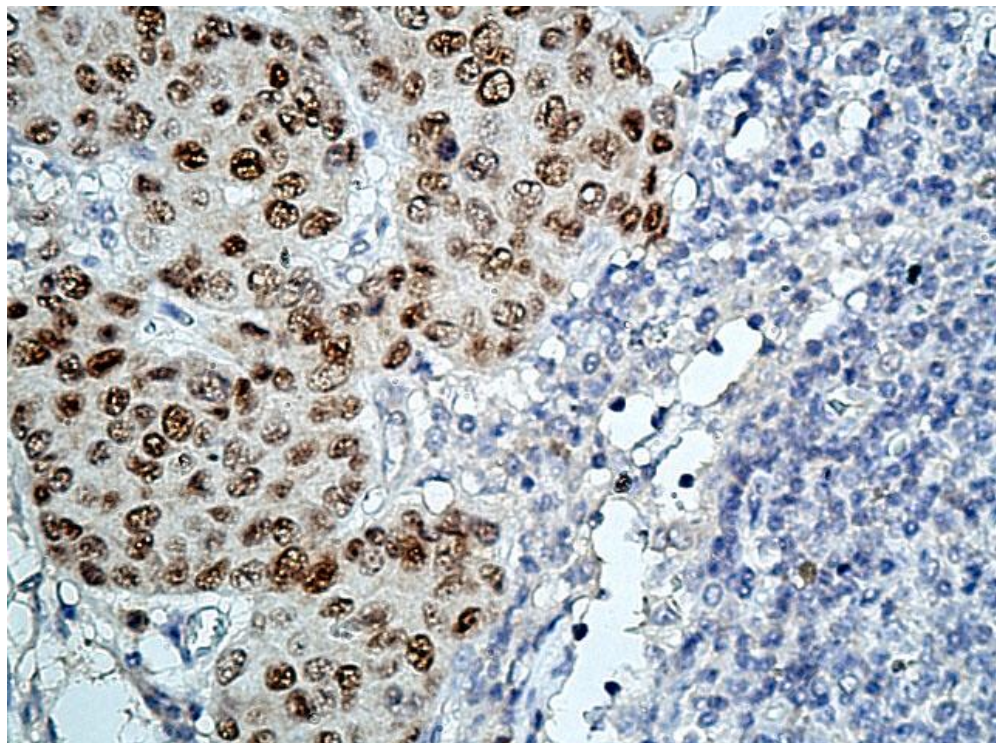


Fig.2.6. Metastază limfonodală de carcinom ductal invaziv de tip NST, cu grad de diferențiere G2, pusă în evidență cu markerul *AR441* pentru receptorul AR.

Contracolorare cu hematoxilină *Lille*, x400.

Procedeele imune pentru HER2 au fost efectuate automat cu LeicaBond Oracle HER2 IHC System (LeicaBiosystem). Statusul HER2 a fost interpretat în baza recomandărilor Societății Americane a Oncologilor Cliniciști (ASCO), după cum urmează [266]:

- 0** – nu se determină colorare sau colorare membranară slab perceptibilă, incontinuu până la 10% din celule;
- +1** – colorare membranară delicată, incontinuu în >10% din celulele tumorale;
- +2** – colorare membranară incompletă, întreruptă de intensitate medie în >10% din celule sau patern circumferențiar intense în <10% din celule;
- +3** – patern circumferențiar intens pozitiv în >10% din celulele tumorale.

Cazurile +2 și +3 au fost considerate HER2⁺ (Fig.2.7). În calitate de control extern pozitiv au servit liniile celulare de control (Leica Biosystems) cu scor HER2 pre-determinat.

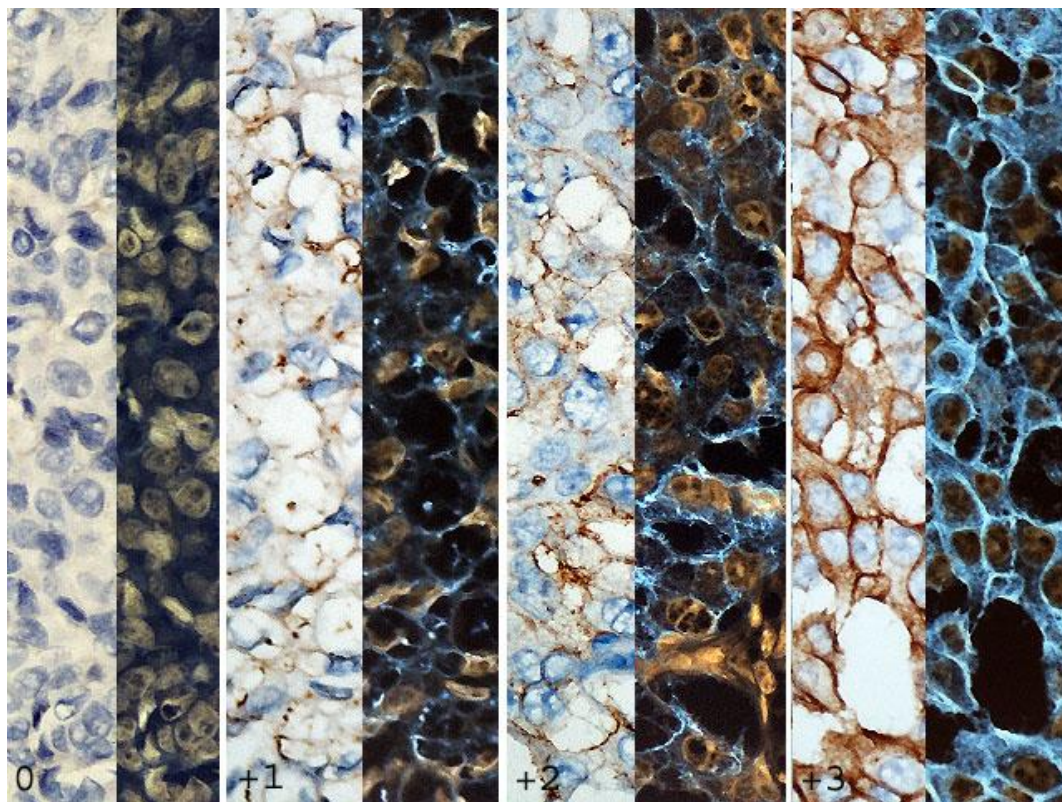


Fig.2.7. Carcinoame invazive ductale, de tip NST, cu grad 0, +1, +2, +3 de exprimare a markerului HER2; contracolorare hematoxilină Lille și imaginile lor inversate; x400;

Rezultatele reacției la E-cadherină au fost evaluate în acord cu sistemul de scorificare propus de Qureshi și coaut. (2006), care îmbină procentul de celule tumorale marcate cu intensitatea colorării, precum [192]:

- 0** – lipsa colorării sau patern membranar în <10% din celule;
- 1** – colorare slabă și incompletă (circular întreruptă) în >10% celule;

2 – patern membranar, circular complet, de intensitate slabă sau moderată în >10% celule;

3 – patern membranar circular complet, intensitate marcată în >10% celule.

În baza acestui sistem de cuantificare cazurile evaluate cu 0 și 1 au fost considerate negative, iar cu 2 și 3 – pozitive. Colorarea citoplasmatică a fost considerată nespecifică și exclusă din evaluare. Celulele epiteliale colorate din ducturile normale au servit în calitate de control intern (Fig.2.8).

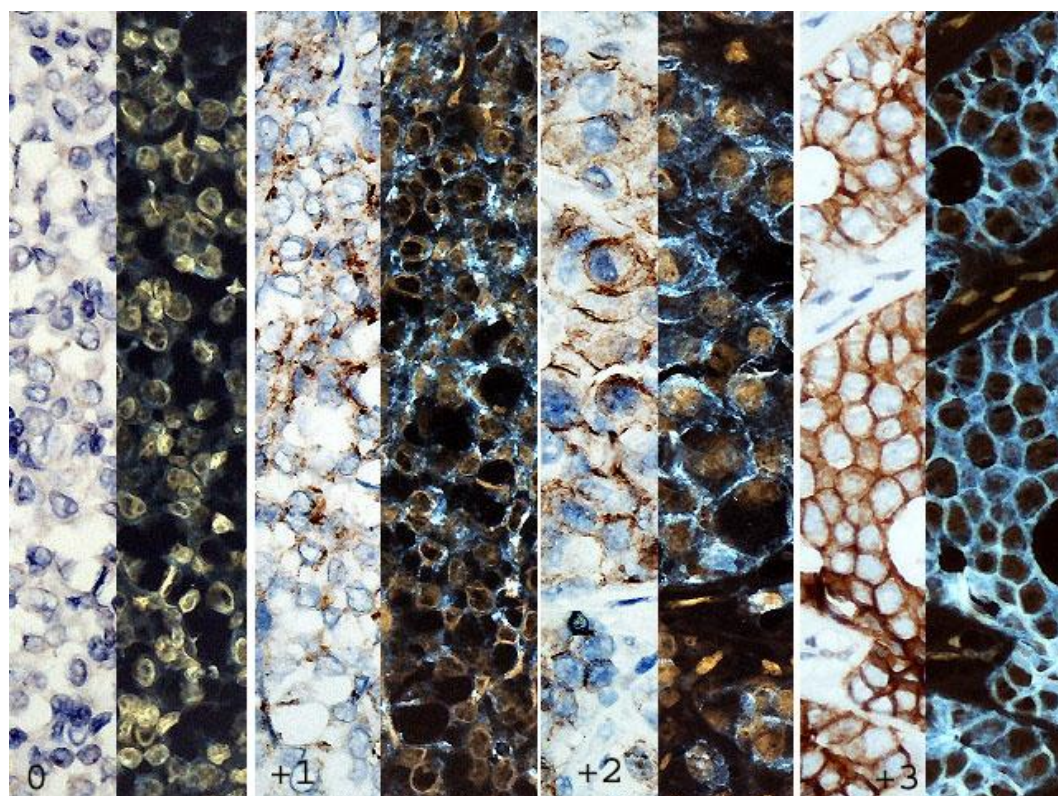


Fig.2.8. Carcinoame invazive ductale, tip NST cu grad divers de exprimare a markerului E-cadherin (0, +1, +2, +3). Secțiuni contracolorate cu hematoxină *Lille*, suplimentate cu imaginile corespondente inversate, x400.

Evaluarea paternului BCL2 a fost efectuată în corespundere cu recomandările lui Callagy și coaut. (2006) [35]:

0 – absența colorării;

+ 1- <10% din celulele tumorale prezintă pattern citoplasmatic;

+ 2 – 10-50% celule colorate;

+ 3 >50% celule tumorale colorate;

Cazurile evaluate cu 0 și 1 au fost considerate negative (Fig.2.9).

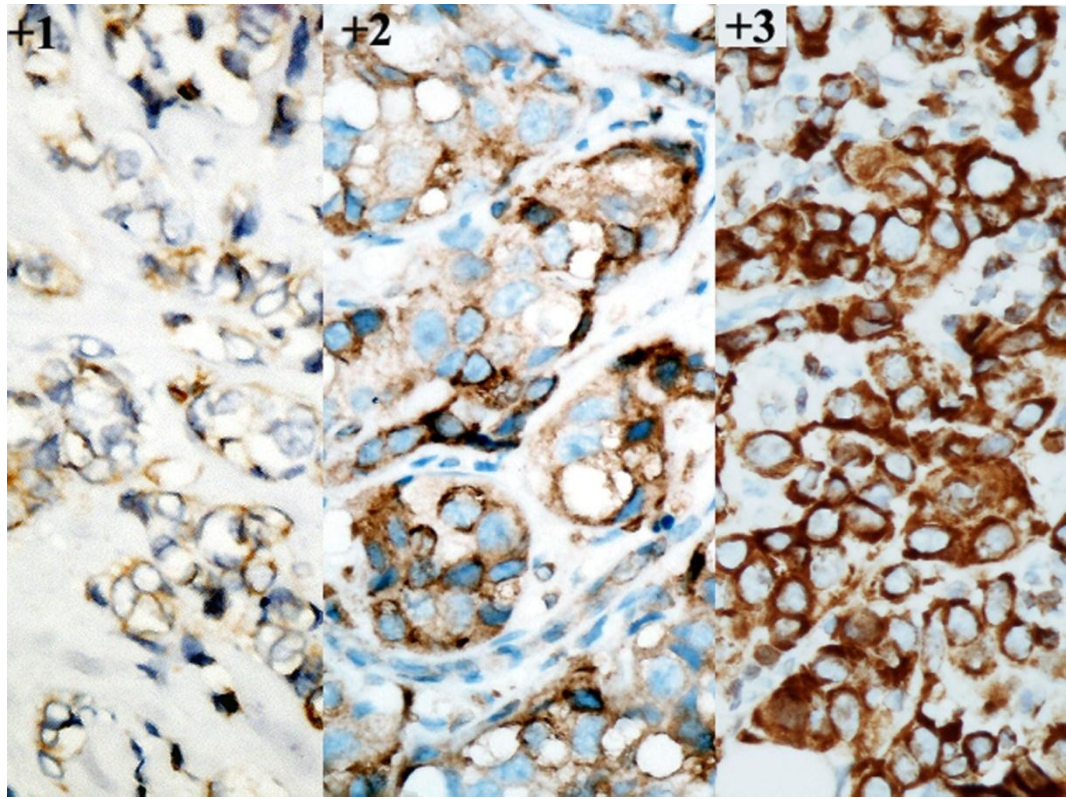


Fig.2.9. Carcinoame invazive ductale, tip NST colorate pentru receptorul BCL2 (+1, +2, +3). Contracolorare cu hematoxină Lille, x400.

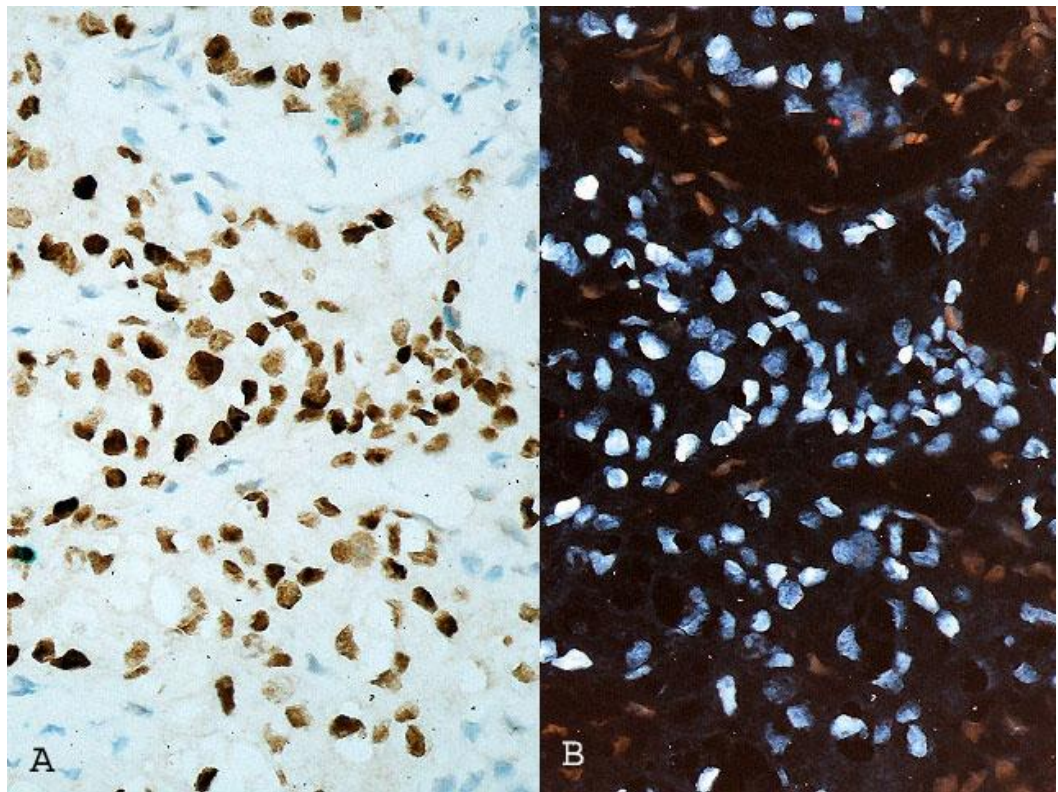


Fig.2.10. Carcinom ductal invaziv de tip NST, apreciat cu gradul +3 pentru markerul p53. Contracolorare hematoxină Lille (A); imaginea omoloagă inversată (B), x400.

Scorificarea markerului nuclear p53 a fost efectuată în baza recomandărilor Yamashita și coaut. (2004), precum: **0** – lipsa colorării nucleare; **1** – <10% din celule pozitive; **2** – 10-30% celule cu patern nuclear specific; **3** – >30% din celulele tumorale colorate specific [271]. Limfocitele colorate din stroma glandei mamare și cele nodale au servit în calitate de control pozitiv (Fig.2.10).

Evaluarea cantitativă a markerului CK5 s-a efectuat în corespundere cu sistemul de gradare propus de Azoulay și coaut. (2005), interpretat precum: **0** – absența colorării; **+1** – colorare de intensitate scăzută a <10% celule tumorale; **+2** – determinarea paternului membranal sau membranal și citoplasmatic la 10-50% celule; **+3** – colorarea intensă a mai mult de 50% celule tumorale [14]. Tumorile cu scor +1 – +3 au fost considerate pozitive (Fig.2.11).

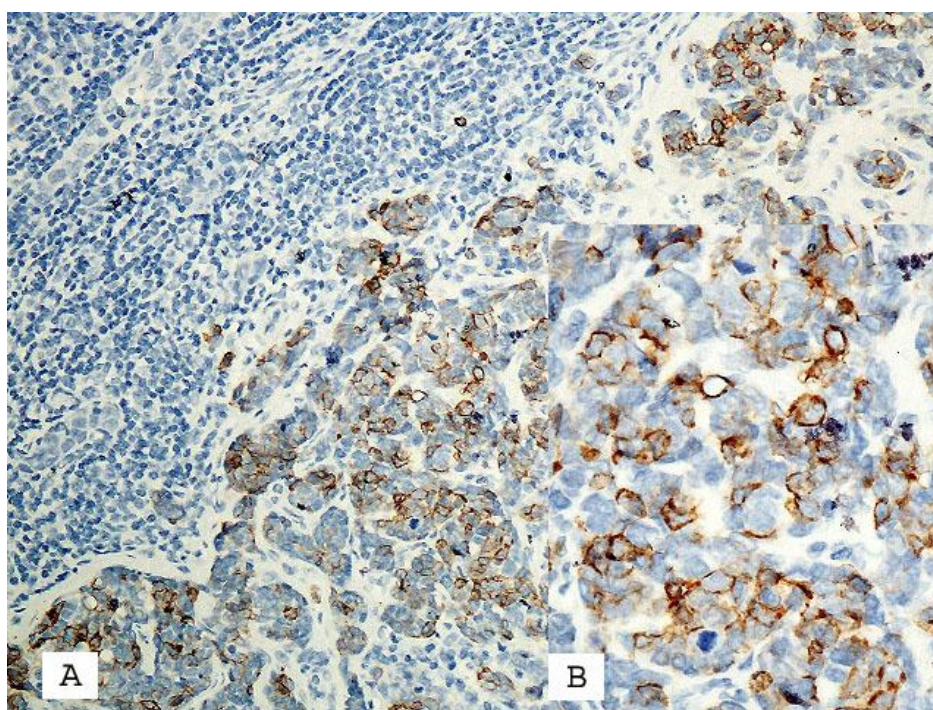


Fig.2.11. Metastază limfonodală de carcinom mamar invaziv ductal, tip NST, scor +3 pentru citokeratina CK5, x200 (A), x400 (B). Contracolorare cu hematoxină *Lille*.

Expresia receptorului EGFR a fost evaluată în corespundere cu ghidul Dako, EGFR PharmDX™ (Dako, Denmark). În baza acestor recomandări sa acceptat orice cantitate numerică de celule tumorale, colorate membranal sau membranal și citoplasmatic, scorul fiind apreciat după comparare cu liniile celulare de control cu scor EGFR pre-determinat. Astfel s-au determinat cazuri cu intensitate joasă (+1), moderată (+2) și puternică (+3) de expresie a receptorului EGFR sau absența acestuia. Celulele epiteliale normale colorate au servit în calitate de control pozitiv intern (Fig.2.12).

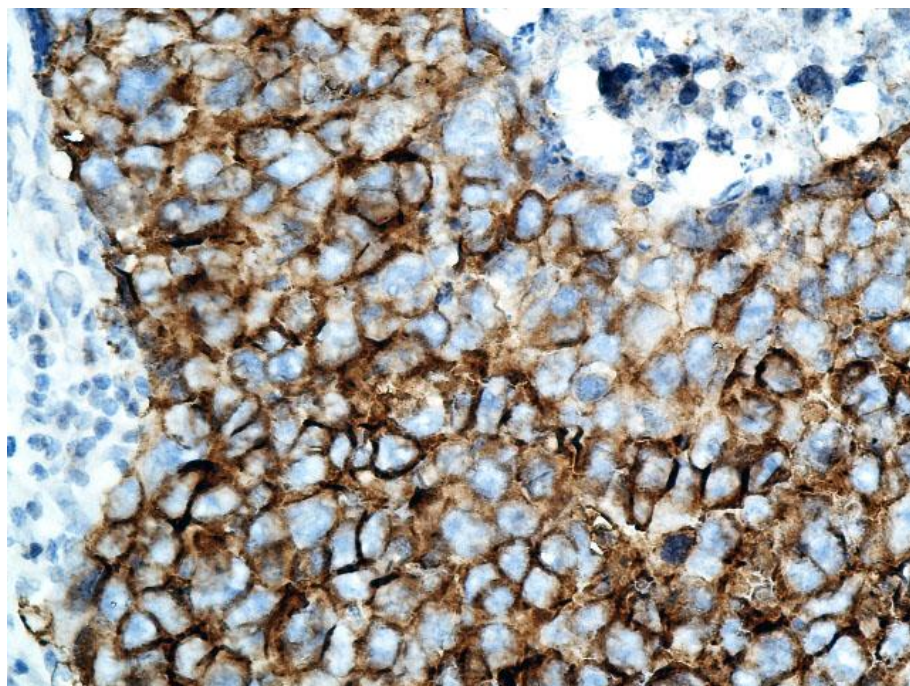


Fig.2.12. Carcinom mamar invaziv ductal de tip NST, grad G3 de diferențiere, scor +3 pentru markerul EGFR, x400. Contracolorare cu hematoxină Lille.

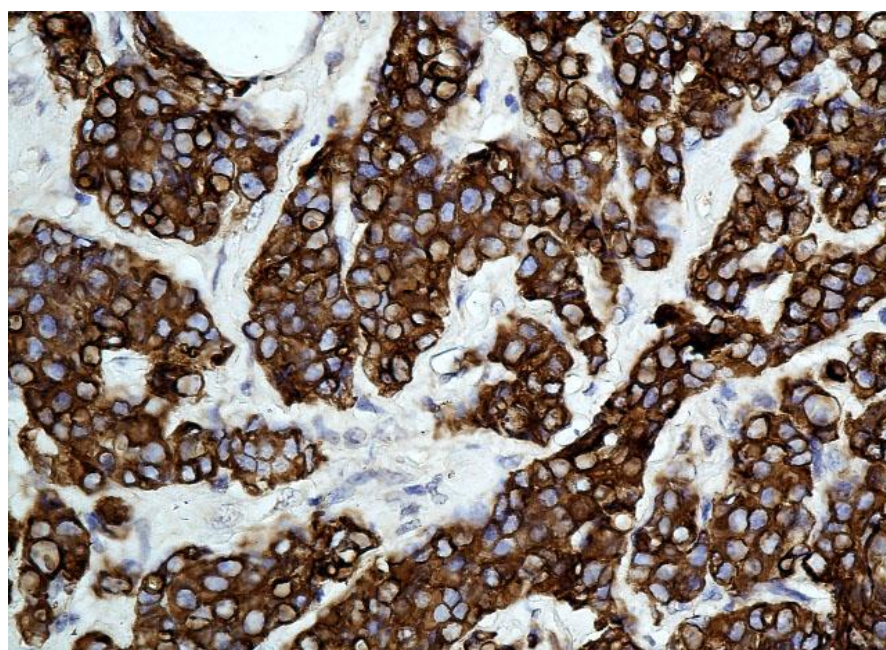


Fig.2.13. Carcinom mamar invaziv ductal de tip NST, cu grad de diferențiere G2. Pan-citokeratina AE1/AE3 intens pozitivă în celulele tumorale, x400.

Contracolorare cu hematoxină Lille.

Markerul AE1/AE3 interacționează cu proteinele filamentelor intermediare de tip 1, 5, 10 și 14, caracteristice unui spectru larg de celule epiteliale, inclusiv mamare. Acest marker a fost aplicat la necesitate pentru confirmarea diagnosticului de carcinom mamar și metastazei sale

limfonodale în tumorile slab diferențiate. Paternul citoplasmatic sau combinat citoplasmatic și membranar a confirmat natura epitelială a tumorii (Fig.2.13).

Pentru studierea stabilității receptorilor celulari tumorali în funcție de microambianță, s-a efectuat implantarea separată a tumorilor primare și a metastazelor limfonodale pe membrana corioalantoidă a oului embrionat. S-au utilizat ouă de găini de rasă *Adler silver*, cu greutatea de 50-60g. Ouăle cu vârsta de 1-3 zile au fost selectate prin determinarea prezenței embrionului prin metoda de transiluminare „in ovo”. Procesarea ulterioară a specimenelor s-a realizat în baza recomandărilor Ribatti și coaut. (2006) [203]:

1. Specimenele selectate au fost dezinfectate prin ștergere cu soluție de alcool etilic 70% și introduse la incubator (Cleo-5, Romania) la temperatura de 38°C și 65% umiditate.

2. După 72 de ore de incubație, la ambii poli ai oului s-a realizat un orificiu punctiform. Suplimentar, la polul îngust al oului s-au extras aproximativ doi-trei mililitri de albuș, după care orificiul a fost acoperit cu plasture transparent, hipoalergen (Sanplast, Medica, Bulgaria). Această procedură a permis crearea unui sac de aer artificial deasupra membranei corioalantoide și desprinderea acesteia de coajă.

Pentru a pune în evidență embrionul și rețeaua vasculară din jurul acestuia, în ziua următoare (a 4-a zi de incubare) s-a decupat o fereastră de cca 1cm² pe suprafața oului, acoperită ulterior provizoriu cu plasture hipoalergen (Fig. 2.14, 2.15).



Fig.2.14. În ziua a 4-a de incubare s-a decupat o fereastră de cca 1cm² pe fața superioară a oului, acoperită ulterior provizoriu cu plasture hipoalergen.

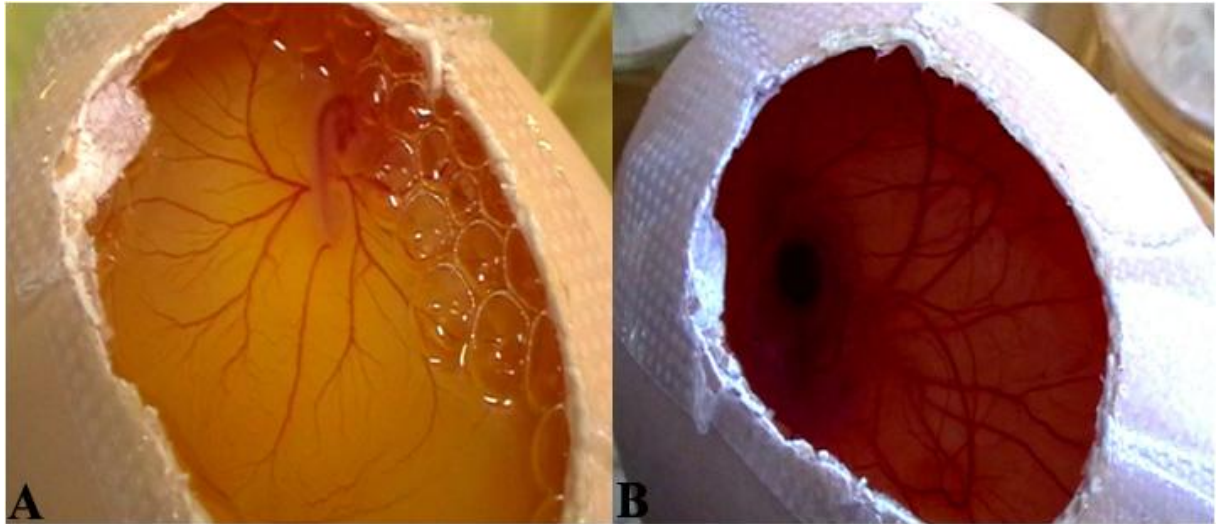


Fig.2.15. **A** – embrion de găină în ziua a 4-a de incubare; **B** – embrion de găină în ziua a 10-a de incubare.

3. În zilele 7-12 de incubare s-a efectuat implantarea mostrelor de carcinom și metastazelor corespondente. Materialul biologic postoperatoriu de 0,5-1cm² a parvenit de la IMSP Institutul Oncologic din RM, transportat timp de 1 oră în soluție fiziologică sterilă la temperatura de 8-10⁰C. Materialul a fost secționat și aplicat pe membrana corioalantoidă, scarificată în prealabil cu acul. Viabilitatea embrionilor s-a monitorizat zilnic. Începând cu ziua a 3-a după implantare clar se evidențiau vasele convergente din membrană în implant (Fig.2.16).

4. În studiu au fost incluse speciemele care au rezistat mai mult de 3 zile după implantare. Experimentul se stopa prin fixarea „in ovo” cu formalină tamponată 10%, timp de 2-3 ore, urmată de rezeția membranei cu implant și fixare suplimentară „ex ovo” timp de 24-48 ore. Materialul a fost procesat similar procedurii descrise anterior. Secțiunile etalate pe lame silanate au fost colorate cu hematoxină-eozină, iar studiul imunohistochimic comparativ (tumoarea primară ↔ metastaza limfonodală ↔ implant din tumoarea primară ↔ implant din metastaza limfonodală) a avut la bază markerii pentru ER, PR, HER2, CK5 și Ki67 (tab. 2.1).

2.4 Analiza statistică

Rezultatele studiului au fost stocate și grupate în baza de date MS Access 2007 (Microsoft Office 2007). Analiza statistică s-a efectuat cu ajutorul soft-ului Winstat 2012.1 (R. Fitch Software, Bad Krozingen, Germany). Diferența dintre 2 grupuri de variabile cantitative s-a efectuat prin testul t-Student. Pentru compararea a mai mult de 2 grupuri cantitative s-a efectuat analiza dispersională (ANOVA, metoda Fisher sau LSD – *least significant difference*). Pentru evidențierea gradului de asociere dintre valorile markerilor utilizați în studiu am efectuat teste de corelație lineară (coeficientul Pearson (r)) sau corelația rangurilor (coeficient Spearman (r_s)).

Gradul asocierii s-a analizat în corespundere cu recomandările lui Evans J.D. (1996): .00-.19 drept corelație foarte slabă; .20-.39 – „corelație slabă”; .40-.59 – „corelație rezonabilă”; .60-.79 – „corelație înaltă”; .80-1.0 drept „corelație foarte înaltă” [75]. Interrelațiile dintre markerii la nivel de tumoarea primară și metastaze limfonodale a fost comparată efectuând regresia lineară (R^2). Pentru Ki67 s-a determinat media aritmetică (M), eroarea standard (ES) și mediana (Md). Pentru separarea cazurilor după activitatea proliferativă, marcată (>14) sau redusă (<14) am utilizat pragul de 14 celule tumorale Ki67 pozitive. Acest prag a fost propus de Goldhirsch și coaut. (2013) și pe larg acceptat de practica oncologică [97].

Pentru toate procedeele statistice valoarea de prag pentru rezultatele semnificativ statistice a fost stabilită la un $p \leq 0,05$.

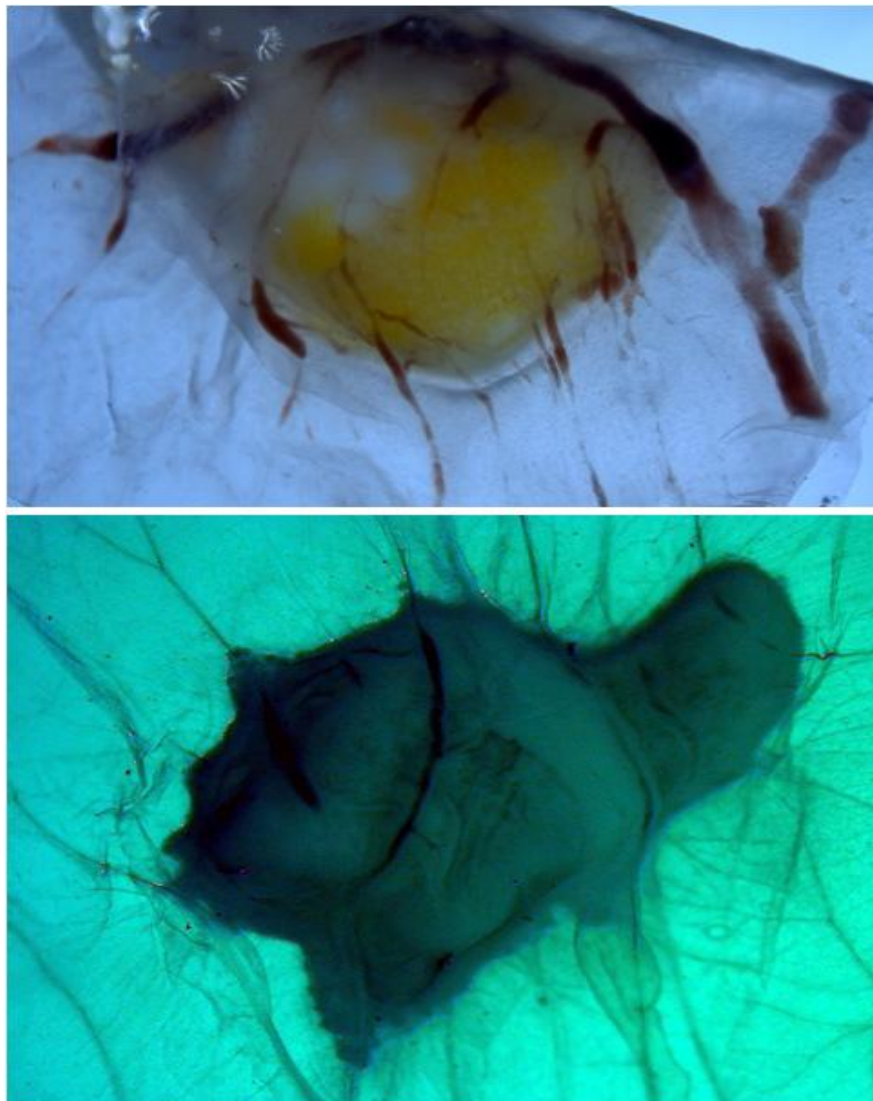


Fig.2.16. Implante de tumoare primară pe membrana corioalantoidă (x4). Viabilitatea implantelor este susținută prin fenomenul de neovascularizare.

2.5 Concluzii la capitolul 2

1. Materialul biologic supus studiului a inclus tumoarea primară și metastazele limfonodale axilare de carcinom mamar invaziv ductal și lobular de la 161 paciente cu vârstă cuprinsă între 33-86 ani, fără chimio- și/sau radioterapie premergătoare. În calitate de control a servit materialul tisular (glandă mamară și noduri limfatici axilari) recoltat de la 18 femei decedate accidental.

2. Studiul este unul morfologic, retrospectiv, descriptiv bazat pe 1 metodă histologică (HE) și 11 metode imunohistochemice (markeri pentru ER, PR, AR, Ki67, HER2, EGFR, CK5, E-cadherină, p53, BCL2, AE1/AE3).

3. Rezultatele studiului descriptiv și ipoteza instabilității profilului molecular au fost verificate prin implantare de tumori mamare pe membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat, fortificate prin evaluări imunohistochemice a receptorilor pentru ER, PR, HER2, CK5 și Ki67.

4. Definirea morfologică a tumorilor, evaluarea expresiei markerilor a fost efectuată în baza recomandărilor OMS (2003), a Societății Americane a Oncologilor Cliniciști (2013) și Asociației Americane pentru Cercetarea Cancerului (2013). S-au utilizat metodele de cuantificare și scorificare propuse de Allred și coaut. (1998), Suciu și coaut. (2014), Qureshi și coaut. (2006), Callagy și coaut. (2006), Yamashita și coaut. (2004), Azoulay și coaut. (2005) și ghidul Dako pentru EGFR (http://www.dako.com/08052_egfr_pharmdx_interpretation_manual.pdf) [7, 14, 35, 72, 97, 192, 235, 271].

5. Materialul a fost sistematizat în baza de date MS Access 2007 și analizat statistic cu WinStat 2012.1, ceea ce a permis formularea concluziilor și recomandărilor practice.

3. DINAMICA MARKERILOR IMUNOHISTOCHEMICI ÎN NORMĂ ȘI ÎN FUNCTIE DE TIPUL, GRADUL HISTOLOGIC AL TUMORII, STATUSUL LIMFONODAL ȘI VÂRSTA PACIENTELOR

3.1. Expresia markerilor utilizați în studiu în glanda mamară neafectată

Receptorii pentru steroizi (estrogeni, progesteron și androgeni) au fost exprasați preponderent de epiteliocitele luminale, sub formă de grupuri celulare solitare hormon-pozitive de până la 10 celule, precum și în fâșii continue cu populații de peste 10 celule imunomarcate (Fig.3.1). Paternul solitar a fost mai frecvent determinat în cazul markerilor pentru PR și AR, iar pentru ER caracteristic iau fost prezentările în grup și fâșii.

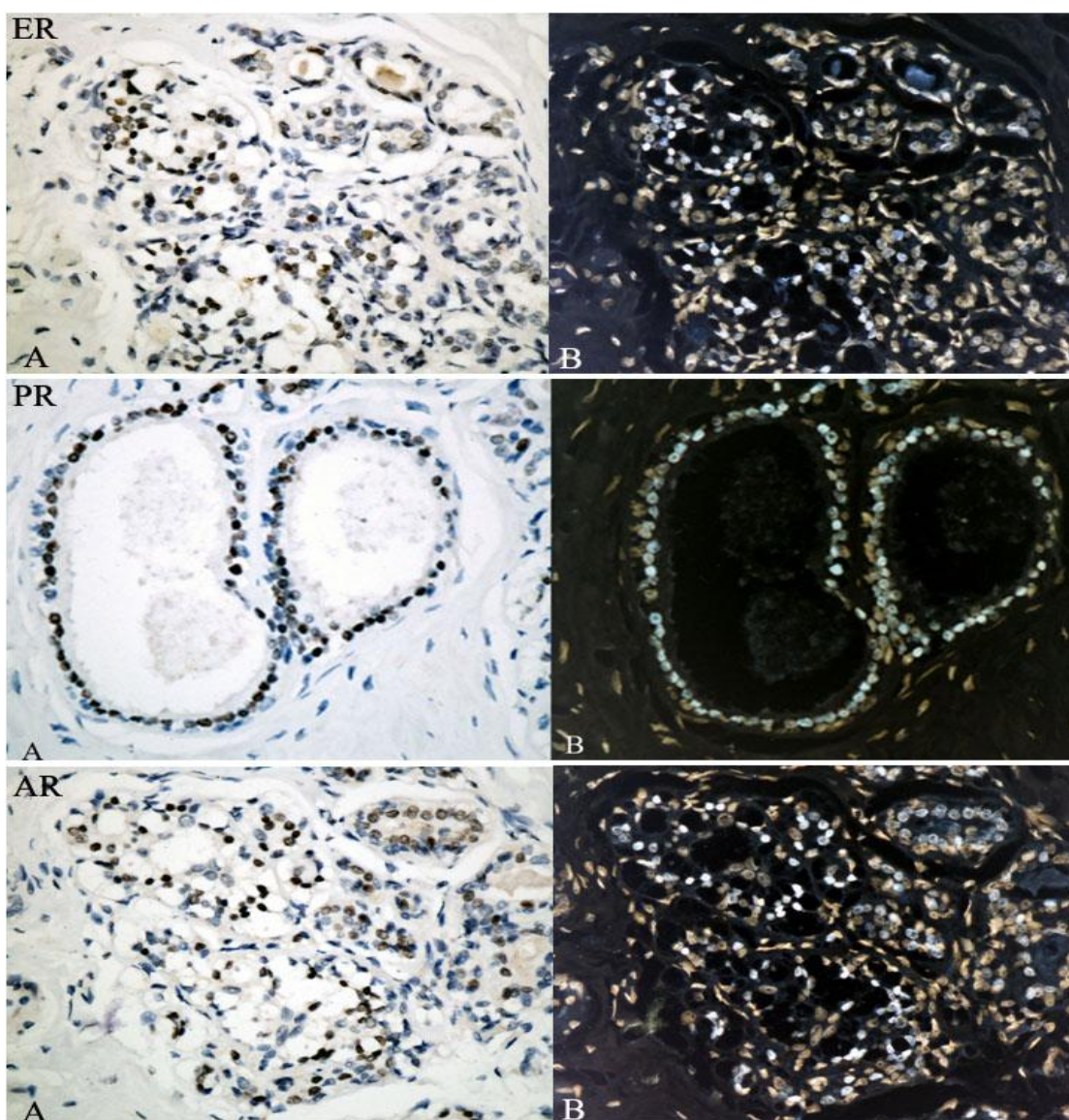


Fig.3.1. Expresia receptorilor pentru ER, PR, AR în TDLU și ducturile interlobulare în glanda mamară sănătoasă a femeii de 62 ani. Secțiuni contracolorată cu hematoxină *Lille* (A), suplimentată cu imaginea corespondentă inversată (B), x40.

Expresia a doi markeri, receptorul membranal HER2 și proteina nucleară p53 nu s-a manifestat în toate cazurile studiate, indiferent de nivelul de diferențiere al epiteliului mamar.

Prezența EGFR sau HER1 a fost depistată la diferite nivele de diferențiere al epiteliului mamar, totuși cu predilecție și intensitate sporită atestată la nivel bazal (Fig.3.2).

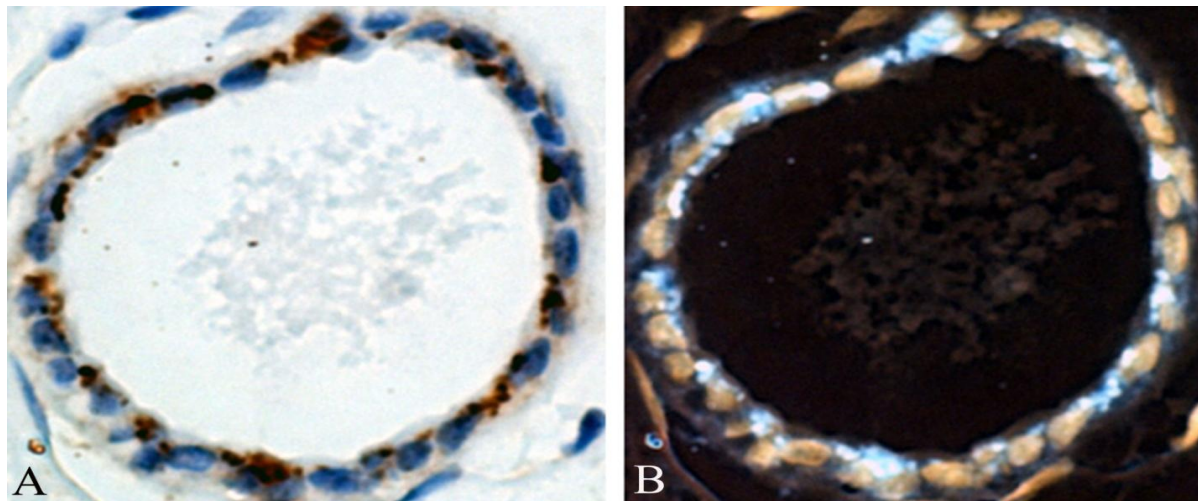


Fig.3.2. Expresia EGFR într-un duct lobular, la femeie de 66 ani. Secțiune contracolorată cu hematoxilină *Lille* (A), suplimentată cu imaginea corespondentă inversată (B), x100.

Citokeratina CK5 cu predilecție a fost expresată de celulele bazale. Totuși prezența acesteia s-a determinat și în celulele luminală în toate cazurile examinate (Fig.3.3).

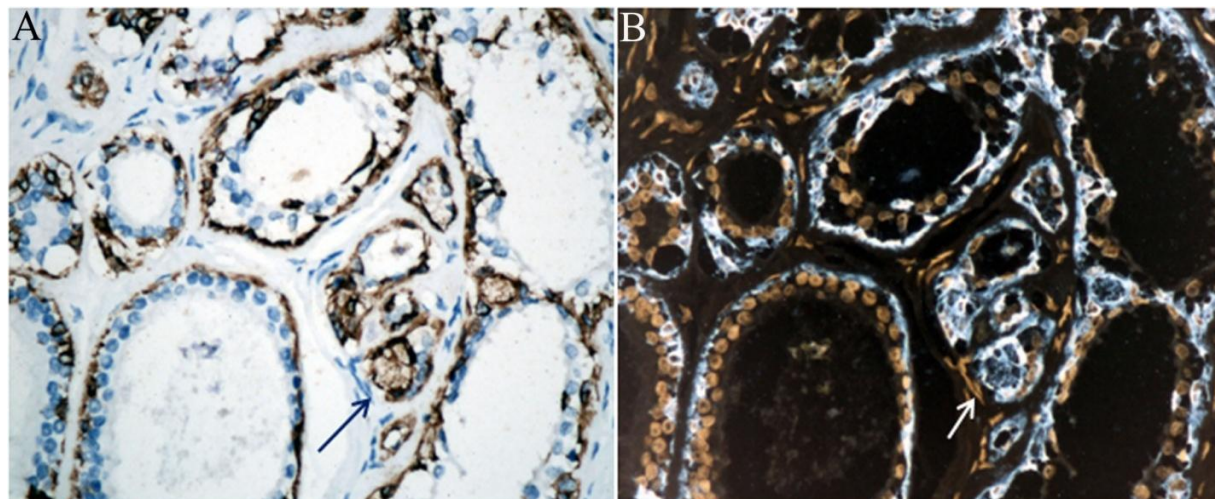


Fig.3.3. Expresia citokeratinei bazale CK5 în ducturi și TDLU (marcat cu săgeată).

Secțiune realizată pe glandă mamară sănătoasă la femeie de 62 ani, contracolorată cu hematoxilină *Lille* (A), suplimentată cu imaginea corespondentă inversată (B), x40.

Proteina Ki67 a definit epiteliocitele glandei mamare neafectate drept rar proliferante. Expresia acestui marker s-a determinat sub formă de celule rare, solitare la nivel de duct sau TDLU, aleatoriu cu sediu bazal sau luminal.

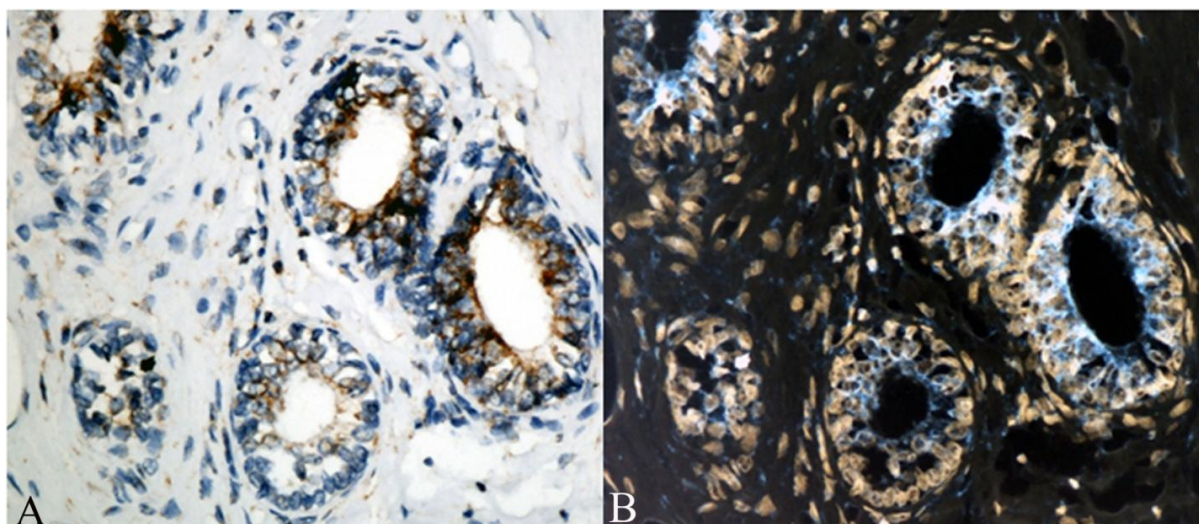


Fig.3.4. Expresia BCL2 în porțiunea terminală a glandei mamare la femeie de 60 ani. Secțiune contracolorată cu hematoxină *Lille* (A), suplimentată cu imaginea corespondentă inversată (B), x40.

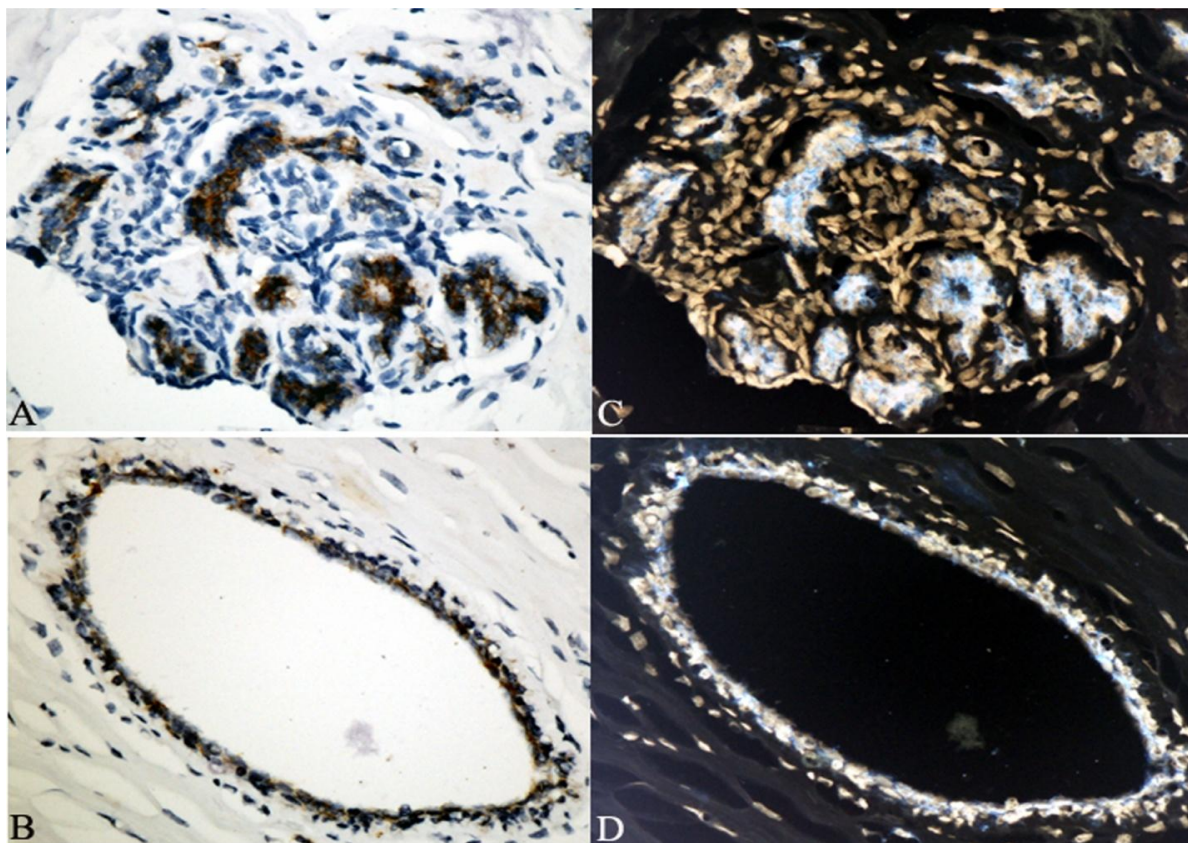


Fig.3.5. Expresia E-cadherinei la nivel de TDLU (A, C) și duct galactofor (B, D) în glanda mamară neafectată a femeii de 29 ani. Secțiuni contracolorate cu hematoxină *Lille* (A, B), suplimentate cu imaginile corespondente inversate (C, D), x40.

În studiul dat expresia BCL2 s-a manifestat sub formă de grupuri sporadice sau fâșii continue, cu predilecție de sediu luminal. Celulele mioepiteliale nu au prezentat acest marker. Unicele celule stromale BCL2 pozitive au fost apreciate morfologic drept limfocite (Fig.3.4).

E-cadherina a fost determinată din abundență în epiteliocele luminal, deși pe alocuri sau pus în evidență și celule bazale/mioepiteliale solitare (Fig. 3.5).

În sumar:

1. Receptorii pentru estrogeni, progesteron, androgeni, BCL2 și E-cadherina sunt exprasați preponderent de celulele luminal, iar markerii pentru CK5 și EGFR pun în evidență mai frecvent epiteliocele bazale.
2. Epiteliul glandei mamare neafectate este unul slab proliferant, cu rare celule Ki67 pozitive și nu expresează markerii HER2 și p53.

3.2. Dinamica receptorilor pentru ER și PR

Carcinomul ductal invaziv de tip NOS. Expresia ER și PR în tumoarea primară. Din numărul total de 161 cazuri supuse studiului, 143 (85,6%) au fost diagnosticate drept carcinom ductal invaziv de tip *NOS (not otherwise specified)* sau *NST (no special type) (neclasat)*. Vârsta pacientelor din grupul dat a variat între 33-86 ani, iar pentru studiul ulterior aceasta a fost divizată în 2 grupe: până la 49 ani (inclusiv) – 41 cazuri/28,7% și după 49 – 102 cazuri/71,3%. Această divizare a avut la bază evidențele statistice și recomandările US Preventive Services Task Force (www.uspreventiveservicestaskforce.org), British Columbia screening programme (www.bccancer.bc.ca), care de asemenea certifică și dublarea incidenței cancerului mamar la femei de după 49 ani.

Microscopic aceste tumori au fost caracterizate prin structuri cu caracteristici maligne, de origine epitelială, dispuse sub formă de cordoane, plaje sincițiale, fie prezentând un caracter difuz infiltrativ (Fig.3.6). Tabloul histologic a variat în funcție de proliferarea componentei epiteliale și infiltrarea componentei stromale. Aspectul invaziv a fost apreciat prin absența membranei bazale și celulelor mioepiteliale (Fig.3.7). Caracterul celulelor tumorale a fost dependent de caz, prezentând variații de activitate mitotică, cu pleomorfism nuclear și celular atenuat sau marcat. Cazurile de carcinom mixt (ductal - lobular), pleomorf și cu particularități melanotice nu au fost luate în calcul. În raport cu gradul de diferențiere, 6 cazuri/4,2% (din 143) au fost cuantificate cu scor G1, 90 cazuri/62,9% cu G2 și 47 cazuri/32,9% cu G3 (tab. 3.1).

Gradul de diferențiere a fost repartizat după grupa de vârstă precum urmează:

- G1: până la 49 – 2 cazuri/1,4%, după 49 – 4 cazuri/2,8%;
- G2: până la 49 – 31 cazuri/21,7%, după 49 – 59 cazuri/41,3%;
- G3: până la 49 – 8 cazuri/5,6, după 49 – 39 cazuri/27,3%.

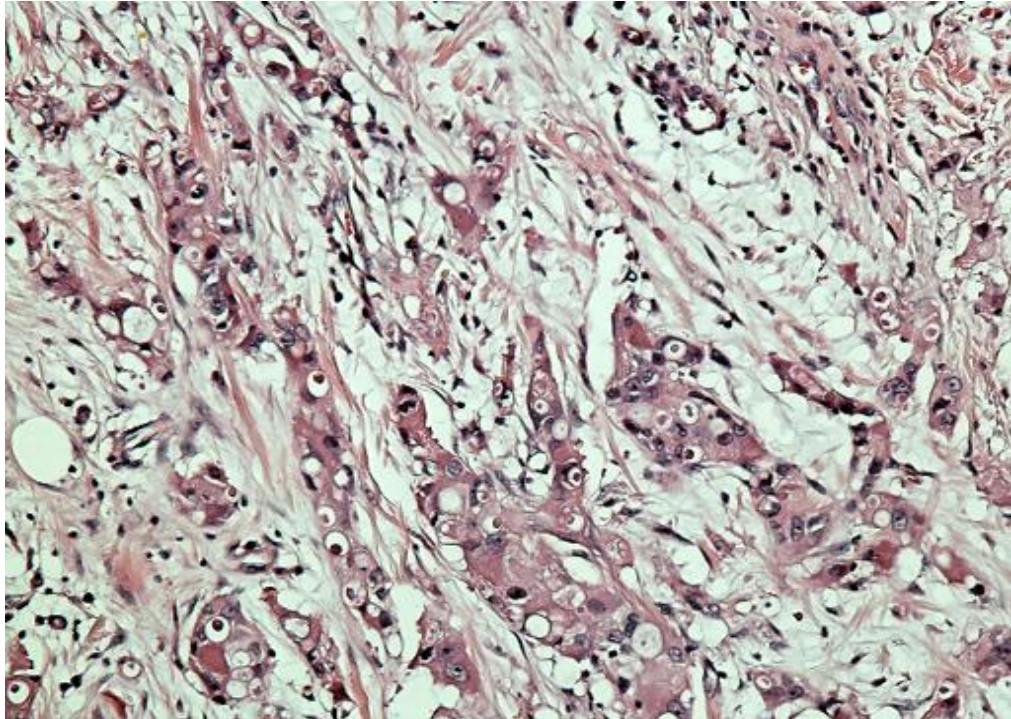


Fig.3.6. Carcinom ductal invaziv de tip NST, G3 prelevat de la o pacientă de 66 ani: aspect morfologic sub formă de cordoane și plaje sincitiale. HE, x200

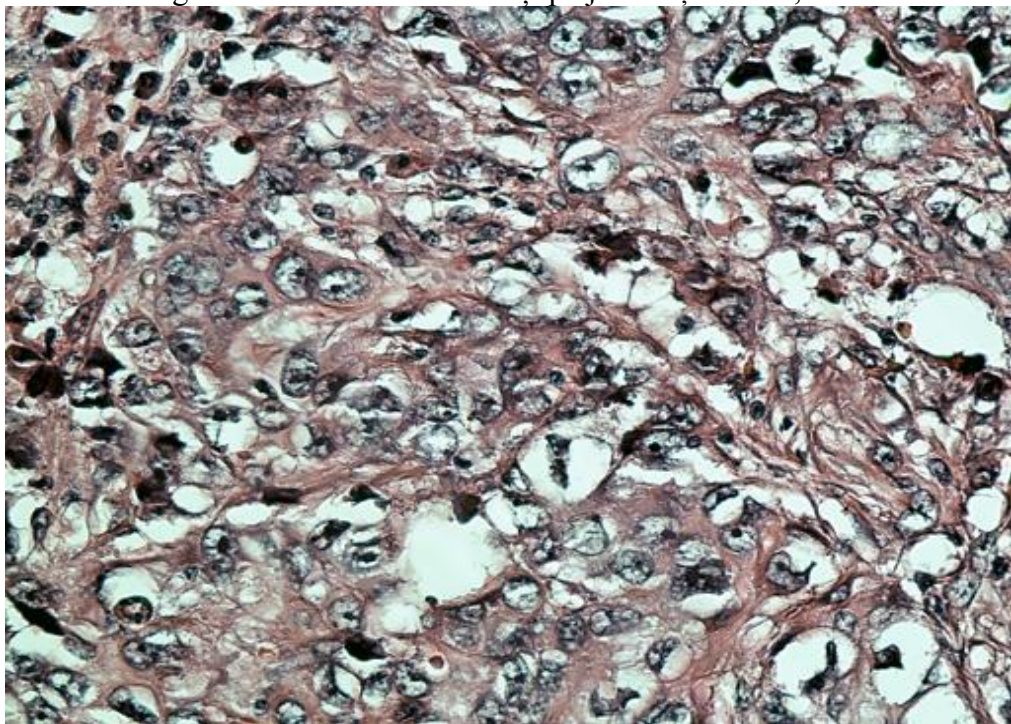


Fig.3.7. Carcinom ductal invaziv de tip NST, G3 prelevat de la o pacientă de 71 ani. De notat caracterul difuz de creștere, cu infiltrația stromei adiacente, lipsa celulelor mioepiteliale și membranei bazale, absența structurii clasice ductal-lobulare. HE, x400

Stroma intratumorală atât după aspect, cât și compoziția celulară varia în limite largi: de la dens conjunctivă, cu aspect hialin, cu cantitate variabilă de collagen și matrice extracelulară până

la lax, mixoidă. Unele carcinoame au avut stromă uniform distribuită, altele s-au prezentat cu centre tumorale fibrotice și puține celule, acestea fiind concentrate la periferia focarelor de fibroză. De asemenea am depistat focare de necroză, în special în cazul tumorilor cu pattern de creștere solid. Rareori am pus în evidență focare de necroză extinsă, cu formare de pseudochisturi. O caracteristică histologică intra- și/sau peritumorală frecvent întâlnită a fost reacția limfoplasmocitară, care a variat în limite largi, de la minimă la marcantă (Fig.3.8).

Tabelul.3.1. Repartizarea cazurilor după gradul de diferențiere și grupa de studiu.

| Gradul de diferențiere | Grupa de vârstă | n | % | |
|-------------------------------|------------------------|----------|----------|------|
| G1 | după 49 | 4 | 2,8 | 4,2 |
| G1 | până la 49 | 2 | 1,4 | |
| G2 | după 49 | 59 | 41,3 | 62,9 |
| G2 | până la 49 | 31 | 21,7 | |
| G3 | după 49 | 39 | 27,3 | 32,9 |
| G3 | până la 49 | 8 | 5,6 | |
| Total | | 143 | 100 | |

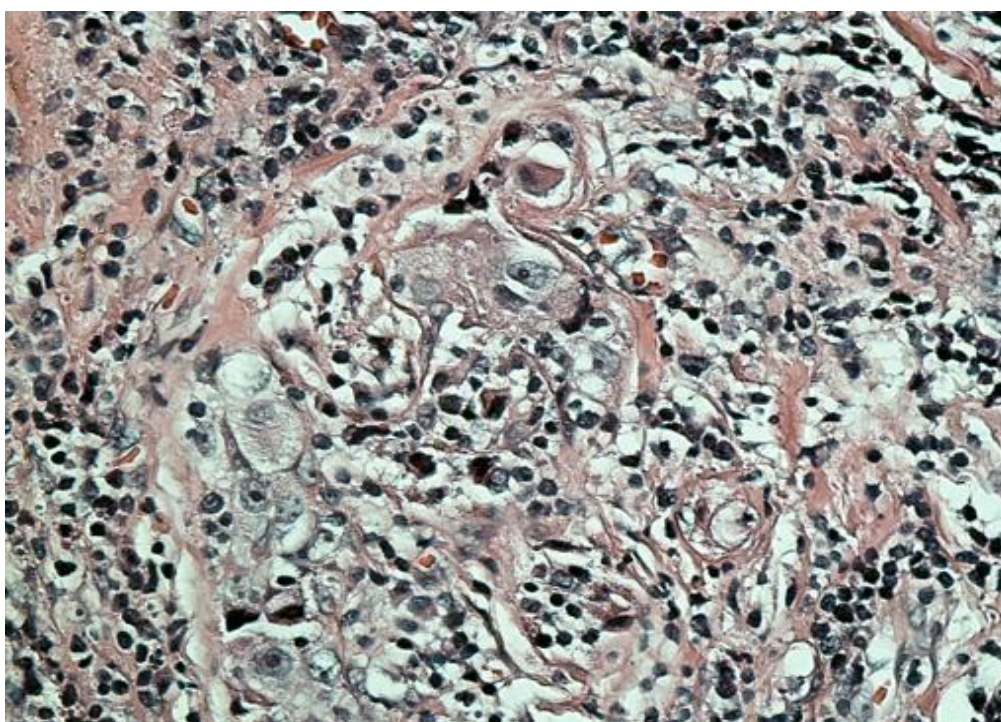


Fig.3.8. Carcinom ductal invaziv, G3 de la o pacientă de 50 ani. De notat reacția limfoplasmocitară exprimată. HE, x400.

Receptorul pentru estrogeni (ER), a fost cuantificat drept negativ în 25 cazuri/17,5%. Restul cazurilor ER pozitive (118/82,5%) le-au fost atribuite următoarele scoruri Allred: +1 – 6 cazuri/5,1%, +2 – 15 cazuri/12,7%, +3 – 97 cazuri/82,2%. Tumorile ER⁺ (25 cazuri) au manifestat toate 3 grade de diferențiere, cu următoarea repartizare: G1 – 2 cazuri/1,4%, G2 – 13 cazuri/9,1% și G3 – 10 cazuri/7% (tab.3.2).

Tabelul.3.2. Repartizarea cazurilor după gradul de diferențiere și scorul Allred pentru ER⁺ (în tumoarea primară).

| ER⁺ (scorul Allred) | Gradul de diferențiere | n | % |
|---|-----------------------------------|----------|----------|
| 0 | G1 | 2 | 1,4 |
| 0 | G2 | 13 | 9,1 |
| 0 | G3 | 10 | 7,0 |
| 1 | G2 | 2 | 1,4 |
| 1 | G3 | 4 | 2,8 |
| 2 | G2 | 10 | 7,0 |
| 2 | G3 | 5 | 3,5 |
| 3 | G1 | 4 | 2,8 |
| 3 | G2 | 65 | 45,5 |
| 3 | G3 | 28 | 19,6 |
| Total | | 143 | 100,0 |

De subliniat, că pentru scorul +1 și +2, nu au fost determinate cazuri cu grad G1, iar repartizarea în raport cu gradul de diferențiere a fost următoarea:

- Scor Allred +1: G2 – 2 cazuri/1,4% și G3 – 4 cazuri/2,8%;
- Scor Allred +2: G2 – 10 cazuri/7% și G3 – 5 cazuri/3,5%.
- Scor Allred +3: G1 – 4 cazuri/2,8%, G2 – 65 cazuri/45,5%, G3 – 28 cazuri/19,6%.

Analizând expresia receptorului ER în relație cu grupele de vârstă am determinat, că pentru fiecare scor Allred majoritatea au constituit-o cazurile „după 49”, iar repartizarea detaliată a fost precum (tab.3.3):

- Scor Allred 0: până la 49 – 8 cazuri/5,6%, după 49 – 17 cazuri/11,9%;
- Scor Allred +1: până la 49 – 2 cazuri/1,4%, după 49 – 4 cazuri/2,8%;
- Scor Allred +2: până la 49 – 4 cazuri/2,8%, după 49 – 11 cazuri/7,7%;
- Scor Allred +3: până la 49 – 27 cazuri/18,9%, după 49 – 70 cazuri/49%.

Tabelul.3.3 Repartizarea cazurilor după grupa de vârstă și scorul Allred pentru ER în tumoarea primară.

| ERtm (scorul Allred) | Grupa de vârstă | n | % |
|---------------------------------|------------------------|------------|--------------|
| 0 | după 49 | 17 | 11,9 |
| 0 | până la 49 | 8 | 5,6 |
| 1 | după 49 | 4 | 2,8 |
| 1 | până la 49 | 2 | 1,4 |
| 2 | după 49 | 11 | 7,7 |
| 2 | până la 49 | 4 | 2,8 |
| 3 | după 49 | 70 | 49,0 |
| 3 | până la 49 | 27 | 18,9 |
| Total | | 143 | 100,0 |

Tabelul.3.4. Repartizarea cazurilor după gradul de diferențiere și scorul Allred pentru PR în tumoarea primară.

| PRtm (scorul Allred) | Gradul de diferențiere | n | % |
|---------------------------------|-----------------------------------|------------|------------|
| 0 | G1 | 1 | 0,7 |
| 0 | G2 | 18 | 12,6 |
| 0 | G3 | 16 | 11,2 |
| 1 | G2 | 9 | 6,3 |
| 1 | G3 | 2 | 1,4 |
| 2 | G1 | 1 | 0,7 |
| 2 | G2 | 12 | 8,4 |
| 2 | G3 | 6 | 4,2 |
| 3 | G1 | 4 | 2,8 |
| 3 | G2 | 51 | 35,7 |
| 3 | G3 | 23 | 16,1 |
| Total | | 143 | 100 |

În raport cu vârsta, însă, valoarea expresiei ER nu a manifestat variație statistic veridică ($r_s=0,1$, $p<0,15$).

Receptorul pentru progesteron (PR) a fost considerat negativ în 35 cazuri/24,5%. Cele 108 cazuri/75,5% PR pozitive au fost repartizate după scorul Allred precum urmează: +1 – 11 cazuri/10,2%, +2 – 19 cazuri/17,6%, +3 – 78 cazuri/72,2% (tab.3.4).

Gradele de diferențiere G1-G3 au fost determinate atât la tumori PR pozitive, cât și negative, cu excepția cazurilor G1, care au fost absente la tumori +1, iar repartizarea vs scorul Allred a fost următoarea:

- Scor 0: G1 – 1 caz/0,7%, G2 – 18 cazuri/12,6% și G3 – 16 cazuri/11,2%;
- Scor +1: G2 – 9 cazuri/6,3% și G3 – 2 cazuri/1,4%;
- Scor +2: G1 – 1 caz/0,7%, G2 – 12 cazuri/8,4% și G3 – 6 cazuri/4,2%;
- Scor +3: G1 – 4 cazuri/2,8%, G2 – 51 cazuri/35,7% și G3 – 23 cazuri/16,1%.

Tabelul.3.5. Repartizarea cazurilor după grupa de vârstă și scorul Allred pentru PR în tumoarea primară.

| PRtm (scorul Allred) | Grupa de vârstă | n | % |
|---------------------------------|------------------------|----------|----------|
| 0 | după 49 | 29 | 20,3 |
| 0 | până la 49 | 6 | 4,2 |
| 1 | după 49 | 9 | 6,3 |
| 1 | până la 49 | 2 | 1,4 |
| 2 | după 49 | 15 | 10,5 |
| 2 | până la 49 | 4 | 2,8 |
| 3 | după 49 | 49 | 34,3 |
| 3 | până la 49 | 29 | 20,3 |
| Total | 143 | 100 | |

În raport cu grupa de vârstă, caracterul de expresie al receptorului PR a fost următorul (tab.3.5):

- Scor 0: până la 49 – 6 cazuri/4,2%, după 49 – 29 cazuri/20,3%;
- Scor +1: până la 49 – 2 cazuri/1,4%, după 49 – 9 cazuri/6,3%;
- Scor +2: până la 49 – 4 cazuri/2,8%, după 49 – 15 cazuri/10,5%;
- Scor +3: până la 49 – 29 cazuri/20,3%, după 49 – 49 cazuri/34,3%.

În raport cu vârsta de asemenea nu s-au determinat corelații statistic veridice ($r_s = -0,09$, $p < 0,15$).

Efectuând o analiză sumară a expresiei ER și PR am determinat, că în 26 cazuri/18,2% expresia acestor receptori este radical una diferită (tab.3.6).

Tabelul.3.6. Studiul comparativ al expresiei receptorilor ER și PR în carcinomul mamar ductal invaziv de tip NOS, la nivel de tumoarea primară.

| Expresie (după ERtm) | Scorul Allred | | Cazuri | | |
|-------------------------|---------------|------|--------|-------|--------------------|
| | | | n | % | |
| | ERtm | PRtm | | | |
| Negativă | 0 | 0 | 17 | 11,9 | *8 (5,6%) |
| | 0* | 1 | 3 | 2,1 | |
| | 0* | 2 | 2 | 1,4 | |
| | 0* | 3 | 3 | 2,1 | |
| Pozitivă | 1* | 0 | 3 | 2,1 | *18 (12,6%) |
| | 1 | 1 | 1 | 0,7 | |
| | 1 | 3 | 2 | 1,4 | |
| | 2* | 0 | 2 | 1,4 | |
| | 2 | 1 | 3 | 2,1 | |
| | 2 | 2 | 3 | 2,1 | |
| | 2 | 3 | 7 | 4,9 | |
| | 3* | 0 | 13 | 9,1 | |
| | 3 | 1 | 4 | 2,8 | |
| | 3 | 2 | 14 | 9,8 | |
| | 3 | 3 | 66 | 46,2 | |
| Total | | | 143 | 100,0 | *26 (18,2%) |

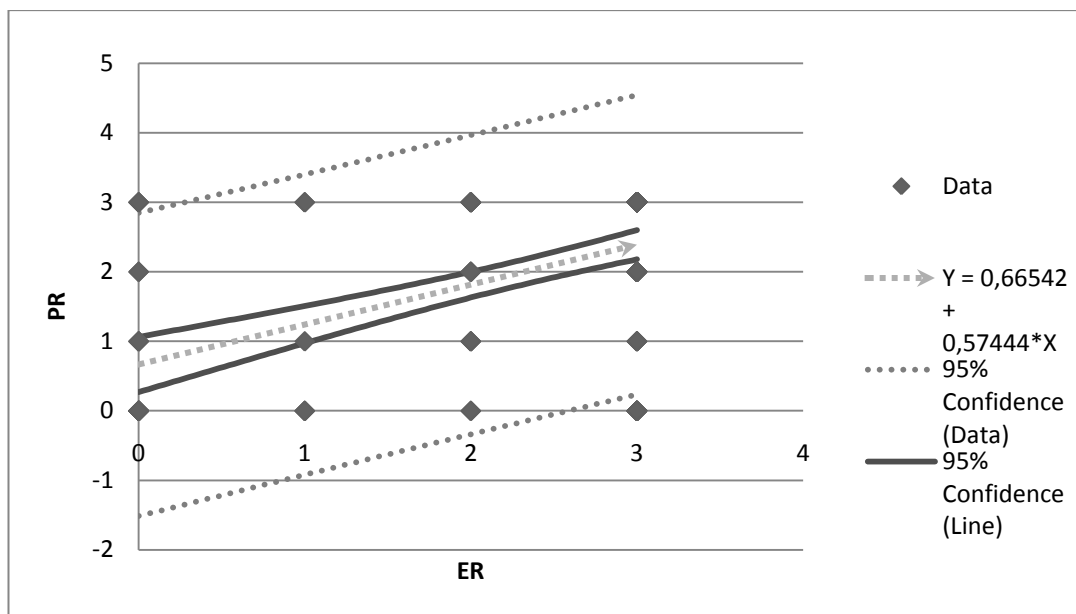
Notă: Prin * sunt selectate cazurile cu expresie diferită (opusă) a ER față de PR.

Tabelul.3.7. Corelația după Spearman a gradului de expresie a receptorilor hormonați ER și PR, și gradului de diferențiere al carcinoamelor mamare ductal invazive de tip NOS.

| | ER | PR | Grad de diferențiere |
|----------------------|---------|---------|----------------------|
| n=143 | | | |
| ER | | | |
| r_s | | 0,48 | -0,11 |
| p | | 0,0001* | 0,10 |
| PR | | | |
| r_s | 0,48 | | -0,12 |
| p | 0,0001* | | 0,08 |

r_s – coeficientul de corelație Spearman. *Valori statistic semnificative.

Astfel în 8 cazuri/5,6% de tumori ER negative, receptorul pentru PR a fost cuantificat drept pozitiv și invers, în 18 cazuri/12,6% de carcinom ER pozitiv, celulele tumorale nu au prezentat receptorul pentru PR.



| n | A | B | R | R ² |
|-----|----------|----------|----------|----------------|
| 143 | 0,665423 | 0,574448 | 0,525034 | 0,275661 |

Fig.3.9. Testul de regresie liniară: relație direct proporțională dintre valoarea ER și PR, rezultată cu corelație de talie rezonabilă.

Prin compararea expresiei acestor markeri, am determinat valori statistic semnificative de diferență, testul t-Student rezultând cu $t=3,1$ la un $p<0,002$.

Dat fiind faptul, că receptorii pentru estrogeni sunt utilizați de rând cu PR în definirea grupului hormon-dependent de tumori, am corelat valorile Allred al acestora, și în plus am verificat corelația cu gradul de diferențiere (tab.3.7). Astfel am determinat, că valoarea expresiei PR în studiul nostru este în funcție de expresia ER (și invers). Ambii markeri au demonstrat însă valori de corelare sub nivelul de credibilitate statistică în raport cu gradul de diferențiere al tumorii.

Faptul că valoarea PR este influențată de ER a demonstrat-o și testul de regresie liniară (Fig.3.9).

Expresia ER și PR în metastazele limfonodale. În acest studiu au fost cuantificate doar cazurile în care metastaza limfonodală prezenta nu mai puțin de 1000 celule tumorale, cu sediu intranodal. Astfel, studiului comparativ – tumoarea primară vs metastaza limfonodală au fost supuse 95 cazuri.

Receptorul ER a fost considerat negativ în 24 cazuri/25,3%, iar în restul metastazelor a prezentat scor Allred pozitiv precum: +1 – în 7 cazuri/7,4%, +2 – 14 cazuri/14,7%, +3 – 50 cazuri/52,6%. Comparând valorile Allred pentru ER din tumoarea primară vs metastază am determinat că în 7 cazuri/7,4% expresia ER se schimba în urma metastazării, și anume: 1 caz/1,1% din negativ în pozitiv și în 6 cazuri/6,3% din pozitiv în negativ. Schimbul expresiei s-a determinat în ambele grupe de vârstă, implicând doar tumori cu grad G2 și G3 de diferențiere. Studiul statistic a determinat valori semnificativ credibile de diferență dintre expresia ER de cele 2 localizări, indicele t-Student fiind egal cu 3,27 la un $p < 0,002$. Totodată, s-a determinat că expresia ER în metastază este puternic influențată de valoarea sa în tumoarea primară (test de regresie liniară: $R=0,85$, $R^2=0,73$).

Receptorul PR a fost evaluat cu scor „0” în 29 cazuri/30,5%, +1 – în 6 cazuri/6,3%, +2 – 13 cazuri/13,7% și +3 – 47 cazuri/49,5%. Similar receptorului ER, valoarea PR din metastază este influențată de tumoarea primară (test de regresie: $R=0,70$, $R^2=0,49$). Prin compararea valorilor pentru PR de ambele localizări, am determinat că acesta s-a schimbat radical în 16 cazuri/16,8%, și anume în 6 cazuri/6,3% din negativ în pozitiv și în 10 cazuri/10,5% din pozitiv în negativ.

Identic cu ER, transferurile de scor pentru PR au fost înregistrate doar la tumori cu grad G2 și G3 de diferențiere, fiind înregistrate în ambele grupe de vârstă.

Eseul statistic de comparare a valorilor PR de ambele localizări nu a determinat valori semnificative, fiindcă indicele t-Student a fost înregistrat la un $t=1,28$, cu $p < 0,207$. Comparând valorile receptorilor hormonal ER, PR de ambele localizări am determinat că din cele 7 cazuri/7,4% cu transfer de valoare pentru ER (Anexa 1) în 4 din ele PR a fost stabil, și invers, instabil în 3 cazuri în urma metastazării (Fig.3.10).

În urma analizei comparative cu valoarea ER a variațiilor de transfer a PR pentru 16 cazuri/16,8%, menționate mai sus, am determinat că în 14 din ele expresia ER a fost stabilă după metastazare și doar în două din ele a devenit negativă în metastaza limfonodală (Anexa 1, Fig.3.10).

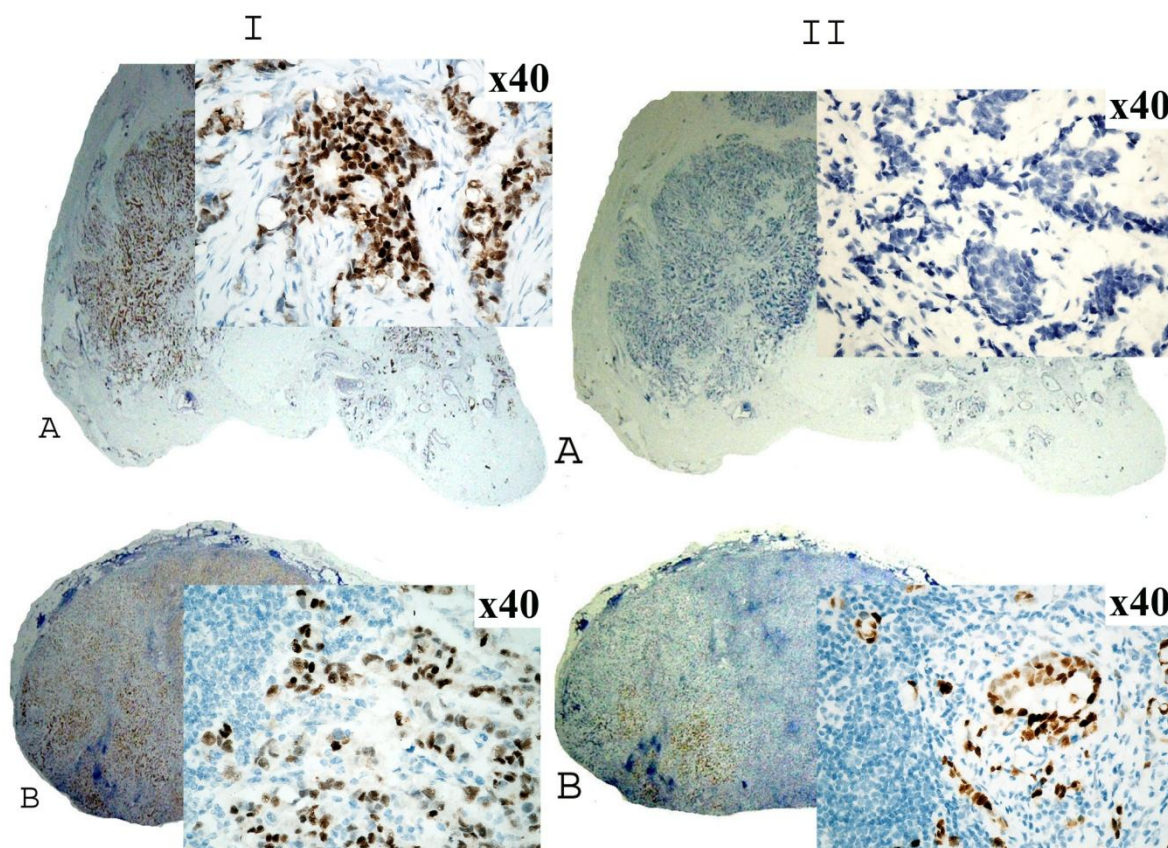


Fig.3.10. Carcinom ductal invaziv, G3, pacientă de 52 ani. Tumoarea primară (A) și metastaza limfonodală (B) colorate simultan pe aceeași lamă pentru ER (I) și PR (II), contracolorare hematoxină *Lille*. De notat, că ER a rămas stabil (I), iar PR a devenit intens pozitiv în urma metastazării (II, B).

Carcinomul lobular invaziv. Expresia ER și PR în tumoarea primară. În studiul dat au fost examinate 18 tumori de la paciente cu vârsta cuprinsă între 45-78 ani, la care histologic s-a stabilit diagnosticul de carcinom mamar lobular invaziv. Aceste tumori în majoritatea cazurilor au fost slab diferențiate, și repartizate după grad precum: G1 – 2 cazuri/11,1%, G2 – 6 cazuri/33,3%, G3 – 10 cazuri/55,6%. Din cele 18 tumori examinate, doar una sa referit la grupul de vârstă de până la 49 ani, fiind evaluată cu gradul G2 de diferențiere.

Histologic aceste tumori au fost reprezentate de celule solitare dispersate sau aranjate într-o singură linie în stroma intens fibrozată (Fig.3.11). Aceste cordoane lineare deseori au fost localizate în jurul ductelor normale. Celulele tumorale au prezentat nucleu rotund-oval, rareori cu aspect denticulat, cu puțină citoplasmă în jurul lor. Pentru studiu au fost selectate cazurile clasice și nu au fost incluse tumorile cu patern alveolar, solid, pleomorfic și tubular.

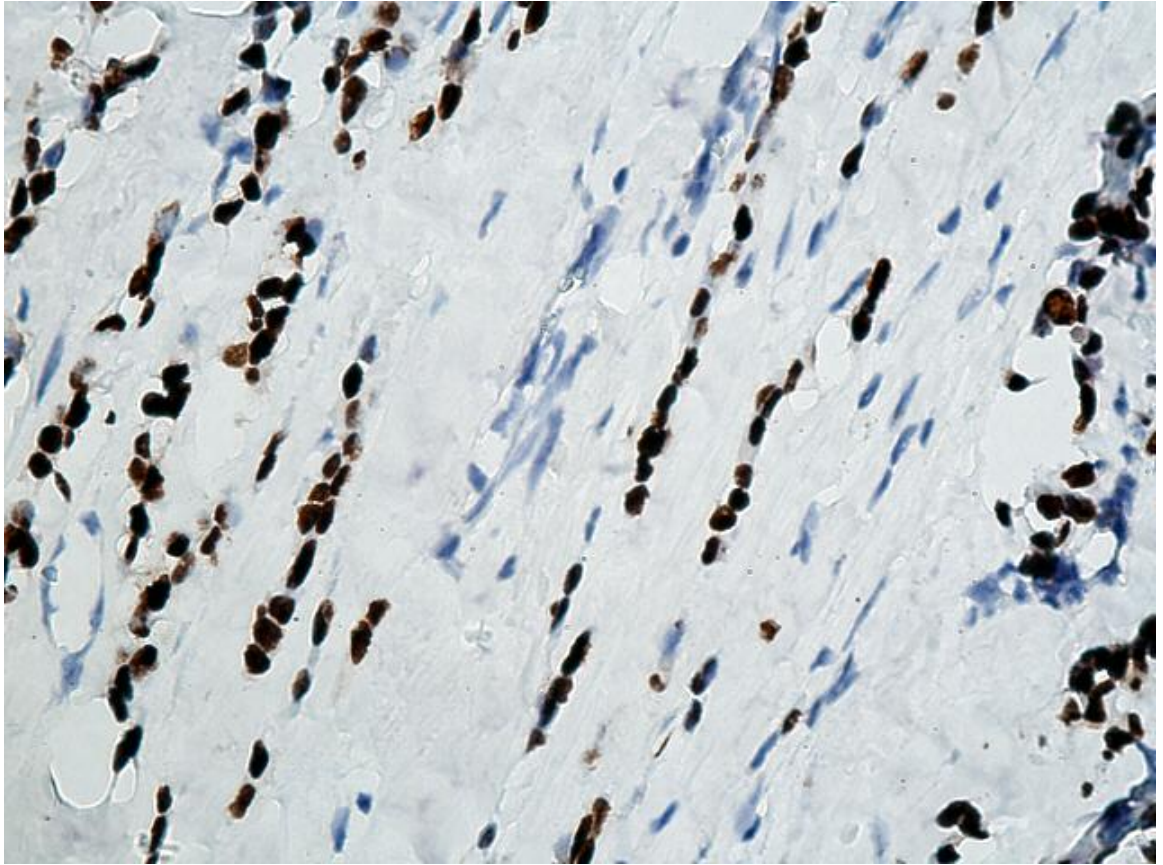


Fig.3.11. Carcinom lobular invaziv, G3, prelevat de la o pacientă de 67 ani. Celulele tumorale au fost marcate la receptorul pentru estrogen (contracolorare cu hematoxină *Lille*, x400). De notat stroma intens fibrozată și cordoanele liniare, în „șir indian” de celule tumorale.

Receptorul pentru ER în tumoarea primară a avut o expresie negativă în 4 cazuri/22,2% și pozitivă în 14 cazuri/77,8%, cu următoarea repartizare după scorul Allred: +2 – în 3 cazuri/16,7%, +3 – 11 cazuri/61,1% (tab.3.8).

Gradul de diferențiere a fost repartizat după scorul Allred pentru ER în felul următor:

- Scor Allred 0: G2 – 2 cazuri/11,1%, G3 – 2 cazuri/11,1%;
- Scor Allred +2: 3 tumori, fiecare cu grad aparte de diferențiere, G1, G2, G3 (în final 5,6% fiecare);
- Scor Allred +3: G1 – 1 caz/5,6%, G2 – 13 cazuri/16,7%, G3 – 7 cazuri/38,9%.

De menționat că scorul +1 nu a fost atribuit nici unui caz. Unicul caz cu vârsta cuprinsă de până la 49 ani, a fost evaluat cu scorul +2. Aproximativ aceeași repartizare după scorul expresiei a fost determinat și în cazul receptorului pentru progesteron (tab.3.9).

Tabelul.3.8. Expresia ER vs gradul de diferențiere al tumorii.

| ERtm (scorul Allred) | Gradul de diferențiere | Cazuri | |
|----------------------------|---------------------------|--------|------|
| | | n | % |
| 0 | G2 | 2 | 11,1 |
| 0 | G3 | 2 | 11,1 |
| 2 | G1 | 1 | 5,6 |
| 2 | G2 | 1 | 5,6 |
| 2 | G3 | 1 | 5,6 |
| 3 | G1 | 1 | 5,6 |
| 3 | G2 | 3 | 16,7 |
| 3 | G3 | 7 | 38,9 |
| Total | | 18 | 100 |

Tabelul.3.9. Expresia PR vs gradul de diferențiere al tumorii.

| PRtm (scorul Allred) | Gradul de diferențiere | Cazuri | |
|----------------------------|---------------------------|-----------|------------|
| | | n | % |
| 0 | G2 | 2 | 11,1 |
| 0 | G3 | 3 | 16,7 |
| 2 | G1 | 1 | 5,6 |
| 2 | G2 | 2 | 11,1 |
| 2 | G3 | 1 | 5,6 |
| 3 | G1 | 1 | 5,6 |
| 3 | G2 | 2 | 11,1 |
| 3 | G3 | 6 | 33,3 |
| Total | | 18 | 100 |

Astfel cazurile au fost repartizate precum urmează: scor 0 – 5 cazuri/27,8%, scor +2 – 4 cazuri/22,2%, scor +3 – 9 cazuri/50%. Au fost înregistrate aproximativ aceleași relații dintre gradul de diferențiere al tumorilor și scorul pentru PR, precum anterior cu ER (tab.3.9).

Prin compararea valorilor expresiei markerilor ER și PR, am constatat un singur caz (5,6%) de diferență majoră, în care ER pozitiv a fost asociat cu PR negativ. Acesta a fost evaluat cu grad G3 de diferențiere, fiind catalogat la grupul de vârstă de „după 49”. (tab.3.10). Totodată testul de regresie a susținut o asociere puternică, statistic semnificativă dintre valorile ER și PR ($R=0,87$, $R^2=0,76$), suplimentar susținut prin testul t-Student ($t=1,46$, $p<0,163$). Testele statistice nu au confirmat asocieri semnificative dintre expresia ER, PR cu vârsta și gradul tumorii. Singura corelație semnificativă statistic s-a determinat la compararea gradului de diferențiere și vârstei pacientelor ($r_s=0,6$, $p<0,007$).

Expresia receptorilor ER și PR după metastazare. Receptorul ER a fost determinat în 13 cazuri/72,2% de tumori metastazate. Evaluând expresia din metastază în raport cu valoarea ER din tumoarea primară am determinat un singur caz de transfer (5,6%), și anume de la +2 la negativ în nodul limfatic.

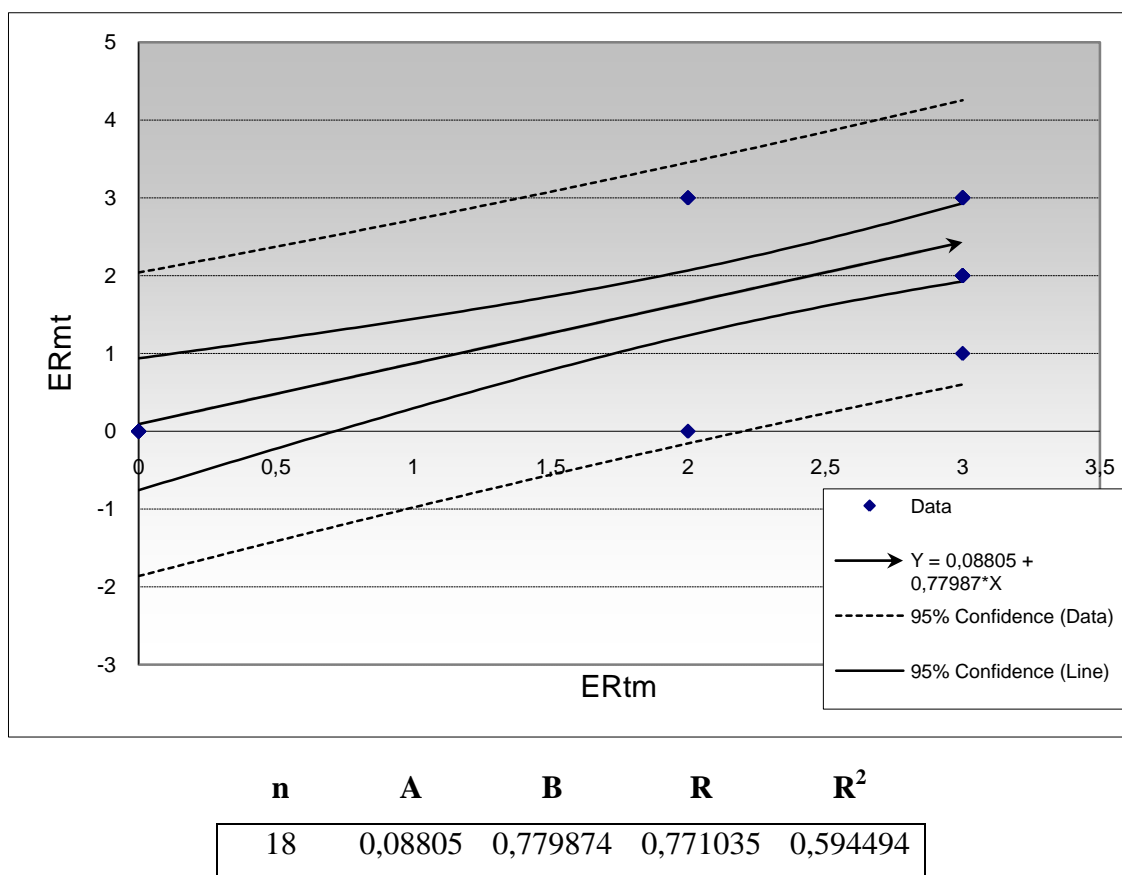


Fig.3.12. Testul de regresie liniară: relație direct proporțională dintre valoarea ER de ambele localizări, rezultată cu corelație de talie înaltă.

Acest caz a fost raportat cu grad G1 de diferențiere și vârstă „după 49”. Trebuie de menționat că acest caz s-a asociat cu transfer identic al expresiei receptorului PR (tab.3.10). Comparând valorile ER de ambele localizări nu am determinat deosebiri semnificativ statistice

($t=1,94$, $p<0,068$). Mai mult, valoarea receptorului pentru ER din metastază a fost în funcție de valoarea sa în tumoarea primară (Fig.3.12).

Tabelul.3.10. Expresia receptorilor hormonal ER și PR în tumoarea primară și metastaza limfonodală: studiu comparativ, raportat la grupa de vârstă și gradul de diferențiere al tumorii.

| Expresia (după ERtm) | Scorul Allred | | | | Grad | Grupa de vârstă | n | % |
|----------------------------|---------------|------|------|------|---------|--------------------|------|------|
| | ERtm | ERmt | PRtm | PRmt | | | | |
| negativă | 0 | 0 | 0 | 0 | G2 | după 49 | 2 | 11,1 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | G3 | după 49 | 2 | 11,1 |
| pozitivă | 2 | 0 | 2 | 0 | G1 | după 49 | 1 | 5,6 |
| | 2 | 3 | 0 | 0 | G3 | după 49 | 1 | 5,6 |
| | 2 | 3 | 3 | 3 | G2 | până la 49 | 1 | 5,6 |
| | 3 | 1 | 3 | 3 | G3 | după 49 | 1 | 5,6 |
| | 3 | 2 | 2 | 2 | G3 | după 49 | 1 | 5,6 |
| | 3 | 2 | 2 | 3 | G2 | după 49 | 1 | 5,6 |
| | 3 | 2 | 3 | 1 | G3 | după 49 | 1 | 5,6 |
| | 3 | 2 | 3 | 2 | G1 | după 49 | 1 | 5,6 |
| | 3 | 2 | 3 | 3 | G3 | după 49 | 1 | 5,6 |
| | 3 | 3 | 2 | 3 | G2 | după 49 | 1 | 5,6 |
| | 3 | 3 | 3 | 0 | G3 | după 49 | 1 | 5,6 |
| | 3 | 3 | 3 | 1 | G2 | după 49 | 1 | 5,6 |
| 3 | 3 | 3 | 3 | G3 | după 49 | 2 | 11,1 | |
| Total | | | | | | | 18 | 100 |

ERtm, PRtm – valoarea scorului Allred pentru ER și PR în tumoarea primară; *ERmt, PRmt* – valoarea scorului Allred pentru ER și PR în metastază; *Grad* – gradul de diferențiere al tumorii.

Repartizarea cazurilor după expresia receptorului PR în metastază a fost următoarea: 7 cazuri (38,9%) PR negativ și 11 cazuri (61,1%) PR pozitiv. La compararea expresiei PR de localizare primară și metastatică am determinat 2 cazuri (11,1%) de transfer al expresiei din pozitiv în negativ, însă similar receptorului ER nu s-au determinat diferențe semnificativ statistice la suprapunerea valorilor de expresie a PR de localizări diferite ($t=1,72$, $p<0,103$). Mai

mult, valoarea expresiei PR în metastază fiind în funcție de valoarea PR din tumoarea primară (testul de regresie liniară: $R=0,67$, $R^2=0,45$).

Prin evaluarea comparativă a cazurilor de transfer ER și PR am determinat, că un caz de transfer de expresie a ER din pozitiv în negativ a fost susținut de schimbări similare a PR, iar al doilea caz de transfer al PR din pozitiv în negativ a evaluat cu un ER stabil pozitiv (tab.3.10, Fig.3.13).

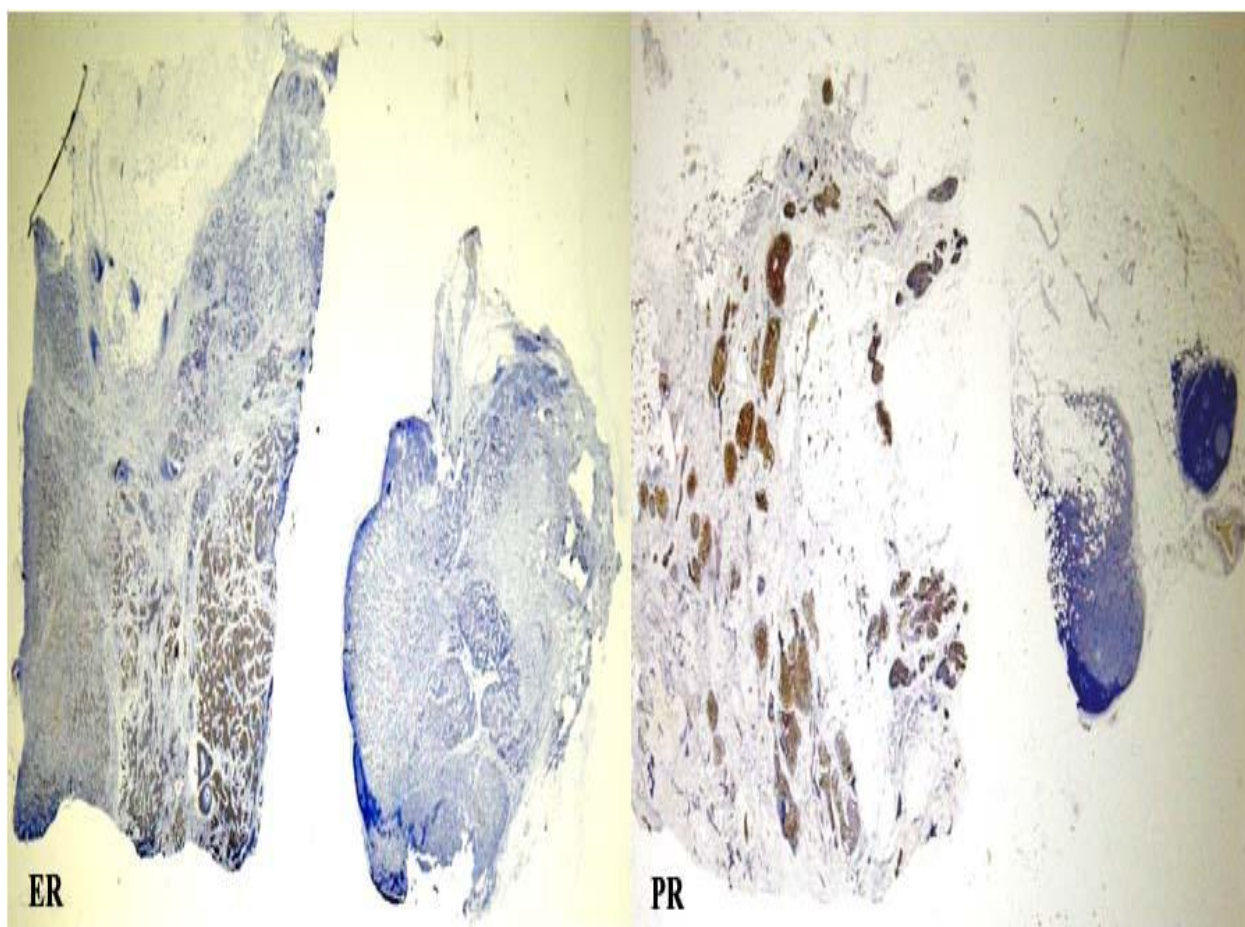


Fig.3.13. Tumori lobular invazive, marcate pentru ER (carcinom G1) și PR (carcinom G3), contracolorare cu hematoxină Lille, x7. De notat, că în ambele cazuri tumorile primare sunt intens hormon-pozitive, iar metastazele limfonodale hormon-negative.

Diferențele statistice dintre tipul ductal și lobular de carcinom mamar invaziv după ER, PR. Deși aceste tipuri de carcinom au trăsături histologice distincte, am considerat oportun de a evidenția și diferențele de expresie a receptorilor hormonalți pentru ER și PR. Deși valorile medii de expresie al acestor receptori par a fi diferite pentru carcinomul ductal și lobular, prin

efectuarea testului ANOVA nu am constatat diferențe semnificativ statistice dintre valorile ER și PR în funcție de tipul histologic (tab. 3.11).

Tabelul 3.11. Analiza dispersională (ANOVA, metoda *LSD*) a valorilor expresiei ER și PR de diversă localizare în funcție de tipul histologic al carcinomului mamar.

| | PRmt lobul | PRmt ductal | ERmt lobul | PRtm lobul | ERmt ductal | PRtm ductal | ERtm lobul | ERtm ductal | M±ES |
|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------|
| PRmt lobul | ---- | 0,633 | 0,821 | 0,821 | 0,633 | 0,616 | 0,821 | 0,616 | 1,5±0,326 |
| PRmt ductal | no | ---- | 0,633 | 0,633 | 0,357 | 0,326 | 0,633 | 0,326 | 1,58±0,134 |
| ERmt lobul | no | no | ---- | 0,821 | 0,633 | 0,616 | 0,821 | 0,616 | 1,78±0,298 |
| PRtm lobul | no | no | no | ---- | 0,633 | 0,616 | 0,821 | 0,616 | 1,94±0,308 |
| ERmt ductal | no | yes | no | no | ---- | 0,326 | 0,633 | 0,326 | 1,95±0,130 |
| PRtm ductal | no | yes | no | no | no | ---- | 0,616 | 0,291 | 1,98±0,106 |
| ERtm lobul | no | no | no | no | no | no | ---- | 0,616 | 2,17±0,294 |
| ERtm ductal | yes | yes | no | no | yes | yes | no | ---- | 2,29±0,097 |

M±ES – media aritmetică±eroarea standard; prin **Bold** – valoarea indicelui t; yes, no – prezența sau absența diferențelor semnificativ statistice la compararea mediilor, la un prag de semnificație $p<0,05$.

În sumar:

1. În studiu au fost incluse carcinoamele mamare invazive de tip ductal NOS și lobular. Acestea în majoritatea cazurilor au avut un grad G2 și G3 de diferențiere. Odată cu înaintarea în vârstă scade gradul de diferențiere al tumorilor mamare invazive.
2. Carcinoamele incluse în studiu în majoritatea cazurilor au fost estrogen și progesteron pozitive. Valoarea expresiei în metastaza limfonodală este influențată de tumoarea primară. Valoarea PR este în asociere cu gradul expresiei ER.
3. Receptorii hormonal pentru ER și PR nu sunt stabili pe parcursul metastazării, iar receptorul pentru PR demonstrează o rată net superioară a instabilității față de ER. Transferurile de scor au loc doar la cazuri cu grad G2 și G3 de diferențiere.
4. Valoarea expresiei receptorilor ER și PR nu este în funcție de tipul și gradul histologic al tumorii și nu este influențată de vârstă pacientelor.

3.3. Stabilitatea receptorului HER2 în procesul metastatic

Carcinomul ductal invaziv de tip NOS. Tumoarea primară. În acest studiu au fost incluse 143 de cazuri de carcinom tip NOS. În baza recomandărilor ASCO (2013) cazurile evaluate cu 0 și +1 au fost considerate negative, iar cele cu +2 și +3 – pozitive [97]. În urma analizelor statistice efectuate am determinat, că carcinomul ductal invaziv nu exprează receptorul HER2 în majoritatea cazurilor (116 cazuri/81,1%). Cazurile cu expresie pozitivă (27 cazuri/18,9%) au fost repartizate după cum urmează: +2 – 11 cazuri/7,7% și +3 – 16 cazuri/11,2% (tab.3.12).

Tabelul.3.12. Expresia HER2 în funcție de gradul de diferențiere al tumorii și vârsta pacientelor.

| HER2tm | Gradul de diferențiere | Grupa de vârstă | Cazuri | |
|--------------|------------------------|-----------------|------------|------------|
| | | | n | % |
| 0 | G1 | după 49 | 4 | 2,8 |
| 0 | G1 | până la 49 | 1 | 0,7 |
| 0 | G2 | după 49 | 46 | 32,2 |
| 0 | G2 | până la 49 | 22 | 15,4 |
| 0 | G3 | după 49 | 31 | 21,7 |
| 0 | G3 | până la 49 | 3 | 2,1 |
| 1 | G2 | după 49 | 3 | 2,1 |
| 1 | G2 | până la 49 | 2 | 1,4 |
| 1 | G3 | după 49 | 3 | 2,1 |
| 1 | G3 | până la 49 | 1 | 0,7 |
| 2 | G2 | după 49 | 4 | 2,8 |
| 2 | G2 | până la 49 | 3 | 2,1 |
| 2 | G3 | după 49 | 1 | 0,7 |
| 2 | G3 | până la 49 | 3 | 2,1 |
| 3 | G1 | până la 49 | 1 | 0,7 |
| 3 | G2 | după 49 | 6 | 4,2 |
| 3 | G2 | până la 49 | 4 | 2,8 |
| 3 | G3 | după 49 | 4 | 2,8 |
| 3 | G3 | până la 49 | 1 | 0,7 |
| Total | | | 143 | 100 |

În relație cu grupul de vârstă am determinat că în cazurile HER2 negative predomină paciențele cu vârsta „după 49” – 87 cazuri/60,8% față de grupul „până la 49” – 29 cazuri/20,3%. În cazurile HER2 pozitive de asemenea au predominat paciențele din grupul „după 49” – 15 cazuri/10,5%, iar grupul de „până la 49” a fost constituit din 12 cazuri/8,4%.

Pentru fiecare tip de scor HER2 s-au determinat toate 3 grade de diferențiere tumorală. Este de menționat că gradul G1 în marea majoritate a susținut scorul HER2 „0” – 5 cazuri/3,5% și doar 1 caz/0,7% a coincis cu scorul HER2 „+3”.

În urma analizei de corelație am determinat, că odată cu înaintarea în vârstă riscul de a face tumoare HER2 pozitivă scade ($r_s = -0,2$, $p < 0,009$). O corelație pozitivă, de talie slabă, dar statistic semnificativă ($r_s = 0,2$, $p < 0,03$) apare și la compararea vârstei cu gradul de diferențiere (tab.3.13).

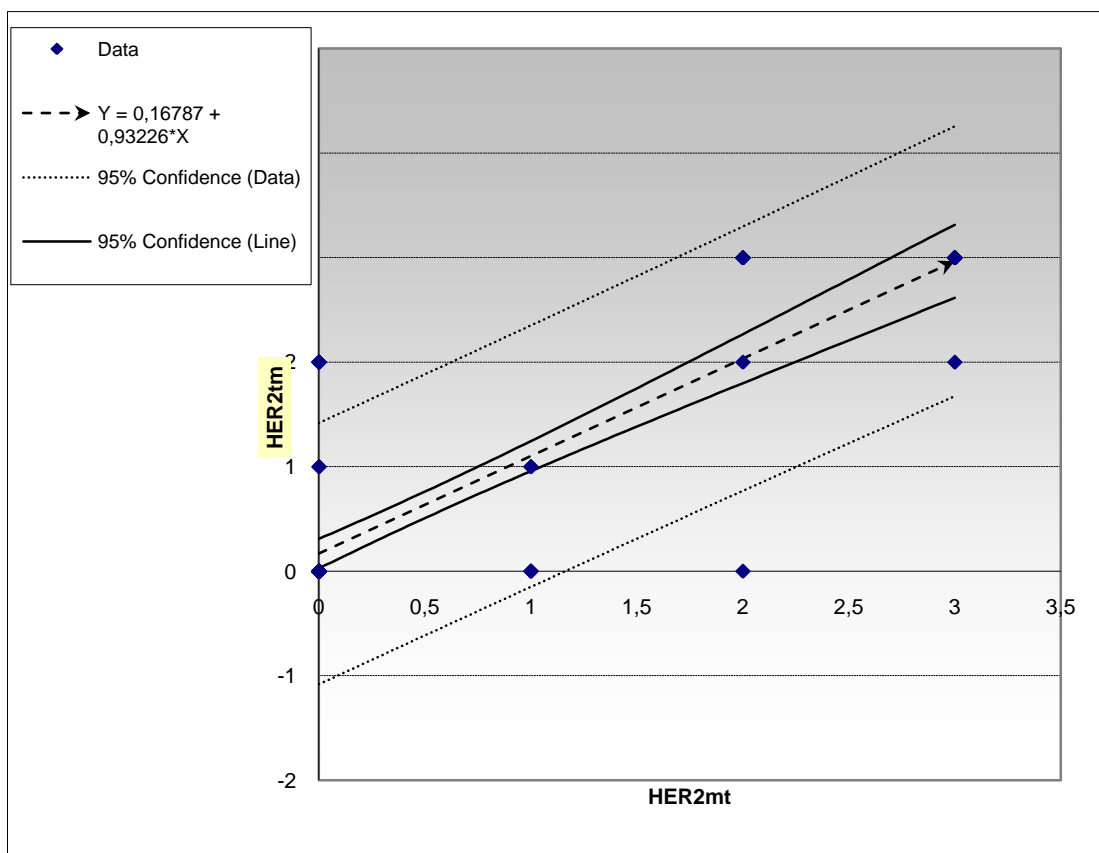
Tabelul.3.13. Corelația după Spearman a valorilor expresiei HER2 în tumoarea primară și metastaze, suplimentat în asocieri cu vârsta și gradul de diferențiere.

| | HER2tm | HER2mt | Vârsta | Grad |
|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| HER2tm | | | | |
| r_s | | 0,74 | -0,2 | 0,01 |
| p | | 0,0001 | 0,039 | 0,472 |
| HER2mt | | | | |
| r_s | 0,74 | | -0,12 | 0,04 |
| p | 0,0001 | | 0,125 | 0,358 |
| Vârsta | | | | |
| r_s | -0,18 | -0,12 | | 0,21 |
| p | 0,039 | 0,125 | | 0,021 |

HER2tm, **HER2mt** – valoarea markerului HER2 în tumoarea primară și metastază; **Grad** – gradul de diferențiere al tumorii; r_s – coeficientul de corelație Spearman, p – pragul de semnificație statistică.

Metastaza limfonodală. Din 143 tumori primare descrise anterior, studiului comparativ au fost supuse 96 cazuri, dintre care 80 cazuri/83,3% au fost considerate HER2 negative și repartizate după scor precum: 0 – 75 cazuri/78,1% și +1 – 5 cazuri/5,2%. Cazurile HER2 pozitive au fost distribuite cu scor +2 – 7 cazuri/7,3% și +3 – 9 cazuri/9,4%. Similar sediului

primar în ambele cazuri, pozitive și negative au predominat pacientele din grupa de vârstă de „după 49”.



| n | A | B | R | R ² |
|----|----------|----------|----------|----------------|
| 96 | 0,167875 | 0,932261 | 0,827416 | 0,684617 |

Fig.3.14. Testul de regresie lineară: relație direct proporțională dintre valoarea HER2tm din tumoarea primară și HER2 din metastază, corelație foarte înaltă.

Deși prin efectuarea testului t-Student am determinat, că expresia HER2 din cele două localizări este diferită statistic ($t=2,12$, $p<0,036$), după perfectarea testului Spearman am concluzionat, că valoarea HER2mt este influențată puternic de nivelul markerului dat în tumoarea primară ($r_s=0,74$ la un $p<0,0001$), rezultat susținut și prin testul de regresie (tab.3.13, Fig.3.14).

Prin studierea comparativă a expresiei HER2 de ambele localizări am determinat că acest receptor este instabil la metastazare, iar direcția de transfer al expresiei este în majoritatea cazurilor de la pozitiv în negativ: total 7 cazuri/7,3% de transfer, din care 6 cazuri/6,3% în direcția pierderii expresiei și un caz/1% de achiziție (tab.3.14, Fig.3.15).

Tabelul.3.14. Studiul comparativ al expresiei HER2 în tumoarea primară vs metastaza limfonodală

| Expresie (după HER2tm) | Scor | | n | % |
|---------------------------|--------|--------|-----------|------------|
| | HER2tm | HER2mt | | |
| negativă | 0 | 0 | 67 | 69,8 |
| | 0 | 1 | 3 | 3,1 |
| | 0* | 2 | 1 | 1,0 |
| | 1 | 0 | 2 | 2,1 |
| | 1 | 1 | 2 | 2,1 |
| pozitivă | 2* | 0 | 6 | 6,3 |
| | 2 | 2 | 1 | 1,0 |
| | 2 | 3 | 1 | 1,0 |
| | 3 | 2 | 5 | 5,2 |
| | 3 | 3 | 8 | 8,3 |
| Total | | | 96 | 100 |

Notă: Prin * au fost selectate cazurile cu transfer de scor HER2 în urma metastazării.

Tumora primara

Metastaza

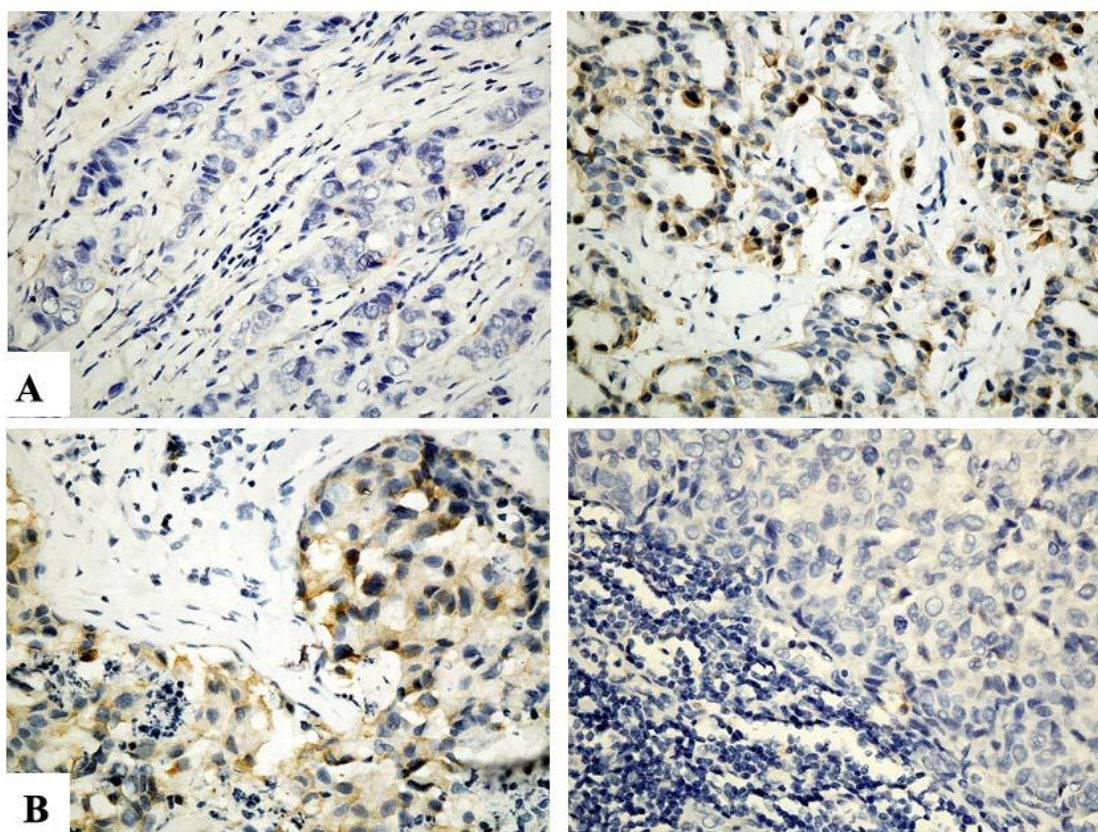


Fig.3.15. Carcinoame ductal invazive: expresia comparativă a HER2 în tumoarea primară vs metastaza limfonodală (contracolorare cu hematoxilină Lille, x40). De notat, că direcția de transfer al expresiei a fost în majoritatea cazurilor de la pozitiv spre negativ (A), rareori invers (B).

Carcinomul lobular invaziv. Tumoarea primară. Din cele 18 cazuri diagnosticate cu carcinom lobular invaziv, 15 cazuri/83,3% au fost considerate HER2 negative, iar repartizarea după scor a fost următoarea: HER2 „0”- 14 cazuri/77,7% și HER2 „+1” – 1 caz/5,6%. Cazurile HER2⁺ au fost minoritare, fiind înregistrate scoruri doar de HER2 „+2” – 3 cazuri/16,7%.

În relație cu gradul histologic, am determinat că gradul G1 (2 cazuri/11,1%) este întâlnit doar printre cazurile HER2 negative, iar în grupul HER2 pozitiv sunt doar tumori slab diferențiate (G2 și G3) (tab.3.16).

După repartizarea acestor cazuri la categorii de vârstă am realizat că majoritatea tumorilor, atât HER2⁺, cât și HER2⁻ au fost prelevate de la paciente „după 49” ani. Un singur caz/5,6% de „până la 49” ani, a fost cuantificat drept HER2 „0” și grad G2 de diferențiere.

Corelații statistice semnificative dintre scorul HER2, vârsta pacientelor și gradul histologic nu au fost înregistrate (tab.3.16). Corelație pozitivă de talie rezonabilă s-a determinat la asocierea vârstei pacientelor și gradul de diferențiere ($r_s=0,57$, $p<0,007$).

Tabelul 3.15. Forța de asociere a valorilor markerului HER2 de diversă localizare, vârsta și gradul de diferențiere al tumorii: corelație după Spearman.

| | HER2tm | HER2mt | Vârsta | Grad |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| HER2tm | | | | |
| r_s | | 0,50 | 0,03 | -0,03 |
| p | | 0,017 | 0,453 | 0,460 |
| HER2mt | | | | |
| r_s | 0,50 | | -0,13 | 0,06 |
| p | 0,017 | | 0,303 | 0,404 |
| Vârsta | | | | |
| r_s | 0,03 | -0,13 | | 0,57 |
| p | 0,453 | 0,303 | | 0,007 |
| Grad | | | | |
| r_s | -0,03 | 0,06 | 0,57 | |
| p | 0,460 | 0,404 | 0,007 | |

Cu **Bold** sunt selectate cazurile statistic semnificative ($p<0,05$); r_s – coeficientul de corelație Spearman; Grad – gradul de diferențiere al tumorii.

Metastaza limfonodală. În sediul limfonodal celulele tumorale au fost considerate în majoritatea cazurilor HER2⁻ (17 cazuri/94,4%). Unei singuri tumori/5,6% i-a fost atribuit scorul HER2 „+2”, care a corespuns gradului histologic G2 și vârsta „după 49” (tab.3.16).

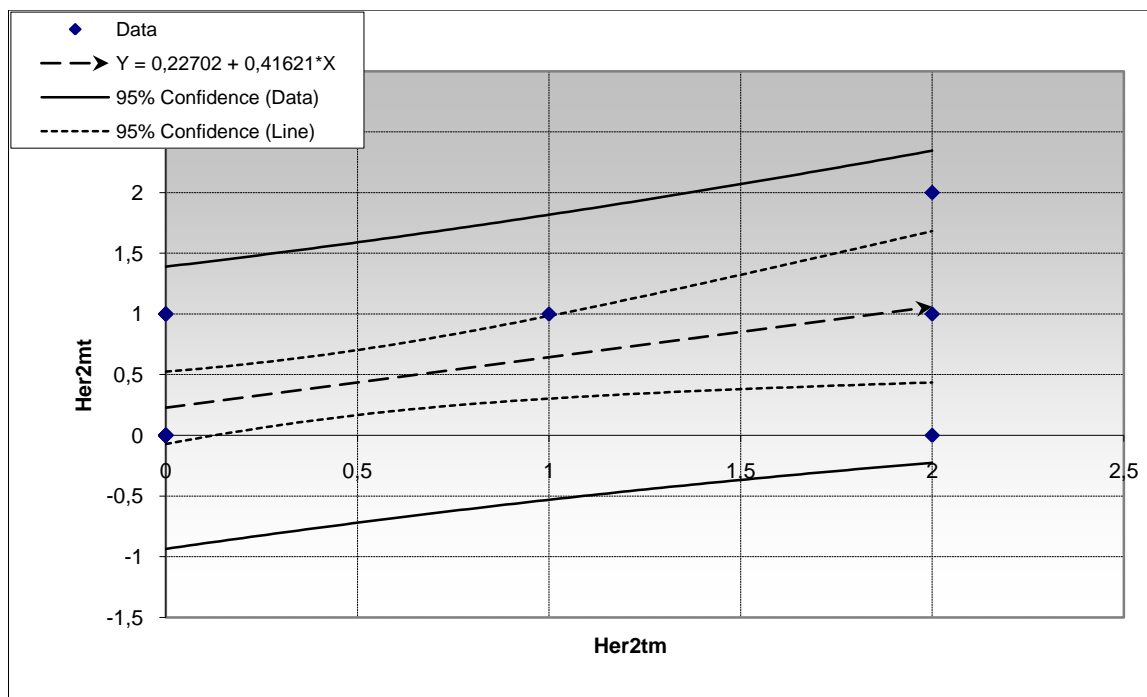
Tabelul.3.16. Expresia receptorului HER2 în tumoarea primară și metastaza limfonodală, în funcție de gradul histologic al tumorii și vârsta pacientei.

| Expresie (după HER2tm) | Gradul expresiei | | Gradul de diferențiere | Grupa de vârstă | Cazuri | |
|------------------------------|------------------|--------|---------------------------|--------------------|--------|-------|
| | HER2tm | HER2mt | | | n | % |
| negativă | 0 | 0 | G1 | după 49 | 1 | 5,6 |
| | 0 | 0 | G2 | după 49 | 3 | 16,7 |
| | 0 | 0 | G2 | până la 49 | 1 | 5,6 |
| | 0 | 0 | G3 | după 49 | 6 | 33,3 |
| | 0 | 1 | G1 | după 49 | 1 | 5,6 |
| | 0 | 1 | G3 | după 49 | 2 | 11,1 |
| | 1 | 1 | G3 | după 49 | 1 | 5,6 |
| pozitivă | 2* | 0 | G2 | după 49 | 1 | 5,6 |
| | 2* | 1 | G3 | după 49 | 1 | 5,6 |
| | 2 | 2 | G2 | după 49 | 1 | 5,6 |
| Total | | | | | 18 | 100,0 |

Cu * sunt selectate cazurile de transfer de scor HER2.

La evaluarea valorilor HER2 de ambele localizări am determinat că acestea corelează rezonabil și statistic semnificativ ($r_s=0,50$ la un $p<0,017$; $t=0$, $p=1$). Mai mult, testul de regresie a cuantificat o asociere pozitivă, direct proporțională între valorile HER2 (Fig.3.16).

Prin compararea expresiei HER2 până și după metastazare, am depistat 2 cazuri/11,1% de transfer de la scor pozitiv la negativ, ambele din categoria de vârstă „după 49” ani (tab.3.16). Cazurile HER2 negative din tumoarea primară nu au achiziționat expresie pozitivă în microambianța limfonodală.



| n | A | B | R | R ² |
|----|----------|----------|----------|----------------|
| 18 | 0,227027 | 0,416216 | 0,532556 | 0,283616 |

Fig.3.16. Testul de regresie lineară dintre HER2 cu localizare primară și limfonodală: relație direct proporțională între variabile.

Diferențele statistice între tipul ductal și lobular de carcinom mamar invaziv după HER2. Prin compararea valorilor HER2 de diversă localizare în funcție de tipul histologic al tumorii am stabilit că expresia acestui receptor nu este în funcție de morfologia carcinomului mamar (tab.3.17).

Tabelul 3.17. Analiza dispersională (metoda LSD) a expresiei receptorului HER2 în funcție de tipul histologic al carcinomului mamar.

| | M±ES | HER2mt lobular | HER2tm lobular | HER2mt ductal | HER2tm ductal |
|-----------------------|-----------|----------------|----------------|---------------|---------------|
| HER2mt lobular | 0,39±0,14 | ---- | 0,66* | 0,51* | 0,51* |
| HER2tm lobular | 0,39±0,18 | no | ---- | 0,51* | 0,51* |
| HER2mt ductal | 0,48±0,10 | no | no | ---- | 0,29* |
| HER2tm ductal | 0,61±0,11 | no | no | no | ---- |

M±ES – media aritmetică±eroarea standard; prin * – valoarea indicelui t; yes, no – prezența sau absența diferențelor semnificativ statistice la compararea mediilor, la un prag de semnificație p<0,05.

În sumar:

1. Carcinoamele mamare ductal invaziv de tip NOS și lobular invaziv sunt preponderent HER2 negative atât la nivel de tumoare primară, cât și metastază.
2. Cu înaintarea în vârstă scade gradul de diferențiere al carcinoamelor invazive și riscul de a genera tumori ductal invazive HER2 pozitive.
3. Expresia HER2 din tumoarea primară a carcinomului ductal invaziv tip NOS, diferă de cea din metastaza limfonodală. Testul de regresie liniară susține însă, că valoarea HER2 din metastază este dependentă de expresia HER2 în tumoarea primară.
4. Receptorul HER2 nu este stabil pe parcursul metastazării în ambele tipuri de cancer studiate, preponderent fiind înregistrată pierderea acestuia după metastazare în nodul limfatic.
5. Valoarea expresiei HER2 nu este în funcție de tipul histologic al carcinomului mamar.

3.4. Evoluția markerilor bazali CK5 și EGFR

Evoluția citokeratinei bazale CK5. Carcinomul mamar ductal invaziv de tip NOS. Tumoarea primară. Expresia citokeratinei bazale CK5 a fost studiată pe un lot de 135 tumori. Pacientele au fost repartizate după grupa de vârstă precum urmează: „până la 49” – 37 cazuri/27,4% și „după 49” – 98 cazuri/72,6%.

Carcinomul ductal invaziv în majoritatea cazurilor a fost evaluat drept CK5 negativ – 119 cazuri/88,1%. Cazurile pozitive au fost repartizate după scor în felul următor: +1 – 9 cazuri/6,6%, +2 – 4 cazuri/3% și +3 – 3 cazuri/2,2%. În relație cu grupul de vârstă am determinat că în cazurile cu expresie negativă predomină tumorile din grupul „după 49” – 89 cazuri/65,9%, urmat de 30 cazuri/22,2% din grupul „până la 49”. O ușoară prevalență a cazurilor ”după 49” față de „până la 49” s-a evidențiat și în cazul tumorilor CK5 pozitive – 9 cazuri/6,7% față de 7 cazuri/5,2%.

Majoritatea tumorilor cercetate au fost echivalente gradului G2 și G3 de diferențiere (tab.3.18). Gradul G1 a fost cuantificat în 5 tumori, dintre care 4 cazuri/3%, toate cu vârsta de „după 49” au corelat cu CK5 negativ și un caz/0,7% de „până la 49” a fost atribuit tumorii cu scor CK5 +2.

La asocierea scorului CK5 cu variabilele de grad și vârstă am determinat că valoarea expresiei citokeratinei bazale corelează direct cu gradul histologic ($r_s=0,03$, $p<0,37$) și invers față de vârsta pacientelor ($r_s= -0,12$, $p<0,08$). Însă acești indici de corelație nu au avut o valoare semnificativ statistică.

Tabelul 3.18. Expresia ciokeratinei bazale CK5 din tumoarea primară (CK5tm), în funcție de gradul de diferențiere al carcinomului și vârsta pacientelor.

| CK5tm | Gradul de diferențiere | Grupa de vârstă | Cazuri | |
|--------------|------------------------|-----------------|--------|-------|
| | | | n | % |
| 0 | G1 | după 49 | 4 | 3,0 |
| 0 | G2 | după 49 | 53 | 39,3 |
| 0 | G2 | până la 49 | 22 | 16,3 |
| 0 | G3 | după 49 | 32 | 23,7 |
| 0 | G3 | până la 49 | 7 | 5,2 |
| 1 | G2 | după 49 | 3 | 2,2 |
| 1 | G2 | până la 49 | 4 | 3,0 |
| 1 | G3 | după 49 | 2 | 1,5 |
| 2 | G1 | până la 49 | 1 | 0,7 |
| 2 | G2 | până la 49 | 2 | 1,5 |
| 2 | G3 | după 49 | 2 | 1,5 |
| 3 | G2 | până la 49 | 1 | 0,7 |
| 3 | G3 | după 49 | 2 | 1,5 |
| Total | | | 135 | 100,0 |

Metastaza limfonodală. Studiului comparativ au fost supuse 92 cazuri, din care metastazele au fost considerate CK5 negative în 83 cazuri/90,2%. Cazurile pozitive, 9/9,8% au fost repartizate după scor precum urmează: +1 – 4 cazuri/4,3%, +2 – cazuri/2,2% și +3 – 3,3%. În relație cu grupa de vârstă, metastaze CK5 negative mai frecvent au fost întâlnite la femei de „după 49” (61 cazuri/66,3%), decât la cele de „până la 49” – 22cazuri/23,9%.

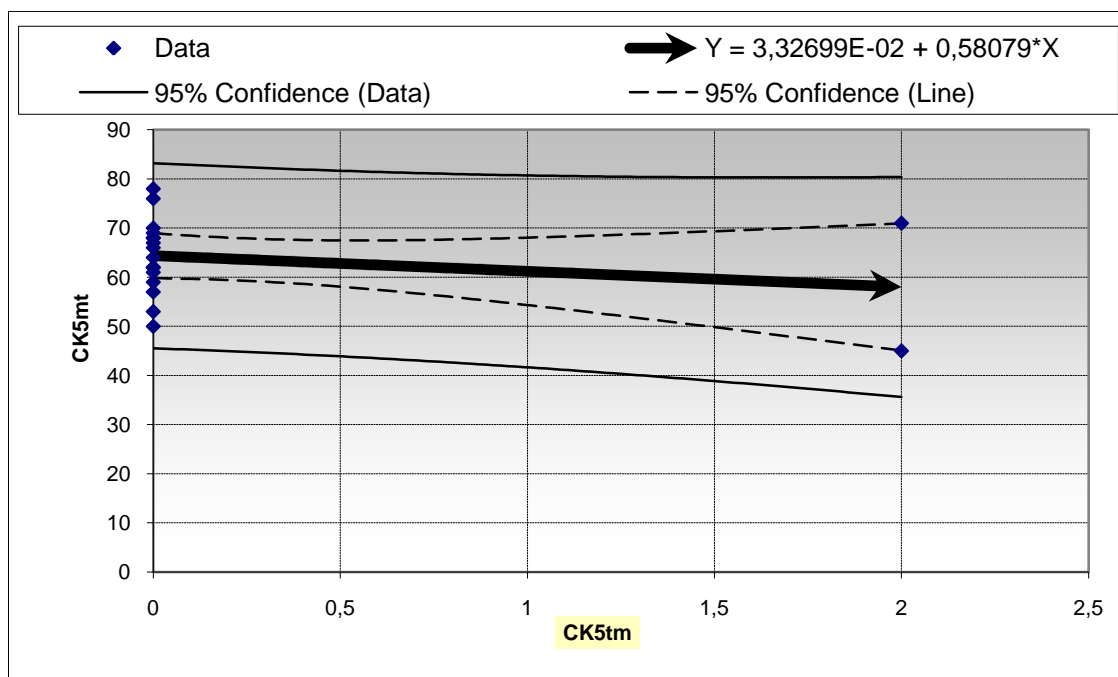
Tabelul 3.19. Calcularea indicilor de corelație a expresiei CK5 de diversă localizare cu vârsta și gradul de diferențiere al tumorii.

| | CK5tm | CK5mt | Vârsta | Grad |
|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| CK5tm | | | | |
| r_s | | 0,62 | -0,10 | 0,05 |
| p | | 0,0001 | 0,173 | 0,331 |
| CK5mt | | | | |
| r_s | 0,62 | | -0,03 | 0,01 |
| p | 0,0001 | | 0,388 | 0,461 |
| Vârsta | | | | |
| r_s | -0,10 | -0,03 | | 0,22 |
| p | 0,173 | 0,388 | | 0,016 |
| Grad | | | | |
| r_s | 0,05 | 0,01 | 0,22 | |
| p | 0,331 | 0,461 | 0,016 | |

r_s – coeficientul de corelație Spearman; **Grad** – gradul de diferențiere al tumorii. Cu **Bold** sunt selectate rezultatele semnificativ statistic ($p < 0,05$).

Cazurile CK5 pozitive au fost repartizate aproximativ egal – 5 cazuri/5,4% după 49 și 4 cazuri/4,4% până la 49 ani.

Eseul statistic a evidențiat că expresia CK5 în metastază este în funcție de valoarea CK5 în tumoarea primară, indicele de corelație indicând valori rezonabile, semnificativ statistice ($r_s=0,62$ la un $p<0,0001$) (tab.3.19).



| n | A | B | R | R ² |
|----|---------|----------|----------|----------------|
| 92 | 0,03327 | 0,580798 | 0,655952 | 0,430273 |

Fig.3.17. Testul de regresie liniară: relație direct proporțională dintre valorile CK5 la nivel de tumoare primară și metastaza limfonodală, rezultată cu corelație de talie înaltă.

Aceste rezultate sunt confirmate și prin testul de regresie, unde expresia CK5 la nivel metastatic a variat în concordanță cu valoarea CK5 din tumoarea primară (Fig.3.17).

La compararea valorilor de expresie a CK5 de ambele localizări nu am primit diferențe semnificativ statistice ($t=1,30$ la un $p<0,20$). O corelație pozitivă, de valoare joasă, dar statistic semnificativă s-a determinat la compararea vârstei cu gradul de diferențiere al tumorii ($r_s=0,22$, la un $p<0,016$). La compararea expresiei CK5 de ambele localizări am determinat 8 cazuri/8,8% de transfer de scor, majoritatea (6 cazuri/6,6%) evoluând cu pierderea expresiei CK5 la metastazare (tab.3.20, Fig.3.18). Din acestea, majoritatea (6 cazuri/6,6%) au prezentat pierderea expresiei CK5 după metastazare.

Tabelul 3.20. Studiul comparativ al expresie CK5 în tumoarea primară vs metastaza limfonodală.

| Expresia (după CK5tm) | CK5tm | CK5mt | n | % | % de transfer de scor |
|-----------------------|----------|----------|----------|------------|------------------------|
| negativă | 0 | 0 | 77 | 83,7 | 2 cazuri / 2,2% |
| | 0 | 1 | 1 | 1,1 | |
| | 0 | 2 | 1 | 1,1 | |
| pozitivă | 1 | 0 | 3 | 3,3 | 6 cazuri / 6,6% |
| | 1 | 1 | 1 | 1,1 | |
| | 1 | 3 | 1 | 1,1 | |
| | 2 | 0 | 3 | 3,3 | |
| | 2 | 1 | 1 | 1,1 | |
| | 2 | 2 | 1 | 1,1 | |
| | 3 | 1 | 1 | 1,1 | |
| 3 | 3 | 2 | 2,2 | | |
| Total | | | 92 | 100,0 | |

Cu **Bold** sunt selectate cazurile cu transfer de scor CK5 în urma metastazării.

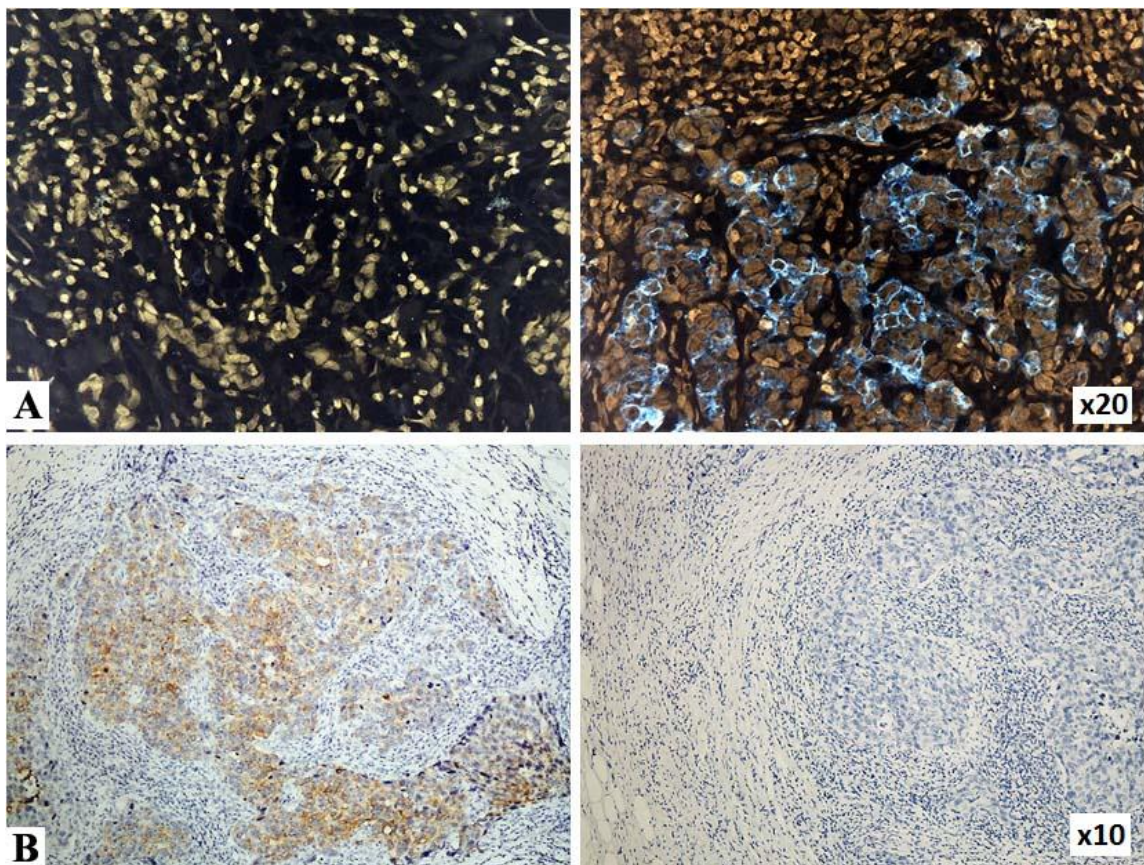


Fig.3.18. Carcinoame ductal invazive: expresia comparativă a citokeratinei bazale CK5 în tumoarea primară vs metastaza limfonodală. De notat, că direcția de transfer al expresiei este în majoritatea cazurilor de la pozitiv în negativ (B, imagine inversată NIS-elements), rareori invers (A, contracolorare cu hematoxilină Lille, x40).

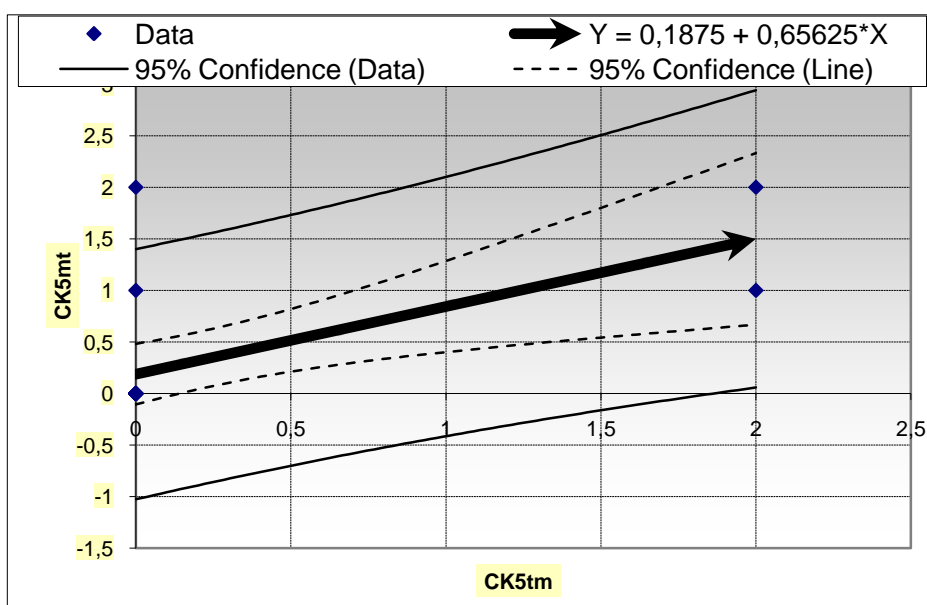
Carcinomul mamar lobular invaziv. Tumoarea primară. Acest tip de tumori a fost caracterizat prin expresie majoritară negativă a citokeratinei bazale CK5. Din 18 cazuri analizate, 16 cazuri/88,9% au fost evaluate cu scor „0” și doar 2 cazuri/11,1% cu scor +2.

În raport cu gradul histologic am determinat ca majoritatea tumorilor CK5 negative au un grad scăzut de diferențiere (G2 – 5 cazuri/27,8%, G3 – 9 cazuri/50%) și doar 2 cazuri/11,1% au fost carcinoame diferențiate G1. Cele 2 cazuri CK5 pozitive au fost evaluate cu G2 și G3.

Testul de corelație nu a evidențiat careva asocieri statistic semnificative dintre CK5 cu vârsta și gradul de diferențiere. În schimb, ultimii 2 parametri au prezentat o corelație de talie rezonabilă ($r_s=0,57$, $p<0,007$) (tab.3.21).

Metastaza limfonodală. În sediul limfonodal tumorile de asemenea au manifestat în majoritate un fenotip CK5 negativ – 14 cazuri/77,8%. Tumorile cu expresie CK5 pozitivă au fost repartizate după scor precum: CK5 +1 – 2 cazuri/11,1% și CK5 +2 – 2 cazuri/11,1%.

Forța de asociere dintre valorile CK5 de ambele localizări a fost evaluată cu o corelație de talie înaltă, statistic semnificativă ($r_s=0,65$, la un $p<0,002$). Diferențe statistice dintre expresia CK5 în tumoarea primară și metastază nu s-au determinat ($t= -0,81$, $p<0,43$). Mai mult, testul de regresie a susținut o relație „cauză-efect” înaltă compararea celor 2 valori de expresie CK5 (Fig.3.19).



| n | A | B | R | R ² |
|----|--------|---------|----------|----------------|
| 18 | 0,1875 | 0,65625 | 0,618718 | 0,382813 |

Fig.3.19. Corelație înaltă a valorilor CK5 din metastază limfonodală cu expresia CK5 în tumoarea primară: test de regresie lineară.

La analiza detaliată a expresiei CK5 în funcție de caz și localizare am determinat 2 cazuri/11,1% de achiziționare de către celulele maligne a expresiei CK5 în ambianța limfonodală (tab.3.21). Aceste cazuri au fost raportate la tumori cu grad G2 și G3. Cazuri de pierdere a expresiei CK5 la metastazare nu s-au semnalat.

Tabelul 3.21. Stabilitatea expresiei CK5 pe parcursul metastazării.

| Expresie (după CK5tm) | CK5tm | CK5mt | Grad de diferențiere | Grupa de vârstă | n | % | % cazurilor de transfer |
|-----------------------|----------|----------|----------------------|-----------------|----------|------------|-------------------------|
| negativă | 0 | 0 | G1 | după 49 | 2 | 11,1 | 2 cazuri / 11,1% |
| | 0 | 0 | G2 | după 49 | 5 | 27,8 | |
| | 0 | 0 | G3 | după 49 | 7 | 38,9 | |
| | 0 | 1 | G3 | după 49 | 1 | 5,6 | |
| | 0 | 2 | G3 | după 49 | 1 | 5,6 | |
| pozitivă | 2 | 1 | G2 | după 49 | 1 | 5,6 | - |
| | 2 | 2 | G3 | după 49 | 1 | 5,6 | |
| Total | | | | | 18 | 100,0 | |

Cu **Bold** sunt selectate cazurile cu transfer de scor.

Diferențele statistice dintre tipul ductal și lobular de carcinom mamar invaziv după expresia CK5. În urma analizei de varianță a valorilor CK5 în funcție de tipul histologic nu am determinat diferențe semnificativ statistice dintre expresia citokeratinei bazale în cazurile de carcinom mamar ductal invaziv (tip NOS) și lobular infiltrativ (tab.3.22).

Tabelul 3.22. Compararea expresiei CK5 din tumoarea primară și metastaza limfonodală în funcție de tipul histologic al carcinomului mamar: testul ANOVA.

| | M±ES | CK5mt ductal | CK5tm lobular | CK5tm ductal | CK5mt lobular |
|----------------------|-----------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| CK5mt ductal | 0,18±0,07 | ---- | 0,34* | 0,19* | 0,34* |
| CK5tm lobular | 0,22±0,15 | no | ---- | 0,34* | 0,44* |
| CK5tm ductal | 0,26±0,07 | no | no | ---- | 0,34* |
| CK5mt lobular | 0,33±0,16 | no | no | no | ---- |

M±ES – media aritmetică±eroarea standard; prin * – valoarea indicelui t; yes, no – prezența sau absența diferențelor semnificativ statistice la compararea mediilor, la un prag de semnificație p<0,05.

În sumar:

1. Carcinoamele invazive de tip ductal (NOS) și lobular în majoritatea cazurilor sunt CK5 negative.
2. Citokeratina bazală CK5 este instabilă pe parcursul metastazării carcinomului ductal invaziv tip NOS, aceasta manifestându-se atât în direcția achiziționării, cât și pierderii expresiei, ultimul tip de transfer constituind majoritatea.
3. În cazul carcinomului lobular invaziv se determină doar achiziționarea de către celulele tumorale a CK5 după metastazare. Rezultatele necesită o confirmare suplimentară din partea altor cercetători pe loturi de cazuri semnificativ mai mari.

Evoluția receptorului factorului de creștere epidermală EGFR.

Carcinomul mamar ductal invaziv de tip NOS. Tumoarea primară. În acest studiu au fost examinate 65 de tumori, dintre care 36 cazuri/55,4% au fost evaluate ca EGFR negative. Cazurile pozitive au fost repartizate după scor precum urmează: scor +1 – 10 cazuri/15,4%, +2 – 15 cazuri/23,1% și +3 – 4 cazuri/6,2%. Cazurile selectate au fost gradate histologic și numeric au constituit: G1 – 2 cazuri/3,08%, G2 – 35 cazuri/53,85% și G3 – 28 cazuri/43,07%. De remarcat, că ambele cazuri G1 au fost EGFR negative.

Grupul de vârstă „după 49” a fost majoritar în ambele cohorte, EGFR pozitivă și negativă (tab.3.23).

Tabelul 3.23. Repartizarea cazurilor după scorul EGFR, gradul histologic și grupa de vârstă.

| Expresie | EGFRtm | Gradul de diferențiere | Grupa de vârstă | n | % |
|-----------------|---------------|-------------------------------|------------------------|----------|----------|
| negativă | 0 | G1 | după 49 | 1 | 1,5 |
| | 0 | G1 | până la 49 | 1 | 1,5 |
| | 0 | G2 | după 49 | 13 | 20,0 |
| | 0 | G2 | până la 49 | 7 | 10,8 |
| | 0 | G3 | după 49 | 12 | 18,5 |
| | 0 | G3 | până la 49 | 2 | 3,1 |
| pozitivă | 1 | G2 | după 49 | 5 | 7,7 |
| | 1 | G2 | până la 49 | 1 | 1,5 |
| | 1 | G3 | după 49 | 2 | 3,1 |
| | 1 | G3 | până la 49 | 2 | 3,1 |
| | 2 | G2 | după 49 | 3 | 4,6 |
| | 2 | G2 | până la 49 | 4 | 6,2 |
| | 2 | G3 | după 49 | 7 | 10,8 |
| | 2 | G3 | până la 49 | 1 | 1,5 |
| | 3 | G2 | după 49 | 2 | 3,1 |
| 3 | G3 | după 49 | 2 | 3,1 | |
| Total | | | | 65 | 100,0 |

Studiul statistic a pus în evidență o corelație slabă, dar statistic semnificativă dintre gradul histologic și vârsta pacientelor incluse în studiu ($r_s=0,23$, $p<0,03$). EGFR raportat la vârstă ($r_s=-0,04$, $p<0,36$) și gradul histologic ($r_s=0,13$, $p<0,14$) însă nu a determinat corelații semnificativ statistice.

Metastaza limfonodală. Studiului comparativ, tumoare primară-metastază au fost supuse 38 cazuri, repartizate după gradul de diferențiere în G1 – 1 caz/2,6%, G2 – 16 cazuri/42,1% și G3 – 21 cazuri/55,3%. Tumorile au fost prelevate de la paciente din următoarele grupe de vârstă: până la 49 – 10 cazuri/26,3% și după 49 – 28 cazuri/73,7%. Majoritatea tumorilor de grupă „până la 49” – 8 cazuri/21,1%, au fost evaluate cu scor EGFR negativ (tab.3.24, 3.26).

Testul t-Student nu a identificat diferențe statistice veridice dintre valoarea EGFR din tumoarea primară vs metastază ($t = -1,96$, $p < 0,06$). Mai mult, valoarea numerică a acestui receptor în metastază este influențată pozitiv de scorul EGFR din tumoarea primară (Fig.3.19).

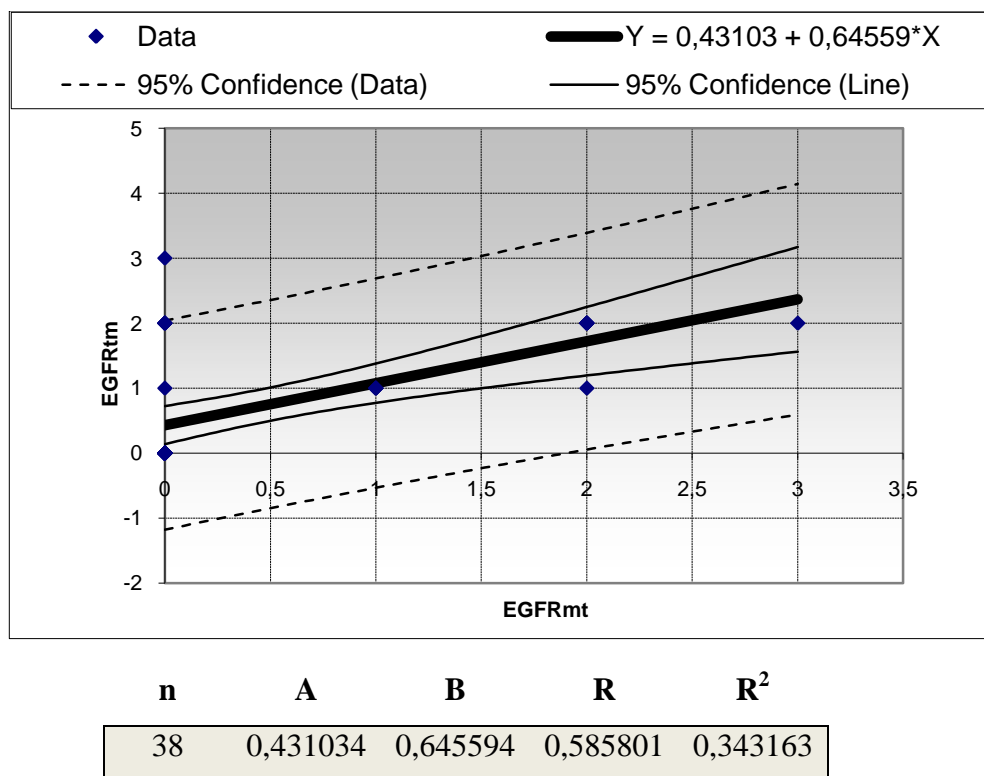


Fig.3.19. Scorul EGFR din metastaza limfonodală vs valoarea EGFR din tumoarea primară: testul de regresie lineară reflectă o corelație pozitivă, de talie rezonabilă.

Tabelul 3.25. Forța de asociere a scorului EGFR de diversă localizare, cu gradul de diferențiere al tumorii și vârsta pacienților

| | EGFRmt | EGFRtm | Grad | Vârsta |
|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| EGFRmt | | | | |
| r_s | | 0,63 | -0,04 | 0,20 |
| p | | 0,0001 | 0,398 | 0,113 |
| EGFRtm | | | | |
| r_s | 0,63 | | 0,15 | -0,02 |
| p | 0,0001 | | 0,184 | 0,442 |
| Grad | | | | |
| r_s | -0,04 | 0,15 | | 0,40 |
| p | 0,398 | 0,184 | | 0,007 |
| Vârsta | | | | |
| r_s | 0,20 | -0,02 | 0,40 | |
| p | 0,113 | 0,442 | 0,007 | |

Grad – gradul de diferențiere al tumorii. Rezultatele semnificativ statistic sunt selectate prin **Bold**. r_s – coeficientul de corelație Spearman și semnificația statistică (p).

La compararea valorilor EGFR de ambele localizări am determinat 6 cazuri/15,8% cu transfer de scor. De menționat, că toate aceste transferuri au ținut de pierderea paternului pozitiv în microambianța limfonodală și au fost repartizate egal după categoriile de vârstă (tab.3.25, Fig.3.20).

Tabelul 3.25. Expresia EGFR în funcție de localizare și vârstă.

| Expresia (după EGFRtm) | EGFRtm | EGFRmt | Grad de diferențiere | Grupa de vârstă | n | % | % cazurilor de transfer |
|------------------------|----------|----------|----------------------|-------------------|----------|------------|-------------------------|
| negativă | 0 | 0 | G1 | până la 49 | 1 | 2,6 | - |
| | 0 | 0 | G2 | după 49 | 6 | 15,8 | |
| | 0 | 0 | G2 | până la 49 | 4 | 10,5 | |
| | 0 | 0 | G3 | după 49 | 11 | 28,9 | |
| pozitivă | 1 | 0 | G3 | până la 49 | 1 | 2,6 | 6 cazuri / 15,8% |
| | 2 | 0 | G2 | până la 49 | 1 | 2,6 | |
| | 2 | 0 | G3 | după 49 | 2 | 5,3 | |
| | 2 | 0 | G3 | până la 49 | 1 | 2,6 | |
| | 3 | 0 | G3 | după 49 | 1 | 2,6 | |
| | 1 | 1 | G2 | după 49 | 1 | 2,6 | |
| | 1 | 1 | G2 | până la 49 | 1 | 2,6 | |
| | 1 | 1 | G3 | după 49 | 1 | 2,6 | |
| | 1 | 2 | G3 | după 49 | 1 | 2,6 | |
| | 2 | 2 | G2 | după 49 | 1 | 2,6 | |
| | 2 | 2 | G2 | până la 49 | 1 | 2,6 | |
| | 2 | 2 | G3 | după 49 | 3 | 7,9 | |
| | 2 | 3 | G2 | după 49 | 1 | 2,6 | |
| Total | | | | | 38 | 100,0 | |

Cu **Bold** sunt selectate cazurile înregistrate cu transfer de scor în urma metastazării.

Carcinomul mamar lobular invaziv. Tumoarea primară. În acest studiu au fost incluse 18 cazuri, din care majoritatea au constituit-o tumorile EGFR negative (13 cazuri/72,2%), iar cazurile cu expresie pozitivă au fost grupate după scor precum: +1 – 1 caz/5,6%, +2 – 2 cazuri/11,1% și +3 – 2 cazuri/11,1%. Toate cazurile au fost incluse în categoria de vârstă de „după 49” ani.

În relație cu gradul de diferențiere am determinat că majoritatea tumorilor (16 cazuri/88,9%) au grad G2 și G3, și doar 2 tumori/11,1%, EGFR negative au avut grad G1 (tab.3.26).

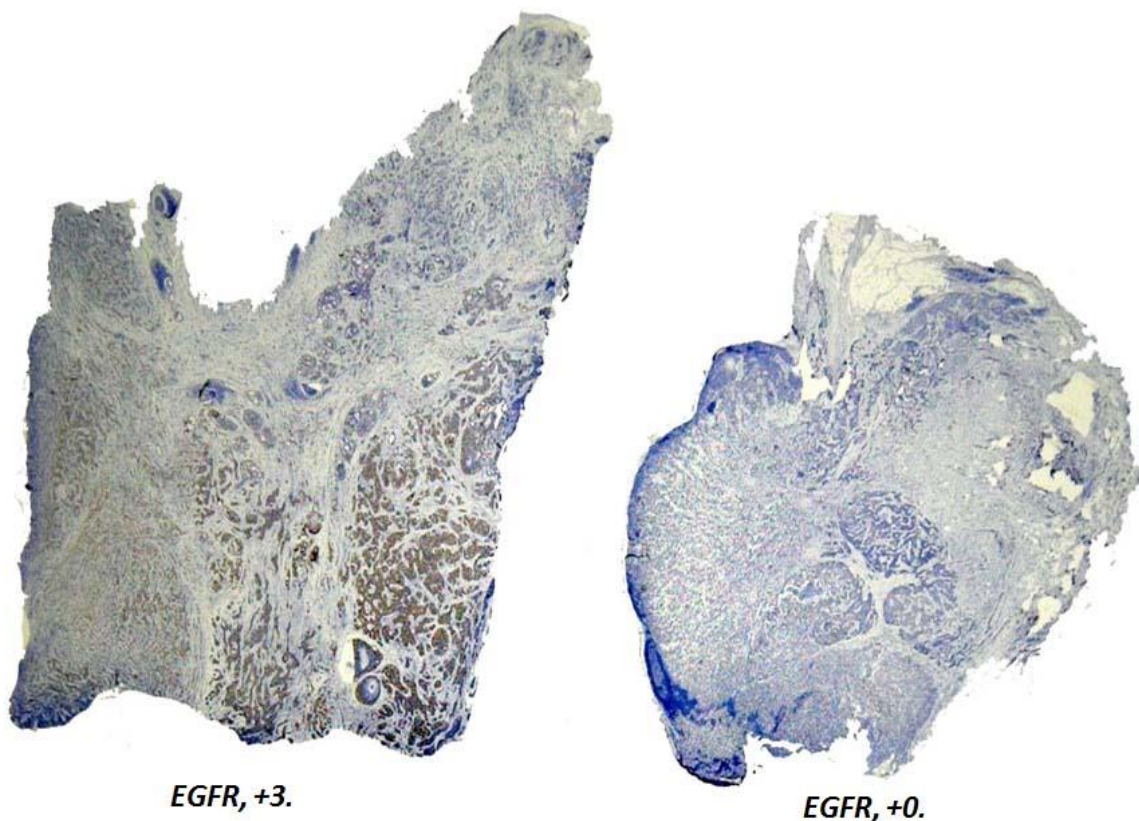


Fig.3.20. Carcinom ductal invaziv: expresia comparativă a EGFR în tumoarea primară vs metastaza limfonodală (contracolorare cu hematoxină *Lille*, x7). De notat, că focarul primar este EGFR intens pozitiv (+3), iar metastaza EGFR negativă (+0).

Tabelul 3.27. Scorul EGFR în dependență de localizare, grupa de vârstă și gradul histologic al tumorii.

| Expresia (după EGFRtm) | EGFRtm | EGFRmt | Gradul de diferențiere | n | % | % cazurilor cu transfer de scor |
|------------------------|----------|----------|------------------------|----------|------------|---------------------------------|
| negativă | 0 | 0 | G1 | 2 | 11,1 | - |
| | 0 | 0 | G2 | 5 | 27,8 | |
| | 0 | 0 | G3 | 6 | 33,3 | |
| pozitivă | 1 | 1 | G3 | 1 | 5,6 | 2 cazuri / 11,1% |
| | 2 | 0 | G2 | 1 | 5,6 | |
| | 2 | 0 | G3 | 1 | 5,6 | |
| | 3 | 1 | G3 | 1 | 5,6 | |
| | 3 | 2 | G3 | 1 | 5,6 | |
| Total | | | | 18 | 100,0 | |

Cu **Bold** sunt selectate cazurile cu transfer de scor.

Eseul statistic de corelație a determinat o asociere pozitivă, de talie rezonabilă a scorului EGFR cu vârsta pacienților ($r_s=0,45$, $p<0,031$) (tab.3.27). Încă o corelație de aceeași semnificație s-a determinat la asocierea vârstei și gradului de diferențiere ($r_s=0,57$, $p<0,007$).

Tabelul 3.27. Forța de asociere dintre EGFR de diversă localizare cu gradul histologic al tumorii și vârsta pacienților: corelație după Spearman.

| | EGFRtm | EGFRmt | Vârsta | Gradul de diferențiere |
|------------------------|---------------|---------------|--------------|------------------------|
| EGFRtm | | | | |
| r_s | | 0,75 | 0,45 | 0,33 |
| p | | 0,0001 | 0,031 | 0,091 |
| EGFRmt | | | | |
| r_s | 0,75 | | 0,14 | 0,39 |
| p | 0,0001 | | 0,289 | 0,06 |
| Vârsta | | | | |
| r_s | 0,45 | 0,14 | | 0,57 |
| p | 0,031 | 0,289 | | 0,007 |
| Gradul de diferențiere | | | | |
| r_s | 0,33 | 0,39 | 0,57 | |
| p | 0,091 | 0,057 | 0,007 | |

r_s – coeficientul de corelație Spearman; p – semnificația statistică. Cu **Bold** sunt selectate cazurile cu semnificație statistică veridică ($p<0,05$).

Metastaza limfonodală. Majoritatea tumorilor la nivel metastatic au fost evaluate cu scor EGFR zero – 15 cazuri/83,3% (tab.3.26).

La compararea valorilor EGFR de ambele localizări am determinat că scorurile EGFR sunt statistic diferite ($t=2,12$, la un $p<0,05$). Însă testul de corelație a evidențiat o asociere pozitivă, puternică dintre valorile EGFR din tumoarea primară și metastază (tab.3.27). Mai mult, testul de regresie a subliniat că valoarea EGFR din metastază este direct proporțională cu scorul EGFR din tumoarea primară (Fig.3.21).

Diferențele statistice a expresiei receptorului EGFR în tipurile ductal și lobular de carcinom mamar invaziv. Prin compararea valorilor de expresie a EGFR în cele 2 tipuri de carcinom incluse în studiu nu am determinat diferențe semnificativ statistice. Astfel testul t-Student a finalizat cu valori $t= -0,41$ ($p<0,66$) la compararea expresiei în tumorile primare și $t= -1,31$ la un $p<0,26$ prin suprapunerea rezultatelor din metastazele limfonodale.

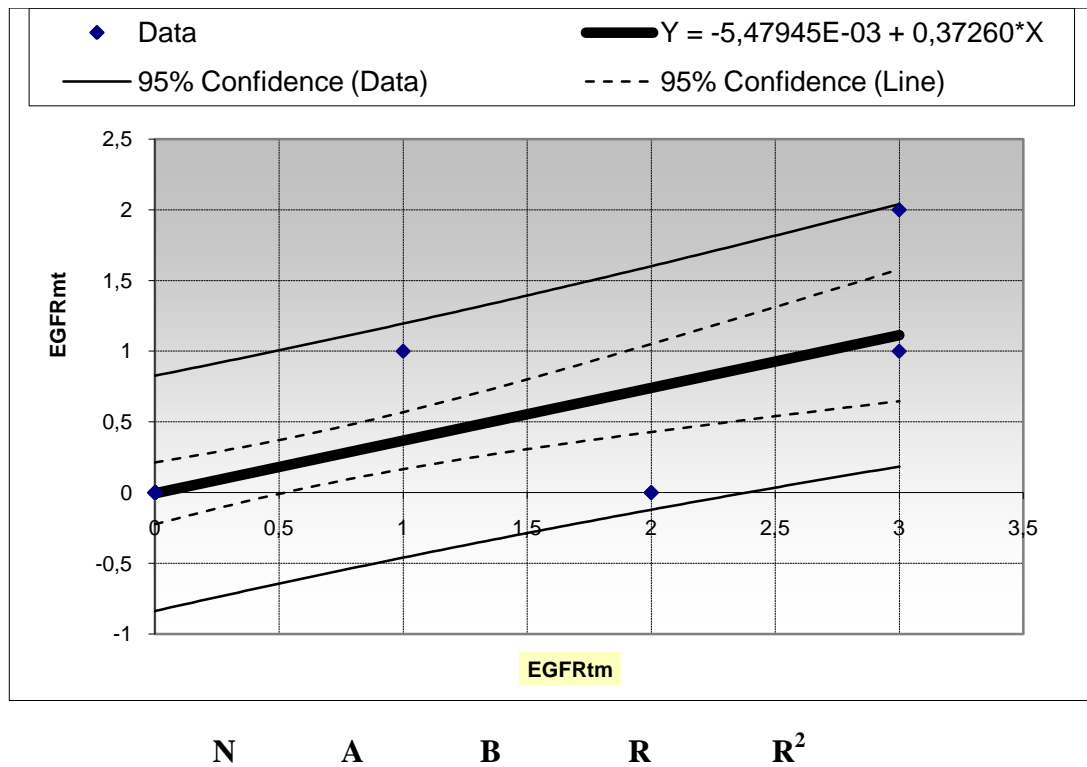


Fig.3.21. Testul de regresie liniară: relație direct proporțională dintre valorile EGFR la nivel de tumoare primară și metastaza limfonodală, rezultată cu corelație de talie înaltă.

În sumar:

1. Carcinomul ductal invaziv tip NOS poate fi în egală măsură EGFR pozitiv sau negativ. Gradul histologic al acestor tumori corelează pozitiv cu vârsta pacientelor.
2. EGFR este instabil pe parcursul metastazării, iar cazurile de transfer implică exclusiv pierderea acestui receptor în microambianța nodului limfatic. Cazurile instabile au un grad histologic slab de diferențiere. Tumorile cu grad înalt de diferențiere (G1) prezintă în exclusivitate patern EGFR negativ.
3. În cazul carcinomului lobular invaziv majoritatea o constituie tumorile EGFR negative, atât la nivel primar, cât și metastatic.
4. În carcinomul lobular valorile EGFR sunt dependente de localizare, însă scorul EGFR din metastază este direct proporțional la valoarea acestuia în tumoarea primară.
5. Nu există diferențe semnificativ statistice dintre carcinoamele invazive de tip ductal și lobular privind expresia EGFR.

3.5. Evoluția markerului nuclear de proliferare Ki67

Carcinomul mamar ductal invaziv de tip NOS. Tumoarea primară. În studiu au fost incluse 110 cazuri de carcinom ductal invaziv tip NOS, colectate postoperatoriu de la femei de vârstă 33-86 ani (tab.3.28). Conform grupei de vârstă pacientele au fost repartizate precum: „până la 49 ani” – 29 femei/26,4% și „după 49 ani” – 81 femei/73,6%. În studiu au predominat tumori cu grad moderat de diferențiere (64 cazuri/58,2%), urmate de G3 (40 cazuri/36,4%) și G1 (6 cazuri/5,4%). Gradul G2 a fost reflectat majoritar în grupa de vârstă de „după 49” – 42 cazuri/38,2% și dublu mai mic a fost descris la femei de „până la 49” ani – 22 cazuri/20%. Incidența tumorilor cu grad G3 de asemenea a fost mai mare la paciente de vârstă înaintată (35 cazuri/31,8%) față de cele de „până la 49” ani. Similar au fost repartizate și tumorile cu grad înalt de diferențiere, G1: mai frecvent au fost întâlnite în grupul de „după 49” ani (4 cazuri/3,6%) în comparație cu cazurile de „până la 49” ani – 2 cazuri/11,8%.

Tabelul 3.28. Incidența cazurilor după proliferarea celulară (marcată și redusă).

| Proliferare | Ki67 | Gradul de diferențiere | Grupa de vârstă | n | % | |
|--------------------|-------------|-------------------------------|------------------------|----------|----------|------|
| marcată | >14 | G1 | după 49 | 1 | 0,9 | 54,5 |
| | >14 | G1 | până la 49 | 1 | 0,9 | |
| | >14 | G2 | după 49 | 19 | 17,3 | |
| | >14 | G2 | până la 49 | 11 | 10,0 | |
| | >14 | G3 | după 49 | 23 | 20,9 | |
| | >14 | G3 | până la 49 | 5 | 4,5 | |
| redusă | <14 | G1 | după 49 | 3 | 2,7 | 45,5 |
| | <14 | G1 | până la 49 | 1 | 0,9 | |
| | <14 | G2 | după 49 | 23 | 20,9 | |
| | <14 | G2 | până la 49 | 11 | 10,0 | |
| | <14 | G3 | după 49 | 12 | 10,9 | |
| Total | | | | 110 | 100 | |

Valoarea medie a Ki67 și eroarea standard per total au fost evaluate la $21,3 \pm 1,9$, iar mediana la 14,7. Expresia acestui marker a corelat pozitiv și statistic semnificativ cu gradul de

diferențiere ($r_s=0,27$, $p<0,002$). Totodată gradul histologic a corelat pozitiv și cu vârsta ($r_s=0,22$, $p<0,01$).

În grupul de vârstă de ”până la 49” ani valoarea medie a Ki67 a fost evaluată la $22,5\pm 3,5$, cu mediana de 19. Valoarea acestui marker însă nu a corelat statistic semnificativ nici cu vârsta pacienților, nici cu gradul histologic al tumorii (tab.3.29).

La pacientele de vârstă de „după 49” ani valoarea medie a Ki67 a fost de $20,8\pm 2,3$ iar mediana de 14. Valoarea indicelui de proliferare a corelat pozitiv, statistic semnificativ cu vârsta pacienților ($r_s=0,18$, $p<0,05$) și gradul de diferențiere ($r_s=0,31$, $p<0,003$).

Deși valorile medii și medianele variază în dependență de categoria de vârstă, testul t-Student nu a evidențiat valori statistic semnificative privitor la expresia Ki67 ($t=0,38$, $p<0,71$).

Tabelul 3.29. Valoarea medie, eroarea standard ($M\pm ES$) și mediana (Md) pentru markerul nuclear Ki67 în tumoarea primară per total (110 cazuri) și după grupa de vârstă. Corelația valorilor Ki67 vs vârsta pacienților și gradul de diferențiere al tumorii.

| | Total | | | Până la 49 ani | | | După 49 ani | | |
|---------------|-----------|--------|--------|----------------|--------|------|-------------|--------|--------|
| | Ki67 | Vârsta | Grad | Ki67 | Vârsta | Grad | Ki67 | Vârsta | Grad |
| Ki67 | | | | | | | | | |
| r_s | | 0,04 | 0,27 | | -0,25 | 0,18 | | 0,18 | 0,31 |
| n | | 110 | 110 | | 29 | 29 | | 81 | 81 |
| p | | 0,35 | 0,002* | | 0,10 | 0,17 | | 0,05* | 0,007* |
| Vârsta | | | | | | | | | |
| r_s | 0,04 | | 0,22 | -0,25 | | 0,03 | 0,18 | | 0,08 |
| n | 110 | | 110 | 29 | | 29 | 81 | | 81 |
| p | 0,35 | | 0,01* | 0,10 | | 0,44 | 0,05* | | 0,24 |
| Gradul | | | | | | | | | |
| r_s | 0,27 | 0,22 | | 0,18 | 0,03 | | 0,31 | 0,08 | |
| n | 110 | 110 | | 29 | 29 | | 81 | 81 | |
| p | 0,002* | 0,01* | | 0,17 | 0,44 | | 0,003* | 0,24 | |
| Ki67 | | | | | | | | | |
| | $M\pm ES$ | | Md | $M\pm ES$ | | Md | $M\pm ES$ | | Md |
| | 21,3±1,9 | | 14,7 | 22,5±3,5 | | 19 | 20,8±2,3 | | 14 |

Notă: **Grad** - gradul de diferențiere al tumorii; r_s – coeficientul de corelație Spearman, p – semnificația statistică; n – numărul de cazuri.

În studiul dat cazurile cu proliferare marcată au constituit 54,5% (60 cazuri), față de cele cu proliferare redusă cu 45,5% (50 cazuri). În corelație cu grupa de vârstă am determinat că, indiferent de valoarea indicelui de proliferare, marcat sau redus, majoritatea în fiecare subgrup au constituit-o paciențele de „după 49” ani (tab.3.29). De asemenea și gradul de diferențiere nu a manifestat o careva afinitate la separarea cazurilor după expresia Ki67, majoritatea în ambele subgrupe constituind-o tumorile G2.

Dat fiind faptul, că expresia Ki67 a corelat pozitiv și statistic semnificativ cu gradul de diferențiere a permis să concluzionez că, odată cu creșterea activității proliferative a celulelor tumorale scade și gradul histologic al tumorii (tab.3.29). Însă trebuie de menționat, că în subgrupul cu proliferare marcată au fost înregistrate 2 cazuri/1,8% de tumori înalt diferențiate și invers, în subgrupul cu intensitate proliferativă redusă majoritatea cazurilor au constituit-o tumorile slab diferențiate (G2 și G3).

Metastaza limfonodală. Studiului comparativ au fost supuse 88 cazuri. Vârsta pacienților a variat de la 33 la 86 ani. Cazurile de „după 49” ani au constituit majoritatea (64 cazuri/72,7%) în comparație cu cele de „până la 49” ani (24 cazuri/27,3%) (tab.3.30).

Tabelul 3.30. Corelația valorilor Ki67 din metastază vs vârsta pacienților și gradul de diferențiere al tumorii. Valoarea medie, eroarea standard ($M \pm ES$) și mediana (Md) pentru markerul nuclear Ki67 în metastaza limfonodală per total (88 cazuri) și după grupa de vârstă.

| | Total | | | Până la 49 ani | | | După 49 ani | | | | |
|---------------|-------|----------------|--------|----------------|--------|----------------|-------------|--------|--------|----------------|----|
| | Ki67 | Vârsta | Gradul | Ki67 | Vârsta | Gradul | Ki67 | Vârsta | Gradul | | |
| Ki67 | | | | | | | | | | | |
| r_s | | 0,05 | 0,13 | | -0,14 | 0,04 | | 0,01 | 0,13 | | |
| n | | 88 | 88 | | 24 | 24 | | 64 | 64 | | |
| p | | 0,313 | 0,117 | | 0,257 | 0,421 | | 0,484 | 0,152 | | |
| Vârsta | | | | | | | | | | | |
| r_s | 0,05 | | 0,24 | -0,14 | | -0,08 | 0,01 | | -0,01 | | |
| n | 88 | | 88 | 24 | | 24 | 64 | | 64 | | |
| p | 0,313 | | 0,011 | 0,257 | | 0,351 | 0,484 | | 0,475 | | |
| Gradul | | | | | | | | | | | |
| r_s | 0,13 | 0,24 | | 0,04 | -0,08 | | 0,13 | -0,01 | | | |
| n | 88 | 88 | | 24 | 24 | | 64 | 64 | | | |
| p | 0,117 | 0,011 | | 0,421 | 0,351 | | 0,152 | 0,475 | | | |
| Ki67 | | | | | | | | | | | |
| | | $M \pm ES$ | Md | | | $M \pm ES$ | Md | | | $M \pm ES$ | Md |
| | | 19,6 \pm 2,4 | 12,7 | | | 17,3 \pm 4,4 | 8,7 | | | 20,4 \pm 2,9 | 14 |

Notă: **Gradul** - gradul de diferențiere al tumorii; r_s – coeficientul de corelație Spearman, p – semnificația statistică; n – numărul de cazuri.

Valoarea medie a markerului Ki67 per 88 cazuri a constituit $19,6 \pm 2,4$, iar mediana 12,7. În grupul de vârstă de „până la 49” ani media markerului de proliferare a constituit $17,3 \pm 4,4$, iar mediana 8,7. În grupul de „după 49” ani media expresiei Ki67 a înregistrat valori de $20,4 \pm 2,9$, cu o mediană de 14. La compararea valorilor Ki67 din metastază în dependență de grupa de vârstă nu am determinat diferențe statistic veridice ($t=0,57$, $p<0,57$).

La compararea valorilor Ki67 de localizare primară și metastatică nu am determinat diferențe statistic semnificative ($t=1,23$, $p<0,22$). Totodată și analiza forței de asociere a valorilor Ki67 de ambele localizări nu a prezentat valori veridice de corelație ($r_s=0,06$, $p<0,33$).

Studiul comparativ a valorii Ki67 din tumoarea primară vs metastază mi-a permis să concluzionez, că acest marker nu este expresat la fel și la nivelul nodului limfatic. Astfel am stabilit 20 cazuri/22,8% de transfer al valorii Ki67 peste pragul de 14% definitivat.

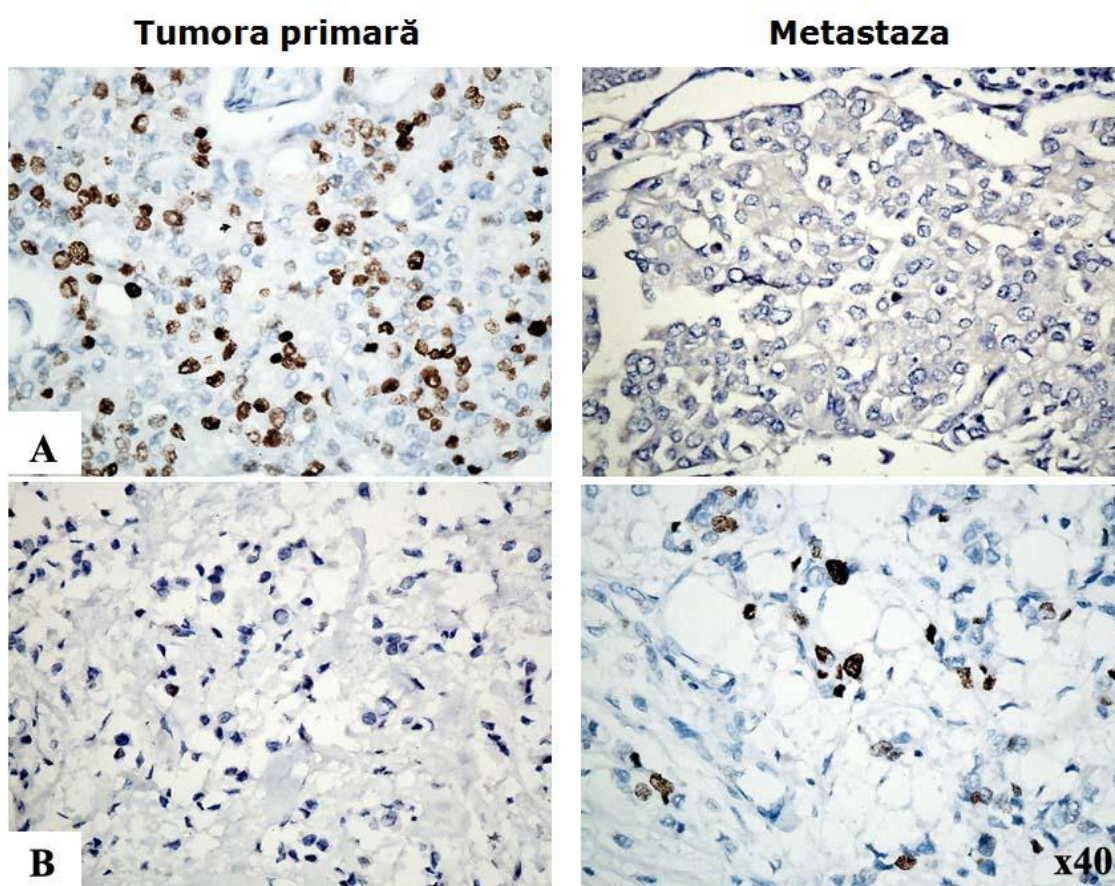


Fig.3.22. Carcinoame ductal invazive de tip NOS: evoluția Ki67 în procesul de metastazare. În majoritatea cazurilor cu transfer de scor al Ki67, metastazele limfonodale au prezentat activitate proliferativă mai redusă comparativ cu tumoarea primară (A). Doar în 5 cazuri (din 20) metastazele au prezentat un scor Ki67 mai mare față de focarul primar (B).

Transferurile au ținut în majoritate de diminuarea activității proliferante a celulelor metastatice (15 cazuri/17,1%). Restul, 5 cazuri/5,7% s-au manifestat prin proliferare sporită a metastazei față de tumoarea primară. De menționat, că ambele tipuri de transfer au avut loc doar la tumori cu grad G2 și G3 de diferențiere (Fig.3.22). În raport cu grupa de vârstă am determinat, că diminuarea activității proliferative are loc atât la pacienți de „până la 49”, cât și „după 49” ani, însă la ultimele de 2 ori mai frecvent (10 cazuri/11,4% vs 5 cazuri/5,7%). Creșterea expresiei Ki67 după metastazare însă a fost înregistrată doar la pacienți de „după 49” ani (tab.3.31).

Tabelul 3.31. Indicele de proliferare Ki67 din tumoarea primară (Ki67tm) vs metastaza limfonodală (Ki67mt).

| Proliferare (după Ki67tm) | Ki67tm | Ki67mt | Grupa de vârstă | Grad | n | % | % cazurilor cu transfer de scor |
|--|---------------|---------------|----------------------------|-------------|-----------|------------|--|
| marcată | >14 | >14 | după 49 | G1 | 1 | 1,1 | 15 cazuri / 17% |
| | >14 | >14 | după 49 | G2 | 11 | 12,5 | |
| | >14 | >14 | după 49 | G3 | 16 | 18,2 | |
| | >14 | >14 | până la 49 | G1 | 1 | 1,1 | |
| | >14 | >14 | până la 49 | G2 | 7 | 8,0 | |
| | >14 | >14 | până la 49 | G3 | 1 | 1,1 | |
| | >14 | <14 | după 49 | G2 | 5 | 5,7 | |
| | >14 | <14 | după 49 | G3 | 5 | 5,7 | |
| | >14 | <14 | până la 49 | G2 | 3 | 3,4 | |
| | >14 | <14 | până la 49 | G3 | 2 | 2,3 | |
| redușă | <14 | >14 | după 49 | G2 | 2 | 2,3 | 5 cazuri / 5,7% |
| | <14 | >14 | după 49 | G3 | 3 | 3,4 | |
| | <14 | <14 | după 49 | G1 | 2 | 2,3 | |
| | <14 | <14 | după 49 | G2 | 11 | 12,5 | |
| | <14 | <14 | după 49 | G3 | 8 | 9,1 | |
| | <14 | <14 | până la 49 | G1 | 1 | 1,1 | |
| | <14 | <14 | până la 49 | G2 | 9 | 10,2 | |
| Total | | | | | 88 | 100 | |

Notă: Cu **Bold** sunt selectate cazurile cu activitate proliferantă instabilă după metastazare.

Carcinomul mamar lobular invaziv. Tumoarea primară. În acest studiu au fost incluse 18 paciente, cu vârsta cuprinsă între 45-78 ani. Evaluarea morfologică a evidențiat în majoritatea cazurilor tumori slab diferențiate, G3 (10 cazuri/55,6%), urmate după incidență de cele G2 (6 cazuri/33,3%) și G1 (2 cazuri/11,1%) (tab.3.32).

Expresia markerului nuclear Ki67 în tumoarea primară a variat în limite largi, de la zero la 72% celule tumorale Ki67 pozitive, valoarea medie a constituit $23,8 \pm 5,2$, iar mediana 18,8. La aplicarea pragului de 14% am stabilit 2 grupe numeric egale referitor la expresia Ki67: 9 cazuri/50% cu proliferare marcată și 9 cazuri/50% cu proliferare redusă.

În relație cu gradul de diferențiere, tumorile intens proliferante au fost estimate exclusiv cu G2 (1 caz/5,6%) și G3 (8 cazuri/44,4%). La cazurile cu proliferare redusă au fost atribuite carcinoame de toate 3 grade histologice: G1 – 2 cazuri/11,1%, G2 – 5 cazuri/27,8% și G3 în 2 cazuri/11,1%. Analiza statistică de corelație a determinat o forță de asociere pozitivă, de talie rezonabilă dintre expresia Ki67 și gradul de diferențiere ($r_s=0,57$, $p<0,007$) (tab.3.32).

Tabelul 3.32. Gradul de asociere dintre expresia Ki67 de diversă localizare, vârsta pacienților și gradul histologic al tumorilor.

| | Ki67tm | Ki67mt | Vârsta | Gradul de diferențiere |
|-------------------------------|---------------|---------------|---------------|-------------------------------|
| Ki67tm | | | | |
| r_s | | 0,70 | 0,37 | 0,57 |
| n | | 18 | 18 | 18 |
| p | | 0,001* | 0,064 | 0,007* |
| Ki67mt | | | | |
| r_s | 0,70 | | 0,30 | 0,59 |
| n | 18 | | 18 | 18 |
| p | 0,001* | | 0,113 | 0,005* |
| Vârsta | | | | |
| r_s | 0,37 | 0,30 | | 0,57 |
| n | 18 | 18 | | 18 |
| p | 0,064 | 0,113 | | 0,007* |
| Gradul de diferențiere | | | | |
| r_s | 0,57 | 0,59 | 0,57 | |
| n | 18 | 18 | 18 | |
| p | 0,007* | 0,005* | 0,007* | |

Notă: *Valorile semnificativ statistic ($p<0,05$), unde r_s – coeficientul de corelație Spearman, n – numărul de cazuri.

Regresia lineară a susținut în continuare relația de tip cauză-efect dintre aceste 2 variabile (Fig.3.23). Totodată trebuie de menționat, că gradul histologic a mai corelat pozitiv și statistic semnificativ cu vârsta pacienților ($r_s=0,57$, $p<0,007$).

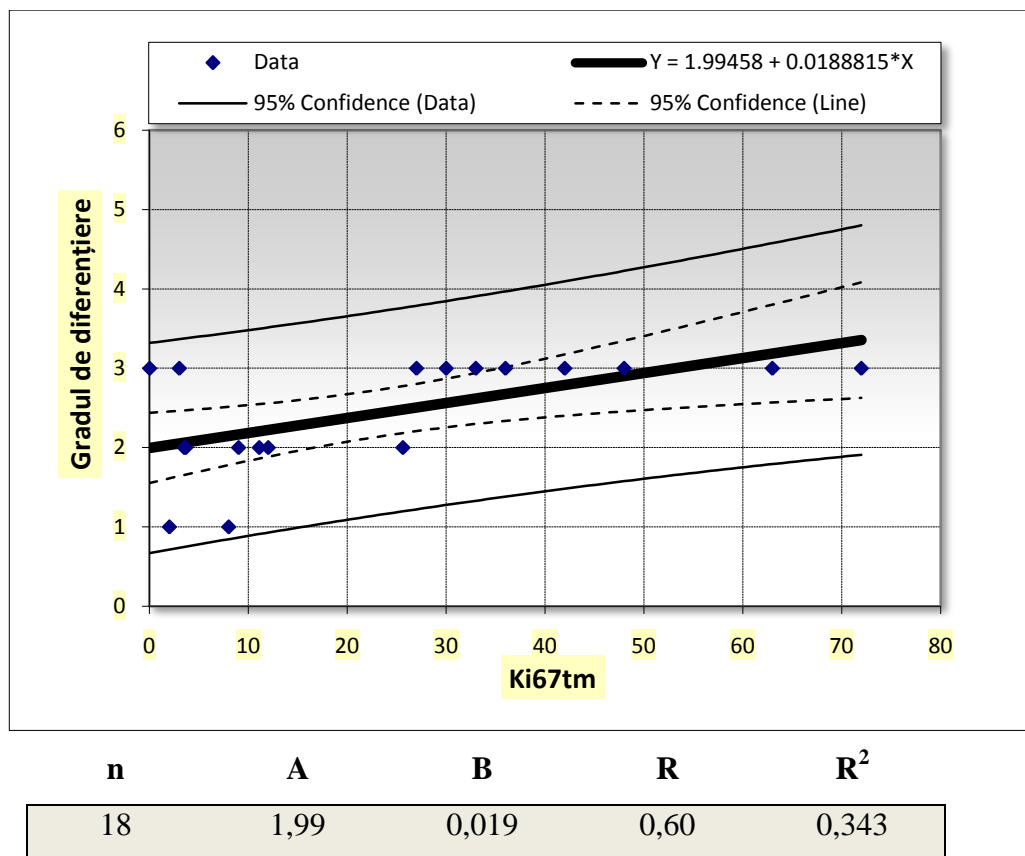


Fig.3.23. Testul de regresie liniară: relație direct proporțională dintre expresia Ki67 și gradul histologic la nivel de tumoare primară, rezultată cu corelație de talie înaltă.

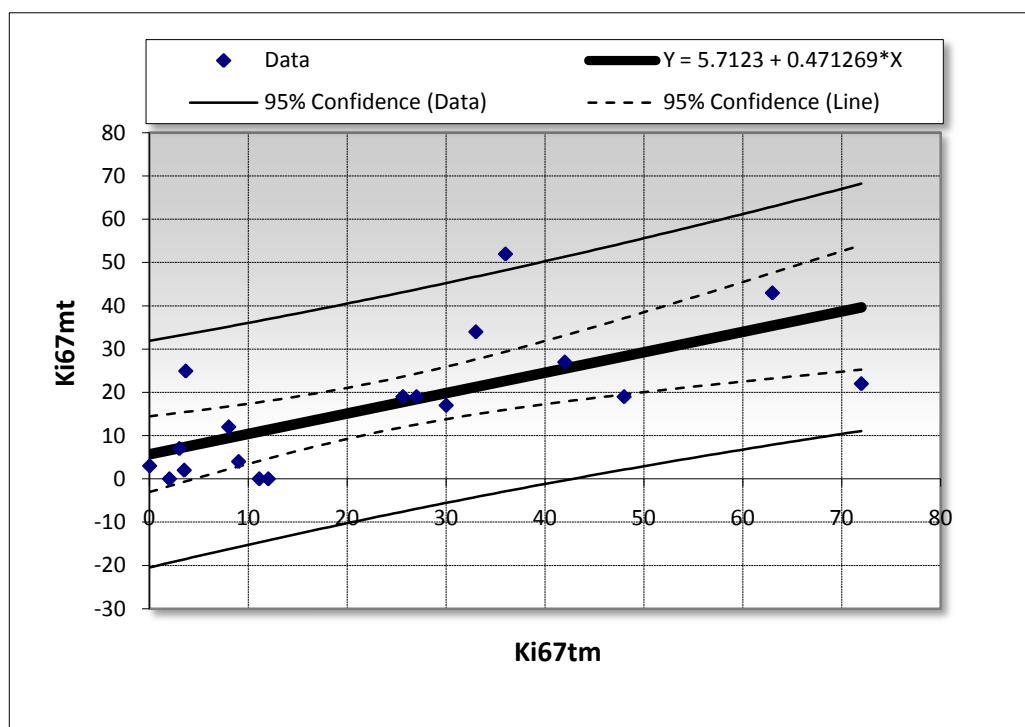
Metastaza limfonodală. Studiului comparativ au fost supuse 18 cazuri de carcinom lobular infiltrativ, cu metastaze axilare dezvoltate. Valoarea procentuală a acestui receptor a variat în limite largi, de la absența expresiei la 52% celule tumorale Ki67 pozitive. Valoarea medie a fost mai mică decât în cazul tumorii primare și a constituit $16,9 \pm 3,6$, și o mediana de 18. Aplicarea pragului de 14% am delimitat 10 cazuri/55,6% cu expresie Ki67 înaltă și 8 cazuri/44,4% cu expresie redusă.

La evaluarea forței de asociere dintre expresia Ki67 de ambele localizări am stabilit, că valoarea acestui receptor în metastază este dependentă de prezența sa în tumoarea primară ($r_s=0,70$, $p<0,001$) (tab.3.33). Această relație direct proporțională a fost susținută în continuare prin testul de regresie (Fig.3.24).

Faptul, că valoarea Ki67 din metastază depinde de expresia sa în tumoarea primară a fost confirmat și prin testul t-Student ($t=1,81$, $p<0,09$).

Evoluția receptorului Ki67 după metastazare a fost examinată pe fiecare caz în parte (tab.3.33). Astfel am stabilit, că doar într-un singur caz/5,6% valoarea markerului nuclear din metastază a fost diferită de cea din tumoarea primară. Aceasta a fost o tumoare cu grad moderat

de diferențiere. Transferul expresiei s-a manifestat prin intensificarea proliferării tumorale în sediul limfonodal (25%) comparativ cu tumoarea primară (3,7%).



| n | A | B | R | R-Square |
|----|-------|-------|------|----------|
| 18 | 5,713 | 0,471 | 0,67 | 0,454 |

Fig.3.24. Testul de regresie lineară cuantifică o asociere pozitivă, statistic semnificativă dintre expresia Ki67 din tumoarea primară (Ki67tm) și metastaza limfonodală (Ki67mt).

Tabelul 3.34. Studiul comparativ al expresiei Ki67 în dependență de localizare.

| Proliferare (după Ki67tm) | Ki67tm | Ki67mt | Gradul de diferențiere | n | % |
|---------------------------------|---------------|---------------|---------------------------|----------|------------|
| marcată | >14 | >14 | G2 | 1 | 5,6 |
| | >14 | >14 | G3 | 8 | 44,4 |
| redușă | <14 | >14 | G2 | 1 | 5,6 |
| | <14 | <14 | G1 | 2 | 11,1 |
| | <14 | <14 | G2 | 4 | 22,2 |
| | <14 | <14 | G3 | 2 | 11,1 |
| Total | | | | 18 | 100 |

Notă: Cu **Bold** sunt selectate cazurile cu transfer de scor Ki67 după metastazare.

Expresia receptorului Ki67 în dependență de tipul histologic, ductal sau lobular de carcinom mamar invaziv. Testul t-Student pentru variabile independente a demonstrat, că expresia Ki67 nu este în funcție de tipul histologic al carcinomului mamar. Astfel analiza statistică a finalizat cu coeficientul $t=0,50$, $p<0,62$ la efectuarea t-testului sau $f=1,20$, $p<0,56$ la executarea F-testului.

În sumar:

1. Carcinomul ductal invaziv de tip NOS prezintă în majoritatea cazurilor activitate proliferativă marcată.
2. Tumorile cu orice grad histologic, G1, G2 sau G3 pot manifesta activitate proliferativă atât marcată, cât și redusă.
3. Valoarea Ki67 nu este în funcție de vârsta pacientei.
4. Expresia Ki67 din metastază nu depinde de activitatea proliferativă a carcinomului ductal invaziv.
5. Ki67 nu este stabil în procesul de metastazare, majoritatea transferurilor țin de diminuarea activității proliferative a celulelor metastatice în microambianța limfonodală. Cazurile Ki67 instabile includ doar tumori cu grad G2 și G3 de diferențiere.
6. Variații în activitatea proliferativă a metastazelor vs tumoarea primară mai frecvent se determină la pacienți de „după 49” ani.
7. Expresia markerului nuclear Ki67 corelează pozitiv cu gradul de diferențiere, indiferent de tipul histologic al tumorii.
8. În cazul carcinomului lobular invaziv se atestă transfer de scor doar în direcția intensificării proliferației tumorale în sediul metastatic. Aceste rezultate necesită o confirmare suplimentară din partea altor cercetători pe un lot statistic semnificativ mai mare.
9. Intensitatea expresiei receptorului nuclear Ki67 nu este în funcție de tipul histologic al carcinomului mamar.

3.6. Dinamica markerilor apoptotici p53 și BCL2

Evoluția markerului pro-apoptotic p53. Carcinomul mamar ductal invaziv de tip NOS. Tumoarea primară. Expresia markerului pro-apoptotic p53 a fost studiată pe un lot de 97 tumori mamare, colectate de la paciente de 33-86 ani. Conform grupei de vârstă acestea au fost repartizate în: până la 49 – 27 cazuri/27,8% și după 49 – 70 cazuri/72,2% (tab.3.34).

Tabelul 3.34. Expresia receptorului p53 vs vârsta pacientelor și gradul de diferențiere al carcinoamelor mamare.

| Expresie | p53tm | Grupa de vârstă | Gradul de diferențiere | n | % |
|--------------|-------|-----------------|------------------------|----|-------|
| negativă | 0 | după 49 | G1 | 3 | 3,1 |
| | 0 | după 49 | G2 | 12 | 12,4 |
| | 0 | după 49 | G3 | 15 | 15,5 |
| | 0 | până la 49 | G1 | 1 | 1,0 |
| | 0 | până la 49 | G2 | 10 | 10,3 |
| | 0 | până la 49 | G3 | 2 | 2,1 |
| pozitivă | 1 | după 49 | G2 | 5 | 5,2 |
| | 1 | după 49 | G3 | 5 | 5,2 |
| | 1 | până la 49 | G2 | 1 | 1,0 |
| | 1 | până la 49 | G3 | 2 | 2,1 |
| | 2 | după 49 | G2 | 11 | 11,3 |
| | 2 | după 49 | G3 | 7 | 7,2 |
| | 2 | până la 49 | G2 | 5 | 5,2 |
| | 3 | după 49 | G2 | 4 | 4,1 |
| | 3 | după 49 | G3 | 8 | 8,2 |
| | 3 | până la 49 | G1 | 1 | 1,0 |
| | 3 | până la 49 | G2 | 4 | 4,1 |
| | 3 | până la 49 | G3 | 1 | 1,0 |
| Total | | | | 97 | 100,0 |

În studiul dat au fost incluse carcinoame cu toate 3 grade de diferențiere, repartizate după frecvență precum: G1 – 5 cazuri/5,2%, G2 – 52 cazuri/53,6% și G3 – 40 cazuri/41,2%.

Gradul G1 de diferențiere a fost înregistrat atât în grupa de vârstă „până la 49” (2 cazuri/2,1%), cât și „după 49”, în 3 cazuri/3,1%. Tumorile cu gradul G2 au fost repartizate după grupul vârste în felul următor: „până la 49” în 20 cazuri/20,6% și „după 49” în 32 cazuri/33%. Carcinoamele cu gradul G3 au prezentat afinitate față de pacientele cu vârsta de „după 49”, cu 35 cazuri/36,1%, în comparație cu cazurile „până la 49” în 5 cazuri/5,2%.

Receptorul p53 a fost evaluat cu scor negativ (zero) în 43 cazuri/44,3%. Cazurile pozitive au fost repartizate după scor precum urmează: +1 – 13 cazuri/13,4%, +2 – 23 cazuri/23,7% și +3 în 18 cazuri/18,6%.

Cazurile cu expresie p53 negativă s-au întâlnit mai frecvent la paciente de vârstă de „după 49”, 30 cazuri/30,9%, față de cele de vârstă „până la 49” cu 13 cazuri/13,4%. Distribuție aproximativ similară s-a determinat și în cazurile p53 pozitive, iar cazurile au fost repartizate după grupa de vârstă în felul următor:

- +1: „până la 49” – 3 cazuri/3,1%, „după 49” în 10 cazuri/10,3%;
- +2: „până la 49” – 5 cazuri/5,2%, „după 49” în 18 cazuri/18,6%;
- +3: „până la 49” – 6 cazuri/6,2%, „după 49” în 12 cazuri/12,4%.

Gradul de diferențiere nu a demonstrat o careva afinitate față de expresia p53. Astfel am înregistrat tumori cu toate 3 grade de diferențiere atât în grupul cu expresie p53 negativă, cât și grupul p53 pozitiv (tab.3.34).

Eseul statistic de corelare Spearman nu a evidențiat asocieri statistic semnificative dintre expresia p53 și gradul de diferențiere al tumorii sau vârsta pacientelor. În schimb, ultimii 2 parametri, vârsta și gradul au demonstrat o corelație de talie joasă ($r_s=0,25$, $p<0,011$), dar statistic semnificativă (tab.3.35).

Metastaza limfonodală. Studiului comparativ tumoare primară-metastază au fost supuse 87 cazuri. La acest nivel numărul de cazuri p53 negative a fost puțin în creștere comparativ cu tumoarea primară, fiind înregistrat în 41 cazuri/47,1%. Cazurile pozitive au fost repartizate după scorul de expresie al p53 precum: +1 – 15 cazuri/17,2%, +2 – 13 cazuri/14,9% și +3 în 18 cazuri/20,7%. Faptul că valoarea expresiei p53 din metastază diferă de localizarea primară a fost susținut de testul t-Student, unde $t=1,95$ la un $p<0,050$. Totodată studiul statistic a demonstrat, că valoarea expresiei p53 în metastaza limfonodală este în funcție de valoarea acestuia în tumoarea primară, coeficientul de corelație Spearman demonstrând o asociere de talie înaltă, statistic semnificativă ($r_s=0,76$ la $p<0,0001$) (tab.3.35). Acest trend al dependenței expresiei p53 de localizare a fost demonstrat și de testul regresiei lineare (Fig.3.25).

Tabelul 3.35. Testul de corelare a rangurilor dintre p53 în dependență de localizare (primară sau metastatică), gradul de diferențiere al carcinomului și vârstă.

| | | p53tm | p53mt | Gradul de diferențiere | Vârsta |
|-------------------------------|-------|---------------|---------------|------------------------|--------------|
| p53tm | r_s | | 0,76 | 0,06 | -0,06 |
| | p | | 0,0001 | 0,304 | 0,305 |
| p53mt | r_s | 0,76 | | 0,09 | 0,03 |
| | p | 0,0001 | | 0,205 | 0,376 |
| Gradul de diferențiere | r_s | 0,06 | 0,09 | | 0,25 |
| | p | 0,304 | 0,205 | | 0,011 |
| Vârsta | r_s | -0,06 | 0,03 | 0,25 | |
| | p | 0,306 | 0,376 | 0,011 | |

r_s – coeficientul de corelare Spearman. Valorile semnificativ statistic ($p < 0,05$) sunt selectate cu **Bold**.

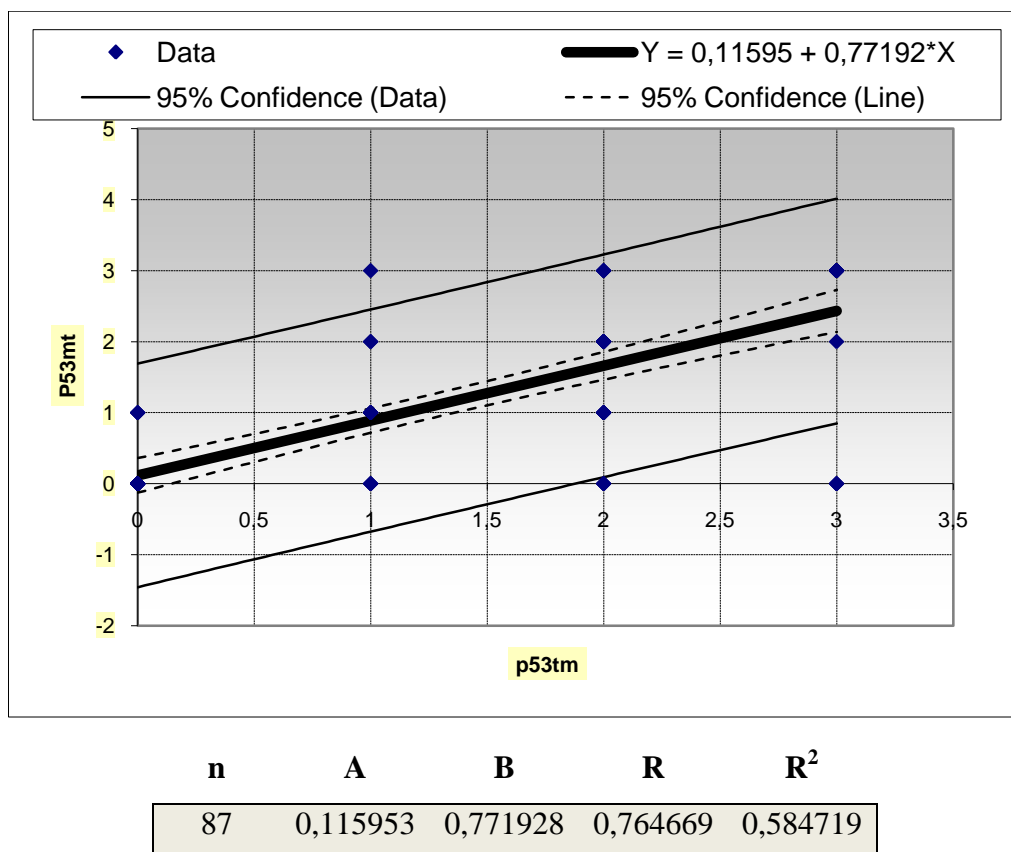


Fig.3.25. Scorul p53 din metastaza limfonodală vs valoarea p53 din tumoarea primară: testul de regresie lineară reflectă o corelație pozitivă, de talie înaltă.

La examinarea detaliată a expresiei p53 de ambele localizări pe fiecare caz în parte am stabilit că acest receptor nu este stabil pe parcursul metastazării (Anexa 2).

Astfel au fost stabilite 12 cazuri/13,79% în care expresia p53 limfonodală a fost una diferită de cea din tumoarea primară. Achiziționare de receptor în urma metastazării s-a înregistrat în 3 cazuri/3,45%. În restul cazurilor (9 cazuri/10,34%) s-a determinat pierderea expresiei p53 după metastazare, implicând în egală măsură toate 3 scoruri al expresiei pozitive (+1 – +3). De menționat, că instabilitatea receptorului p53 a fost înregistrată la pacienți de ambele categorii de vârstă studiate, până și după 49 ani, și au implicat doar tumori cu gradul G2 și G3 de diferențiere (Fig.3.26).

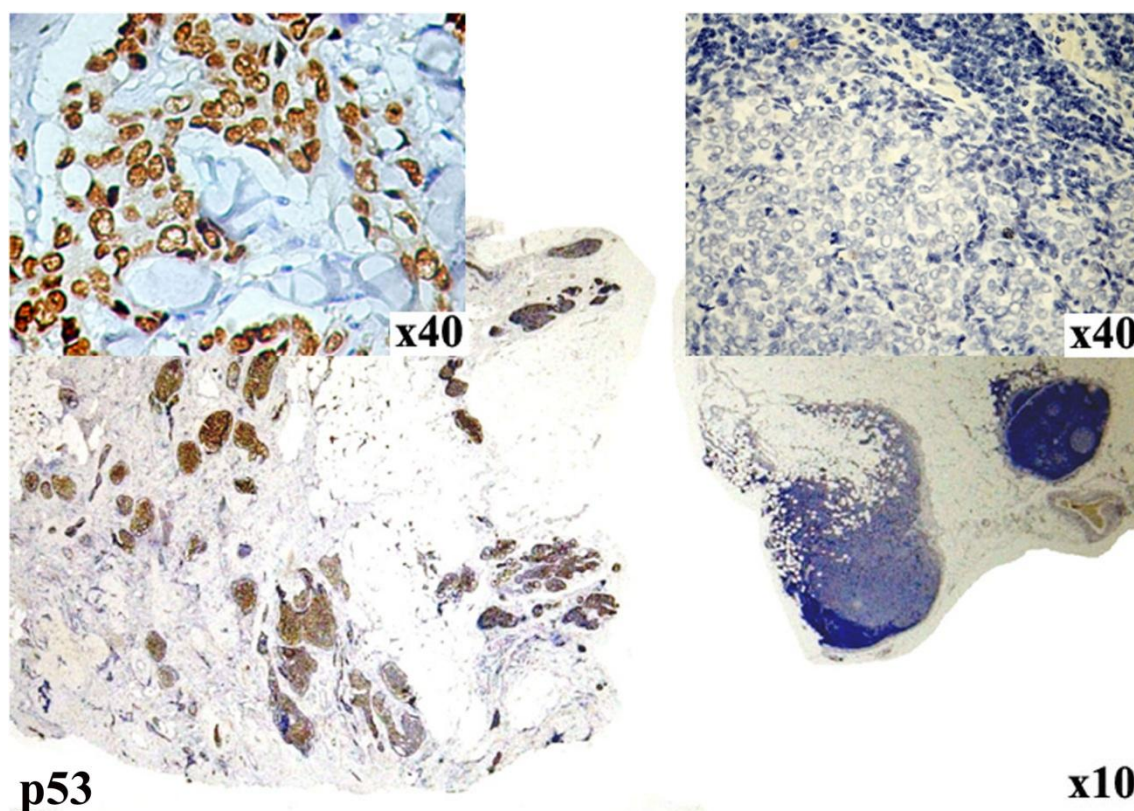


Fig.3.26. Carcinom ductal invaziv de tip NOS: evoluția markerului pro-apoptotic p53 în procesul de metastazare. În majoritatea cazurilor cu transfer de scor al p53 (9 cazuri/10,34%) s-a determinat pierderea expresiei acestuia după metastazare.

Carcinomul mamar lobular invaziv. Tumoarea primară. În acest studiu au fost analizate tumori, descifrate morfologic drept carcinoame mamare lobular invazive recoltate de la 18 pacienți cu vârste de 45-78 ani.

Majoritatea tumorilor investigate (16 cazuri/88,9%) au manifestat grad G2 și G3 de diferențiere, și doar 2 tumori/11,1%, au avut grad G1 (tab.3.36, 3.37).

Receptorul p53 nu a fost depistat în cazul a 5 tumori/27,8%. Cazurile pozitive (13 cazuri/72,2%) au fost repartizate după scorul p53 în felul următor: scor +1 – 3 cazuri/16,7%, +2 – 6 cazuri/33,3% și +3 în 4 cazuri/22,2%.

În relație cu gradul de diferențiere al tumorii am determinat, că cazurile p53 negative au prezentat exclusiv grad G3, iar cele 2 cazuri/11,1% G1 au fost cuantificate ambele cu scor p53 +2 (tab.3.37).

Eseul statistic de corelare nu a evidențiat asocieri statistic semnificative dintre valoarea expresiei p53 cu gradul de diferențiere al tumorii și vârsta pacientelor. Gradul histologic însă a corelat pozitiv, la un nivel rezonabil ($r_s=0,57$, $p<0,007$) cu vârsta pacientelor (tab.3.36).

Tabelul 3.36. Expresia p53 de diversă localizare vs gradul de diferențiere al tumorii și vârsta pacientelor: testul de corelație Spearman.

| | | p53tm | p53mt | Gradul de diferențiere | Vârsta |
|-------------------------------|-------|---------------|---------------|-------------------------------|---------------|
| p53tm | r_s | | 0,76 | -0,09 | 0,00 |
| | p | | 0,0001 | 0,36 | 0,49 |
| p53mt | r_s | 0,76 | | 0,08 | 0,05 |
| | p | 0,0001 | | 0,37 | 0,42 |
| Gradul de diferențiere | r_s | -0,09 | 0,08 | | 0,57 |
| | p | 0,36 | 0,37 | | 0,007 |
| Vârsta | r_s | 0,00 | 0,05 | 0,57 | |
| | p | 0,49 | 0,42 | 0,007 | |

Cu **Bold** sunt selectate cazurile statistic semnificative ($p<0,05$). r_s – coeficientul de corelație Spearman.

Metastaza limfonodală. La acest nivel am determinat o ușoară creștere a numărului de cazuri p53 negative (7 cazuri/38,9%) comparativ cu tumoarea primară (tab.3.37). Eseul statistic t-Student nu a evidențiat diferențe semnificativ statistice dintre expresia p53 de ambele localizări ($t=0,82$ la un $p<0,42$). Mai mult, valoarea expresiei p53 din metastază a corelat înalt pozitiv cu

scorul p53 din tumoarea primară ($r_s=0,76$, $p<0,0001$) (tab.3.37). Dependența acestor 2 variabile a fost demonstrată și prin testul de regresie liniară (Fig.3.27).

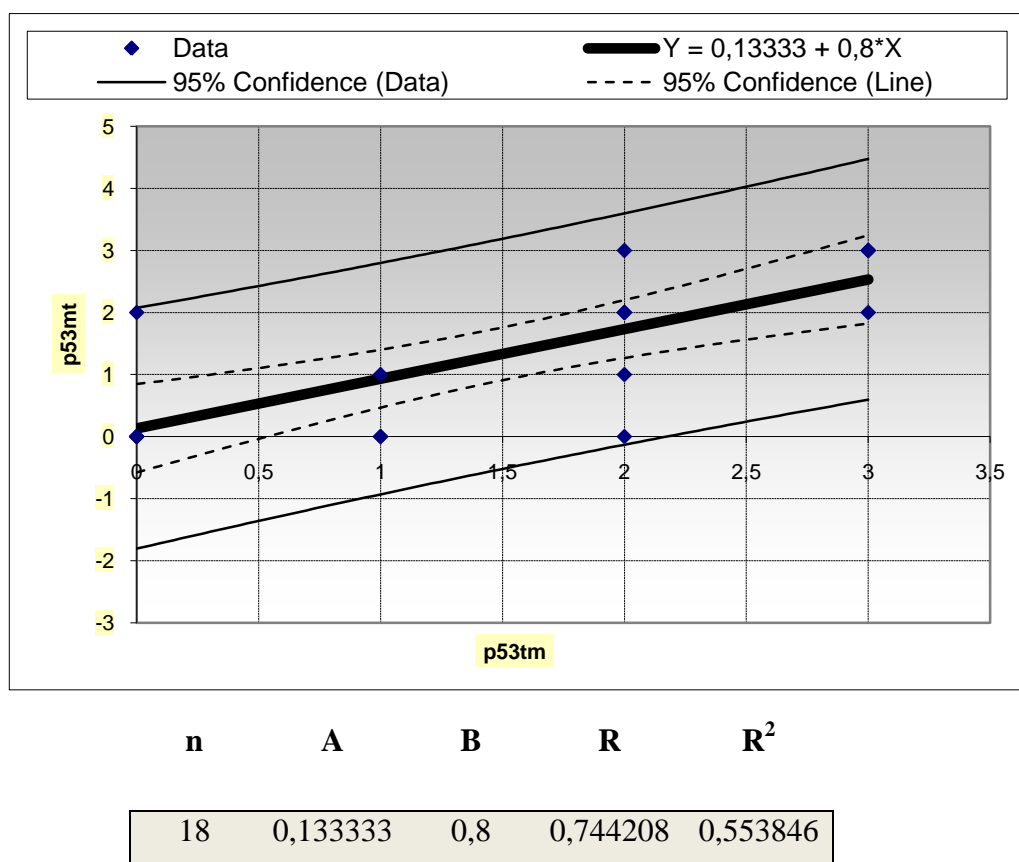


Fig.3.27. Expresia p53 din metastaza limfonodală vs expresia p53 din tumoarea primară: testul de regresie liniară indică o corelație pozitivă, de talie înaltă.

La compararea expresiei de ambele localizări pe fiecare caz în parte, am determinat că receptorul p53 nu este stabil pe parcursul metastazării (tab.3.37).

Cazurile p53 instabile au implicat doar tumori cu grad scăzut și moderat de diferențiere. Evoluția acestui receptor în timpul metastazării s-a manifestat atât prin pierderea expresiei, cât și prin achiziție de fenotip p53. De menționat însă, că cazurile cu transfer de scor din pozitiv în negativ (3 cazuri/16,68%) au predominat față de cazurile cu achiziție de p53 după metastazare (1 caz/5,56%).

Diferențele statistice a expresiei receptorului p53 în tipurile ductal și lobular de carcinom mamar invaziv. La compararea valorilor p53 din tumoarea primară în cazul carcinomului ductal invaziv cu cel lobular infiltrativ am stabilit, că expresia p53 nu este în funcție de tipul histologic al tumorii, testul t-Student (independent) prezentând valori mai mici decât semnificația statistică de $p<0,05$ ($t=0,77$, $p<0,45$).

Tabelul 3.37. Incidența cazurilor p53 pozitive și negative în dependență de localizare, gradul histologic și grupa de vârstă.

| Expresie (după p53tm) | p53tm | p53mt | Gradul de diferențiere | Grupa de vârstă | n | % | % cazurilor cu transfer de scor |
|-----------------------------|----------|----------|---------------------------|--------------------|----------|--------------|---|
| negativă | 0 | 0 | G3 | după 49 | 4 | 22,22 | 1 caz / 5,56% |
| | 0 | 2 | G3 | după 49 | 1 | 5,56 | |
| pozitivă | 1 | 0 | G2 | după 49 | 2 | 11,11 | 3 cazuri / 16,68% |
| | 1 | 1 | G2 | după 49 | 1 | 5,56 | |
| | 2 | 0 | G2 | după 49 | 1 | 5,56 | |
| | 2 | 1 | G2 | după 49 | 1 | 5,56 | |
| | 2 | 2 | G1 | după 49 | 2 | 11,11 | |
| | 2 | 2 | G3 | după 49 | 1 | 5,56 | |
| | 2 | 3 | G2 | după 49 | 1 | 5,56 | |
| | 3 | 2 | G3 | după 49 | 1 | 5,56 | |
| 3 | 3 | G3 | după 49 | 3 | 16,67 | | |
| Total | | | | | 18 | 100 | |

Cu **Bold** sunt selectate cazurile cu transfer de scor în urma metastazării.

În sumar:

1. În carcinoamele mamare ductal invaziv de tip NOS și lobular infiltrativ se atestă o prevalență a cazurilor p53 pozitive.
2. Expresia p53 nu este în funcție de vârsta pacientelor și gradul de diferențiere al tumorii.
3. Valoarea expresiei p53 din metastază este în funcție de scorul expresiei p53 în tumoarea primară.
4. Markerul pro-apoptotic p53 nu este stabil pe parcursul metastazării, evoluând fie cu pierdere sau achiziționare de fenotip p53. Transferurile de scor p53 mai frecvent înregistrate țin de pierderea expresiei p53 în ambianța limfonodală, indiferent de tipul histologic al tumorii.
5. Expresia p53 nu este în funcție de tipul histologic al carcinomului mamar invaziv, ductal sau lobular.

Evoluția markerului anti-apoptotic BCL2

Carcinomul mamar ductal invaziv de tip NOS. Tumoarea primară. În acest studiu au fost examinate 93 tumori, prelevate majoritar de la paciente din grupul de vârstă „după 49” – 67 cazuri/72% și minoritar, „până la 49” cu 26 cazuri/28%. Tumorile examinate au fost cuantificate după gradul de diferențiere precum: cele mai multe cazuri (50 cazuri/53,8%) au avut scor G2, urmate în descresștere de G3 (38 cazuri/40,9%) și G1 (5 cazuri/5,3%). Cazurile cu vârsta de „până la 49” au fost gradate cel mai frecvent cu G2 (19 cazuri/20,4%), urmate de G3 (5 cazuri/5,1%) și G1 (2 cazuri/2,2%).

Tabelul 3.38. Expresia receptorului BCL2 din tumoarea primară (BCL2tm) în relație cu gradul de diferențiere al tumorii și vârsta pacientelor.

| Expresie | BCL2tm | Gradul de diferențiere | Grupa de vârstă | n | % |
|-----------------|---------------|-------------------------------|------------------------|-----------|------------|
| negativă | 0 | G1 | după 49 | 1 | 1,1 |
| | 0 | G1 | până la 49 | 1 | 1,1 |
| | 0 | G2 | după 49 | 5 | 5,4 |
| | 0 | G2 | până la 49 | 3 | 3,2 |
| | 0 | G3 | după 49 | 7 | 7,5 |
| | 1 | G2 | după 49 | 1 | 1,1 |
| | 1 | G3 | după 49 | 3 | 3,2 |
| | 1 | G3 | până la 49 | 1 | 1,1 |
| pozitivă | 2 | G2 | după 49 | 1 | 1,1 |
| | 2 | G2 | până la 49 | 4 | 4,3 |
| | 2 | G3 | după 49 | 7 | 7,5 |
| | 2 | G3 | până la 49 | 1 | 1,1 |
| | 3 | G1 | după 49 | 2 | 2,2 |
| | 3 | G1 | până la 49 | 1 | 1,1 |
| | 3 | G2 | după 49 | 24 | 25,8 |
| | 3 | G2 | până la 49 | 12 | 12,9 |
| | 3 | G3 | după 49 | 16 | 17,2 |
| | 3 | G3 | până la 49 | 3 | 3,2 |
| Total | | | | 93 | 100 |

Studiul imunohistochimic a determinat că carcinomul ductal invaziv este în majoritatea cazurilor BCL2 pozitiv – 71 cazuri/76,3%, și anume cu expresie +3 (58 cazuri/62,4%). Cazurile BCL2 negative au fost evaluate preponderent cu „0” – 17 cazuri/18,3%, urmate de +1 cu 5 cazuri/5,4%. La compararea expresiei markerului în cauză cu grupa de vârstă am determinat că majoritatea tumorilor de vârstă „până la 49” au expresie +3 (16 cazuri/17,2%). Descrierea detaliată a cazurilor este expusă în Tabelul 3.38.

Eseul statistic nu a determinat însă valori semnificative de corelare dintre valoarea expresiei BCL2 cu gradul de diferențiere al tumorii și vârsta pacienților (tab.3.39). Unica corelație pozitivă, de talie slabă, dar statistic semnificativă s-a semnalat la asocierea vârstei și gradului de diferențiere al tumorii ($r_s=0,22$ la un $p<0,016$).

Tabelul 3.39. Corelație după Spearman a expresiei BCL2 de diversă localizare vs gradul de diferențiere al tumorii și vârsta pacienților.

| | BCL2tm | BCL2mt | Grad | Vârsta |
|---------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| BCL2tm | | | | |
| r_s | | 0,60 | -0,15 | -0,04 |
| n | | 87 | 93 | 93 |
| p | | 0,0001 | 0,080 | 0,346 |
| BCL2mt | | | | |
| r_s | 0,60 | | -0,17 | 0,07 |
| n | 87 | | 87 | 87 |
| p | 0,0001 | | 0,064 | 0,247 |
| Grad | | | | |
| r_s | -0,15 | -0,17 | | 0,22 |
| n | 93 | 87 | | 93 |
| p | 0,080 | 0,064 | | 0,016 |
| Vârsta | | | | |
| r_s | -0,04 | 0,07 | 0,22 | |
| n | 93 | 87 | 93 | |
| p | 0,346 | 0,247 | 0,016 | |

Grad – gradul de diferențiere al tumorii. BCL2tm, BCL2mt – localizarea receptorului BCL2 în tumoarea primară și metastaza limfonodală. Rezultatele semnificativ statistic sunt selectate prin **Bold**. r_s – coeficientul de corelație Spearman și semnificația statistică (p).

Metastaza limfonodală. Evoluția BCL2 a fost comparată pe un lot de 87 tumori, dintre care 41 cazuri/47,1% au fost considerate BCL2 negative și 46 cazuri/52,9% BCL2 pozitive. Grupele de vârstă au fost repartizate relativ similar, cu o ușoară prevalență a ambelor categorii, de până la 49 și după 49 în cohorta cazurilor BCL2 pozitive (Anexa 3).

La compararea valorilor BCL2 din tumoarea primară și metastază am determinat că expresia este una diferită, în funcție de localizare, iar testul t-Student a atins valori semnificativ statistice ($t=4,86$ la un $p<0,00001$). Însă valoarea expresiei din metastaza limfonodală a fost în funcție de expresia BCL2 din tumoarea primară, coeficientul Spearman atingând cote rezonabile de corelare ($r_s=0,6$, $p<0,0001$) (tab.3.40), afirmație susținută și de testul de regresie lineară (Fig.3.28).

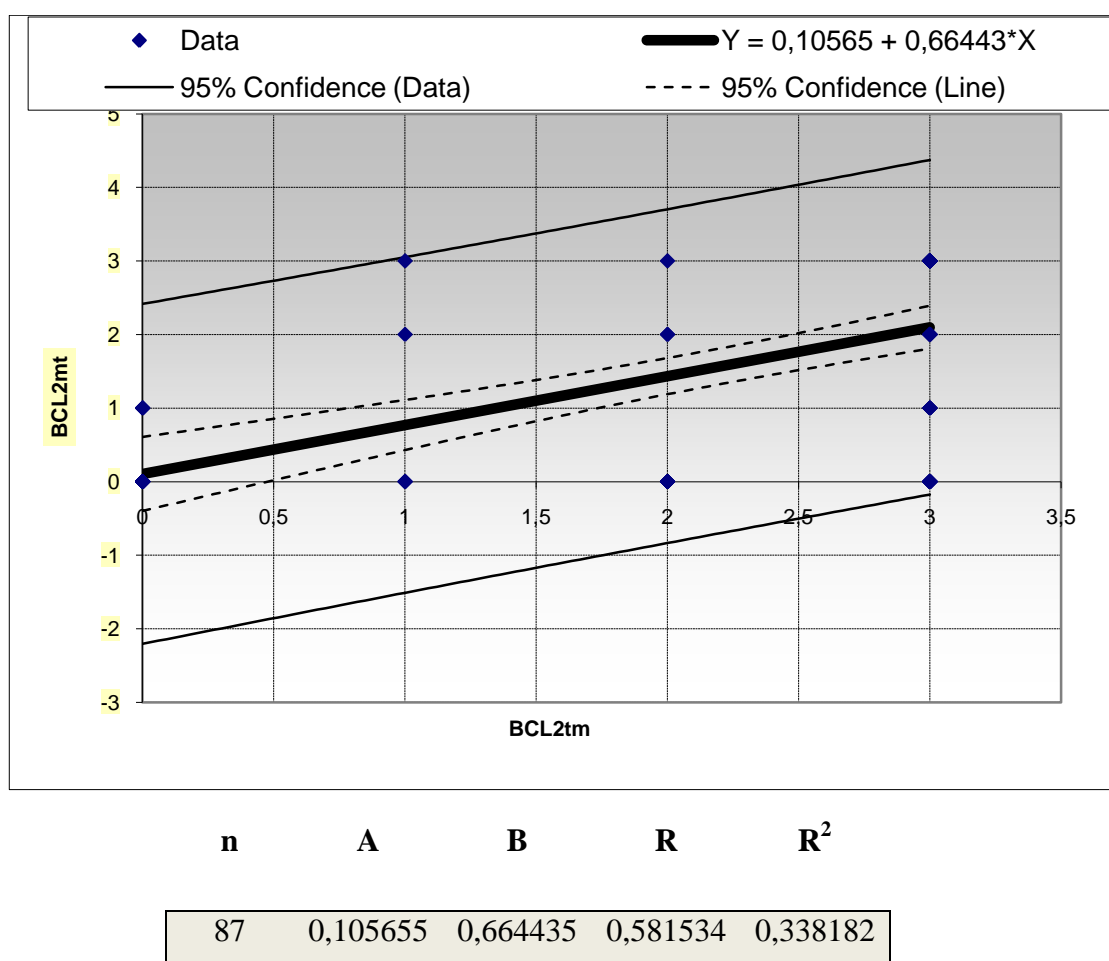


Fig.3.28. Expresia BCL2 din metastaza limfonodală vs valoarea BCL2 din tumoarea primară: testul de regresie lineară reflectă o corelație pozitivă, de talie rezonabilă.

Diferențele de expresie primară-metastatică s-au datorat existenței a 23 cazuri/26,3% de transfer de scor, dintre care 2 cazuri/2,2% au prezentat achiziționare de receptor după metastazare, iar 21 cazuri/41,1% sau soldat cu pierderea expresiei BCL2 în ambianța

limfonodală (Anexa 3, Fig.3.29). Cazurile de BCL2 achiziționare au implicat doar tumori de grad G3 la paciente de „după 49” ani.

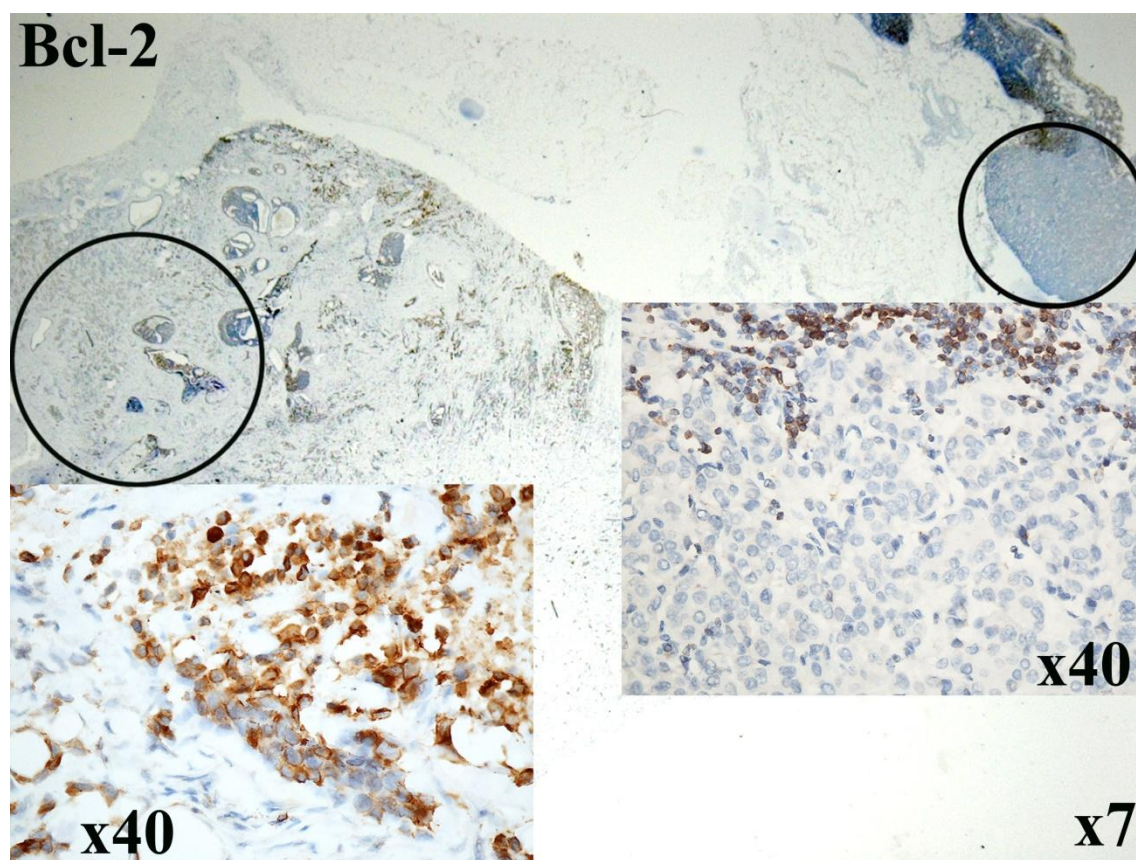


Fig.3.29. Carcinom ductal invaziv, G2. Tumoarea primară și metastaza sa limfonodală colorate pe aceeași lamă pentru receptorul anti-apoptotic BCL2. De notat, că tumoarea primară este intens pozitivă (+3), iar metastaza BCL2 negativă. Contracolorare hematoxină Lille.

Cazurile cu pierderea expresiei BCL2 după metastazare au fost înregistrate la tumori cu grad G2 și G3, dintre care în 6 cazuri/6,9% au implicat paciente cu vârsta de „până la 49” ani.

Carcinomul mamar lobular invaziv. Tumoarea primară. În studiul dat am determinat că în carcinomul lobular invaziv predomină cazurile cu expresie BCL2 pozitivă (11 cazuri/61,1%) față de cele BCL2 negative (7 cazuri/38,9%). În relație cu gradul de diferențiere am constatat că majoritatea tumorilor sunt G2 și G3, cu excepția a 2 cazuri/11,1% BCL2 negative, cu grad G1 și vârsta pacientei de „după 49” ani (tab.3.43). Eseul statistic de corelare însă nu a stabilit asocieri de forță semnificativă, coeficientul Pearson fiind egalat cu $r=0,20$ și $p<0,219$ la corelarea expresiei BCL2 cu gradul de diferențiere și $r=0,06$ la $p<0,410$ în cazul BCL2 vs vârsta pacientelor. Unica corelație statistic semnificativă s-a stabilit la asocierea gradului de diferențiere și vârstei pacientelor ($r=0,48$, $p<0,022$).

Metastaza limfonodală. La nivelul metastazei limfonodale au predominat cazurile BCL2 negative – 11 cazuri/61,1%, repartizate după gradul de diferențiere al tumorii primare precum urmează: G3 – 6 cazuri/33,3%, G2 – 3 cazuri/16,7% și G1 – 2 cazuri/11,1% (tab.3.40).

La compararea valorilor de expresie a BCL2 testul t-Student nu a determinat diferențe semnificativ statistice, dependente de localizare ($t=2,01$ la un $p<0,06$). Mai mult, coeficientul Spearman a atins cote rezonabile de corelație la asocierea valorilor BCL2 de ambele localizări ($r=0,56$, $p<0,008$).

Tabelul 3.40. Expresia BCL2 în funcție de localizare, grupa de vârstă și gradul de diferențiere al tumorii de tip lobular invaziv.

| Expresie (după BCL2tm) | BCL2tm | BCL2mt | Gradul de diferențiere | n | % | % cazurilor cu transfer de scor |
|------------------------------|----------|----------|---------------------------|----------|-------------|---|
| negativă | 0 | 0 | G1 | 2 | 11,1 | - |
| | 0 | 0 | G2 | 1 | 5,6 | |
| | 0 | 0 | G3 | 2 | 11,1 | |
| | 0 | 1 | G3 | 1 | 5,6 | |
| | 1 | 1 | G3 | 1 | 5,6 | |
| pozitivă | 2 | 3 | G3 | 1 | 5,6 | 4 cazuri / 22,3% |
| | 3 | 0 | G2 | 2 | 11,1 | |
| | 3 | 0 | G3 | 1 | 5,6 | |
| | 3 | 1 | G3 | 1 | 5,6 | |
| | 3 | 2 | G3 | 2 | 11,1 | |
| | 3 | 3 | G2 | 3 | 16,7 | |
| | 3 | 3 | G3 | 1 | 5,6 | |
| Total | | | | | 18 | 100 |

Cu **Bold** sunt selectate cazurile cu transfer de scor BCL2 după metastazare.

Trebuie de menționat însă, că la compararea valorilor BCL2 de ambele localizări am determinat 4 cazuri/22,3% de transfer de scor după metastazare. Acestea exclusiv au ținut de pierderea receptorului în micromediul limfonodal după metastazarea tumorilor cu grad G2 și G3 (tab.3.40).

Expresia receptorului BCL2 în dependență de tipul histologic al carcinomului mamar invaziv. Deși carcinomul ductal invaziv de tip NOS are trăsături histologice distincte, capabile de a diferenția de cel lobular invaziv, testul t-Student nu a determinat diferențe statistice a expresiei BCL2 atât la nivelul tumorii primare ($t = -1,12$, $p < 0,264$), cât și în sediul limfonodal ($t = -0,99$, $p < 0,324$) al tumorilor comparate.

În sumar:

1. Tumorile primare examinate, de tip ductal invaziv și lobular infiltrativ sunt preponderent BCL2 pozitive, au grad scăzut de diferențiere și afectează mai frecvent femeii din categoria de vârstă de „după 49”. Gradul de diferențiere al tumorilor corelează pozitiv cu vârsta pacientelor.
2. Expresia BCL2 este în funcție de localizare, însă valoarea BCL2 din metastază depinde de expresia acestuia în tumoarea primară.
3. BCL2 nu este stabil pe parcursul metastazării, predominând cazurile de pierdere a acestuia în ambianța limfonodală. Cazurile de transfer implică numai tumori cu grad scăzut și moderat de diferențiere, afectând în special femeii de „după 49” ani.
4. În cazul carcinomului lobular invaziv s-au determinat exclusiv cazuri cu pierderea expresiei BCL2 după metastazare.
5. Nu s-au determinat diferențe semnificativ statistice dintre expresia BCL2 în funcție de tipul histologic, ductal sau lobular invaziv.

3.7. Stabilitatea E-cadherinei în evoluția procesului metastatic

Carcinomul mamar ductal invaziv de tip NOS. Tumoarea primară. Markerul de adeziune intercelulară E-cadherina a fost studiat pe un lot de 138 tumori, colectate de la paciente cu vârsta cuprinsă între 33-86 ani. În funcție de categoria de vârstă am determinat, că majoritatea o constituie paciențele de „după 49” ani – 100 cazuri/72,5%, față de cele de „până la 49” ani, cu 38 cazuri/27,5% (tab.3.41).

Tabelul 3.41. Expresia E-cadherinei din tumoarea primară, în funcție de gradul de diferențiere al tumorii și vârsta pacientelor.

| Expresie | E-cadherina | Grupa de vârstă | Gradul de diferențiere | n | % | |
|----------|-------------|-----------------|------------------------|-----|------|------|
| | | | | | | |
| negativă | 0 | după 49 | G2 | 3 | 2,2 | 2,9 |
| | 0 | până la 49 | G3 | 1 | 0,7 | |
| pozitivă | 2 | după 49 | G2 | 5 | 3,6 | 97,1 |
| | 2 | după 49 | G3 | 6 | 4,3 | |
| | 2 | până la 49 | G2 | 2 | 1,4 | |
| | 3 | după 49 | G1 | 4 | 2,9 | |
| | 3 | după 49 | G2 | 50 | 36,2 | |
| | 3 | după 49 | G3 | 32 | 23,2 | |
| | 3 | până la 49 | G1 | 2 | 1,4 | |
| | 3 | până la 49 | G2 | 27 | 19,6 | |
| 3 | până la 49 | G3 | 6 | 4,3 | | |
| Total | | | | 138 | 100 | |

În studiul dat au predominat tumori cu grad moderat (87 cazuri/63%) și scăzut de diferențiere (45 cazuri/32,6%) în comparație cu carcinoamele bine diferențiate (6 cazuri/4,4%). De menționat că, gradul G1 a fost determinat în ambele grupe de vârstă, dar predominant la paciente de „după 49” ani – 4 cazuri/2,9%.

Valoarea markerului E-cadherina a fost una majoritar pozitivă (134 cazuri/97,1%), iar expresia acestuia a fost înregistrată la tumori de orice grad de diferențiere și paciente de ambele categorii de vârstă. De menționat, că în cohorta tumorilor E-cadherin pozitive au predominat cazurile cu scor „+3” – 121 cazuri/87,7%, față de cele „+2” – 13 cazuri/9,4%.

Eseul de corelare nu a determinat asocieri semnificativ statistice dintre valoarea expresiei E-cadherinei cu vârsta pacientelor și gradul de diferențiere al tumorilor (tab.3.42). Unica

corelație pozitivă, de talie joasă, însă semnificativ statistică s-a înregistrat la compararea vârstei și gradului histologic al tumorii ($r_s=0,16$, $p<0,035$).

Tabelul 3.42. Expresia E-cadherinei în funcție de localizare, gradul de diferențiere al tumorii și vârsta pacienților: testul de corelare Spearman.

| | Ecadtm | Ecadmt | Vârsta | Gradul de diferențiere |
|-------------------------------|---------------|---------------|---------------|-------------------------------|
| Ecadtm | | | | |
| r_s | | 0,12 | 0,06 | -0,08 |
| n | | 94 | 138 | 138 |
| p | | 0,129 | 0,260 | 0,170 |
| Ecadmt | | | | |
| r_s | 0,12 | | 0,04 | 0,05 |
| n | 94 | | 94 | 94 |
| p | 0,129 | | 0,345 | 0,320 |
| Vârsta | | | | |
| r_s | 0,06 | 0,04 | | 0,16 |
| n | 138 | 94 | | 138 |
| p | 0,260 | 0,345 | | 0,035* |
| Gradul de diferențiere | | | | |
| r_s | -0,08 | 0,05 | 0,16 | |
| n | 138 | 94 | 138 | |
| p | 0,170 | 0,320 | 0,035* | |

*Rezultate semnificativ statistic ($p<0,05$); n – numărul de cazuri investigate; r_s – coeficientul de corelație Spearman și semnificația statistică (p). **Ecadtm** – scorul expresiei E-cadherinei în tumoarea primară; **Ecadmt** – valoarea E-cadherinei în metastaza limfonodală.

Metastaza limfonodală. Studiului comparativ au fost supuse 94 tumori. Metastazele limfonodale, precum și tumorile primare au manifestat preponderent fenotip E-cadherin pozitiv în 86 cazuri/91,5%. Studiul comparativ tumoare primară-metastază a evidențiat o dublă creștere a cazurilor E-cadherin negative în sediul limfonodal (8 cazuri/8,5%), în special datorită cazurilor cu expresie de limită „+1” a acestui marker.

Corelând valorile acestui marker în funcție de localizare am determinat, că valoarea E-cadherinei din metastază nu depinde de expresia inițială din tumoarea primară ($r_s=0,12$, $p<0,129$). Mai mult, studiul comparativ a confirmat, că expresia E-cadherinei din metastază diferă semnificativ statistic de valorile acesteia din tumoarea primară ($t=2,46$, $p<0,02$).

Analiza detaliată a expresiei E-cadherinei pe fiecare caz în parte a pus în evidență 9 cazuri/9,57% cu transfer de scor după metastazare (tab.3.43).

Tabelul 3.43. Evoluția E-cadherinei în procesul metastatic: expresia E-cadherinei în tumoarea primară (Ecadtm) vs valoarea acesteia în sediul metastatic (Ecadmt).

| Expresie după Ecadtm | Ecadtm | Ecadmt | Gradul de diferențiere | Grupa de vârstă | n | % | % cazurilor cu transfer de scor |
|----------------------|----------|----------|------------------------|-------------------|----------|-------------|---------------------------------|
| negativă | 0 | 3 | G3 | până la 49 | 1 | 1,06 | 1 caz / 1,06% |
| pozitivă | 2 | 0 | G3 | după 49 | 1 | 1,06 | 8 cazuri / 8,51% |
| | 2 | 1 | G2 | după 49 | 1 | 1,06 | |
| | 2 | 2 | G3 | după 49 | 1 | 1,06 | |
| | 2 | 3 | G2 | până la 49 | 1 | 1,06 | |
| | 2 | 3 | G3 | după 49 | 4 | 4,26 | |
| | 3 | 0 | G3 | după 49 | 1 | 1,06 | |
| | 3 | 0 | G3 | până la 49 | 1 | 1,06 | |
| | 3 | 1 | G2 | după 49 | 2 | 2,13 | |
| | 3 | 1 | G2 | până la 49 | 1 | 1,06 | |
| | 3 | 1 | G3 | după 49 | 1 | 1,06 | |
| | 3 | 2 | G1 | până la 49 | 1 | 1,06 | |
| | 3 | 2 | G2 | după 49 | 4 | 4,26 | |
| | 3 | 2 | G2 | până la 49 | 4 | 4,26 | |
| | 3 | 2 | G3 | după 49 | 1 | 1,06 | |
| | 3 | 3 | G1 | după 49 | 3 | 3,19 | |
| | 3 | 3 | G1 | până la 49 | 1 | 1,06 | |
| | 3 | 3 | G2 | după 49 | 24 | 25,53 | |
| | 3 | 3 | G2 | până la 49 | 15 | 15,96 | |
| 3 | 3 | G3 | după 49 | 23 | 24,47 | | |
| 3 | 3 | G3 | până la 49 | 3 | 3,19 | | |
| Total | | | | | 94 | 100 | |

Cu **Bold** sunt selectate cazurile cu transfer de scor la metastazare.

Cazurile E-cadherin instabile au implicat doar tumori cu grad G2 și G3 de diferențiere și paciente de ambele categorii de vârstă. Din cele 9 cazuri/9,57% înregistrate cu transfer de scor, 8 cazuri/8,51% au evoluat cu pierderea expresiei E-cadherinei după metastazare, și o singură tumoare, G3 a manifestat achiziționare de fenotip E-cadherin pozitiv în sediul limfonodal (Fig.3.30).

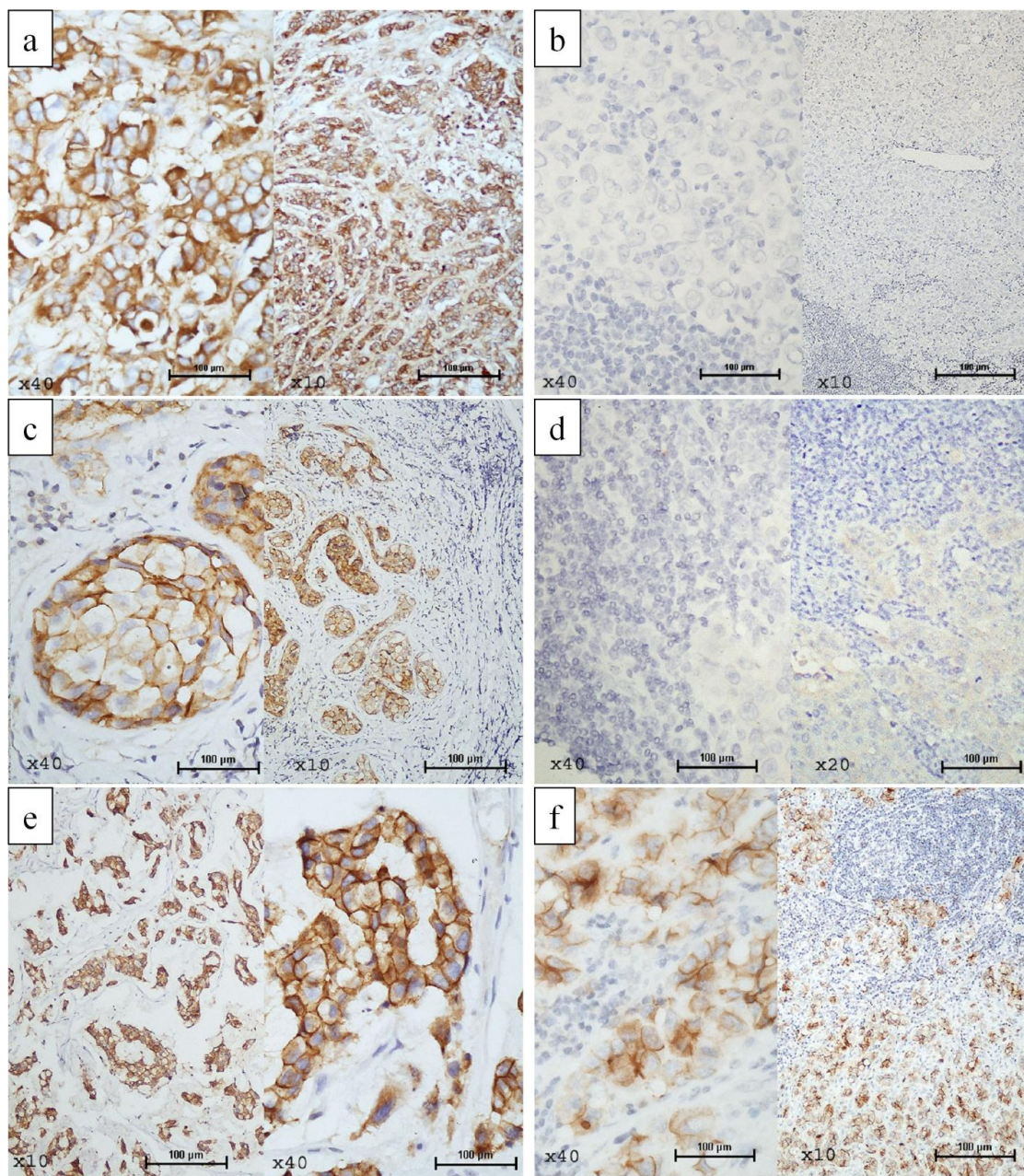


Fig.3.30. Carcinoame ductal invazive de tip NOS: evoluția E-cadherinei în procesul metastatic. Din 9 cazuri/9,57% înregistrate cu transfer de scor, 8 cazuri/8,51% au evoluat cu pierderea expresiei E-cadherinei după metastazare (a-b; c-d), și o singură tumoare, G3 a manifestat achiziționare de fenotip E-cadherin pozitiv în sediul limfonodal. În restul cazurilor expresia E-cadherinei a fost stabilă, preponderent pozitivă (e-f).

Carcinomul mamar lobular invaziv. Tumoarea primară. În acest studiu au fost incluse 18 tumori, descifrate morfologic drept carcinoame lobular infiltrative, colectate postoperatoriu de la paciente cu vârsta cuprinsă între 45-78 ani. Aceste tumori au manifestat preponderent grad de diferențiere G2 (6 cazuri/33,3%) și G3 (10 cazuri/55,6%), mai rar G1(2 cazuri/11,1%).

Studiul imunohistochimic a evidențiat că tumorile lobular invazive manifestă o ușoară prevalență a cazurilor cu expresie negativă a E-cadherinei (10 cazuri/50,6%), față de cele pozitive (8 cazuri/44,4%). De remarcat faptul, că cazurile E-cadherin negative au fost exclusiv tumori cu grad moderat și scăzut de diferențiere, iar cele 2 cazuri/11,1% cu scor G1 au exprimat E-cadherina din abundență (tab.3.44).

Tabelul 3.44. Expresia E-cadherinei în funcție de localizare și gradul de diferențiere al tumorii.

| Expresie (după Ecadtm) | Ecadtm | Ecadmt | Gradul de diferențiere | n | % |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-----------------------------------|----------|------------|
| negativă | 0 | 0 | G2 | 1 | 5,6 |
| | 0 | 0 | G3 | 7 | 38,9 |
| | 0 | 2 | G2 | 1 | 5,6 |
| | 1 | 1 | G3 | 1 | 5,6 |
| pozitivă | 2 | 0 | G2 | 1 | 5,6 |
| | 3 | 2 | G1 | 2 | 11,1 |
| | 3 | 2 | G2 | 2 | 11,1 |
| | 3 | 3 | G2 | 1 | 5,6 |
| | 3 | 3 | G3 | 2 | 11,1 |
| Total | | | | 18 | 100 |

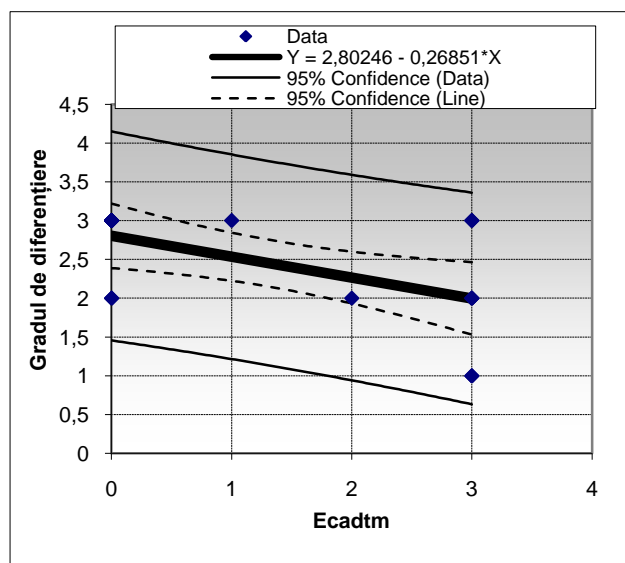
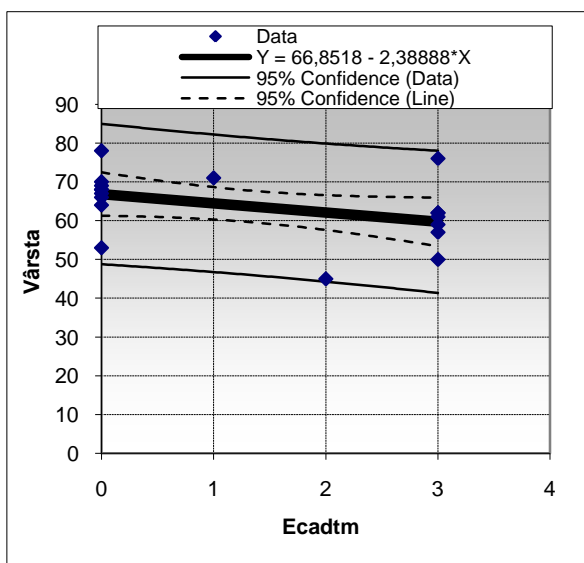
Cu **Bold** sunt selectate cazurile cu transfer de scor al E-cadherinei după metastazare. **Ecadtm** – scorul expresiei E-cadherinei în tumoarea primară; **Ecadmt** – valoarea E-cadherinei în metastaza limfonodală.

Eseul statistic de corelare a evidențiat o asociere de talie rezonabilă, statistic semnificativă, însă inversă dintre expresia E-cadherinei cu vârsta ($r_s = -0,44$, la $p < 0,033$) și gradul de diferențiere ($r_s = -0,52$, la $p < 0,013$) (tab.3.45). Relația dintre aceste variabile a fost confirmată și prin testul de regresie lineară (Fig.3.31).

Tabelul 3.45. Studiul de corelație a valorilor E-cadherinei de diversă localizare, vârstă și gradul de diferențiere.

| | Ecadtm | Ecadmt | Vârsta | Gradul de diferențiere |
|-------------------------------|---------------|---------------|---------------|-------------------------------|
| Ecadtm | | | | |
| r_s | | 0,84 | -0,44 | -0,52 |
| p | | 0,0001 | 0,033 | 0,013 |
| Ecadmt | | | | |
| r_s | 0,84 | | -0,13 | -0,39 |
| p | 0,0001 | | 0,305 | 0,054 |
| Vârsta | | | | |
| r_s | -0,44 | -0,13 | | 0,57 |
| p | 0,033 | 0,305 | | 0,007 |
| Gradul de diferențiere | | | | |
| r_s | -0,52 | -0,39 | 0,57 | |
| p | 0,013 | 0,054 | 0,007 | |

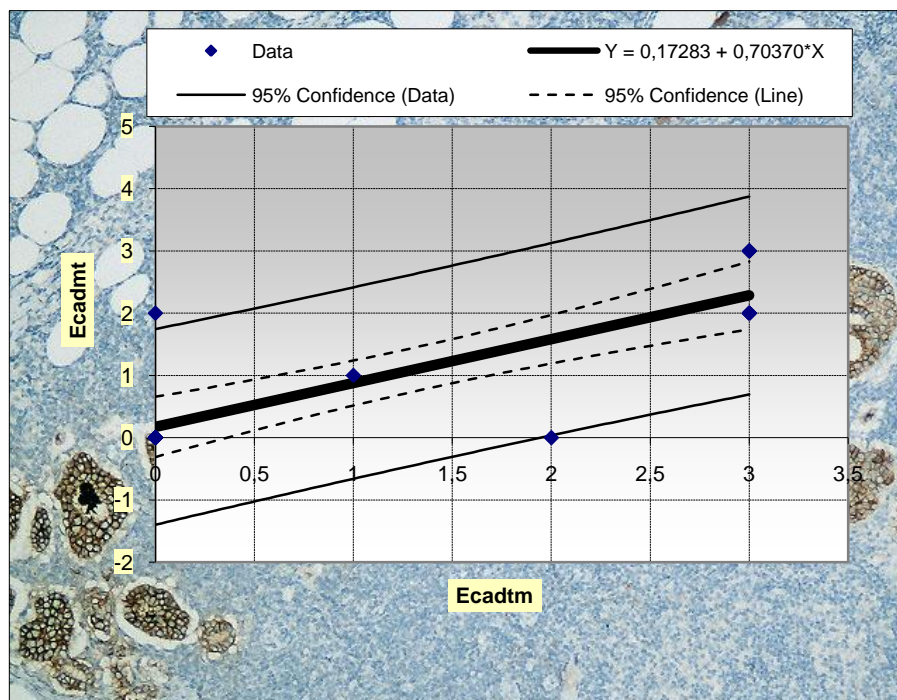
r_s – coeficientul de corelație Spearman și semnificația statistică (p). **Ecadtm** – scorul expresiei E-cadherinei în tumoarea primară; **Ecadmt** – valoarea E-cadherinei în metastaza limfonodală. Cazurile semnificativ statistice au fost evidențiate cu **Bold**.



| n | A | B | R | R ² | n | A | B | R | R ² |
|----|-------|-------|------|----------------|----|------|-------|------|----------------|
| 18 | 66,85 | -2,39 | 0,40 | 0,16 | 18 | 2,80 | -0,27 | 0,55 | 0,31 |

Fig.3.31. Testul de regresie liniară: corelație invers proporțională, de talie rezonabilă dintre valorile E-cadherinei din tumoarea primară vs vârsta pacienților și gradul de diferențiere al tumorilor.

Metastaza limfonodală. Incidența cazurilor după expresia E-cadherinei a fost similară cu cea din tumoarea primară: 10 cazuri/55,6% E-cadherin negative și 8 cazuri/44,4% E-cadherin pozitive, fapt confirmat și prin testul t-Student ($t=1,17$, $p<0,26$). Mai mult, valoarea acestui marker din metastază este influențată direct de expresia sa în tumoarea primară. Astfel testul de corelație a prezentat valori înalte, statistic semnificative (tab.3.45). Relația de cauză-efect dintre valorile E-cadherinei a fost susținută și de testul regresiei lineare (Fig.3.32).



| n | A | B | R | R ² |
|----|------|------|------|----------------|
| 18 | 0,17 | 0,70 | 0,83 | 0,69 |

Fig.3.32. Expresia E-cadherinei în funcție de localizare: testul de regresie lineară prezintă o corelație foarte înaltă dintre valorile acestui marker din tumoarea primară și metastaza limfonodală.

La o analiză amănunțită a fiecărui caz în parte am determinat, că E-cadherina nu este stabilă în procesul metastatic (tab.3.44). Astfel am evidențiat 2 cazuri/11,1% cu transfer de scor, atât în direcția achiziționării E-cadherinei (1 caz/5,6%) după metastazare, cât și pierderii acestui marker în sediul limfonodal (1 caz/5,6%).

Expresia E-cadherinei în funcție de tipul histologic, ductal sau lobular invaziv. La compararea expresiei E-cadherinei în carcinomul ductal invaziv cu cel lobular infiltrativ, am

determinat că valoarea acesteia variază în funcție de tipul histologic al tumorii. Astfel testul t-Student (independent) a rezultat cu valori înalte, statistic semnificative ($t=8,20$, la un $p<0,0001$).

În sumar:

1. Expresia E-cadherinei este în funcție de tipul histologic al tumorii, ductal sau lobular invaziv.
2. Carcinomul ductal invaziv de tip NOS prezintă în majoritatea cazurilor markerul de aderență intercelulară E-cadherina.
3. Expresia E-cadherinei în tumoarea primară nu este în funcție de gradul de diferențiere al carcinomului și vârsta pacientelor.
4. Expresia E-cadherinei din metastază diferă de valorile acesteia din tumoarea primară.
5. E-cadherina nu este stabilă pe parcursul metastazării, evoluând preponderent cu pierderea acestui marker în sediul limfonodal.
6. În cazul carcinomului lobular invaziv se atestă o ușoară prevalență a cazurilor E-cadherin negative. Expresia acesteia în tumoarea primară corelează invers cu vârsta pacientelor și gradul de diferențiere al tumorii: valorile negative a acestui marker mai frecvent se determină la paciente de vârstă înaintată și tumori cu grad scăzut de diferențiere.
7. E-cadherina nu este stabilă pe parcursul metastazării nici în carcinomul lobular infiltrativ, prezentând în măsură egală transferuri de scor cu achiziție sau pierdere de fenotip caracteristic acestui marker.

3.8. Evoluția receptorului pentru AR în microambianța limfonodală

Carcinomul ductal invaziv de tip NOS. Expresia în tumoarea primară. În acest studiu au fost incluse 15 paciente cu vârsta cuprinsă între 33-79 ani. Conform grupei de vârstă acestea au fost repartizate în: „până la 49” ani – 4 paciente/26,7% și 11 paciente/73,3% „după 49” ani (tab.3.46). Tumorile studiate au fost repartizate după gradul histologic precum: G2 – 8 cazuri/53,3% și G3 în 7 cazuri/46,7%.

În relație cu gradul histologic toate cazurile de „până la 49” ani au fost evaluate cu scor moderat, G2 de diferențiere. În cazul grupei de „după 49” ani s-au determinat tumori cu grad histologic G2 (4 cazuri/26,7%) și G3 (7 cazuri/46,7%).

Tabelul 3.46. Expresia receptorului pentru androgeni (AR), raportată la vârsta pacientelor și gradul histologic al tumorilor.

| Expresie | AR | Grupa de vârstă | Gradul de diferențiere | n | % |
|----------|----|-----------------|------------------------|----|------|
| negativă | 0 | după 49 | G3 | 1 | 6,7 |
| pozitivă | 1 | până la 49 | G2 | 1 | 6,7 |
| | 2 | după 49 | G2 | 1 | 6,7 |
| | 2 | după 49 | G3 | 1 | 6,7 |
| | 3 | după 49 | G2 | 3 | 20,0 |
| | 3 | după 49 | G3 | 5 | 33,3 |
| | 3 | până la 49 | G2 | 3 | 20,0 |
| Total | | | | 15 | 100 |

Receptorul pentru androgeni a fost evaluat cu scor pozitiv în 14 cazuri/93,3%. Aceste cazuri au fost repartizate după scorul Allred în felul următor: 1 caz/6,7% cu scor „+1”, 2 cazuri/13,3% cu scor „+2” și 11 cazuri/73,3% cu scor Allred „+3”. Doar o singură tumoare (6,7%), cu grad G3, dezvoltată la pacientă de „după 49” ani nu a prezentat receptorul pentru AR.

În cadrul studiului statistic scorul expresiei AR nu a corelat semnificativ credibil cu gradul histologic al tumorii și vârsta pacientelor (tab.3.47). De remarcat însă, că ultimele 2 variabile au prezentat o asociere statistic semnificativă, de talie rezonabilă ($r_s=0,50$, $p<0,030$).

Metastaza limfonodală. În studiul comparativ metastază-tumoare primară au fost incluse 13 cazuri, dintre care 2 cazuri/15,4% au fost evaluate cu scor Allred „0”. Cazurile pozitive (11/84,6%) au fost repartizate după scor precum: „+2” – 1 caz/7,7% și „+3” în 10 cazuri/76,9%.

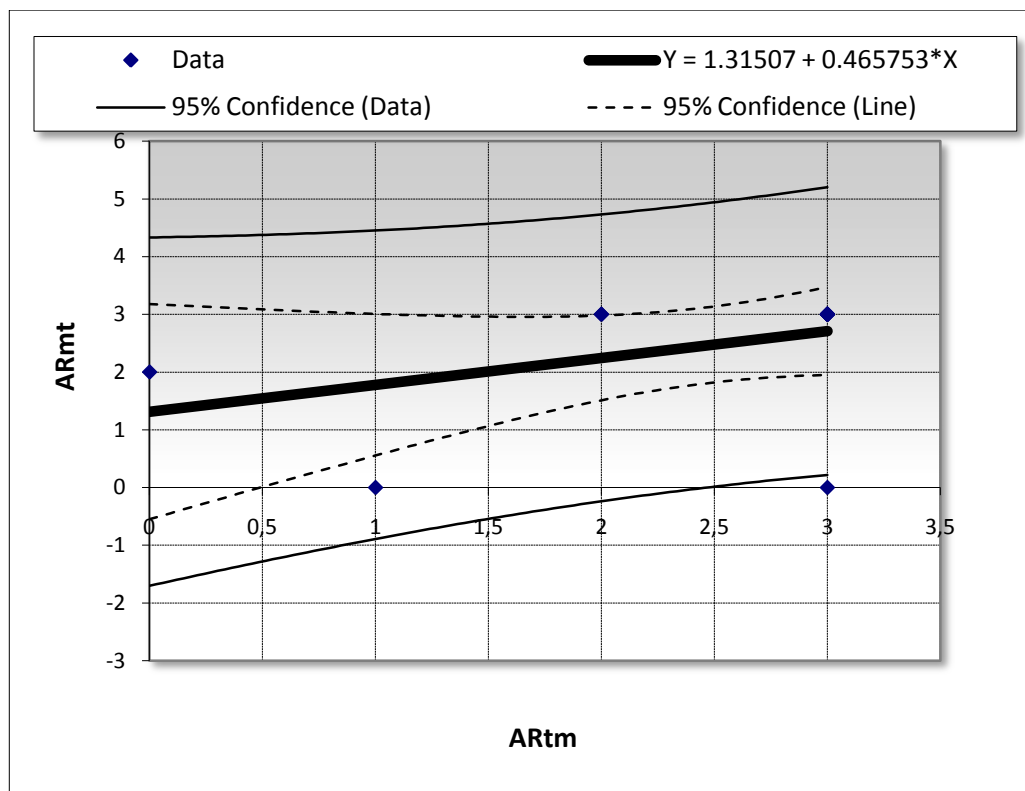
Tabelul 3.47. Expresia AR în funcție de localizare, gradul histologic al tumorii și vârsta pacienților: corelația rangurilor după Spearman.

| | ARtm | ARmt | Gradul de diferențiere | Vârsta |
|-------------------------------|-------------|-------------|-------------------------------|---------------|
| ARtm | | | | |
| r_s | | 0,49 | -0,06 | 0,32 |
| n | | 13 | 15 | 15 |
| p | | 0,044* | 0,416 | 0,122 |
| ARmt | | | | |
| r_s | 0,49 | | -0,11 | 0,06 |
| n | 13 | | 13 | 13 |
| p | 0,044* | | 0,358 | 0,421 |
| Gradul de diferențiere | | | | |
| r_s | -0,06 | -0,11 | | 0,50 |
| n | 15 | 13 | | 15 |
| p | 0,416 | 0,358 | | 0,030* |
| Vârsta | | | | |
| r_s | 0,32 | 0,06 | 0,50 | |
| n | 15 | 13 | 15 | |
| p | 0,122 | 0,421 | 0,030* | |

Notă: r_s – coeficientul de corelație Spearman. *Valori statistic semnificative ($p < 0,05$).

La compararea expresiei AR în dependență de localizare nu am determinat diferențe statistic semnificative, t-testul prezentând valori de $t=0$ la $p=1$. Mai mult, testul de corelare a finalizat cu rezultat statistic veridic în favoarea dependenței pozitive, de talie rezonabilă a expresiei AR din metastază de valoarea AR din tumoarea primară ($r_s=0,49$, $p < 0,044$) (tab.3.47). Legătura de tip cauză-efect dintre aceste 2 variabile a fost susținută și de testul de regresie (Fig.3.33).

Evoluția receptorului pentru AR în procesul metastatic a fost evaluată prin compararea scorului Allred al tumorii de ambele localizări (tab.3.48). Astfel am determinat, că expresia acestui receptor nu este stabilă după metastazare, înregistrând transfer de scor în 3 cazuri/23,1%. Evoluția acestui receptor a decurs atât cu achiziționare de fenotip AR pozitiv (1caz/7,7%), atât și prin pierderea acestui receptor de celula tumorală în ambianța limfonodală (2 cazuri/15,4%).



| n | A | B | R | R ² |
|----|------|------|------|----------------|
| 13 | 1,32 | 0,47 | 0,40 | 0,16 |

Fig.3.33. Testul de regresie liniară: relație direct proporțională dintre expresia AR de localizare primară și metastatică, rezultată cu corelație de talie rezonabilă.

Tabelul 3.48. Stabilitatea receptorului pentru AR în procesul de metastazare.

| Expresie (după ARtm) | ARtm | ARmt | Grupa de vârstă | Gradul de diferențiere | n | % | % cazurilor cu transfer de scor |
|----------------------|----------|----------|-------------------|------------------------|----------|------------|---------------------------------|
| negativă | 0 | 2 | după 49 | G3 | 1 | 7,7 | 1 caz / 7,7% |
| pozitivă | 1 | 0 | până la 49 | G2 | 1 | 7,7 | 2 cazuri / 15,4% |
| | 2 | 3 | după 49 | G2 | 1 | 7,7 | |
| | 2 | 3 | după 49 | G3 | 1 | 7,7 | |
| | 3 | 0 | după 49 | G3 | 1 | 7,7 | |
| | 3 | 3 | după 49 | G2 | 2 | 15,4 | |
| | 3 | 3 | după 49 | G3 | 4 | 30,8 | |
| Total | | | | | 13 | 100,0 | |

Notă: cazurile cu transfer de scor în urma metastazării au fost selectate cu **Bold**.

În sumar:

1. Carcinomul ductal invaziv de tip NOS în majoritatea cazurilor este androgen pozitiv.
2. Expresia AR nu este influențată de gradul histologic al tumorii și vârsta pacientelor.
3. Valoarea AR din metastază este direct proporțională cu expresia AR în tumoarea primară.
4. Receptorul pentru AR nu este stabil pe parcursul metastazării. Transferul de scor poate evolua atât cu achiziționare de fenotip AR pozitiv, cât și prin pierderea acestui receptor de către celula tumorală în ambianța limfonodală.

3.9. Analiza comparativă a expresiei receptorilor incluși în studiu: interrelațiile dintre toți markerii utilizați în funcție de tipul și gradul histologic al tumorii, vârsta pacientelor.

Carcinomul ductal invaziv de tip NOS. În acest studiu vor fi descriși textual doar rezultatele statistice semnificative. Toate rezultatele numerice sunt expuse detaliat în Anexa 6.

Receptorul pentru estrogeni în tumoarea primară (ERtm) a corelat pozitiv cu expresia markerului pentru progesteron, androgeni și markerul anti-apoptotic BCL2. Totodată, creșterea valorii ER a concordat cu diminuarea expresiei markerilor pentru CK5, EGFR și HER2. Aceleași relații s-au păstrat și la asocierea valorii ERtm cu receptorii expuși anterior, dar în sediul metastatic. În plus, la acest nivel ERtm a corelat invers și cu markerul nuclear Ki67, și proteina pro-apoptică p53 (Fig.3.34).

Pornind de la ipoteza, că expresia ER din metastază (ERmt) ar trebui să aibă aceleași tipuri de asocieri ca și ER (ERtm) din sediul primar am comparat valorile ERmt cu toți markerii incluși în studiu. Astfel am determinat că direcția de asociere dintre markeri este similară ca și în cazul ERtm, cu câteva excepții: ERmt nu a corelat statistic veridic cu EGFR de ambele localizări, iar în cazul receptorului pentru AR a prezentat afinitate doar în sediul limfonodal.

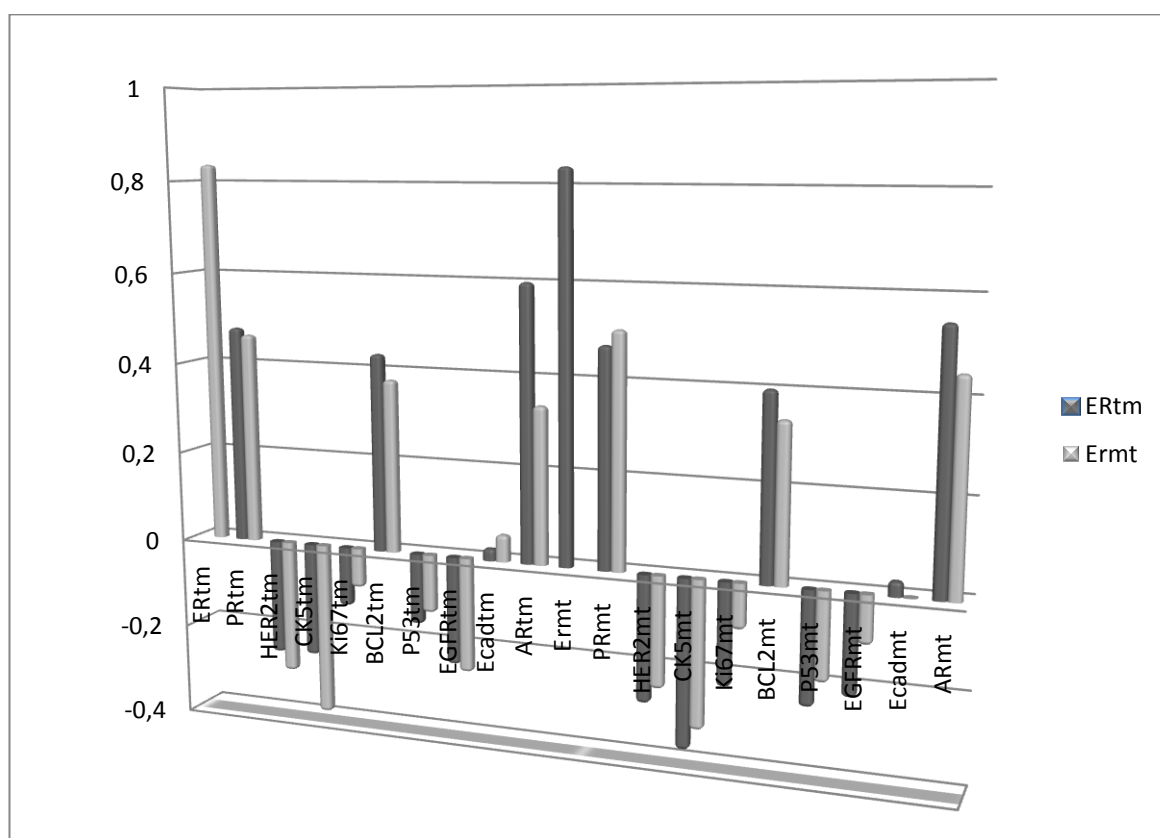


Fig.3.34. Corelarea expresiei ER din tumoarea primară și metastaza limfonodală cu valorile markerilor incluși în studiu.

Expresia receptorului pentru progesteron din tumoarea primară (PR_{tm}) în general a prezentat aceleași corelații ca și ER_{tm}. Drept excepție a servit asocierea inversă, semnificativă cu EGFR de la nivel metastatic și absența relațiilor statistice veridice cu citokeratina bazală CK5 și AR de nivel limfonodal.

Deosebirea relațiilor statistice a PR din metastază (PR_{mt}) și PR_{tm} a constat în prezența legăturilor direct proporționale a PR_{mt} cu E-cadherina și inversă cu p53 și EGFR din tumoarea primară, iar la nivel metastatic în plus s-a asociat pozitiv cu AR_{mt}, pierzând semnificația statistică cu EGFR_{mt} și HER2_{mt}.

Expresia HER2 din tumoarea primară a corelat pozitiv cu valorile CK5 și invers proporțional cu ER, PR, BCL2 de ambele localizări. Simetria a fost deranjată prin faptul, că HER2_{tm} a prezentat valori pozitive, statistic semnificative la corelare cu markerul nuclear de proliferare Ki67 doar la nivelul metastazei.

Relațiile statistice pentru HER2_{mt} au fost asemănătoare cu rezultatele pentru HER2_{tm}. Deosebirea însă a constat, că HER2_{mt} a corelat pozitiv la nivel metastatic și cu E-cadherina, iar forța de asociere cu PR_{mt} a fost înregistrată sub limita veridicității statistice.

Citokeratina bazală CK5 din tumoarea primară a corelat pozitiv, la cote semnificative statistic cu HER2 și Ki67 de ambele localizări. Corelații negative veridice au fost înregistrate în raport cu ER, PR, BCL2 atât la nivel de tumoare primară, cât și metastază. CK5_{tm} a corelat negativ semnificativ cu AR doar la nivel primar.

Citokeratina CK5 din metastază a fost diferită de CK5_{tm} prin absența relațiilor semnificative statistic cu PR, BCL2 și AR de ambele localizări. În plus, la nivel metastatic s-a înregistrat o corelație semnificativă directă cu EGFR_{mt}.

Markerul de proliferare Ki67 din tumoarea primară a corelat pozitiv cu citokeratina bazală CK5 și proteina pro-apoptotică p53 de ambele localizări. O corelație de talie joasă, pozitivă dar semnificativă statistic s-a determinat în relație cu E-cadherina din metastază. Corelații semnificative, cu valoare negativă s-au determinat la asocierea Ki67_{tm} cu BCL2_{tm} și AR_{mt}.

Markerul de proliferare Ki67 din metastază a prezentat însă o gamă mult mai variată de corelații semnificative statistic, în special cu receptorii din tumoarea primară. Deși indicele de corelație a atins cote joase, acestea s-au dovedit a fi statistic semnificative și negative ca valoare la asocierea Ki67_{mt} cu ER_{tm}, PR și AR de ambele localizări. Valori pozitive s-au înregistrat la corelarea Ki67_{mt} cu HER2, CK5, p53 de ambele localizări și E-cadherina în metastază.

Receptorul anti-apoptotic BCL2_{tm} s-a asociat pozitiv cu ER, PR de ambele localizări. Valori negative indicele de corelare a prezentat la compararea BCL2_{tm} cu Ki67_{tm}, iar cu HER2, CK5 atât la nivel primar, cât și metastatic.

Spre deosebire de BCL2 de localizare primară, BCL2mt nu a corelat semnificativ statistic cu CK5. În plus, la nivel metastatic aceasta a prezentat o corelație inversă cu p53.

Proteina pro-apoptotică p53 din tumoarea primară a corelat pozitiv cu Ki67 de ambele localizări și EGFR din metastază. Valori negative indicele de corelație a atins doar la asocierea p53tm cu PRmt.

Valoarea p53 din metastază a prezentat o afinitate mai mare la asociere cu expresia markerilor studiați, comparativ cu p53tm. Astfel p53mt a prezentat asocieri inverse semnificative cu ER, PR de ambele localizări și BCL2, AR din metastază.

Expresia EGFRtm a corelat pozitiv doar cu valoarea EGFR din metastază. În relație cu ERtm, PRmt și ARmt indicele de corelație a prezentat valori negative.

Corelațiile prezentate de EGFRmt au fost diferite de cele prezentate în cazul EGFRtm, prin apariția asocierilor cu p53 de ambele localizări, CK5mt și absența corelației semnificativ statistic cu ER.

Markerul de adeziune intercelulară E-cadherina din tumoarea primară a corelat puternic pozitiv cu expresia receptorului pentru androgeni, de ambele localizări și PR de nivel metastatic. E-cadherina de nivel metastatic însă a prezentat corelații de talie joasă, dar statistic semnificative doar cu HER2mt și Ki67 de ambele localizări.

Nivelul expresiei receptorului pentru AR din tumoarea primară a prezentat corelații pozitive cu ERtm, PRtm, PRmt, Ecadtm, ARmt și legături inverse în relație cu CK5tm și Ki67mt. Expresia markerului AR de la nivel metastatic a manifestat asocieri mai numeroase comparativ cu ARtm, reflectate prin legături direct proporționale cu ER de ambele localizări, PRmt, Ecadtm, ARtm și asocieri de valori negative cu Ki67 la ambele nivele, p53mt și EGFRtm.

În sumar:

1. Relațiile statistice dintre markerii celulari incluși în studiu, de localizare primară și metastatică nu sunt identice. Aceasta presupune că metastaza limfonodală are un fenotip imunohistochimic particular. Cauzele posibile țin fie de influența ambianței limfonodale, fie de evoluția metastatică rapidă a unei colonii de celule tumorale, „invizibile” imunohistochimic în tumoarea primară.
2. Pentru receptorul ER de ambele localizări sunt comune relațiile statistice cu PR, HER2, CK5, BCL2 de ambele nivele, p53 și AR metastatice.
3. Corelația expresiei progesteronului, PRtm și PRmt a coincis la asociere cu ER și BCL2 de ambele localizări, HER2tm, CK5tm, ARtm, Ki67mt și p53mt.

4. Receptorul pentru factorul uman de creștere epidermală 2, de localizare primară și metastatică au prezentat similaritate la corelare cu ER, CK5 și BCL2 de ambele nivele, precum și cu PR_{tm}, Ki67_{mt}.
5. Asocierile statistice ale citokeratinei bazale CK5, de localizare primară și metastatică au coincis în relație cu BCL2_{tm}, cu ER, HER2 și Ki67 de ambele nivele.
6. Indicele de proliferare Ki67 de ambele localizări a prezentat relații statistice similare cu CK5 și p53, atât de nivel primar cât și limfonodal, precum și cu E-cadherina, și receptorul pentru androgeni de ordin metastatic.
7. Markerul anti-apoptotic BCL2 din tumoarea primară a prezentat similaritate statistică cu omologul din metastază la asociere cu ER, PR și HER2 de ambele localizări, precum și cu CK5_{tm}.
8. Interrelațiile statistice ale markerului pro-apoptotic p53 de ambele localizări au coincis la corelare cu Ki67 de ambele nivele, PR și EGFR de nivel limfonodal.
9. Asocierile statistice ale EGFR și E-cadherinei sunt în funcție de localizare. Expresia acestor markeri la nivel primar nu a coincis cu valoarea expresiei receptorilor omologi de nivel metastatic.
10. Corelațiile statistice ale AR din tumoarea primară au coincis cu cele manifestate de markerul pentru AR de localizare limfonodală față de ER și E-cadherina primare, precum și cu PR, Ki67 de ordin metastatic.

Carcinomul lobular invaziv. Receptorul pentru estrogeni ER_{tm} a prezentat corelații pozitive semnificative cu markerul pentru progesteron PR și proteina nucleară Ki67 de ambele localizări, iar cu BCL2, EGFR și p53 doar de localizare primară (Anexa B). În plus ER_{tm} a corelat invers proporțional cu citokeratina bazală, atât din tumoarea primară, cât și metastază.

Markerul pentru ER din metastază însă a fost mai puțin elocvent la asocieri statistice semnificative, demonstrând relații direct proporționale doar cu PR de ambele localizări, Ki67_{tm}, BCL2_{tm} și EGFR_{tm}.

Receptorul pentru progesteron PR_{tm} a demonstrat asocieri pozitive de talie înaltă cu expresia ER, Ki67, EGFR de ambele localizări și BCL2 din tumoarea primară. Expresia PR din metastază a corelat asemănător cu PR_{tm}, deosebindu-se prin absența asocierilor veridice cu Ki67 și EGFR de orice localizare, suplimentată prin apariția legăturilor reciproce statistice semnificative cu p53_{tm}.

Supraexpresia HER2 din tumoarea primară a coincis statistic veridic doar cu diminuarea proteinei pro-apoptotice p53 și doar la nivelul metastatic. Opus, supraexpresia HER2 din metastază a prezentat o relație invers proporțională doar cu BCL2 și doar la nivel primar.

Citokeratina bazală CK5tm a corelat doar cu ERtm, prezentând asocieri inverse de rang satisfăcător. Expresia CK5 din metastază a prezentat un spectru mai larg de corelații comparativ cu CK5tm, însă toate asocierile au fost negative după direcție și au inclus markeri doar din tumoarea primară: ERtm, Ki67tm și p53tm.

Markerul de proliferare Ki67 a demonstrat corelații semnificative pozitive cu receptorul pentru estrogeni și EGFR de ambele localizări, PRtm, BCL2tm și invers proporțional cu CK5 metastatic. Valoarea markerului nuclear Ki67 din metastază însă a corelat pozitiv doar cu ER și PR de localizare primară, și EGFR de la ambii poli.

Expresia receptorului anti-apoptotic BCL2 din tumoarea primară a corelat pozitiv și statistic semnificativ cu ER și PR de ambele localizări, precum și cu Ki67tm și EGFRtm. Unica asociere de talie negativă a fost înregistrată doar în relație cu HER2mt. Expresia receptorului omonim de nivel metastatic BCL2mt a corelat pozitiv doar cu expresia BCL2 la nivel primar.

Markerul pro-apoptotic p53 a corelat statistic pozitiv cu ER localizare primară, cu PR, EGFR și E-cadherina metastatice. Unica asociere inversă p53tm a manifestat-o doar cu CK5 din metastază. Receptorul p53 din metastază însă nu a demonstrat legături statistice veridice cu receptorii hormonal, în schimb dezvoltând relații direct proporționale cu E-cadherina de ambele localizări și EGFR metastatic, precum și relații de scor negativ cu HER2mt.

Markerul EGFRtm a prezentat asocieri pozitive de divers grad cu ER și Ki67 de ambele localizări, suplinind relațiile statistice de nivel primar cu corelații pozitive comparat cu PR și BCL2. Expresia EGFR înregistrată la nivel de metastază a corelat pozitiv cu Ki67 și p53 de ambele localizări, precum și cu receptorul pentru progesteron și BCL2 de nivel primar.

Markerul de adeziune intercelulară E-cadherina din tumoarea primară a corelat pozitiv doar cu p53 metastatic. Markerul omonim Ecadmt a corelat cu p53 de ambele localizări.

În sumar:

1. Corelațiile expresiei ER de localizare primară și metastatică au coincis la asociere cu PR de ambele localizări, Ki67, BCL2 și EGFR din tumoarea primară.
2. Valoarea expresiei PR de ambele localizări a prezentat corelații asemănătoare în raport cu ER de ambele nivele și BCL2 de localizare primară.
3. Asocierile statistice ale markerilor HER2, BCL2 și CK5 din tumoarea primară, nu coincid cu interrelațiile statistice ale HER2, BCL2 și CK5 din metastază.

4. Ki67 de ambele nivele corelează simultan cu EGFR de ambele localizări, cu ER și PR doar de localizare primară.
5. Markerul pro-apoptotic p53, din tumoarea primară și metastază au manifestat rezultate statistice similare la comparare cu EGFR și E-cadherina de nivel limfonodal.
6. Expresia EGFR de ambele localizări au coincis statistic la asociere cu Ki67 de ambele nivele, precum și cu PR, BCL2 de localizare metastatică.
7. Unica coincidență statistică a expresiei E-cadherinei de ambele localizări s-a determinat la asociere cu valoarea p53 de ordin metastatic.

3.10. Concluzii la capitolul 3

1. În glanda mamară neafectată receptorii ER, PR, AR, BCL2 și E-cadherina sunt exprasați preponderent de celulele luminale, iar markerii pentru CK5 și EGFR pun în evidență mai frecvent epiteliocele bazale. Epiteliul glandei mamare neafectate este unul slab proliferant, cu rare celule Ki67 pozitive și nu expresează markerii HER2 și p53.
2. În studiu au fost incluse carcinoamele mamare invazive cel mai frecvent întâlnite, de tip ductal NOS și lobular. Acestea în majoritatea cazurilor au avut un grad G2 și G3 de diferențiere. Odată cu înaintarea în vârstă scade gradul de diferențiere al carcinoamelor mamare invazive.
3. Majoritatea tumorilor mamare sunt estrogen și progesteron pozitive. Valoarea PR corelează cu gradul expresiei ER. Receptorii ER și PR nu sunt stabili pe parcursul metastazării. Transferurile de scor au loc doar la cazuri cu gradul G2 și G3 de diferențiere.
4. Tipul histologic al carcinomului mamar nu definește expresia HER2. Carcinoamele mamare ductal invaziv de tip NOS și lobular invaziv sunt preponderent HER2 negative, atât la nivel de tumoare primară, cât și metastază. Odată cu înaintarea în vârstă a pacienților scade gradul de diferențiere al carcinoamelor invazive și riscul de a genera tumori ductal invazive HER2 pozitive.
5. Expresia HER2 din tumoarea primară a carcinomului ductal invaziv tip NOS, diferă semnificativ statistic de cea din metastaza limfonodală. În cazul carcinomului lobular invaziv, expresia HER2 nu este în funcție de localizare, primară sau metastatică.
6. Receptorul HER2 nu este stabil pe parcursul metastazării în ambele tipuri de cancer studiate, preponderent fiind înregistrată pierderea acestuia după metastazare.
7. Carcinoamele invazive de tip ductal (NOS) și lobular în majoritatea cazurilor nu expresează citokeratina bazală CK5. Acest marker este instabil pe parcursul metastazării carcinomului ductal invaziv tip NOS, evoluând atât în direcția achiziționării, cât și pierderii expresiei. În cazul carcinomului lobular invaziv se determină doar achiziționarea de către celulele tumorale a CK5 după metastazare.
8. Carcinomul ductal invaziv tip NOS poate fi în egală măsură EGFR pozitiv sau negativ. În cazul carcinomului lobular invaziv majoritatea o constituie tumorile EGFR negative, atât la nivel primar, cât și metastatic. EGFR este instabil pe parcursul metastazării, iar cazurile de transfer implică exclusiv pierderea acestui receptor în microambianța nodului limfatic. Cazurile instabile au un grad histologic slab de diferențiere. Tumorile cu grad înalt de diferențiere prezintă în exclusivitate patern EGFR negativ.

9. Tumorile cu orice grad histologic, G1, G2 sau G3 pot manifesta activitate Ki67 atât marcată, cât și redusă. Valoarea Ki67 nu este în funcție de vârsta pacientei. Acest marker nu este stabil în procesul de metastazare carcinomului de tip NOS, majoritatea transferurilor țin de diminuarea activității proliferative a celulelor metastatice în microambianța limfonodală. Cazurile Ki67 instabile includ doar tumori cu grad G2 și G3 de diferențiere. În cazul carcinomului lobular invaziv se atestă transfer de scor doar în direcția intensificării proliferației tumorale în sediul metastatic.
10. Tumorile primare examinate, de tip ductal invaziv și lobular infiltrativ sunt preponderent BCL2 pozitive, au grad scăzut de diferențiere și afectează mai frecvent femeii din categoria de vârstă de „după 49”. BCL2 nu este stabil pe parcursul metastazării carcinomului de tip NOS, predominând cazurile de pierdere a acestuia în ambianța limfonodală. Cazurile de transfer implică numai tumori cu grad scăzut și moderat de diferențiere, afectând în special femeii de „după 49” ani. În cazul carcinomului lobular invaziv s-au determinat exclusiv cazuri cu pierderea expresiei BCL2 după metastazare.
11. În carcinoamele mamare ductal invaziv de tip NOS și lobular infiltrativ se atestă o prevalență a cazurilor p53 pozitive. Expresia p53 nu este în funcție de tipul histologic al carcinomului mamar. Prezența p53 nu este în funcție de vârsta pacientelor și gradul de diferențiere al tumorii. Markerul pro-apoptotic nu este stabil pe parcursul metastazării, evoluând fie cu pierdere sau achiziționare de fenotip p53. Transferurile de scor p53 mai frecvent înregistrate țin de pierderea expresiei p53 în ambianța limfonodală, indiferent de tipul histologic al tumorii.
12. Expresia E-cadherinei este în funcție de tipul histologic al tumorii, ductal sau lobular invaziv. Carcinomul de tip NOS prezintă în majoritatea cazurilor markerul de aderență intercelulară, iar în cazul tumorilor lobulare se atestă o ușoară prevalență a cazurilor E-cadherin negative. E-cadherina nu este stabilă pe parcursul metastazării, evoluând în cazul carcinomului de tip NOS preponderent cu pierderea acestui marker în sediul limfonodal, iar în carcinomul lobular, prezentând în măsură egală transferuri de scor cu achiziție sau pierdere.
13. Carcinomul ductal invaziv de tip NOS în majoritatea cazurilor este androgen pozitiv. Expresia AR nu este influențată de gradul histologic al tumorii și vârsta pacientelor. Acest marker nu este stabil pe parcursul metastazării. Transferul de scor poate evolua atât cu achiziționare de fenotip AR pozitiv, cât și prin pierderea acestui receptor de către celula tumorală în ambianța limfonodală.

14. Relațiile statistice dintre markerii celulari incluși în studiu, de localizare primară și metastatică nu sunt identice. Aceasta indică că metastaza limfonodală are un fenotip imunohistochimic particular.

4. CARACTERISTICA SUBTIPURILOR MOLECULARE

4.1. Incidența și dinamica subtipurilor prin prisma recomandărilor St Gallen, 2013

Carcinomul ductal invaziv de tip NOS. Subtipurile moleculare au fost studiate pe un lot de 116 tumori, evaluate morfologic drept carcinom ductal invaziv de tip NOS. La clasificarea subtipurilor moleculare s-au luat în considerație recomandările lui Goldhirsch și coaut. (2013), delimitând următoarele entități nozologice: Luminal A, Luminal B, HER2 pozitiv, Basal-like și 5NP (cu fenotip 5 negativ) [97].

Combi-națiile defini-torii pentru fiecare subtip, diversificate în acest studiu au fost:

1. Subtipul Luminal A, definit precum ER⁺ și/sau PR⁺, HER2⁻, CK5⁻, Ki67<14%;
2. Luminal B a fost divizat în:
 - a. Luminal B/HER2 (ER⁺ și/sau PR⁺, HER2⁺, CK5⁻, Ki67<14%);
 - b. Luminal B/Ki67 (ER⁺ și/sau PR⁺, HER2⁻, CK5⁻, Ki67>14%);
 - c. Luminal B/HER2/Ki67 (ER⁺ and/or PR⁺, HER2⁺, CK5⁻, Ki67>14%). Acest subtip l-am definit în premieră cu scopul de a evidenția și studia cazurile Luminal B/HER2 cu diversă activitate proliferativă;
3. HER2 pozitiv (sau cu supraexpresia de HER2) la combinația ER⁻, PR⁻, HER2⁺, CK5⁻;
4. Basal-like a fost definit precum ER⁻, PR⁻, HER2⁻ și CK5⁺;
5. 5NP a fost selectat la asocierea ER⁻, PR⁻, HER2⁻ și CK5⁻.

Pentru a evidenția statistic transferurile posibile de subtip la compararea tumorii primare și metastazei limfonodale, subtipul 5NP a fost echivalat cu „1”, Basal-like cu „2”, HER2⁺ ca „3”, Luminal B/HER2- „4”, Luminal B/HER2/Ki67 – „5”, Luminal B/Ki67 – „6”, iar Luminal A cu „7”.

În urma studiului efectuat am determinat, că tumorile de tip NOS sunt preponderent de tip Luminal (tab.4.1).

Cota majoritară printre subtipurile Luminale a constituit-o Luminal B (59 cazuri/50,9%), urmat de Luminal A cu o incidență de 41 cazuri/35,3%. Grupul Luminal B a fost neomogen după structura sa, majoritatea cazurilor fiind catalogate drept Luminal B/Ki67 (45 cazuri/38,8%), succedate de Luminal B/HER2/Ki67 (10 cazuri/8,6%) și Luminal B/HER2 (4 cazuri/3,4%).

Ierarhia subtipurilor moleculare în tumoarea primară a fost urmată cu 10 cazuri/8,6% HER2 pozitive, 4 cazuri/3,4% cu subtip 5NP și 2 cazuri/1,7% de Basal-like.

Majoritatea subtipurilor moleculare au manifestat afinitate pentru tumori cu gradul mediu (G2) și scăzut (G3) de diferențiere (Tabelul 4.1). Gradul înalt, G1 s-a determinat în 4 cazuri/3,4% cu subtip Luminal A, plus a câte un caz demonstrat în Luminal B/Ki67 și Luminal B/HER2/Ki67.

Tabelul 4.1. Incidența subtipurilor moleculare în carcinomul mamar invaziv de tip NOS, la nivel de tumoare primară și metastaze limfonodale.

| Subtip Tm | Grad | n | % | Subtip Mt | n | % |
|---------------------|-------------|------------|--------------|---------------------|-----------|--------------|
| 5NP | G2 | 3 | 2,2 | 5NP | 3 | 3,2 |
| 5NP | G3 | 1 | 0,9 | 5NP | 3 | 3,2 |
| Basal-like | G3 | 2 | 1,7 | Basal-like | 2 | 2,2 |
| HER2 | G2 | 4 | 3,4 | Basal-like | 1 | 1,1 |
| HER2 | G3 | 6 | 5,2 | HER2 | 4 | 4,3 |
| Luminal A | G1 | 4 | 3,4 | HER2 | 4 | 4,3 |
| Luminal A | G2 | 27 | 23,3 | Luminal A | 3 | 3,2 |
| Luminal A | G3 | 10 | 8,6 | Luminal A | 20 | 21,5 |
| Luminal B/HER2 | G2 | 4 | 3,4 | Luminal A | 13 | 14,0 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | G1 | 1 | 0,9 | Luminal B/HER2 | 4 | 4,3 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | G2 | 6 | 5,2 | Luminal B/HER2/Ki67 | 1 | 1,1 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | G3 | 3 | 2,6 | Luminal B/HER2/Ki67 | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | G1 | 1 | 0,9 | Luminal B/HER2/Ki67 | 2 | 2,2 |
| Luminal B/Ki67 | G2 | 25 | 21,6 | Luminal B/Ki67 | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | G3 | 19 | 16,4 | Luminal B/Ki67 | 18 | 19,4 |
| Total | | 116 | 100,0 | Luminal B/Ki67 | 13 | 14,0 |
| | | | | Total | 93 | 100,0 |

Notă: **Subtip Tm** – subtipul molecular la nivel de tumoare primară; **Subtip Mt** - subtipul molecular la nivel de metastază limfonodală; **Grad** – gradul de diferențiere al tumorii.

Corelarea valorii subtipului molecular cu markerii incluși în studiu a pus în evidență valori pozitive, statistic semnificative în raport cu expresia ER, PR și BCL2 (tab.4.2). Legături inverse, de asemeni statistic semnificative s-au determinat la asocierea subtipului molecular cu valoarea expresiei HER2, Ki67, CK5, p53, EGFR și gradul de diferențiere al tumorii.

Tabelul 4.2. Corelație după Spearman a subtipurilor moleculare de localizare primară și metastatică cu markerii incluși în studiu.

| | Vârsta | Grad | ER tm | PR tm | AR tm | HER2 tm | Ki67 tm | CK5 tm | BCL2 tm | p53 tm | EGFR tm | E-cadherin tm | Subtip tm |
|------------------|--------|--------------|---------------|---------------|----------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|------------------|---------------|
| Subtip Tm | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | -0,04 | -0,16 | 0,67 | 0,46 | 0,19 | -0,56 | -0,39 | -0,26 | 0,43 | -0,17 | -0,29 | -0,04 | |
| n | 116 | 116 | 116 | 116 | 15 | 116 | 115 | 115 | 90 | 93 | 55 | 114 | |
| p | 0,318 | 0,040 | 0,0001 | 0,0001 | 0,247 | 0,0001 | 0,0001 | 0,002 | 0,0001 | 0,047 | 0,017 | 0,346 | |
| Subtip Mt | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,02 | -0,08 | 0,68 | 0,47 | 0,37 | -0,41 | -0,29 | -0,40 | 0,40 | -0,14 | -0,23 | 0,08 | 0,74 |
| n | 93 | 93 | 93 | 93 | 15 | 93 | 93 | 93 | 85 | 86 | 39 | 92 | 93 |
| p | 0,431 | 0,216 | 0,0001 | 0,0001 | 0,087 | 0,0001 | 0,002 | 0,0001 | 0,0001 | 0,100 | 0,076 | 0,230 | 0,0001 |

Tabelul 4.2. continuare

| | ER mt | PR mt | AR mt | HER2 mt | Ki67 mt | CK5 mt | BCL2 mt | p53 mt | EGFR mt | E-cadherin mt | Subtip mt |
|------------------|---------------|---------------|----------|---------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|------------------|---------------|
| Subtip Tm | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,56 | 0,44 | -0,07 | -0,49 | -0,39 | -0,15 | 0,37 | -0,21 | -0,50 | -0,08 | 0,74 |
| n | 94 | 95 | 15 | 95 | 94 | 93 | 87 | 87 | 38 | 93 | 93 |
| p | 0,0001 | 0,0001 | 0,396 | 0,0001 | 0,0001 | 0,078 | 0,0001 | 0,027 | 0,001 | 0,212 | 0,0001 |
| Subtip Mt | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,70 | 0,54 | 0,36 | -0,42 | -0,30 | -0,25 | 0,35 | -0,25 | -0,27 | 0,01 | |
| n | 93 | 93 | 15 | 93 | 93 | 93 | 85 | 86 | 37 | 91 | |
| p | 0,0001 | 0,0001 | 0,094 | 0,0001 | 0,002 | 0,008 | 0,001 | 0,011 | 0,051 | 0,464 | |

Notă: **tm** – tumoare primară, **mt** – metastaza limfonodală, **Grad** – gradul de diferențiere al tumorii; r_s – coeficientul de corelație Spearman.

Valorile statistice semnificative (p≤0,05) au fost selectate cu **Bold**.

Compararea profilului molecular din tumoarea primară cu cel din metastază a pus în evidență 24 cazuri/25,8% de tumori cu schimb de subtip la metastazare. Direcția de transfer a evaluat atât în direcția Bazală (10 cazuri/10,7%), cât și cu achiziționarea de markeri Luminali după metastazare (14 cazuri/15,1%). Instabilitatea profilului molecular va fi analizată în cadrul fiecărui subtip (Anexa 4).

Luminal A. Vârsta medie a pacientelor din acest subgrup a constituit $57,3 \pm 1,6$ ani, cu o mediană de 58 (tab.4.3). Studiul dat a definitivat subtipul Luminal A, drept tumoare cu predilecție G2 diferențiată, hormon-dependentă (ER, PR), HER2, CK5, p53, EGFR negativă, cu expresie marcată a BCL2 și E-cadherinei.

Tabelul 4.3. Caracteristica subtipului Luminal A în tumoarea primară: valorile medii pentru vârstă, gradul de diferențiere și markerii incluși în studiu.

| | Vârsta | Grad | ER | PR | HER2 | Ki67 | CK5 | BCL2 | p53 | EGFR | E-cadherina |
|-----------|--------|------|-----|-----|------|------|-----|------|-----|------|-------------|
| M | 57,3 | 2,2 | 2,7 | 2,1 | 0,02 | 5,7 | 0,1 | 2,6 | 0,7 | 0,7 | 2,8 |
| ES | 1,6 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,02 | 0,7 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,1 |
| Md | 58 | 2 | 3 | 2 | 0 | 5,1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 |

Notă: **M**, **ES** – media aritmetică \pm eroarea standard, **Md** – mediana, **Grad** – gradul de diferențiere al tumorii.

Eseurile statistice au pus în evidență corelații pozitive, de talie semnificativă la asocierea ER cu Ki67 ($r_s=0,26$, $p=0,048$), p53 cu Ki67 ($r_s=0,33$, $p=0,035$), precum și valori corelative inverse la asocierea HER2 cu BCL2 ($r_s=-0,39$, $p=0,021$), CK5 cu Ki67 ($r_s=-0,27$, $p=0,047$), BCL2 cu HER2 ($r_s=-0,39$, $p=0,021$), EGFR cu E-cadherina ($r_s=-0,56$, $p=0,002$).

Tumorile de acest subtip manifestă o activitate proliferativă redusă, indicele Ki67 fiind evaluat cu $5,7 \pm 0,6$ și o mediană de 5,1. Aceasta vine în contradicție cu datele morfologiei clasice prin faptul, că majoritatea tumorilor de tip Luminal A au manifestat majoritar grad histologic G2 (27 cazuri/65,9%) și G3 (10 cazuri/24,4%) de diferențiere. Tumorile bine diferențiate, G1 s-au determinat în doar 4 cazuri/9,8%.

În urma descifrării expresiei markerilor am stabilit și unele abateri de la definiția clasică a subtipului Luminal A:

- 2 cazuri/4,9% apreciate ER negative, statusul de subtip hormon-dependent fiind suplinit prin expresia marcată a PR;
- În 8 cazuri/19,5% expresia negativă a PR a fost susținută cu un scor Allred pozitiv pentru ER;
- Improprrie acestui subtip, citokeratina bazală CK5 a fost evaluată cu scor pozitiv în 2 cazuri/4,8%. Aceasta va servi drept punct de reper la dezbateră existenței unui nou subtip molecular, BasoLuminal în capitolul Sinteza rezultatelor.

În metastaza limfonodală de asemeni s-a determinat prevalența celulelor pozitive pentru ER, PR, BCL2 și E-cadherina (tab.4.4).

Tabelul 4.4. Caracteristica subtipului Luminal A în metastaza limfonodală: valorile medii a markerilor incluși în studiu.

| | ER | PR | HER2 | Ki67 | CK5 | BCL2 | p53 | EGFR | E-cadherina |
|-----------|-----------|-----------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|--------------------|
| M | 2,3 | 2,0 | 0,1 | 4,1 | 0,03 | 2,0 | 0,7 | 0,4 | 2,5 |
| ES | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 1,0 | 0,03 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Md | 3 | 3 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 |

Notă: **M**, **ES** - media aritmetică±eroarea standard, **Md** – mediana.

Asocierile statistice la acest nivel au pus în evidență legături pozitive, de talie semnificativă dintre ER și PR ($r_s=0,42$, $p=0,01$), ER și Ki67 ($r_s=0,44$, $p=0,007$). Corelații inverse s-au determinat la asocierea vârstei pacientei cu expresia BCL2 ($r_s=-0,32$, $p=0,05$) și CK5 cu EGFR ($r_s=-0,10$, $p=0,001$).

La compararea expresiei markerilor de cele două localizări, primar cu metastatic am determinat diferențe statistic veridice doar dintre valorile Ki67 ($t=0,88$, $p<0,05$), susținând astfel ideea că tumoarea primară este mai activ proliferantă decât metastaza. La analiză încrucișată a expresiei markerilor din tumoarea primară cu metastaza limfonodală am concluzionat că asocieri de talie statistic credibilă s-au determinat pentru majoritatea receptorilor incluși în studiu: ER ($r_s=0,52$, $p=0,002$), PR ($r_s=0,70$, $p=0,0001$), Ki67 ($r_s=0,31$, $p=0,05$), BCL2 ($r_s=0,50$, $p=0,004$), p53 ($r_s=0,87$, $p=0,0001$), EGFR ($r_s=0,65$, $p=0,006$), E-cadherina ($r_s=0,32$, $p=0,041$). Cote sub limita credibilității statistice au fost înregistrate la compararea expresiei HER2 ($r_s=-0,03$, $p=0,43$) și CK5 ($r_s=-0,03$, $p=0,43$).

La compararea subtipului molecular din tumoarea primară cu metastaza am determinat că subtipul Luminal A a fost instabil în 5 cazuri/12,2% (tab.4.5).

În particular, în 2 cazuri/4,8% subtipul Luminal A a fost înlocuit în metastază cu 5 NP datorită lipsei de expresie a ER, PR, HER2 și CK5. În alte 2 cazuri/4,8% acest subtip a fost

transferat la Luminal B/Ki67 grație activității proliferative sporite a tumorii la nivel metastatic și într-un singur caz/2,4% s-a identificat drept Luminal B/HER2 datorită expresiei receptorului epidermal de creștere HER2. Numărul cazurilor cu transfer de subtip ar putea fi considerat mai mare dacă am lua în considerație și expresia simultană a CK5 cu ER, PR. La momentul de față acest subtip, BasoLuminal este în faza investigațiilor de laborator, iar în cadrul studiului dat va servi drept una din sursele dezbaterilor la capitolul de sinteză a rezultatelor.

Tabelul 4.5. Stabilitatea subtipului Luminal A: analiza comparativă a tumorii primare cu metastaza limfonodală.

| Tumoarea primară | | Metastaza | | n | % |
|------------------|-----------|----------------|------------|----------|------------|
| Subtip | Markerii | Subtip | Markerii | | |
| Luminal A | ER | 5NP | - | 1 | 2,4 |
| Luminal A | ER | Luminal A | ER | 4 | 9,8 |
| Luminal A | ER | Luminal A | ER,PR | 2 | 4,9 |
| Luminal A | ER | Luminal B/Ki67 | ER,PR,Ki67 | 1 | 2,4 |
| Luminal A | ER,PR | Luminal A | ER | 2 | 4,9 |
| Luminal A | ER,PR | Luminal A | ER,PR | 23 | 56,1 |
| Luminal A | ER,PR | Luminal A | ER,PR,CK5 | 1 | 2,4 |
| Luminal A | ER,PR | Luminal A | PR | 1 | 2,4 |
| Luminal A | ER,PR | Luminal B/HER2 | ER,PR,HER2 | 1 | 2,4 |
| Luminal A | ER,PR | Luminal B/Ki67 | ER,PR,Ki67 | 1 | 2,4 |
| Luminal A | ER,PR,CK5 | 5NP | - | 1 | 2,4 |
| Luminal A | ER,PR,CK5 | Luminal A | ER,PR,CK5 | 1 | 2,4 |
| Luminal A | PR | Luminal A | PR | 2 | 4,9 |
| Total | | | | 41 | 100,0 |

Notă: Subtip – subtipul molecular; Markerii – markerii în baza cărora a fost definit subtipul molecular. Cu **Bold** au fost selectate cazurile cu transfer de subtip la metastazare.

Luminal B. Acest subtip molecular a fost stabilit la examinarea tumorilor a 59 pacienți cu vârsta $55,2 \pm 1,5$ ani (tab.4.6). Tumorile Luminal B au fost caracterizate drept hormon-dependente, grație expresiilor marcate înregistrate pentru ER, PR și AR. În plus, acest tip de carcinom tindea să exprime în abundență receptorii pentru BCL2, p53 și E-cadherina. Tumorile Luminal B au fost certificate drept activ proliferante, comparativ cu cele Luminal A. Indicele de

proliferare Ki67 a fost echivalat la o medie de $29,6 \pm 2,0$. Majoritatea tumorilor au prezentat grad histologic G2 de diferențiere (35 cazuri/59,3%), urmate în descreștere procentuală de cazuri agresive G3 (22 cazuri/37,3%) și carcinoame diferențiate G1 (2 cazuri/3,4%).

În structura celor 59 paciente examinate cu subtip Luminal B, cota majoritară i-a fost atribuită tumorilor Luminal B/Ki67 (45 cazuri), urmate în descreștere de Luminal B/HER2/Ki67 (10 cazuri) și Luminal B/HER2 în 4 cazuri.

Tabelul 4.6. Caracteristica subtipului Luminal B în tumoarea primară: valorile medii pentru vârstă, gradul de diferențiere și markerii incluși în studiu.

| | Vârsta | Grad | ER | PR | AR | HER2 | Ki67 | CK5 | BCL2 | p53 | EGFR | E-cadherina |
|-----------|--------|------|-----|-----|-----|------|------|-----|------|-----|------|-------------|
| M | 55,2 | 2,3 | 2,5 | 2,2 | 2,4 | 0,6 | 29,6 | 0,2 | 2,3 | 1,5 | 0,7 | 2,8 |
| ES | 1,5 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,1 | 2,0 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,1 |
| Md | 55 | 2 | 3 | 3 | 3 | 0 | 29 | 0 | 3 | 1,5 | 0 | 3 |

Notă: **M**, **ES** - media aritmetică \pm eroarea standard, **Md** – mediana.

Eseul statistic de corelare a scos în evidență asocieri pozitive dintre vârsta pacientelor cu expresia receptorului pentru ER ($r_s=0,30$, $p=0,01$) și BCL2 ($r_s=0,31$, $p=0,02$). Totodată am determinat că odată cu înaintarea în vârstă se micșorează riscul de a face un cancer mamar Luminal B/HER2 pozitiv ($r_s=-0,26$, $p=0,02$), CK5 pozitiv ($r_s=-0,29$, $p=0,01$) și EGFR pozitiv ($r_s=-0,35$, $p=0,05$). Gradul de diferențiere al tumorii a prezentat o singură corelație de talie credibilă, în raport cu expresia HER2, pledând în favoarea afirmației că odată cu micșorarea gradului de diferențiere al tumorii crește riscul de dezvoltare al subtipului Luminal B/HER2 ($r_s=-0,22$, $p=0,04$).

Corelarea valorilor ER cu expresia markerilor utilizați în studiu a pus în evidență asocieri pozitive cu PR ($r_s=0,25$, $p=0,03$), AR ($r_s=0,55$, $p=0,05$) și BCL2 ($r_s=0,34$, $p=0,01$). Totodată corelații veridice a ER, inverse după sens au fost determinate în asociere cu Ki67 ($r_s=-0,31$, $p=0,01$), CK5 ($r_s=-0,33$, $p=0,01$) și p53 ($r_s=-0,29$, $p=0,02$).

Receptorul pentru PR a prezentat două corelații veridice din punct de vedere statistic. Una pozitivă, cu ER, cea dea două inversă în relație cu expresia p53 ($r_s=-0,28$, $p=0,03$).

Valoarea expresiei AR a înregistrat cote semnificative în relație cu ER și E-cadherina ($r_s=0,86$, $p=0,001$).

Expresia receptorului epidermal HER2 a prezentat corelații semnificative doar față de valoarea markerului din aceeași familie, EGFR ($r_s=0,40$, $p=0,03$).

Asocierile prezentate de markerul nuclear Ki67 au permis să concluzionăm că tumorile ER pozitive tind să prolifereze mai lent ($r_s=-0,31$, $p=0,01$) comparativ cu cele CK5 pozitive ($r_s=0,28$, $p=0,01$).

Corelațiile stabilite de factorii apoptotici au fost în funcție de tipul markerului. Astfel receptorul anti-apoptotic BCL2 a prezentat asocieri pozitive cu ER ($r_s=0,34$, $p=0,01$) și negative cu CK5 ($r_s=-0,36$, $p=0,01$). Markerul pro-apoptotic p53 însă a manifestat legături inverse la expresia ER ($r_s=-0,29$, $p=0,02$) și PR ($r_s=-0,28$, $p=0,03$). Față de CK5, receptorul p53 a prezentat asocieri pozitive, însă sub limita credibilității statistice ($r_s=0,21$, $p=0,08$).

Receptorul de creștere EGFR a prezentat legături pozitive de asociere doar cu HER2, iar markerul de adeziune E-cadherina doar cu valoarea AR ($r_s=0,86$, $p=0,001$).

Metastazele limfonodale dezvoltate de tumorile Luminale B au prezentat aceleași caracteristici ca și tumoarea primară, adică ER, PR, AR, BCL2, p53 și E-cadherin pozitive (tab.4.7). Diferențe veridice statistice s-au determinat doar dintre valorile Ki67 ($t=2,44$, $p<0,05$). Aceasta sugerează ideea că tumoarea primară este mai activ proliferantă. Totuși, valorile $Ki67>14$ înregistrate în ambele arii de studiu indică păstrarea comportamentului agresiv al subtipului Luminal B și după metastazare.

Tabelul 4.7. Valoarea medie a markerilor imunohistochimici incluși în studiu în metastazele nodale dezvoltate de carcinomul Luminal B.

| | ER | PR | AR | HER2 | Ki67 | CK5 | BCL2 | p53 | EGFR | E-cadherina |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|--------------------|
| M | 2,2 | 1,8 | 2,2 | 0,4 | 23,3 | 0,2 | 1,6 | 1,2 | 0,3 | 2,8 |
| SE | 0,2 | 0,2 | 0,4 | 0,1 | 2,8 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,1 |
| Md | 3 | 2 | 3 | 0 | 19 | 0 | 2 | 1 | 0 | 3 |

Notă: **M**, **ES** - media aritmetică±eroarea standard, **Md** – mediana.

Analiza încrucișată a expresiei markerilor omonimi de ambele localizări a pus în evidență corelații pozitive, statistic veridice pentru majoritatea receptorilor studiați: ER ($r_s=0,83$, $p=0,001$), PR ($r_s=0,56$, $p=0,001$), HER2 ($r_s=0,62$, $p=0,001$), Ki67 ($r_s=0,40$, $p=0,001$), CK5 ($r_s=0,66$, $p=0,001$), BCL2 ($r_s=0,56$, $p=0,001$), p53 ($r_s=0,61$, $p=0,001$), EGFR ($r_s=0,58$, $p=0,01$). Imaginea în oglindă a tumorii în metastază nu s-a confirmat în cazul AR ($r_s=0,51$, $p=0,08$) și E-cadherinei ($r_s=-0,12$, $p=0,21$).

La compararea subtipului molecular de ambele localizări am determinat că tumorile Luminal B au suferit un transfer la alt subtip în 16 cazuri/27,1%, incidența majoritară (10 cazuri/16,9%) fiind înregistrată în cazul subtipului Luminal B/Ki67 (Anexa 5).

În 11 cazuri/18,6% metastazele au evoluat în tumori mai diferențiate, Luminal A grație diminuării activității proliferative (Ki67 măsurate), iar în 2 cazuri datorită pierderii expresiei HER2. Pierderea markerului HER2 a fost și drept unica cauză de transfer a 2 tumori/3,4% Luminal B/HER2/Ki67 în Luminal B/Ki67. Pierderea receptorilor pentru hormonii ER și PR a servit drept cauză de dezvoltare a 2 metastaze/3,4% Basal-like și una/1,7% HER2 pozitivă.

Trebuie să menționez că, divizarea subtipului Luminal B/HER2 după activitatea proliferativă a pus în evidență faptul că transferurile de subtip sunt mai frecvente în cazul tumorilor Luminal B/HER2/Ki67 (5 din 10) față de Luminal B/HER2 lent proliferante (1 din 4).

Subtipul HER2. Subtipul molecular HER2 a fost stabilit în cazul a 10 tumori, colectate de la femei cu vârsta cuprinsă între 56,5±3,8 (tab.4.8). După gradul de diferențiere histologică aceste tumori au fost caracterizate prioritar agresive (G3 – 6 cazuri/60%, G2 – 4 cazuri/40%). În favoarea acestui argument pledează și valoarea medie înaltă a Ki67 (28,4±9,8). Imunohistochimic astfel de tumori au fost definitivate drept ER, PR negative, HER2 pozitive. În baza rezultatelor obținute acest profil a fost completat ca tumori preponderent BCL2, p53, E-cadherin pozitive. Acest tip de carcinoame nu a prezentat afinitate pentru citokeratina bazală CK5 (70% CK5 negative). Totuși, expresia simultană a HER2 și CK5 a fost înregistrată în 30% cazuri, care în exclusivitate au prezentat tumori cu un indice de proliferare Ki67 foarte înalt (>50%), la paciente de vârstă înaintată.

Tabelul 4.8. Caracteristica subtipului HER2 în tumoarea primară: valorile medii pentru vârstă, gradul de diferențiere și markerii incluși în studiu.

| | Vârsta | Grad | ER | PR | HER2 | Ki67 | CK5 | BCL2 | p53 | EGFR | E-cadherina |
|-----------|--------|------|-----|-----|------|------|-----|------|-----|------|-------------|
| M | 56,5 | 2,6 | 0,0 | 0,0 | 2,8 | 28,4 | 0,7 | 1,5 | 1,2 | 0,6 | 2,8 |
| ES | 3,8 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 9,8 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,3 | 0,1 |
| Md | 54,0 | 3,0 | 0,0 | 0,0 | 3,0 | 25,1 | 0,0 | 2,0 | 2,0 | 0,0 | 3,0 |

Notă: **M**, **ES** - media aritmetică±eroarea standard, **Md** – mediana.

Procedeul statistic de corelare a demonstrat, că tumorile de acest subtip tind să piardă receptorul BCL2 odată cu înaintarea în vârstă ($r=-0,60$; $p=0,03$). Totodată, markerii ER, PR,

EGFR, E-cadherina, precum și gradul histologic nu au atins cote semnificativ statistic de corelare cu alți receptori incluși în studiu la nivel de tumoare primară.

Anterior am menționat, că subtipul HER2 pare a fi specific tumorilor cu un grad agresiv de diferențiere, proliferare. Procedul de corelare însă a evidențiat corelații inverse a markerului HER2 cu receptorul nuclear Ki67 ($r=-0,59$; $p=0,05$). Legături de același sens sau obținut și la asocierea HER2 cu CK5 ($r=-0,78$; $p=0,01$). Pe de altă parte, eseu statistic a demonstrat, că expresia HER2 sporește și riscul de achiziționare a p53 de către celulele tumorale ($r=0,58$; $p=0,05$).

Conform datelor literaturii expresia pozitivă a citokeratinei bazale CK5 este caracteristică grupului bazal, triplu negativ de carcinoame mamare [97]. Determinarea acesteia în 30% de tumori HER2 pozitive impune cerința de a delibera la întrebarea, dacă aceste tumori HER2-CK5 pozitive sunt reprezentate de o singură clonă celulară. Eseul de corelare nea permis să constatăm că în cadrul subtipului HER2, expresia CK5 corelează puternic pozitiv cu gradul de proliferare al tumorii ($r=0,90$; $p=0,001$), adică invers relațiilor statistice dintre HER2-Ki67 descrise anterior. Aceasta pledează în favoarea ipotezei că carcinomul mamar este eterogen celular chiar în cadrul aceluiași subtip molecular.

În cazul tumorilor HER2 pozitive am determinat, că expresia markerului anti-apoptotic BCL2 corelează paradoxal pozitiv cu prezența receptorului pro-apoptotic, p53 ($r_s=0,66$; $p=0,03$).

Metastazele limfonodale de carcinom HER2 pozitiv în general au reflectat același profil molecular, ca și tumoarea primară (tab.4.9). Însă la compararea mediilor numerice am determinat că metastazele acestui tip de tumori sunt mai agresiv proliferante, date confirmate printr-un t-test dependent ($t=-2,39$, $p=0,05$).

Tabelul 4.9. Valoarea medie a markerilor imunohistochimici incluși în studiu în metastazele nodale dezvoltate de carcinomul HER2 pozitiv.

| | ER | PR | HER2 | Ki67 | CK5 | BCL2 | p53 | EGFR | E-cadherina |
|-----------|-----------|-----------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|--------------------|
| M | 0,1 | 0,0 | 2,8 | 43,0 | 0,5 | 0,3 | 1,5 | 0,3 | 2,9 |
| SE | 0,1 | 0,0 | 0,2 | 10,5 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,1 |
| Md | 0,0 | 0,0 | 3,0 | 37,0 | 0,0 | 0,0 | 1,5 | 0,0 | 3,0 |

Notă: **M**, **ES** - media aritmetică±eroarea standard, **Md** – mediana.

Corelarea încrucișată a markerilor de localizare primară și metastatică a determinat asocieri pozitive, statistic semnificative dintre valorile expresiei Ki67 ($r=0,85$; $p=0,001$), CK5 ($r=0,80$; $p=0,01$), p53 ($r=0,80$; $p=0,01$), E-cadherina ($r=0,65$; $p=0,04$) (Anexa C).

Compararea profilului molecular din tumoarea primară vs metastaza a pus în evidență un singur caz (10%) de transfer, soldat cu achiziționarea celulelor metastazate a receptorului ER, ceea ce nea permis să diagnosticăm la acest nivel subtipul Luminal B/HER2 (tab.4.10). Această tumoare, cu grad G3 a fost recoltată de la o pacientă de 63 ani și a fost evaluată ca cel mai activ proliferant carcinom din lotul de studiu, până (Ki67=75) și după metastazare (Ki67=96). Este necesar de remarcat, că acesta este unul din cele 3 cazuri de expresie simultană cu HER2 a citokeratinei bazale CK5.

Tabelul 4.10. Stabilitatea subtipului molecular HER2 la metastazare.

| Tumoarea primară | | Metastaza | | n | % |
|------------------|---------------|----------------------------|-------------------------|----------|-------------|
| Subtip | Markerii | Subtip | Markerii | | |
| HER2 | HER2 | HER2 | HER2 | 2 | 20,0 |
| HER2 | HER2 | HER2 | HER2,Ki67 | 3 | 30,0 |
| HER2 | HER2,Ki67 | HER2 | HER2,Ki67 | 2 | 20,0 |
| HER2 | HER2,Ki67,CK5 | HER2 | HER2,Ki67 | 1 | 10,0 |
| HER2 | HER2,Ki67,CK5 | HER2 | HER2,Ki67,CK5 | 1 | 10,0 |
| HER2 | HER2,Ki67,CK5 | Luminal B/HER2/Ki67 | ER,HER2,CK5,Ki67 | 1 | 10,0 |
| Total | | | | 10 | 100,0 |

Notă: Subtip – subtipul molecular; Markerii – markerii în baza cărora a fost definit subtipul molecular. Cu **Bold** au fost selectate cazurile cu transfer de subtip la metastazare.

Subtipurile Triplu negative (5 NP (cu fenotip 5 negativ) și Basal-like). Grupul de tumori triplu negative a fost depistat la paciente cu vârsta cuprinsă între 50-76 ani și a inclus 4 cazuri/3,4% de tumori cu fenotip 5NP și 2 paciente/1,7% de carcinoame Basal-like. Din motivul numărului mic de cazuri nu am evaluat statistic aceste subtipuri. Simpla comparare a subtipurilor de până/după metastazare a pus în evidență un singur caz de transfer de la Basal-like la 5NP, diagnosticat în cazul unei paciente de 71 ani, cu un carcinom G3, agresiv proliferant (Ki67=61). De menționat, că după metastazare indicele Ki67 a înregistrat cote caracteristice unei tumori slab proliferante (Ki67=9).

La o examinare complexă a subtipurilor moleculare vs markerii incluși în studiu nu am depistat o combinație, legitate proprie unui subtip. Fiecare tumoare s-a prezentat imunohistochimic ca un caz personalizat (Anexa D).

În sumar:

1. În structura moleculară a carcinomului mamar de tip NOS prevalează combinațiile proprii grupului Luminal, hormon-dependent.
2. Odată cu creșterea gradului de diferențiere a subtipului molecular, tumorile pierd un șir de markeri precum HER2, Ki67, CK5, p53, EGFR și tind să expreseze ER, PR, BCL2.
3. Tumorile Luminal A sunt hormon-dependente (ER, PR), HER2, CK5, p53, EGFR negative, cu o expresie marcată a BCL2 și E-cadherinei. Deși în subtipul Luminal A se atestă asocierea pozitivă, paradoxală a ER și p53 cu Ki67, aceste tumori sunt cu predilecție slab proliferative.
4. După metastazare carcinomul Luminal A tinde să mențină expresia ER, PR, Ki67, BCL2, p53, EGFR și E-cadherina.
5. Subtipul Luminal A este instabil pe parcursul metastazării.
6. Tumorile Luminal B exprimă ER, PR, AR, BCL2, p53 și E-cadherina și sunt activ proliferante, comparativ cu cele Luminal A.
7. Luminal B spre deosebire de Luminal A exprimă p53.
8. Tumorile Luminal B tind să mențină după metastazare expresia ER, PR, HER2, Ki67, CK5, BCL2, p53 și EGFR.
9. În structura tumorilor Luminal B predomină subtipul Luminal B/Ki67. Proliferarea activă a tumorilor Luminal B susține și prevalența numerică a subtipului Luminal B/HER2/Ki67 față de Luminal B/HER2.
10. Subtipul Luminal B este instabil la metastazare, în majoritatea cazurilor evoluând într-un subtip mai diferențiat, Luminal A. Tumorile activ proliferante sunt cele mai instabile la metastazare.
11. Expresia CK5 de rând cu ER, PR, HER2 servește drept o dovadă a posibilității de diversificare a subtipurilor moleculare existente (dar trebuie imunohistochimie dublă – nu știm dacă este aceeași celulă sau diferite).
12. Tumorile HER2 pozitive tind să piardă receptorul BCL2 odată cu înaintarea în vârstă.
13. Expresia HER2 corelează cu diminuarea gradului de proliferare Ki67 și expresia CK5, totodată sporind șansele de achiziție de către celulele tumorale a markerului p53. Însă corelarea pozitivă a CK5 cu Ki67 în cadrul acestui subtip pledează pentru ipoteza eterogenității celulare în cadrul aceluiași subtip de tumori. În cazul tumorilor HER2

pozitive expresia markerului anti-apoptotic BCL2 corelează paradoxal pozitiv cu prezența receptorului pro-apoptotic, p53. Metastazele carcinomului HER2 păstrează același profil molecular, cu excepția că devin mai agresive.

14. Subtipul HER2 nu este stabil pe parcursul metastazării, transferurile de subtip evaluând doar cu achiziționarea de receptori luminali.

Carcinomul mamar de tip lobular invaziv. Subtipurile moleculare au fost studiate pe un lot de 18 tumori, evaluate morfologic drept carcinom lobular invaziv. Ca și în cazul carcinomului ductal la clasificarea subtipurilor moleculare s-au luat în considerație recomandările lui Goldhirsch și coaut. (2013), delimitând următoarele entități nozologice: Luminal A, Luminal B, HER2 pozitiv, Basal-like și 5NP (cu fenotip 5 negativ).

Ca și în cazul tumorilor ductale, cel mai frecvent întâlnite au fost carcinoamele Luminale, 14 cazuri/77,8% (tab.4.11).

Tabelul 4.11. Incidența subtipurilor moleculare în carcinomul mamar invaziv lobular, la nivel de tumoare primară și metastaze limfonodale.

| Subtip Tm | Grad | n | % | Subtip Mt | n | % |
|---------------------|------|----|-------|----------------|----|------|
| 5NP | G2 | 1 | 5,6 | 5NP | 2 | 11,1 |
| Basal-like | G3 | 1 | 5,6 | Basal-like | 2 | 11,1 |
| HER2 | G2 | 1 | 5,6 | HER2 | 1 | 5,6 |
| HER2 | G3 | 1 | 5,6 | Luminal A | 3 | 16,7 |
| Luminal A | G1 | 2 | 11,1 | Luminal B/Ki67 | 10 | 55,6 |
| Luminal A | G2 | 3 | 16,7 | Total | 18 | 100 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | G2 | 1 | 5,6 | | | |
| Luminal B/Ki67 | G3 | 8 | 44,4 | | | |
| Total | | 18 | 100,0 | | | |

Stratificarea cazurilor Luminale a pus în evidență că carcinoamele lobulare cel mai frecvent dezvoltă tumori Luminale de tip B (9 cazuri/50%), dintre care subtipul Luminal B/Ki67 a constituit marea majoritate (8 cazuri/44,4%). Subtipul Luminal A a fost determinat în 5 cazuri/27,8%. De menționat, că două cazuri au reprezentat tumori cu un grad înalt, G1 de diferențiere. Tumorile HER2, 5NP și Basal-like au fost determinate în cazuri unitare.

Subtipurile moleculare de carcinom lobular au manifestat predominant grad scăzut G3 (10 cazuri/55,6%) și moderat G2 de diferențiere histologică (6 cazuri/33,3%).

Eseul statistic a pus în evidență corelații pozitive, credibile dintre subtipul molecular al tumorii și valorile expresiei ER ($r_s=0,51$, $p=0,015$), PR ($r_s=0,43$, $p=0,037$) (tab.4.12).

Tabelul 4.12. Corelație după Spearman a subtipurilor moleculare de localizare primară și metastatică cu markerii incluși în studiu.

| | Vârsta | Grad | ER tm | PR tm | HER2 tm | Ki67 tm | CK5 tm | BCL2 tm | p53 tm | EGFR tm | Ecaderina tm | Subtip tm |
|------------------|--------|--------------|---------------|--------------|--------------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------------|--------------|
| Subtip Tm | | | | | | | | | | | | |
| r _s | -0,38 | -0,39 | 0,51 | 0,43 | -0,47 | -0,06 | -0,04 | 0,16 | 0,19 | -0,11 | 0,12 | |
| n | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | |
| p | 0,06 | 0,053 | 0,015 | 0,037 | 0,024 | 0,40 | 0,44 | 0,26 | 0,23 | 0,34 | 0,31 | |
| Subtip Mt | | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,01 | -0,08 | 0,78 | 0,51 | -0,26 | 0,14 | -0,19 | 0,38 | 0,19 | 0,13 | -0,15 | 0,66 |
| n | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 |
| p | 0,48 | 0,38 | 0,0001 | 0,015 | 0,15 | 0,29 | 0,23 | 0,06 | 0,23 | 0,30 | 0,28 | 0,002 |

Tabelul 4.12. continuare

| | ER mt | PR mt | HER2 mt | Ki67 mt | CK5 mt | BCL2 mt | p53 mt | EGFR mt | Ecaderina mt | Subtip mt |
|------------------|--------------|--------------|------------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------------|--------------|
| Subtip Tm | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,41 | 0,55 | -0,17 | 0,02 | -0,25 | 0,02 | 0,14 | 0,00 | -0,14 | 0,66 |
| n | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 |
| p | 0,044 | 0,009 | 0,25 | 0,47 | 0,16 | 0,46 | 0,29 | 0,5 | 0,29 | 0,002 |
| Subtip Mt | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,65 | 0,69 | -0,04 | 0,04 | -0,33 | 0,05 | 0,09 | 0,09 | -0,15 | |
| n | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | |
| p | 0,002 | 0,001 | 0,44 | 0,44 | 0,09 | 0,41 | 0,36 | 0,35 | 0,28 | |

Notă: **tm** – tumoare primară, **mt** – metastaza limfonodală, **Grad** – gradul de diferențiere al tumorii; r_s – coeficientul de corelație Spearman.

Valorile statistice semnificative (p≤0,05) au fost selectate cu **Bold**.

Altfel spus, odată cu diferențierea Luminală a carcinomului, celulele tumorale preferă să expreseze ER și PR, totodată tind să piardă HER2 ($r_s=-0,47$, $p=0,024$) și dezvoltă un grad histologic slab de diferențiere ($r_s=-0,39$, $p=0,053$).

Compararea subtipului molecular din tumoarea primară vs metastază a pus în evidență 4 cazuri/22,2% de transfer, majoritatea (3 cazuri) evoluând în direcție bazală (tab.4.13). Instabilitatea profilului molecular va fi analizată în cadrul fiecărui subtip.

Luminal A. Vârsta medie a pacientelor care au dezvoltat tumori Luminale A a constituit $55,8\pm 3,2$ ani (tab.4.14). Aceste tumori au evoluat în exclusivitate cu grad G1 și G2 de diferențiere histologică. În cazul dat datele morfologice sunt complementate perfect de rezultatele imunohistochimice, indicele de proliferare Ki67 înregistrat cu mult sub pragul pozitivității ($5,6\pm 1,7$). Tumorile Luminal A pot fi caracterizate drept ER, PR, BCL2, p53, E-cadherin pozitive și HER2, CK5, EGFR negative.

Tabelul 4.13. Stabilitatea subtipurilor moleculare a carcinomului lobular invaziv pe parcursul metastazării.

| Subtip Tm | Subtip Mt | n | % |
|----------------------------|-----------------------|----------|------------|
| 5NP | 5NP | 1 | 5,6 |
| Basal-like | Basal-like | 1 | 5,6 |
| HER2 | Basal-like | 1 | 5,6 |
| HER2 | HER2 | 1 | 5,6 |
| Luminal A | 5NP | 1 | 5,6 |
| Luminal A | Luminal A | 3 | 16,7 |
| Luminal A | Luminal B/Ki67 | 1 | 5,6 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | Luminal B/Ki67 | 1 | 5,6 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | 8 | 44,4 |
| Total | | 18 | 100,0 |

Notă: cazurile cu transfer de scor în urma metastazării au fost selectate cu **BOLD**.

Eseul statistic de corelare nu s-a efectuat datorită numărului redus de cazuri.

Improprie definiției clasice tumoare Luminal A a fost depistat un singur caz de expresie simultană de rând cu ER, PR și a citokeratinei bazale CK5, ceea ce impune diversificarea acestui subtip la capitolul de sinteză.

Metastazele limfonodale dezvoltate de carcinoamele Luminal A au prezentat același profil molecular ca tumoarea primară (tab.4.15).

Tabelul 4.14. Caracteristica subtipului Luminal A în tumoarea primară: valorile medii pentru vârstă, gradul de diferențiere și markerii incluși în studiu.

| | Vârsta | Grad | ER | PR | HER2 | Ki67 | CK5 | BCL2 | p53 | EGFR | E-cadherina |
|-----------|--------|------|-----|-----|------|------|-----|------|-----|------|-------------|
| M | 55,8 | 1,6 | 2,6 | 2,4 | 0 | 5,6 | 0,4 | 1,8 | 1,6 | 0 | 2,2 |
| ES | 3,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,0 | 1,7 | 0,4 | 0,7 | 0,2 | 0,0 | 0,6 |
| Md | 57 | 2 | 3 | 2 | 0 | 3,65 | 0 | 3 | 2 | 0 | 3 |

Notă: **M**, **ES** – media aritmetică±eroarea standard, **Md** – mediana, **Grad** – gradul de diferențiere al tumorii.

Tabelul 4.15. Caracteristica subtipului Luminal A în metastaza limfonodală: valorile medii a markerilor incluși în studiu.

| | ER | PR | HER2 | Ki67 | CK5 | BCL2 | p53 | EGFR | E-cadherina |
|-----------|-----|-----|------|-------|-----|------|-----|------|-------------|
| M | 2 | 2,2 | 0,2 | 7,786 | 0,2 | 1,2 | 1,4 | 0 | 1,2 |
| ES | 0,5 | 0,6 | 0,2 | 4,8 | 0,2 | 0,7 | 0,6 | 0 | 0,5 |
| Md | 2 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 |

Notă: **M**, **ES** - media aritmetică±eroarea standard, **Md** – mediana.

Compararea subtipului molecular al tumorii de ambele localizări a pus în evidență 2 cazuri/40% cu transfer de tip în urma metastazării. Ambele cazuri au evoluat în direcție bazală, prezentând particularități imunohistochemice proprii subtipului 5NP și Luminal B/Ki67.

Tabelul 4.16. Stabilitatea subtipului Luminal A: analiza comparativă a tumorii primare cu metastaza limfonodală.

| Tumoarea primară | | Metastaza | | n | % |
|------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|----------|-------------|
| Subtip | Markerii | Subtip | Markerii | | |
| Luminal A | ER,PR | 5NP | 5NP | 1 | 20,0 |
| Luminal A | ER,PR | Luminal A | ER,PR | 3 | 60,0 |
| Luminal A | ER,PR,CK5 | Luminal B/Ki67 | ER,PR,CK5,Ki67 | 1 | 20,0 |
| Total | | | | 5 | 100,0 |

Notă: Subtip – subtipul molecular; Markerii – markerii în baza cărora a fost definit subtipul molecular. Cu **Bold** au fost selectate cazurile cu transfer de subtip la metastazare.

Luminal B. Acest subtip molecular a fost descifrat la 9 pacienți cu carcinom mamar lobular invaziv cu vârsta cuprinsă în limitele 68,8±1,9 ani (tab.4.17). Imunohistochimic aceste tumori au fost caracterizate hormon-dependente (ER, PR), BCL2, p53, EGFR pozitive, iar expresia HER2, CK5 și E-cadherinei nu s-a depistat sau a fost una cazuistică. Caracteristic acestui subtip ia fost agresivitatea înaltă: 8 din 9 cazuri au fost cuantificate cu grad histologic G3, 1 caz – G2. Aceste date au fost complementate imunohistochimic prin indicii de proliferare Ki67 înalt, statistic înregistrat la cote de 41,8±5,4 sau mediana 36.

Tabelul 4.17. Caracteristica subtipului Luminal B în tumoarea primară: valorile medii pentru vârstă, gradul de diferențiere și markerii incluși în studiu.

| | Vârsta | Grad | ER | PR | HER2 | Ki67 | CK5 | BCL2 | p53 | EGFR | E-cadherina |
|-----------|--------|------|-----|-----|------|------|-----|------|-----|------|-------------|
| M | 68,8 | 2,9 | 2,9 | 2,6 | 0,3 | 41,8 | 0,0 | 2,3 | 1,8 | 1,2 | 0,7 |
| ES | 1,9 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 5,4 | 0,0 | 0,4 | 0,5 | 0,4 | 0,4 |
| Md | 68 | 3 | 3 | 3 | 0 | 36 | 0 | 3 | 2 | 1 | 0 |

Notă: **M**, **ES** - media aritmetică±eroarea standard, **Md** – mediana.

Din 9 cazuri examinate, majoritatea (8 cazuri) au fost diferențiate de subtipul Luminal A grație indicelui nuclear de proliferare înalt (mai mare de 14%), astfel definind subtipul Luminal B/Ki67. Un singur caz agresiv, G3 și Ki67 înalt, de rând cu receptorii hormonali a prezentat și markerul HER2, ceea ce ne-a permis definirea subtipului Luminal B/HER2/Ki67.

Eseul de corelare a pus în evidență legătura inversă dintre gradul histologic de diferențiere și expresia HER2 ($r_s = -0,75$, $p = 0,01$). Astfel, tumorile Luminale B, odată cu creșterea agresivității tind să piardă receptorul epidermal 2.

O altă corelație statistică, dar pozitivă după sens s-a determinat dintre ER și PR ($r_s = 0,75$, $p = 0,01$). Totodată expresia receptorului pentru progesteron a corelat semnificativ, pozitiv și cu BCL2 ($r_s = 0,71$, $p = 0,02$). Acesta din urmă, a prezentat asocieri statistice pozitive în relație cu expresia EGFR ($r_s = 0,70$, $p = 0,02$). Markerul adeziunii intercelulare, E-cadherina a înregistrat cote statistice semnificative, de sens pozitiv doar cu EGFR ($r_s = 0,76$, $p = 0,01$).

Metastazele limfonodale dezvoltate de carcinoamele Luminal B au păstrat aceleași caracteristici imunohistochimice ca și tumoarea primară. Unica diferență, argumentată statistic s-a înregistrat la compararea activității de proliferare Ki67 ($t = 2,02$, $p = 0,053$). Oricum expresia

Ki67 la nivel metastatic de $28 \pm 4,1$ sugerează păstrarea caracterului agresiv al carcinomului Luminal B și după metastazare.

Tabelul 4.18. Valoarea medie a markerilor imunohistochimici incluși în studiu în metastazele nodale dezvoltate de carcinomul Luminal B.

| | ER | PR | HER2 | Ki67 | CK5 | BCL2 | p53 | EGFR | E-cadherina |
|-----------|-----------|-----------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|--------------------|
| M | 2,4 | 1,8 | 0,3 | 28,0 | 0,1 | 1,3 | 1,4 | 0,4 | 0,9 |
| SE | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 4,1 | 0,1 | 0,4 | 0,5 | 0,2 | 0,5 |
| Md | 3 | 2 | 0 | 22 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 |

Notă: **M**, **ES** - media aritmetică \pm eroarea standard, **Md** – mediana.

Corelarea expresiei markerilor omonimi de ambele localizări a pus în evidență asocieri pozitive, statistic semnificative pentru p53 ($r_s=0,90$, $p=0,001$), EGFR ($r_s=0,70$, $p=0,02$) și E-cadherină ($r_s=0,85$, $p=0,001$).

La compararea subtipului tumorii de ambele localizări am determinat un singur caz (11,1%) de transfer, de la Luminal B/HER2/Ki67 la Luminal B/Ki67, grație pierderii HER2 la nivel metastatic (tab.4.19). De asemeni trebuie menționat un caz Luminal B/Ki67 care la nivel metastatic, de rând cu ER, PR, Ki67 a achiziționat și citokeratina bazală. Din motivul că în practica oncologică subtipul BasoLuminal nu este introdus oficial nu am evidențiat acest caz drept tumoare cu transfer de subtip.

Tabelul 4.19. Stabilitatea subtipului Luminal B la metastazare.

| Tumoarea primară | | Metastaza | | n | % |
|----------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------|----------|-------------|
| Subtip | Markerii | Subtip | Markerii | | |
| Luminal B/HER2/Ki67 | ER,PR,HER2, Ki67 | Luminal B/Ki67 | ER,PR,Ki67 | 1 | 11,1 |
| Luminal B/Ki67 | ER,Ki67 | Luminal B/Ki67 | ER,Ki67 | 1 | 11,1 |
| Luminal B/Ki67 | ER,PR,Ki67 | Luminal B/Ki67 | ER,Ki67 | 1 | 11,1 |
| Luminal B/Ki67 | ER,PR,Ki67 | Luminal B/Ki67 | ER,PR,CK5,Ki67 | 1 | 11,1 |
| Luminal B/Ki67 | ER,PR,Ki67 | Luminal B/Ki67 | ER,PR,Ki67 | 5 | 55,6 |
| Total | | | | 9 | 100,0 |

Notă: Subtip – subtipul molecular; Markerii – markerii în baza cărora a fost definit subtipul molecular. Cu **Bold** au fost selectate cazurile cu transfer de subtip la metastazare.

Subtipul HER2 și Triplu negative. Aceste 2 subtipuri nu au fost descrise statistic din motivul numărului mic de cazuri: unitar pentru 5NP, Basal-like și 2 cazuri HER2. Din toate cazurile menționate, o tumoare HER2 pozitivă după metastazare a fost cuantificată grație pierderii markerului epidermal 2 și achiziționării de CK5 drept subtip Basal-like. Tumoarea dată a fost depistată la o pacientă de 66 ani. În pofida gradului histologic slab de diferențiere G3, indicele de proliferare Ki67 a fost cuantificat sub limitele pozitivității în ambele localizări.

Ca și în cazul subtipurilor moleculare dezvoltate de carcinoamele ductale, la o examinare complexă a subtipurilor moleculare în cazul tumorilor lobulare vs markerii incluși în studiu nu am depistat o combinație proprie unui subtip. Fiecare tumoare s-a prezentat imunohistochimic ca un caz personalizat (Anexa E).

În sumar:

1. Subtipurile moleculare dezvoltate de carcinomul lobular sunt instabile pe parcursul metastazării, preponderent evoluând cu pierderea receptorilor luminali.
2. Tumorile Luminal A dezvoltate de carcinomul lobular spre deosebire de cel ductal sunt p53 pozitive.
3. Carcinomul lobular tot dezvoltă subtip BasoLuminal.
4. Subtipul HER2 nu este stabil. În cazul tumorilor lobulare degradează în Basal-like.
5. Subtipul Luminal B dezvoltat de carcinomul lobular invaziv spre deosebire de cel ductal nu expresează E-cadherina.

4.2. Stabilitatea profilului molecular al carcinomului mamar după implantare pe membrana corioalantoidă a oului embrionat

În prima zi după implantare fragmentele de țesut histopatologic aplicate pe membrana corioalantoidă aveau un contur clar delimitat, culoare alb-gălbuie, cu suprafață netedă. În ziua 3-4-a după implantare suprafața implantului devenea bombată, rugoasă, cu culoare neschimbată. La acest termen de asemeni se determinau vase nou formate, convergente spre implant (Fig.4.1).

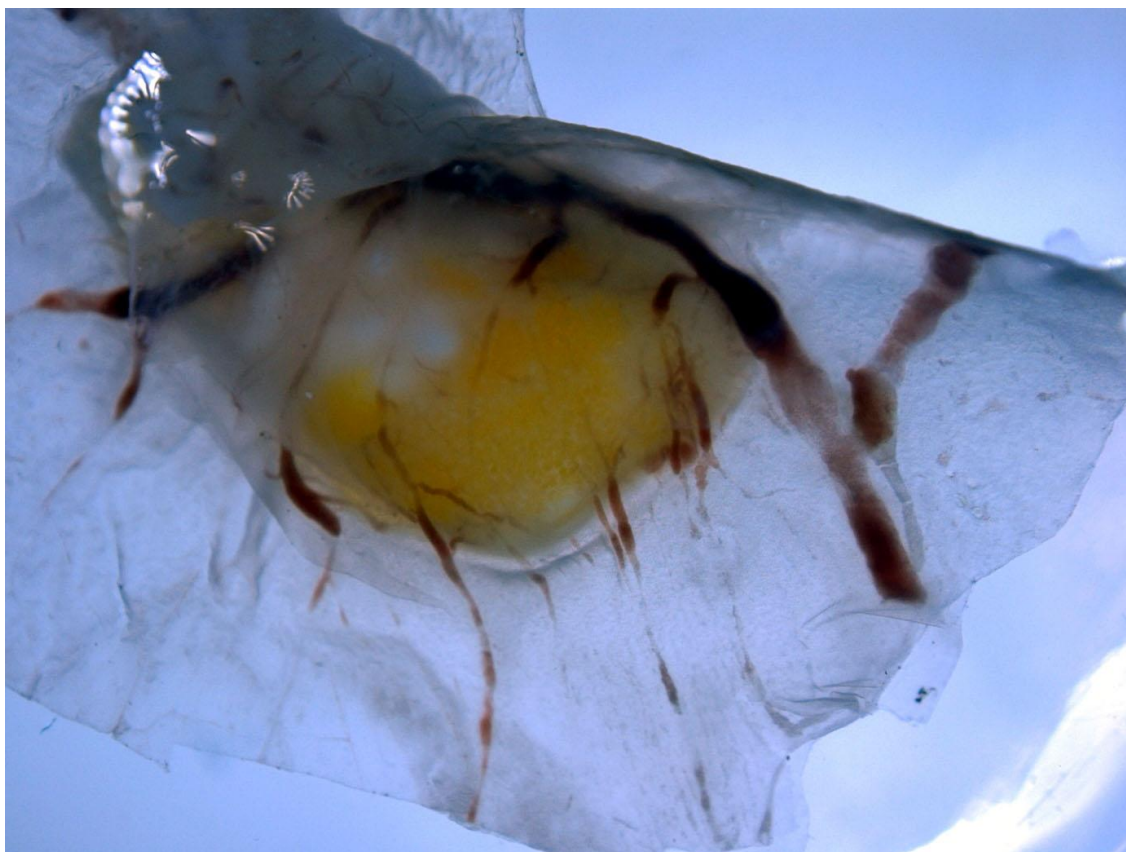


Fig.4.1. Implant de carcinom mamar pe membrane corioalantoidă, ziua a 4-a (x2). Țesutul aplicat de culoare galbenă, bombat, cu multiple vase nou formate, convergente din membrană în implant.

Proveniența acestor vase din membrana corioalantoidă a fost dovedită histologic prin prezența eritrocitelor nucleate, caracteristice păsărilor (Fig.4.2).

La ziua a 3-4-a în grosimea membranei corioalantoide deja se observa invazia celulelor tumorale. Aranjamentul acestor celule a fost eterogen, după caz prezentând fie celule solitare, cordoane sau grupuri. Originea epitelială a acestor celule a fost confirmată prin colorare cu pan-citokeratina AE1/AE3 (Fig.4.3).

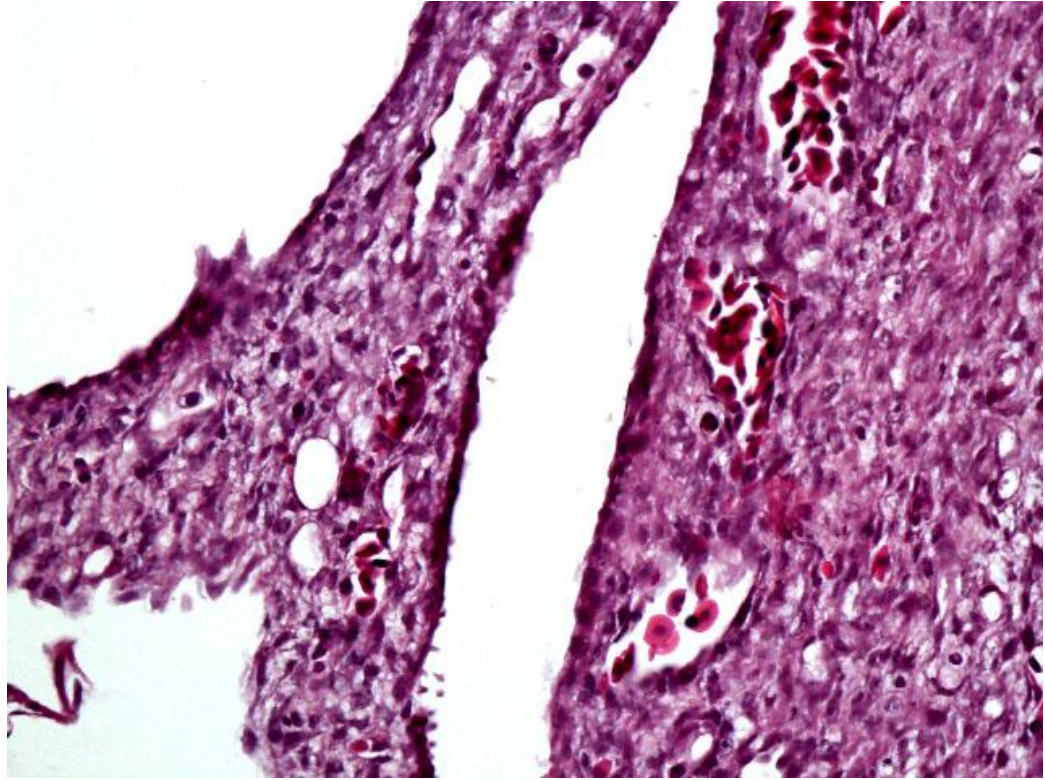


Fig.4.2. Vase neoformate în implant de tumoare mamară pe membrane corioalantoidă. Apartenența acestor vase gazdei este certificată de prezența eritrocitelor nucleate. HE, x400.

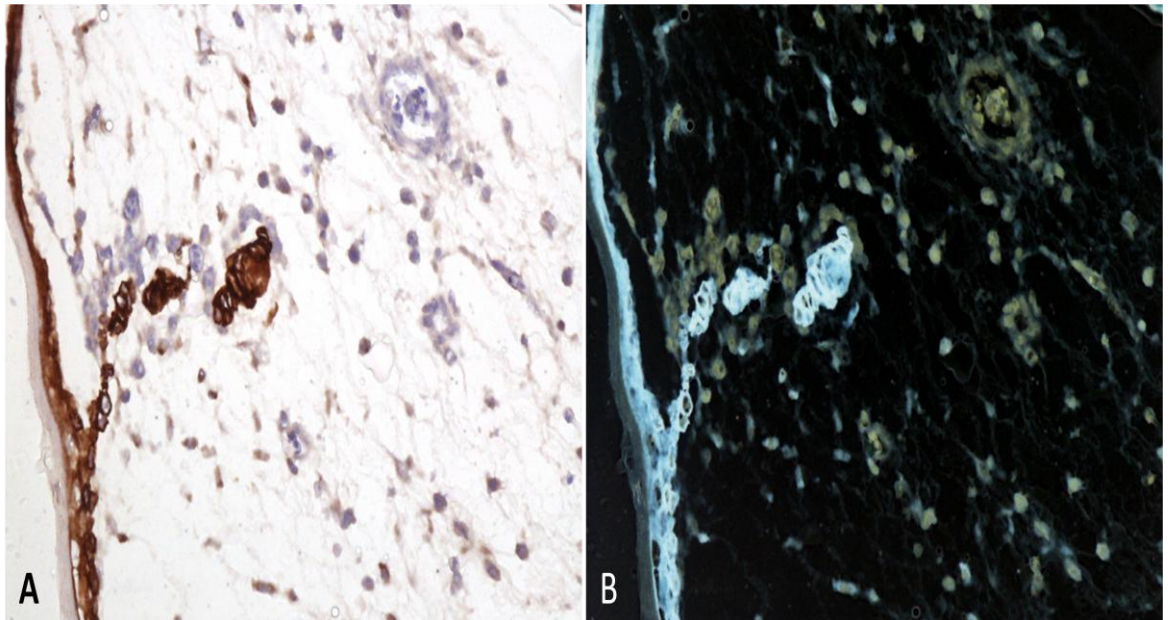


Fig.4.3. Implant de carcinom mamar pe membrana corioalantoidă, ziua a 4-a post-implant. Colorație pan-citokeratină AE1/AE3 (A) și imaginea sa inversată (x400). Imaginea confirmă invazia tumorii în membrană, cu dispunerea celulelor tumorale solitar, sub formă de cordoane și grupuri.

Examinarea microscopică a specimenelor a permis să concludem, că celulele invadate prezentau particularități morfologice și imunohistochimice deosebite față de țesutul de origine. Și anume, forma celulelor solitare varia de la rotund-oval, la aspect stelat, ceea ce mima structural celulele stromale ale membranei corioalantoide (Fig.4.4). În schimb, celulele tumorale care preferau aranjament în cordoane sau grupuri, mima după aspectul histologic carcinomul scuamocelular. În toate aceste cazuri proveniența tumorală a celulelor a fost confirmată prin colorare cu AE1/AE3. Imunohistochimic am determinat că intensitatea exprimării AE1/AE3 în celulele invadate a variat de la slab în celulele solitare la pronunțat în celulele aranjate în grupuri sau cordoane.

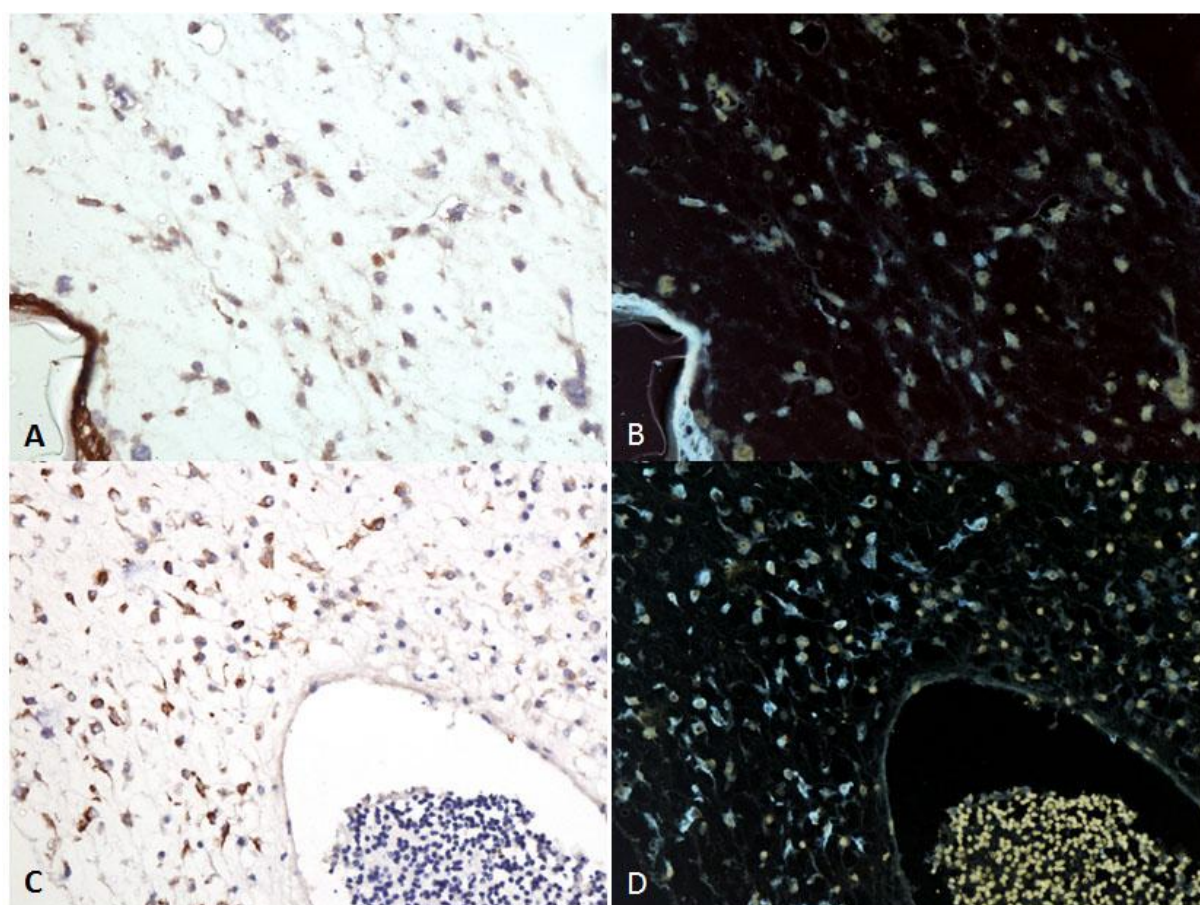


Fig.4.4. Carcinom mamar ductal invaziv, implant pe membrana corioalantoidă, ziua a 5-a.

Celulele tumorale au fost puse în evidență cu pan-citokeratina AE1/AE3 (A, C, x400). Intensitatea diferită de exprimare de către celulele tumorale a pan-citokeratinei se determina mai bine în imaginile inversate, variind de la slab în celulele solitare, la pronunțat la cele aranjate în cordoane (B, D).

Analiza expresiei markerilor din tumoarea primară vs celulele diseminate în implant a pus în evidență preponderența cazurilor cu pierderea ER (19 cazuri/86,4%) în membrana

corioalantoidă, urmate în 2 cazuri/9,1% cu ER stabil pozitiv și un caz cu ER stabil negativ (tab.4.20).

Tabelul 4.20. Evoluția markerilor ER, PR, HER2, CK5 după implantare pe membrana corioalantoidă.

| Subtip | | Implant | | | | | n | % |
|-----------------------|----------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|----------|------------|
| Tm | Mt | ER | PR | HER2 | CK5 | Subtip | | |
| HER2 | HER2 | Stabil negativ | Stabil negativ | HER2 pierdere | Stabil negativ | 5NP | 1 | 4,5 |
| Luminal A | Luminal A | ER pierdere | PR pierdere | Stabil negativ | Stabil negativ | 5NP | 1 | 4,5 |
| Luminal A | Luminal A | Stabil pozitiv | Stabil pozitiv | Stabil negativ | Stabil negativ | Luminal A | 1 | 4,5 |
| Luminal B/HER2 | Luminal B/HER2 | ER pierdere | PR pierdere | Stabil pozitiv | Stabil negativ | HER2 | 1 | 4,5 |
| Luminal B/HER2 | Luminal B/HER2 | Stabil pozitiv | Stabil negativ | Stabil pozitiv | Stabil negativ | Luminal B/HER2 | 1 | 4,5 |
| Luminal B/HER2 | Luminal B/HER2/Ki67 | ER pierdere | Stabil pozitiv | HER2 pierdere | Stabil negativ | Luminal A | 1 | 4,5 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | Luminal B/HER2 | ER pierdere | PR pierdere | HER2 pierdere | Stabil negativ | 5NP | 2 | 9,1 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | Luminal B/HER2/Ki67 | ER pierdere | PR pierdere | HER2 pierdere | Stabil negativ | 5NP | 2 | 9,1 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | Luminal B/HER2/Ki67 | ER pierdere | Stabil pozitiv | HER2 pierdere | Stabil negativ | Luminal A | 9 | 40,9 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/HER2/Ki67 | ER pierdere | Stabil pozitiv | Stabil negativ | Stabil negativ | Luminal A | 2 | 9,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | ER pierdere | PR pierdere | Stabil negativ | Stabil negativ | 5NP | 1 | 4,5 |
| Total | | | | | | | 22 | 100,0 |

Notă: Cazurile cu transfer de subtip în metastaza limfonodală au fost selectate cu **BOLD**. Cazurile cu transfer de subtip în implant au fost hașurate. În toate cazurile examinate celulele tumorale diseminate în implant au prezentat activitate proliferativă (Ki67) scăzută (<14%).

Un comportament deosebit față de ER a fost detectat în cazul receptorului PR: acesta majoritar (13 cazuri/59,1%) a fost evaluat stabil pozitiv, urmat în 7 cazuri/31,8% de pierdere a PR după implantare și 2 cazuri/9,1% cu PR stabil negativ.

În situația markerului HER2, implantarea tumorii pe membrana corioalantoidă a condus în majoritatea cazurilor la pierderea acestui receptor în noua ambianță (15 cazuri/68,2%), urmată în descreștere de cazurile HER2 stabil negative (5 cazuri/22,7%) și HER2 stabil pozitive (2 cazuri/9,1%). Citokeratina bazală CK5 s-a dovedit a fi cea mai predictivă în evoluție, prezentând expresie negativă până și după implantare în toate 22 cazuri.

În urma comparării subtipului molecular al tumorii primare vs metastaza limfonodală am determinat 2 cazuri de transfer de la Luminal B/Ki67 la Luminal B/HER2/Ki67. Restul cazurilor nu au prezentat date concludente unui transfer de subtip (tab.4.20).

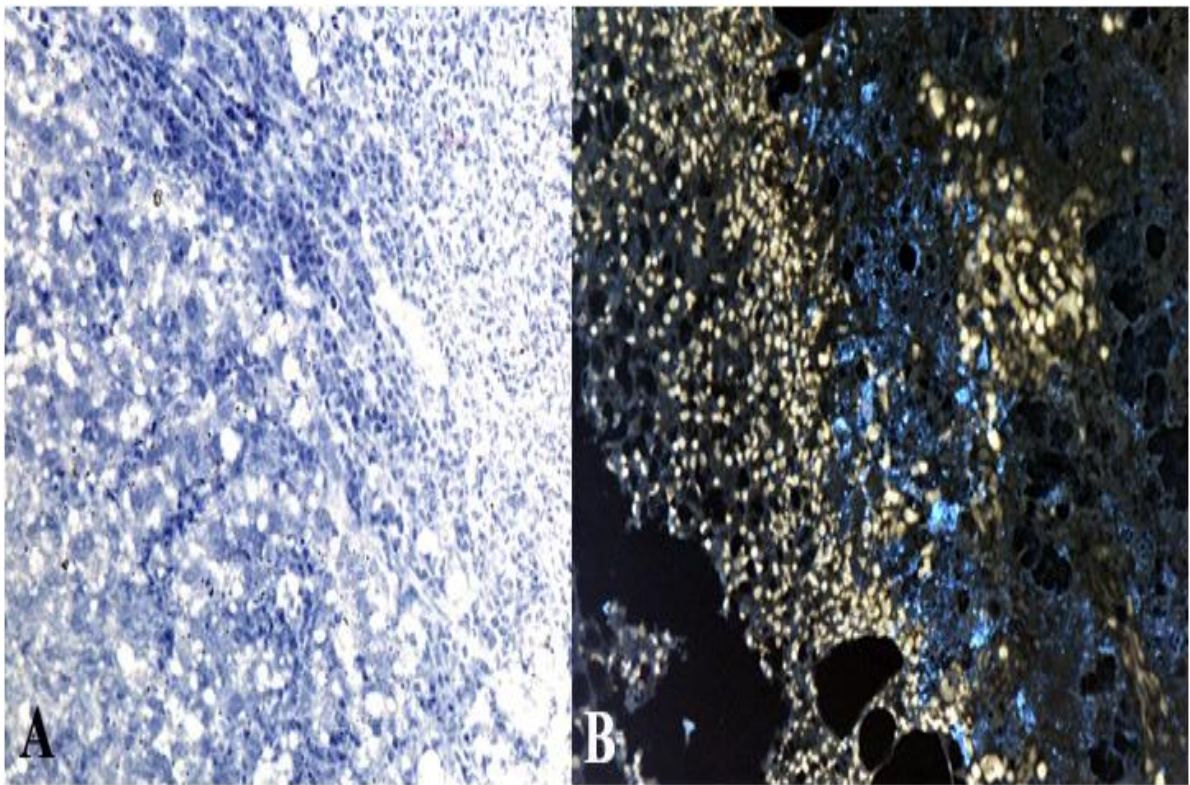


Fig.4.5. Implant de metastază limfonodală a unui carcinom mamar ductal invaziv de tip NOS, G3, HER2 pozitiv pe membrana corioalantoidă, ziua a 3-a (x40). În imaginea **A** se determină o masă de celule distruse, înconjurată de o bordură limfocitară densă. În imaginea **B**, prin inversare la hotar cu masa limfocitară se determină celule solitare, fragmente celulare DAB- pozitive care însă nu reflectă pattern-ul de colorare caracteristic markerului HER2.

La compararea expresiei ER, PR, HER2 și CK5 din tumoarea primară cu celulele tumorale diseminate în implant am determinat schimbarea subtipului în 90,9% (20 cazuri), și anume în 12 cazuri (54,4%) celulele invadate au dezvoltat un fenotip mai diferențiat, caracteristic subtipului Luminal A, în 7 cazuri (31,8%) au prezentat caracteristici proprii subtipului 5NP și într-un caz (5,4%) s-a delimitat fenotipul HER2, deși tumoarea primară și metastaza au fost specificate ca Luminal B/HER2. Doar 2 cazuri, Luminal A și Luminal B/HER2 nu au suferit un transfer de subtip.

Ținem să menționăm, că în studiu nu au fost cuantificate toate cazurile cu implant de metastază limfonodală. Această decizie a avut la bază mai mulți factori, și anume:

1. Toți embrionii cu astfel de implante decedau în primele zile după implantare (maximal la a 3 zi);
2. Prezența infiltratului limfocitar și/sau focarele de necroză masive au pus la îndoială veridicitatea rezultatelor imunohistochimice stabilite (Fig.4.5).

În sumar:

1. La implantarea în membrana corioalantoidă a carcinomului mamar se atestă transfer de subtip molecular în majoritatea cazurilor.
2. Markerii analizați au o evoluție diferită după implantare: ER și HER2 preponderent cu pierdere, PR stabil pozitiv, CK5 stabil negativ.

4.3. Concluzii la capitolul 4

1. În structura moleculară a carcinomului mamar invaziv de tip NOS numeric prevalează subtipurile Luminale. Odată cu diferențierea luminală, tumorile pierd un șir de markeri precum HER2, Ki67, CK5, p53, EGFR și tind să prezinte ER, PR, BCL2.
2. Tumorile Luminal A sunt hormon-dependente (ER, PR), HER2, CK5, p53, EGFR negative, cu o expresie marcată a BCL2 și E-cadherinei. Pentru acest subtip se atestă asocierea pozitivă, paradoxală a ER și p53 cu Ki67. Subtipul Luminal A este instabil pe parcursul metastazării.
3. Tumorile Luminal B exprimă ER, PR, AR, BCL2, p53 și E-cadherina și sunt activ proliferante, comparativ cu cele Luminal A. Luminal B spre deosebire de Luminal A exprimă p53. În structura tumorilor Luminal B predomină subtipul Luminal B/Ki67. Proliferarea activă a tumorilor Luminal B susține și prevalența numerică a subtipului Luminal B/HER2/Ki67 față de Luminal B/HER2. Subtipul Luminal B este instabil la metastazare, în majoritatea cazurilor evoluând într-un subtip mai diferențiat, Luminal A. Tumorile activ proliferante sunt cele mai instabile la metastazare.
4. Expresia CK5 de rând cu ER, PR, HER2 servește drept o dovadă a posibilității de diversificare a subtipurilor moleculare existente (dar trebuie imunohistochimie dublă – nu știm este aceeași celulă sau diferite).
5. Tumorile HER2 pozitive tind să piardă receptorul BCL2 odată cu înaintarea în vârstă. Expresia HER2 corelează cu diminuarea indicelui de proliferare Ki67 și expresia CK5, totodată sporind șansele de achiziție de către celulele tumorale a markerului p53. În cazul tumorilor HER2 pozitive expresia markerului anti-apoptotic BCL2 corelează paradoxal pozitiv cu prezența receptorului pro-apoptotic, p53. Subtipul HER2⁺ nu este stabil pe parcursul metastazării, transferurile de subtip evaluând doar cu achiziționarea de receptori luminali.
6. Subtipurile moleculare dezvoltate de carcinomul lobular sunt instabile pe parcursul metastazării, preponderent evoluând cu pierderea receptorilor luminali. Tumorile Luminal A dezvoltate de carcinomul lobular spre deosebire de cel ductal sunt p53 pozitive. Subtipul HER2 dezvoltat de tumorile lobulare nu este stabil, însă spre deosebire de carcinomul ductal degradează în direcția Basal-like. Subtipul Luminal B dezvoltat de carcinomul lobular invaziv spre deosebire de cel ductal nu expresează E-cadherina.

7. Instabilitatea carcinomului mamar a fost dovedită în majoritatea cazurilor cu implant de tumoare în membrana corioalantoidă. Markerii analizați s-au dovedit a avea o evoluție diferită după implantare: ER și HER2 preponderent cu pierdere, PR stabil pozitiv, iar CK5 stabil negativ.

5. SINTEZA REZULTATELOR OBȚINUTE

Metastazele reprezintă produsul a unui proces multistadial dezvoltat de tumoarea primară, care implică diseminarea celulelor canceroase și adaptarea acestora la condițiile noului mediu ambiant. Aceste procese sunt caracterizate prin achiziționarea sau pierderea expresiei de către neoplasm a unor markeri celulari, grație alterărilor de nivel genetic și/sau epigenetic.

Eseurile chirurgicale deopotrivă cu noile chimioteraputice sunt eficiente în terapia tumorilor primare, mai ales în stadiile incipiente. Aceste procedee însă sunt ineficiente în cazul metastazelor datorită răspândirii sistemice și chimiorezistenței dezvoltate de către celulele diseminate. Astfel metastazele devin cauza principală a deceselor, iar prevenirea metastazării ar deveni o cale efectivă de tratament.

Rezultatele prezentului studiu pledează în favoarea concluziei, că profilul molecular al metastazelor limfonodale dezvoltate de carcinomul mamar nu corespunde cu profilul tumorii primare. De ce? Răspunsul la această problemă ar putea fi elucidat prin prisma mai multor discuții.

Anatomia. Glanda mamară este un organ cu structură lobulară. Conform conceptului propus de Going and Mohun (2006) lobii prezintă unități structurale, care posedă particularități anatomice, morfologice individuale [95]. Fiecare lob își are începutul cu multiple (sute-mii) de TDLU (unitate terminală ductal-lobulară) care drenează în ducturi de ordin intra- și extralobular. Toate aceste structuri sunt formate din epiteliocite și celule mioepiteliale acoperite de o membrană bazală continuă. Prezența mai multor unități anatomice, fiecare cu o vastă diversitate celulară, diferite după localizare, morfologie, funcție generează întrebarea: E posibil oare ca diverse celule, din diferite TDLU să se malignizeze în același moment? Teoretic, da. Empiric, în favoarea acestei ipoteze pledează un șir de dovezi: dezvoltarea uni-momentană a carcinomului invaziv și celui *in situ*, dezvoltarea tumorilor în ambii sâni sau în cadrul aceleași glande, dar segmente și lobi diferiți.

O altă întrebare, la același capitol ar fi dacă există posibilitatea malignizării diferitor celule în cadrul aceluiși TDLU? Teoretic da, am putea susține că oricare ar fi cauza malignizării, exo- și/sau endogenă există posibilitatea acțiunii lor orchestrate, țintite în cadrul aceleași unități terminale. În favoarea acestei ipoteze este însăși clasificarea carcinoamelor, cu evidențierea formelor mixte, ducto-lobulare. Mai mult, datele imunohistochemice relatează pozitivitatea procentuală, numerică sau gradată a unui marker susținând ipoteza dată, precum că în cadrul aceleași tumori, celulele tumorale nu sunt de același tip. Drept exemplu, dacă cuantificăm markerul ER cu 80%, indicăm din start că 20% din celulele tumorale, cel puțin la nivel de ER sunt diferite, deși canceroase!

Complexitatea problemei mai este sporită prin faptul că epitelocitele mamare sunt structuri dinamice, supuse diferențierii celulare, baso-luminale, stadializată morfologic și imunohistochimic. Etapele de diferențiere descrise în literatură pot explica cauza generării multiplelor forme de carcinom mamar. Am indicat „multiple” conform datelor OMS, deși ipotetic putem genera mult mai multe forme înmulțind numărul de celule și etapele lor de diferențiere la factorii mutageni, multiplicat, deci și încurcat cu stress-ul, alimentația, stilul de viață, numărul de copii născuți și nu în ultimul rând cu ereditatea. De ce nu? Omul când nu știe cum să explice un anumit fenomen din viața sa implică voia Domnului, iar când vine vorba de sănătate implică ereditatea.

Ereditatea. Conform datelor lui Tot T. (2005, 2007, 2010) rezultă că cancerul mamar este o maladie lobară, iar structurile tumorale, *in situ* sau cu pattern invaziv își au originea într-un singur lob [241-243]. Aceste date au pus bazele teoriilor „lobului afectat” și cronometrării biologice. Conform ipotezei lui Agelopoulos și coaut. (2008) lobul este afectat încă în perioada embrionară iar la naștere deja conține celule stem și celule comitate, purtătoare de mutații [5]. Aceste abnormalități genetice fac mai sensibile celulele în cauză la acțiunea factorilor mutageni ulteriori, exo- sau endogeni. Astfel autorii susțin că cancerul mamar este o boală înăscută, unde fiecare pacient are o anumită predispunere de a dezvolta un anumit tip de cancer, iar ceasul biologic care va finaliza cu transformarea malignă deplină a celulelor este în funcție de tipul și intensitatea stimulilor mutagenici. În favoarea acestei ipoteze vorbesc și datele lui Jobsen și coaut. (2003), referitor la dezvoltarea cancerului mamar concomitent în ambii sâni (1,5% cazuri), mai frecvent de tip histologic tubular și cu dispunere în cadranul medial [119].

Prezența celulelor stem afectate, atât în segmentul secretor, cât și în cel ductal susține posibilitatea dezvoltării neoplasmului de orice nivel glandular. Tot T. (2010) însă consideră, că leziunile *in situ*, puțin diferențiate tind preponderent să se dezvolte în cadrul TDLU, iar leziunile înalt diferențiate afectează mai frecvent ducturile ce drenează TDLU [242]. Această opinie însă vine în contradicție cu datele lui Wellings și coaut. (1973, 1975), care au susținut ideea că vasta majoritate a cancerelor de sân, invazive sau precursorii „in situ”, au origine în TDLU, indiferent de tipul histologic [261, 262]. Opiniile discutate până acum însă au și ceva comun, toate au drept punct de origine al carcinomului mamar, arborele glandular, histologic format din multiple TDLU și ducturi. Multiple, chiar și în cadrul aceluiași lob și lobul. Astfel se conturează iarăși ipoteza expusă mai sus despre posibilitatea dezvoltării concomitente a procesului neoplazic în mai multe porțiuni glandulare ale aceluiași lob, iar celulele afectate și gradul de malignizare pot fi diferite. Aceasta va finaliza prin dezvoltarea în cadrul aceluiași lob a formațiunilor benigne și maligne, cu diferit potențial metastatic.

După Visvader J.E. (2009) multitudinea subtipurilor tumorale reflectă atât diverse profiluri mutaționale, cât și originea celulară diferită [252]. Studiul profilului genetic al diverselor tipuri de carcinom mamar a scos în evidență faptul, că tumorile Basal-like corespund după semnăturile genetice cu celulele progenitoare comitate luminal. Aceste date au pus la îndoială opinia despre sursa stem celulară, incipientă a carcinomului Basal-like. Mai mult, subtipurile Claudin-low și Normal breast-like s-au dovedit a fi apropiate după profilul genetic cu celulele stem mamare, diversificate în plus prin caracteristici genetice proprii stromei mamare, de origine mezenchimală. Altfel spus, pentru astfel de tumori definiția de carcinom sau neoplazie epitelială, este insuficientă, deoarece caracteristicile mezenchimale pledează în favoarea unui diagnostic de sarcom.

Montel și coaut. (2006) a demonstrat că tumorile de același tip, dar de localizare diferită la același pacient au semnături genetice distincte [160]. Mai mult Urquidi și coaut. (2002) a pus în evidență eterogenitatea tumorii prin măsurarea activității metastatice: celulele canceroase sunt diferite după capacitățile sale metastatice, exprimat de la activ la non-metastatice [251]. Mai mult, autorul a concluzionat că odată cu creșterea abilităților metastatice se schimbă profilul markerilor expesați. Astfel putem presupune că fenotipul tumorii nu este pre-determinat și static, dar poate evolua pe parcursul dezvoltării tumorii.

Conform datelor lui Roodi N. (1995) mutațiile genetice ER la 1% din pacienți explică variabilitatea răspunsului la pacienți cu tumori ER pozitive [206]. Recent, s-au descris mutații la nivel de genă-ESR1, care codifică domeniul de fixare (ligand-binding domain) a receptorului ER pentru estrogen [117, 140, 204, 244]. Astfel sau pus în evidență 3 tipuri de mutații la acest nivel:

1. Amplificarea genică, cu formarea de copii multiple a ESR1;
2. Translocația, în care o parte din gena ce codifică receptorul ER este schimbată aleatoriu, neobișnuit cu diverse părți din genom;
3. Mutația punctiformă la domeniul activ al receptorului ER captator de estrogen. Mutația dată blochează receptorul ER, menținându-l într-o formă stabil activă și stimulând în permanență celula tumorală, în pofida lipsei de estrogen. Aceasta este și cauza rezistenței la inhibitorii de aromatază. Important e faptul că, aceste mutații s-au determinat doar în metastaze (la 6 din 11 pacienți tratați cu inhibitori de aromatază), fiind absente în tumorile primare.

Odată cu blocarea receptorului ER celula tumorală drept acomodare la tratament își schimbă calea pentru supraviețuire. Drept exemplu s-au raportat un șir de cazuri de „shift”, adică transfer a tumorii de la ER⁺ la HER2⁺ și invers, drept răspuns la tratamentul efectuat [54, 268].

Pe de altă parte, pierderea expresiei receptorului PR (progesteron) în decursul terapiei endocrine este mult mai frecventă decât a ER [30]. În astfel de cazuri tumoarea devine mai agresivă, iar pronosticul mult mai nefavorabil. O altă sursă de rezistență raportată la inhibarea ER este receptorul pentru androgeni (AR), prin care factorii de creștere pot stimula proliferarea tumorii [61]. După Gutierrez M.C. (2005) la circa 20% din paciente supuse terapiei endocrine tumoarea devine rezistentă pe parcursul tratamentului [102].

În lumina celor expuse trezește dispute și originea tumorilor mamare BRCA1 (*breast related cancer antigen 1*) asociate, adică genetic determinate. Inițial Foulkes și coaut. (2004) a determinat, că aceste tumori expresează markeri proprii subtipurii Basal-like [85]. Însă Lim și coaut. (2009) au evidențiat, că aberațiile de BRCA1 nu numai că nu sunt caracteristice pentru celulele mamare stem cancerigene, ba mai mult tumorile cu deficiențe BRCA1 conțin foarte puține celule stem [141]. Drept sursă posibilă a acestor tumori autorii consideră celula progenitoare deja comitată luminal, ipoteză în susținerea căreia vorbește și expresia markerilor (EGFR, CK5) caracteristici subtipurii Basal-like. În susținerea acestei ipoteze vin și datele prezentate de Lakhani și coaut. (2005) care subliniază că cca 1/3 din progenitoarele luminal prezintă receptorul ER α , ceea ce coincide cu cele cca 30% de tumori BRCA1, ER pozitive. Aceste date par a fi suficiente pentru a explica eficiența în unele cazuri de tumori BRCA1 a ovarectomiei profilactice sau a chimioprofilaxiei cu tamoxifen. Gena tumoral supresorie BRCA1 are o poziție crucială în reglarea diferențierii celulare și remanierea defectelor de ADN [281]. Celulele epiteliale, odată comitate luminal sunt supuse „atacului” proliferativ estrogen mediat, din care motiv riscă cu mai mare probabilitate să achiziționeze mutații BRCA1. De ce? Fiindcă conform datelor lui Liu R. și coaut. (2007) anume la aceste celule s-a remarcat instabilitatea marcantă a genomului [143]. În plus, autorii au depistat că majoritatea tumorilor BRCA1 pozitive prezintă și mutații de genă p53, ceea ce în consecință se reflectă prin sporirea potențialului proliferativ al carcinomului.

Astfel, predispunerea genetică de a face carcinom mamar este dovedită în cazul BRCA1, este pusă sub discuție în cazul BRCA2 și va servi drept câmp de studiu pentru multe generații. Totuși nu acest factor este determinant în instabilitatea tumorilor pe parcursul metastazării. Populația labilă și activă de celule glandulare, influențată de stromă, diversificată prin stadii de diferențiere implică dezvoltarea capitoulului consacrat eterogenității celulare.

Epiteliocitele mamare. Din vasta ierarhie de epitelioците mamare, presupuse sau determinate în laboratoarele științifice, practica morfologică cotidiană pune în evidență celulele mioepiteliale, bazale și luminal [281].

Evidențierea *mioepiteliocitelor* este de un real folos pentru a evidenția gradul de invazie al tumorii, precum și pentru diferențierea leziunilor proliferative benigne de cele maligne. În cazul carcinoamelor invazive se atestă lipsa mioepiteliocitelor, ceea ce a servit drept motiv de a nu include aceste celule în studiul de față.

Celulele bazale sunt identificate grație conținutului citoplasmatic specific de citokeratine cu greutate moleculară înaltă, precum CK5/6, 14, 17 și prezenței receptorului pentru factorul de creștere epidermală (EGFR). Ușor, dacă la acestea nu ar fi asociate, cel puțin după localizare celulele stem. În plus, celula bazală este o celulă deja comitată, care este bazală doar după sediul său, deși poate expresa un șir de receptori, care vor diversifica această populație celulară. Trebuie de subliniat, că setul bazal de celule constituie cca 5% din totalul epiteliocitelor și este imunohistochimic eterogen, incluzând deopotrivă cu CSM, celule comitate luminal sau mioepitelial, și mioepiteliocite diferențiate.

Conform datelor lui Shackleton și coaut. (2006) celula stem este localizată adiacent membranei bazale, iar imunohistochimic poate fi definită CD49f⁺, EpCAM⁻, CD24⁻, CD133⁻, HER2⁻, ER⁻, PR⁻ [218]. În baza datelor lui Petersen și coaut. (2010) adiacent caracteristicilor imunohistochimice enumerate mai pot fi adăugate CD44⁺ și PROC⁺ [182]. La graviditate această celulă își demonstrează caracterul său pluripotent, generând „înmugurirea” segmentului terminal al TDLU cu o serie întreagă de celule [281]. În opinia autorilor, această celulă este capabilă să genereze întregul arbore epitelial mamar. Celulele stem încep diferențierea prin generarea progenitoarelor bi- și unipotente. Celulele comitate, bipotente sunt caracterizate imunohistochimic CD49f⁺, Thy1⁺, CD10⁺, EpCAM⁻, MUC1⁻, CD24⁻, CD133⁻, HER2⁻, ER⁻, PR⁻. Celula bipotentă se poate diferenția atât în epiteliul alveolar sau ductal, cât și în mioepiteliocite. În opinia lui Petersen și coaut. (2010) aceste celule sunt localizate bazal și expresează în abundență FGFR, IGFBP7 (*insulin-like growth factor binding protein-7*), Notch3 (*neurogenic locus notch homolog protein 3*), decorina, Thy1 (*thymocyte antigen 1*), GAS6 (*growth arrest specific factor 6*) și tenascina C [182]. Deși sunt rar proliferante, aceste celule trebuie să poseze totuși o bună capacitate de a-și menține integru profilul său genetic, molecular în urma posibilelor leziuni. Datele experimentale prezentate de Woodward și coaut. (2005) indică rezistența lor înaltă la alterări de pH, temperatură și acțiunea toxinelor, iar proliferarea mitotică reprezintă în sine un mecanism intern de verificare, prin existența momentelor de „check point” [267].

Celula stem comitată în direcția luminală va fi definită ca CD49f⁺, EpCAM⁺, KIT⁺, ER⁺/ER⁻. Grație expresiei în abundență a EpCAM-ului, aceste celule proliferază intens. Conform datelor lui Lim și coaut. (2009), de rând cu celulele bipotente comitate luminal

descrise anterior, sunt și celule ce expresează suplimentar markerul CK5/6 [141]. Aceasta sugerează ideea că CK5/6 nu este un receptor specific doar celulelor bazale, după cum sa vehiculat anterior. În susținerea acestei idei sunt și rezultatele studiului nostru, care a pus în evidență 4,8% de tumori luminale, care paradoxal au exprimat și citokeratina bazală. Altfel spus, malignizarea epitelului mamar poate avea loc la orice etapă de diferențiere, susținând posibilitatea de includere în clasificarea moleculară a unui nou subtip, BasoLuminal. Totuși, separarea acestui subtip propunem să fie considerată drept dovadă a eterogenității cancerului mamar: evidențierea a cca 5% de tumori luminale CK5 pozitive nu este suficient, trebuie să fie luat în calcul și numărul acestor celule, care a fost în prezentul studiu mai mic de 10%. Altfel spus, cca 10% din celulele tumorale cu caracteristici luminale (cel puțin ER/PR pozitive) au prezentat și CK5. Complexitatea problemei însă este susținută și de către criteriile de clasificare: după ASCO (2013) tumoarea este ER pozitivă, deci luminală dacă cel puțin 10% din celule expresează receptorul pentru estrogen [97]. Astfel, apriori tumoarea este considerată eterogenă după componența celulară, cel puțin formată din celule ER^+-CK5^+ , ER^+-CK5^- , ER^-CK5^+ și ER^-CK5^- . Trebuie de să subliniat că doar în 4,8% sau 2 cazuri, prin utilizarea a 2 markeri (ER și CK5) am determinat existența ipotetică a 4 tipuri de celule tumorale, fiecare cu proprietăți deosebite, cel puțin imunohistochimice.

Inițial s-a presupus că celula progenitoare luminală poate servi drept sursă exclusivă pentru epitelul luminal și ductal. Visvader J.E. (2009) însă a contestat ideea, demonstrând că epitelul luminal posedă plasticitate, cu posibilitatea de a se diferenția și în direcția mioepitelială [252]. Paradoxal, dar capacitatea progenitorului alveolar de a dezvolta și linia mioepitelială indică la faptul că în glanda mamară, obișnuit are loc dediferențierea, atât râvnită de cercetători. Această opinie confirmă experimentul lui Smith G.H. (1996), care la transplantarea celulelor cu fenotip luminal a obținut epitelul mamar cu toată gama celulară [225]. Aceasta complică datele problemei, indicând la posibilitatea tumorii de a dezvolta tulpini celulare atât cu „evoluție” luminală, cât și „involuție” bazală.

Din cele expuse reiese, că epitelul mamar este extrem de eterogen chiar în condiții normale. Ce ar fi dacă am schimba microambianța, am implica stres-ul, celulele imune...? Probabil vom obține noi culturi celulare. Drept exemplu, Petersen și coaut. (2010) au confirmat aceasta la cultivarea celulelor luminale în prezența toxinei holerice și, surpriză, au obținut focare de celule basal-like [182]! În plus, la cultivarea celulelor luminale pe membrană bazală reconstituită sau obținut minoritar structuri asemănătoare mugurilor terminali, iar majoritar structuri acinare. Aceste date susțin pe de o parte ipoteza că celulele stem sunt localizate și printre celulele diferențiate, iar pe de altă parte implică posibilitatea dediferențierii epitelului

luminal. Totuși oricât de frumoasă nu ar fi morfologia glandei mamare, mai celebră devine ea în combinație cu imunohistochimia.

Imunohistochimia. Exact, însă privită nu drept cauză al diversității epiteliului mamar, ci drept rezultat al aspirațiilor oncologiei moderne de a dezvolta un tratament personalizat, cel puțin la nivel mamar. Drept rezultat am obținut clone celulare cu diverse „semnături” moleculare.

Celulele CK5 pozitive. Opiniile contemporane relatează acest receptor drept o caracteristică indispensabilă a celulelor bazale și mioepiteliale, mai bine spus a celulelor progenitoare, capabile de a se diferenția atât luminal, cât și mioepitelial. În baza datelor raportate de către Otterbach și coaut. (2000), rezultă că acest marker la nivel ductal este mai pronunțat expresat de către mioepiteliocite, iar la nivel de TDLU de către celulele luminale [172]. Rezultate asemănătoare, care susțin expresia CK5 atât în compartimentul bazal, cât și cel adluminal al glandei mamare neafectate au fost raportate anterior în cadrul un studiu personal [281].

Odată cu diferențierea luminală, epiteliocitele pierd CK5/6 și expresează citokeratinele CK8/18/19. În cazul diferențierii în direcția mioepitelială CK5/6 este substituit de p63 și actina de mușchi neted. Totuși procesul de pierdere/achiziție/schimb de citokeratine este unul dinamic. Bocker și coaut. (2005) au demonstrat că în acinul mamar lactogen, epiteliocitele sunt aranjate în grupuri luminale sau secretorii CK8/18⁺ și bazale sau proliferative, ultimele prezentând un mix de celule CK8/18⁺ și CK5/6⁺ [28].

Date asemănătoare se depistează și în cazul tumorilor benigne, care încorporează un număr impunător și de celule CK5/6 pozitive. Însă în cazul tumorilor maligne, are importanță clona celulară, bazală sau luminală. Prin sursa lor diferită, Heatley și coaut. (1995) explică absența celulelor CK5/6 pozitive în tumorile luminale, precum și în hiperplazia atipică sau carcinomul ductal in situ [106]. În opinia lui Laakso și coaut. (2005) tumorile CK5/14 pozitive constituie aproximativ 9% din totalul carcinoamelor mamare, iar majoritatea au un grad histologic G3 [131]. În cazul studiului dat, am evidențiat că ambele tipuri de tumori, lobulare sau ductale în majoritatea cazurilor (90%) sunt CK5 negative, cu caracteristici morfologice proprii carcinoamelor G2 și G3. În plus, am confirmat, că expresia CK5 din metastază este în funcție de valoarea CK5 din tumoarea primară. Altfel spus, eseu statistic de corelare vorbește elocvent în favoarea expresiilor „cererea dictează piața” iar „tumoarea primară compoanța metastazei”. Până la moment am considerat, diagnosticat și tratat în baza tabloului morfologic „pictat” de tumoare în sediul primar. Urmând unul din citatele Mariei Montessori, precum că în natură, ceea ce ne impresionează mai puternic, nu sunt legile sale, ci abaterile presupun că nu

tumoarea primară, ci metastaza sa va fascina cercetătorii și schimba destinul pacienților. Astfel, la compararea expresiei CK5 de ambele localizări am pus în evidență 8 cazuri/8,8% de tumori NST sau 2 cazuri/11,1% de carcinom lobular instabile la metastazare. Totuși originea tumorii și-a lăsat amprenta, prin faptul că carcinomul NST a evoluat atât prin achiziție de CK5 la nivel de metastază (2 cazuri/2.2%), cât și pierdere de citokeratină bazală (6 cazuri/6.6%). În cazul carcinomului lobular ambele cazuri de transfer au evoluat doar prin achiziție de CK5.

Celulele EGFR pozitive. EGFR sau HER1 este o proteină specifică pentru celulele bazale. Goldhirsch și coaut. (2013) au propus utilizarea EGFR de comun cu citokeratina bazală CK5 în definirea subtipului molecular Basal-like [97]. EGFR este expresat pe suprafața celulelor epiteliale în normă și în cele tumorale, având drept scop reglarea activității proliferative și diferențierii celulare. Activarea receptorului dat are loc prin asocierea unuia din liganzi, EGF sau TGF- α , sursa cărora sunt atât celulele normale, cât și cele tumorale. Totodată, poate avea loc și asocierea EGFR cu alți reprezentanți ai familiei erbB (erbB-2 și erbB-3), proces soldat cu activarea proliferării celulare și invaziei tumorale, rareori includerea proceselor apoptotice. Conform datelor prezentate de Walker și coaut. (1991), EGFR este prezent la toate nivelele de diferențiere al epitelului mamar, totuși mai exprimat în celulele bazale [254]. În opinia autorilor epiteliocele luminale EGFR negative sunt mai degrabă o excepție pe fondalul general intens pozitiv. Rezultate similare am publicat și în cadrul un studiu propriu anterior [281].

Creșterea activității proliferative sub influența EGFR sau a liganzilor săi a fost constatată într-un șir de tumori precum cancerul pulmonar, ovarian, intestinal, prostatic, pavimentos și mamar. În ultima, supraexpresia EGFR a fost asociată cu absența receptorilor pentru estrogeni și răspuns slab la Tamoxifen. Cercetările întreprinse de Sainsbury et al (1987) au stabilit că prezența EGFR este direct proporțională cu dimensiunea tumorii și gradul histologic de diferențiere, astfel sporind recurențele și micșorarea perioadei de supraviețuire [212].

Faptul că EGFR este inclus deopotrivă cu CK5 în definirea aceleiași tip de tumori, bazale, presupune existența acelorași particularități de expresie și metastazare. Însă studiul dat contestă această presupunere printr-un șir de rezultate, și anume:

1. Carcinomul ductal invaziv tip NOS poate fi în egală măsură EGFR pozitiv sau negativ, iar în cazul tipului lobular invaziv majoritatea o constituie tumorile EGFR negative.
2. EGFR, similar ca CK5 este instabil pe parcursul metastazării, însă cazurile de transfer implică exclusiv pierderea EGFR în microambianța nodului limfatic în ambele tipuri de tumori. În plus cazurile instabile au prezentat un grad histologic slab de diferențiere, iar tumorile cu grad înalt au exprimat în exclusivitate patern EGFR negativ.

Mai mult, eseuul statistic de corelare vorbește despre independența expresiei celor 2 receptori la nivel primar, iar surpriza cea mare vine în cadrul metastazei, unde s-a atestat o corelație pozitivă, statistic semnificativă dintre EGFR și CK5 (Anexa A). Altfel spus, numeroasele celulele CK5 negative au ținut în umbră unicele celulele CK5 pozitive, dovedite a fi și EGFR pozitive, care au manifestat un potențial metastatic activ. Apelând la incidența expresiei celor 2 receptori putem spune că în cazul carcinomului ductal invaziv expresia CK5 coincide cu EGFR în 59.4% cazuri, dintre care în 53.6% ambii markeri sunt negativi, iar în 5.8% pozitivi. Asemănător am determinat și în cazul carcinomului lobular, în care s-a depistat doar co-expresia CK5 negativ-EGFR negativ în 61.1%.

Din cele relatate putem presupune că tipul histologic al tumorii își are propria sa amprentă imunohistochimică deși eseurile statistice nu au determinat diferențe veridice la compararea expresiei markerilor bazali.

Următorul marker, expresat în stadiul intermediar de diferențiere al epiteliului mamar este „ruda” EGFR-ului, sau HER2.

Celulele HER2 pozitive. Celula progenitoare comitată luminal proliferază și se diferențiază trecând printr-un stadiu tranzitoriu, HER2 pozitiv. Acest receptor membranar (*human epidermal growth factor receptor 2 sau receptor tyrosine-protein kinase erbB-2, sau CD340*) a fost detectat într-o vastă gamă de celule epiteliale, cu sediu la nivel gastro-intestinal, respirator, ovarian, urinar, precum și în celulele progenitoare hematopoietice. Sumativ, stimularea acestui receptor rezultă cu amplificarea potențialului proliferativ. Conform datelor lui Visvader J. (2009) această proteină are un rol decisiv în diferențierea progenitoarelor mamare luminale [252]. În prezentul studiu, în toate cazurile studiate de glandă mamară neafectată nu am determinat celule HER2 pozitive, rezultat similar raportat încă de Pavelic și coaut. în 1992 [177].

După cum am menționat stimularea lui HER2 rezultă ca și în cazul lui EGFR cu sporirea activității proliferative. Totuși în cadrul acestui studiu am stabilit că celulele tumorale HER2 pozitive au preponderent un indice Ki67 sub 14%, definindu-le astfel ca slab proliferante (Anexa C). După Visvader J. (2009) celula progenitoare HER2 pozitivă inițial nu exprimă receptorii hormionali [252]. Adevărat și în cazul tumorilor. Prin compararea și corelarea expresiei HER2 cu ceilalți markeri incluși în studiu am determinat corelația invers proporțională cu CK5 și ER. Altfel spus, la acest stadiu celula nu mai este bazală, însă nu a acaparat particularități luminale. Astfel de tumori vor fi evaluate drept HER2 pozitive. Întrebarea firească, care rezultă din scopul acestei lucrări este: tumorile HER2 pozitive sunt omogene? Realmente nu. În 6 cazuri/22.2% am determinat prezența simultană a CK5. Firește ar fi de

presupus că de rând cu subtipul BasoLuminal, mult râvnit de a fi definit nozologic, ar putea exista și Baso(CK5)HER2? Plus, o fi aceste celule progenitoare? Probabil da, fiindcă 22.2% de tumori HER2 pozitive au exprimat și EGFR. Iar aceasta ar indica și existența probabilă a tumorilor Baso(HER1)HER2. Totuși expresia markerilor bazali, HER1 și CK5 pare a nu fi simultană. Din cele 22.2%, doar într-un singur caz (3.7%) s-a determinat expresia pozitivă, simultană a HER2, HER1 și CK5.

Faptul că tumorile HER2 nu sunt omogene ar prezice și activitate metastatică diferită. După cum am relatat anterior, aceste tumori sunt instabile la metastazare, evoluând exclusiv în 6 cazuri/6,3% în direcția pierderii expresiei HER2. Aceste tumori în 5 cazuri au fost și CK5 negative, însă în 3 cazuri EGFR pozitive. Astfel putem presupune că CK5 este un marker mai timpuriu și „mai bazal” decât EGFR. Relația strânsă, „de rudenie” cu HER1 este susținută și prin faptul că din cele 6 cazuri evaluate cu pierdere de HER2, 2 cazuri au evoluat simultan și cu pierdere a EGFR-ului. Discordanțe semnificative privind status-ul HER2 au fost raportate de Santinelly și coaut. [214]. În particular, s-au demonstrat diferențe dintre tumoarea primară și LNM sincrone în 6.7%, tumoarea primară și recurențele locale în 13.3%, tumoarea primară și metastazele metacrone îndepărtate în 28.6%. Rezultate similare a raportat Niikura și coaut. (2012), unde din 40 cazuri HER2 pozitive, netratate, 4 metastaze au prezentat status HER2 negativ [169]. Instabilitatea acestui receptor a fost raportată și de Adamczyk și coaut. (2012) în 4,5% cazuri, cu deosebirea că pacientele au fost supuse anterior chimioterapiei [4].

Odată cu diferențierea sa, epitelocitul mamar tinde să piardă HER2, achiziționând ER, PR ceea ce-i atribuie particularități luminale.

Celule hormon pozitive (ER, PR și AR). Estrogenii și progesteronul sunt considerați mitogenii de bază ai epiteliului mamar. Acțiunea acestora pare a fi realizată la toate etapele de diferențiere al epiteliului mamar, chiar și în pofida lipsei receptorilor omonimi la etapele inițiale. Mallepell și coaut. (2006) consideră că estrogenii acționează printr-un mecanism mediat paracrin, iar Asselin-Labat și coaut. (2006) confirmă existența acestei căi grație afectării potențialului mitotic al celulelor stem la șoarecii ovariectomizați [13, 152] Mai mult, Ciarloni și coaut. (2007) certifică faptul că estrogenii influențează celulele bazale prin amphiregulină, care potențează proliferarea epiteliului mamar [48].

Rolul estrogenilor în diferențierea mamară a fost elocvent elucidat prin extirparea ovarelor la șoarecii aflați în pre-pubertate sau la cei cu deficit indus genetic de ER α . În toate aceste cazuri s-a semnalat doar formarea unui sistem ductal rudimentar. Totuși influența estrogenilor, este în strictă legătură cu microambianța celulară. Brisken și coaut. (2007) relatează, că simpla transplantare a epiteliului ER α deficitar în stroma mamară a șoarecilor *wild type* nu conduce la

diferențierea epitelială ulterioară [31]. În cazul când celulele ER α deficitare erau amestecate cu epiteliocite normale ER pozitive, s-a semnalat o diferențiere intensă a sistemului ductal, în special pe baza celulelor defecte genetic. Mai mult, acestea au fost determinate atât în stratul bazal, cât și în compartimentul luminal. Astfel autorii au concluzionat că țesutul ER α deficitar conține celule stem, iar acestea din urmă se pot diferenția doar în prezența epiteliocitelor ER pozitive. Ultimele au fost denumite de Brisken și coaut. (2007) drept „celule senzoriale” [31]. Ulterior aceste date au fost confirmate și de Sleeman și coaut. (2007), care au identificat în compartimentul bazal celule CD24/CD133/ER pozitive [224]. Astfel ipoteza precum că celulele ER pozitive sunt luminale, deci diferențiate pare a fi zdruncinată.

Brisken și coaut. (2007) consideră că „celulele senzoriale”, ER pozitive detectează nivelul sistemic de estrogeni ca apoi să regleze local diferențierea celulelor stem [31]. În plus, introducerea 17- β - estradiolului șoarecilor pubertari ovariectomizați rezultă cu restabilirea potențialului de creștere ductală, mecanism realizat în opinia autorilor prin intermediul receptorului EGFR. Ciarloni și coaut. (2007) consideră că aceste celule, drept răspuns la acțiunea estrogenilor, elimină local amfiregulină, proces realizat prin intermediul unei metalopeptidaze ADAM17 (*ADAM metallopeptidase domain 17* sau *TACE (tumor necrosis factor- α -converting enzyme)*) [48]. Autorii au menționat faptul că, epiteliul glandei mamare lipsit prin eseuri genetice de amphiregulină nu formează muguri terminali, chiar în prezența estrogenilor. Efect asemănător a fost realizat și la blocarea receptorului EGFR al celulelor stromale din jurul mugurelui terminal, fapt ce sugerează rolul important al acestora în diferențierea epiteliului glandei mamare.

Brisken și coaut. (2007) au determinat că, odată cu instalarea pubertății, influența mitogenică a 17- β -estradiolului descrește dramatic [31]. Începând cu această perioadă procesele de proliferare și morfogeneză sunt dictate de nivelul seric al progesteronului, nivelul căruia oscilează în dependență de fazele ciclului ovarian. Cantitatea și durata maximă se va atesta la graviditate.

La fel ca și estrogenii, progesteronul poate stimula proliferarea epiteliocitelor luminale atât hormon-pozitive, cât și hormon-negative. Această acțiune este realizată în opinia lui Brisken și coaut. (2007) în aceeași manieră, paracrină aidoma estrogenilor [31]. Totuși în realizarea acestei acțiuni sunt implicați alți factori, cum ar fi RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* sau *tumor necrosis factor ligand superfamily member 11* (TNFSF11)) și wnt-4 (*wingless-type MMTV integration site family, member 4*). Factorul RANKL este o proteină din familia TNF (*tumour necrosis factor*), cu implicații multiple, cum ar fi apoptoză, imunitate, regenerarea și remodelarea osoasă. Mulac-Jericevic și coaut. (2003) consideră că RANKL

stimulează proliferarea epiteliului mamar prin inducerea de sinteză în celulele luminale a ciclului D1 [162].

Proteina wnt-4 este pe larg studiată grație implicării sale regulatorii în embriogeneză, și anume în comitarea dezvoltării sexuale feminine a embrionului. În plus, grație influenței sale asupra celulelor stem această proteină este frecvent studiată în oncogeneză. La nivel mamar, Brisken și coaut. (2007) consideră că progesteronul stimulează producerea de către „celulele senzoriale” elucidate mai sus, anume a wnt-4 [31]. Ulterior acest factor va stimula celulele stem, acțiune soldată cu diviziune celulară asimetrică, obținerea unei noi celule stem și a celulei fiice comitate. Toate aceste fenomene anticipează în normă posibilă gravitatea. Pike și coaut. (2000) au stabilit că utilizarea progesteronului în postmenopauză în calitate de tratament hormonal substitutiv, crește riscul de dezvoltare a cancerului mamar [184]. În opinia lui Brisken și coaut. (2007) aceasta se întâmplă grație efectului proliferativ al progesteronului asupra celulelor stem restante, care au acumulat de-a lungul vieții defecte genetice [31].

Din cele relatate anterior putem confirma prezența epiteliocitelor ER, PR pozitive în toate compartimentele glandulare. În una din publicațiile anterioare am evidențiat că, în glanda mamară neafectată receptorii pentru estrogeni și progesteron sunt exprasați doar de epiteliocite luminale, iar aranjarea acestora poate varia de la solitar, la grupuri celulare hormon-pozitive de până la 10 celule sau sub formă de fâșii continue cu populații de peste 10 celule imunomarcate [281]. Totuși paternul solitar este mai frecvent determinat în cazul celulelor PR pozitive, iar pentru ER caracteristic îi sunt prezentările în grup și fâșii. Conținutul numeric al celulelor hormon-pozitive a variat în limitele a 4-20%. Conform datelor din literatură epiteliocitele mamare mai frecvent expresează ER decât PR (99%/89%) [250]. Pe de altă parte, autorii au subliniat că PR este mai frecvent înregistrat pozitiv în premenopauză, pe când expresia ER crește odată cu vârsta, înregistrând cel mai înalt nivel în postmenopauză. Oricum aceste date au un rol orientativ, iar fiecare caz are particularitățile sale distinctive.

Conform datelor lui Engström M. (2013) cca 80% din toate cancerurile mamare sunt hormon-pozitive [73]. Aceste date sunt susținute și prin prezentul studiu, atât prin frecvența înaltă a expresiei ER (82,5%), cât și PR (75,5%) în carcinomul de tip NOS. Expresii asemănătoare au fost depistate și în cazul tumorilor lobulare. Aceasta presupune că neoplaziile sunt mai frecvent dezvoltate de celule diferențiate, însă gradul de diferențiere al majorității covârșitoare de tumori luminale a pledat în favoarea tumorilor agresive, G2 și G3. Totuși, datele imunohistochimice curente susțin că tumorile hormon-pozitive au o rată de proliferare Ki67 scăzută, iar valoarea expresiei receptorilor ER și PR nu este în funcție de tipul și gradul histologic al tumorii, în plus nu este influențată de vârstă pacientelor. Oricum, predominanța

covârșitoare de tumori hormon-pozitive implică presupunerea că anume celulele ER, PR pozitive sunt cel mai frecvent afectate și cel mai frecvent susceptibile de a dezvolta tumori. Rămâne de stabilit evoluția acestor celule pe parcursul metastazării.

Estrogenii și progesteronul sunt secretați în dependență de faza ciclului ovarian-uterin, ceea ce presupune existența variațiilor procentuale dintre numărul celulelor țintă. Totuși, în studiul prezent expresia ER a corelat pozitiv cu prezența PR și invers. Mai mult, majoritatea asocierilor pozitive sau negative proprii ER, au fost similar descrise și pentru PR, astfel pledând în favoarea rudeniei acestor 2 receptori, separându-i net de markerii bazali, EGFR, CK5 și HER2.

Dar, pentru fiecare regulă este cel puțin o excepție, care la capitolul dat poate fi formulată prin întrebarea: tumorile hormon-pozitive sunt oare omogene? Desigur nu, iar eterogenitatea este dictată de ceea ce noi considerăm prag al pozitivității, în cazul receptorilor hormonal. Acest prag variază în limite largi, de la 1% la 30% [97, 193]. De altfel, dacă ASCO (2013) raportează tumoarea drept hormon-dependență la existența a unei singure celule ER pozitivă, din start vom referi 99% celule la o altă etapă de diferențiere, însă nu hormon-pozitivă [97]. Din aceste considerente am efectuat un studiu comparativ al expresiei ER și PR față de setul bazal de markeri. Și nu numai, chiar și a ER cu PR, în pofida relațiilor de „rudenie”. După cum am evidențiat în capitolul 3, în 8 cazuri/5,6% tumoarea ER negativă a exprimat PR, și invers în 18 cazuri/12,6% tumorile ER pozitive au fost PR negative. Analiza încrucișată a ER cu HER2 a pus în evidență 15 cazuri/10.5% de expresie simultană de către tumoare a acestor 2 receptori, ceea ce a „retrogradat” stadiul de diferențiere al neoplasmului. Eterogenitatea tumorilor luminales a fost susținută și în următoarele 10 cazuri/7% de co-expresie ER-CK5, astfel pledând repetat în favoarea izolării nozologice al subtipului BasoLuminal. Nu mai simplist a fost și în cazul relațiilor ER-EGFR, unde 21 cazuri/30,4% au implicat de rând cu ER și markerul caracteristic pentru subtipurile triplu negative. Și aceasta nu este finalul, fiindcă 2 cazuri au prezentat un cocktail triplu pozitiv, ER-CK5-EGFR, dintre care unul a culminat fenomenul prin expunerea unui pentamix CK5-EGFR-HER2-PR-ER pozitiv. O fi aceasta o singură clonă de celule tumorale sau un mixt de clone, este greu de afirmat, dar din pozițiile medicinei contemporane și al tratamentului personalizat implicăm de la bun început tactica triplă, a remediilor anti-hormonale+anti-HER2+citostatice. Și, atent, doar din rezultatele descifrate la nivel de tumoare primară!.

În ceea ce privește cele 8 tumori ER negative, dar PR pozitive nu ar fi cazul de deliberat în cadrul acestui studiu, fiindcă cauzele posibile ale acestui fenomen, cu sediu epigenetic, citoplasmatic sau membranar au fost deja descrise și nu fac parte din obiectivele cercetării în

cauză. Scopul delimitării acestor cazuri, a constat în evidențierea clonelor sau combinațiilor celulare posibil de a fi dezvoltate de către carcinomul mamar. Astfel toate aceste cazuri au avut un fenotip imunohistochimic singular, exprimat după pozitivitate precum PR⁺, PR⁺-CK5⁺, PR⁺-EGFR⁺, PR⁺-CK5⁺-HER2⁺, PR⁺-EGFR⁺-HER2⁺ și 3 cazuri cu un fenotip curat PR⁺. Dacă am utiliza drept bază tratamentul propus de Goldhirsch A. (2013), atunci schemele utilizate ar trebui de la bun început structurate ca Hormonal, Hormonal-Citostatice, Hormonal-Citostatice-anti-HER2 [97]. În plus, stimate cititor, ținem să subliniem că nu am inclus și tratamentul în caz de apariție a rezistenței tumorii la unul din medicamentele specificate.

Cele indicate mai sus, pledează în favoarea definiției că fiecare tumoare, cel puțin mamară trebuie considerată specifică și fiecare va necesita un tratament personalizat. Și aceasta doar la nivel primar, doar în tumorile NOS.

În capitolul consacrat stabilității receptorilor hormoni am evidențiat 7 cazuri/7,4% în care expresia ER s-a schimbat în urma metastazării, și anume 1 caz/1,1% din negativ în pozitiv și în 6 cazuri/6,3% din pozitiv în negativ. În cazul lui PR procentul transferurilor a fost unul mai drastic, implicând 16 cazuri/16,8%, dintre care 6 cazuri/6,3% din negativ în pozitiv și în 10 cazuri/10,5% din pozitiv în negativ. Cazurile cu evoluție negativ-pozitiv pot fi lămurite prin implicarea pragului pozitivității, care utilizat în acest studiu a fost după Allred, constituit la 10%. Altfel spus, tumorile date având unice celule ER, PR pozitive au fost clasificate drept hormon-independente, deși aceste celule s-au dovedit a avea un potențial metastatic mai mare, decât în cazul tumorilor în care clonele ER, PR pozitive dominau numeric. Descifrarea componenței celulare în cazul cu pierderea ER la metastazare, a pus în evidență o tumoare primară ER-CK5-HER2 pozitivă, inducând presupunerea că celulele canceroase singulare, ER pozitive metastazează mai timpuriu decât cele cu fenotip bazal. Fenotipurile tumorilor care au evoluat cu pierderea ER în metastază a avut caracteristici specifice fiecărui caz, precum PR⁺, PR⁺-HER2⁺, PR⁺-CK5⁺-HER2⁺, PR⁺-CK5⁺, PR⁺-CK5⁺-EGFR⁺ și un caz PR-CK5-EGFR-HER2 negativ.

De asemenea, fenotipuri imunohistochimice particulare le-au fost atribuite și cazurilor cu achiziția PR în metastază, combinațiile înregistrate inițial în tumoarea primară ca ER⁺ (3 cazuri), ER⁺-HER2⁺ (2 cazuri), ER⁺-CK5⁺. Totuși, prezența în toate combinațiile a receptorului pentru estrogen confirmă ipoteza că celulele ER au un potențial metastatic mai mare, decât cele cu markerii bazali și PR, în pofida diferențierii Luminale aparente. Această ipoteză mai are drept sprijin singurul caz de transfer înregistrat în cazul carcinomului lobular invaziv, și anume de la PR pozitiv la PR negativ, păstrând receptorul pentru estrogeni.

În comparație cu estrogenii și progesteronul, androgenii au un nivel seric relativ stabil pe parcursul ciclului ovarian-uterin și menopauzei [281]. Androgenii își exercită funcția prin potențarea expresiei EGFR, iar expresia combinată a AR-EGFR predispune la un pronostic nefavorabil. După cum am constatat mai sus, epitelocitele mamare sunt eterogene în ceea ce privește expresia ER și PR. Wang și coaut. (2014) au constatat că aceste celule sunt diferite și după expresia AR: majoritatea epitelocitelor luminale ER pozitive prezintă și receptorul pentru AR, 10% sunt doar AR pozitive și rare celule sunt ER pozitive-AR negative [255]. În baza datelor publicate de Santagata și coaut. (2014), reiese că celulele luminale hormon-pozitive (ER/PR) nu sunt activ mitotic, postulat valabil și în cazul epitelocitelor AR pozitive, care în majoritate sunt Ki67 negative [213]. Wang și coaut. (2014) confirmă cele relatate, prin studiul concentrației proteinelor intracelulare AR mediate, PSA (*prostate specific antigen*) și GCDFP-15 (*gross cystic disease fluid protein-15*) [255]. Astfel se conturează ideea că celulele AR pozitive nu sunt funcțional active.

Receptorul pentru AR⁺ este determinat în circa 70% carcinoame mamare, deseori asociindu-se cu expresia markerilor ER și PR. Necesitatea determinării expresiei acestui receptor este că activarea genomului pe secvența AR este cauza rezistenței la hormonoterapie în cazurile ER⁺. Pe de altă parte, pacientele care au dezvoltat tumori AR pozitive – ER negative au răspuns mai bine la tratamentul hormonal, decât în cazul tumorilor AR negative. Ba mai mult, lipsa sau mutațiile de genă pentru AR este una nefastă pentru pacient deoarece conduce la apariția chimiorezistenței, ca exemplu la medroxyprogesterone acetate, care utilizează AR drept punct de acțiune. În plus, după Moifar și coaut. (2003) valoarea acestuia corelează cu ER, ba mai mult chiar cu expresia PR [158]. Însă după Park et. al. (2010) acest receptor mai este determinat în tumorile hormon-independente în circa 30%, creând dificultăți de diagnostic diferențial cu subtipurile Basal-like și HER2⁺ [173]. După datele lui Chintamani și coaut. (2010) AR pozitiv este întâlnit în cca 50% din tumorile ER negative [44]. În cazul studiului de față am determinat că majoritatea cazurilor de tumori NOS studiate au prezentat markerul AR. Totuși expresia AR nu a fost influențată de gradul histologic al tumorii și vârsta pacientelor, iar corelarea AR din metastază cu expresia AR în tumoarea primară ar presupune stabilitate pe parcursul metastazării. Fals, studiul de față a demonstrat că AR nu este stabil, iar transferul de scor poate evolua atât cu achiziționare de fenotip AR pozitiv, cât și prin pierderea acestui receptor de către celula tumorală în ambianța limfonodală.

Eterogen a fost și carcinomul lobular. Deopotrivă cu ER și PR sau determinat în sediul primar următoarele clone celulare: ER⁺-PR⁺, ER⁺-PR⁺-CK5⁺, ER⁺-PR⁺-EGFR⁺, ER⁺-PR⁺-EGFR⁺-HER2⁺. Totuși acest carcinom pare a fi mai stabil, cel puțin din punctul de vedere a ER

și PR: am determinat doar 2 cazuri de transfer, unul cu pierderea exclusivă a PR, inițial fiind ER-PR-EGFR pozitiv, iar al 2-lea cu pierderea simultană a ER-PR, astfel favorizând dezvoltarea unei metastaze triplu negative (Anexa A).

Celule E-cadherin pozitive. Din cele relatate anterior, E-cadherina sau uvomorulina, (CD324) este prezentată drept o proteină de adeziune celulară, calciu-dependentă indispensabilă celulelor epiteliale [281]. La nivelul glandei mamare expresia acestui marker este dependentă de mai mulți factori. Estrogenii susțin expresia E-cadherinei prin intermediul unui mecanism lanț MTA3 (*metastasis associated 1 family, member 3*) – Mi-2 (*proteins mi-2*)/NuRD (*nucleosome remodeling deacetylase*) – Snail (*zinc finger protein snai1*) – E-cadherin. Pe de altă parte, HER2 și TGFβ supresează expresia acestui receptor. În glanda mamară neafectată E-cadherina am determinat-o din abundență în epitelioцитеle luminale, deși pe alocuri sau evidențiat și celule bazale/mioepiteliale solitare. Acest marker a fost inclus în studiu grație multiplelor roluri, deseori controversate conform datelor din literatură. Această proteină este implicată în stratificarea și polarizarea epitelioцitelor mamare, totodată fiind responsabilă de supresiunea invaziei și capacității metastatice. Blocarea selectivă a acestei proteine s-a soldat fie cu o morfogeneză anormală, fie cu dediferențiere epitelială și dezvoltare de neoplasm. Această funcție clasează E-cadherina în rândul factorilor supresori de tumori. Studiul acestei proteine a devenit și mai incitant după descoperirea lui Berx și coaut. (2001) în carcinoamele lobulare a mutațiilor 16q22.1 (genă responsabilă de codificarea E-cadherinei) [23]. Astfel lipsa E-cadherinei este considerată drept o caracteristică imunohistochimică a carcinomului lobular. Însă de rând cu funcția de tumor supresor, E-cadherinei iau fost atribuite funcții alternative, care îi atestă implicarea în progresia tumorală. Ultima este discutată pe larg în contextul tranziției epitelio-mezenchimale. Acest proces de dediferențiere epitelială a avut drept caracteristică morfologică schimbarea polarității celulare, achiziția de proprietăți mezenchimale, pierderea adeziunilor celulare și sporirea migrației. Din punctul acesta de vedere prezența E-cadherinei stabilizează celula, prevenind astfel invazia și metastazarea. În plus un șir de evidențe reflectă E-cadherina în calitate de factor ce blochează intravazarea tumorii, care de la sine este un pas important în evoluția bolii. Kowalski și coaut. (2003) au determinat că majoritatea carcinoamelor ductale sunt E-cadherin pozitive, ceea ce explică raritatea depistării microembolilor în aceste tumori, comparativ cu neoplasmele lobulare și inflamatorii [129].

Deși expresia acestui marker a fost pe larg mediatizată în funcție de tipul histologic al carcinomului, nu există date elocvente referitor la eterogenitatea expresiei E-cadherinei și relațiile statistice cu markerii epiteliali bazali, luminali, precum și stabilitatea ei pe parcursul metastazării.

În cadrul acestui studiu am reconfirmat, că expresia E-cadherinei este în funcție de tipul histologic al tumorii, tumorilor de tip NOS revenindu-le întâietatea în ceea ce privește expresia pozitivă. Totuși, expresia acestui marker nu a fost în funcție de gradul de diferențiere al carcinomului ductal și vârsta pacientelor. În 4 cazuri/2,9% de tumori NOS nu am determinat prezența E-cadherinei, dintre ele profilul imunohistochimic a fost determinat în 2 cazuri ca ER⁺-PR⁺ și a câte un caz de ER⁺-PR⁺-HER2⁺-EGFR⁺ și ER⁺-PR⁺-CK5⁺. Tumorile E-cadherin pozitive în majoritatea cazurilor au prezentat suplimentar fenotipul ER⁺-PR⁺ (37 cazuri/26,8%), în rest au fost determinate combinații individuale (Anexa D). Doar 4 din ele, au fost E-cadherin pozitive – hormon-negative, tumorile exprimând fenotip HER2⁺, HER2⁺-EGFR⁺, CK5⁺ și 5-NP.

În cazul carcinomului lobular invaziv am determinat o ușoară prevalență a cazurilor E-cadherin negative. Expresia pozitivă în tumoarea primară a corelat invers cu vârsta pacientelor și gradul de diferențiere al tumorii. Lipsa acestui marker mai frecvent s-a manifestat la paciente de vârstă înaintată și tumori cu grad scăzut de diferențiere. Studiul profilului molecular al cazurilor E-cadherin negative (10 cazuri din 18) a reconfirmat ipoteza lansată mai sus, precum că tumorile hormon-pozitive sunt mai active metastatic. Clonele celulare depistate au fost catalogate precum HER2⁺, ER⁺, ER⁺-PR⁺ (3 cazuri), ER⁺-PR⁺-EGFR⁺ (2 cazuri), ER⁺-PR⁺-CK5⁺ (2 cazuri), ER⁺-PR⁺-HER2⁺ și CK5⁺. Neomogene au fost și tumorile lobulare E-cadherin pozitive (8 cazuri), fiind depistate următoarele grupuri celulare: ER⁺-PR⁺-EGFR⁺ (2 cazuri), ER⁺-PR⁺ (3 cazuri), ER⁺-PR⁺-CK5⁺, HER2 și un caz 5-negativ.

Din cele relatate reiese că, tumorile mamare *per total* sunt E-cadherin pozitive, iar prezența acesteia nu împiedică răspândirea metastazelor. Apare însă întrebarea: au metastazat celulele E-cadherin pozitive, sau anumite clone negative „mascate” de pozitivitatea carcinomului? Ultima ipoteză este cel mai probabilă, fiindcă din cele 9 cazuri de tumori NOS/9,57% înregistrate cu transfer de scor, 8 cazuri/8,51% au evoluat cu pierderea expresiei E-cadherinei după metastazare, și o singură tumoare, G3 a manifestat achiziționare de fenotip E-cadherin pozitiv în sediul limfonodal. Studiul profilului molecular a indicat fenotipuri cazuistice, combinațiile fiind ER-PR-EGFR, PR-HER2-EGFR, ER, ER-PR, ER-EGFR, ER-PR-CK5, EGFR și PR pozitive în cazurile soldate cu pierderea E-cadherinei în nodul limfatic, și ER-PR-HER2-EGFR pozitiv în cazul cu achiziție de către metastază a E-cadherinei. Trebuie de menționat că, odată cu pierderea E-cadherinei în 2 cazuri metastaza a devenit și EGFR negativă, iar în a câte 1 caz HER2 și ER negativă.

În cazul tumorilor lobulare au fost depistate doar 2 cazuri cu transfer de scor, unul cu achiziționare și unul cu pierderea E-cadherinei în metastază. Totuși de infirmat prin aceasta

ipoteza lansată mai sus, precum că tumorile E-cadherin pozitive sunt mai activ metastatice, nu pot datorită numărului mic de cazuri relatate drept carcinom lobular.

Chekhun și coaut. [2013] au demonstrat că, pronosticul bolii și dezvoltarea metastazelor în cazul tumorilor bazale și luminale este în strictă dependență de expresia E-cadherinei [43]. Anume, prezența acestui marker de rând cu incidența joasă sau lipsa expresiei CD44 și CD24 susține formarea coloniilor locale în tumorile luminale pe de o parte. Pe de alta, lipsa E-cadherinei în tumorile bazale se soldează cu absența adezivității celulare și capacități înalte de metastazare. Mai mult, Tang și coaut. [2012] consideră E-cadherina drept un marker caracteristic al subtipului triplu negativ. Aceste date însă vin în contradicție cu rezultatele prezentului studiu [238]. Din totalul de 134 tumori NOS, E-cadherin pozitive doar 24 au fost ER negative, dintre care 7 au prezentat un profil molecular tipic pentru subtipul triplu negativ. În cazul carcinomului lobular din 8 tumori E-cadherin pozitive 3 au avut și un fenotip ER negativ, repartizate după profil ca HER2⁺, CK5⁺ și triplu negativ.

Recent sau expus și ipoteze ce infirmă funcția clasică a E-cadherinei, adică de a preveni invazia și metastazarea. Chu și coaut. [2013] au determinat că pacienții cu cancer de subtip bazal, E-cadherin pozitiv au un pronostic nefavorabil [46]. Acești autori presupun că, E-cadherina este necesară pentru expansiunea celulară a unei tulpini tumorale. Care? Prin combinația a doar 6 markeri (ER, PR, HER2, CK5, EGFR, E-cadherina) am determinat că în majoritatea cazurilor avem pacienți cu un fenotip molecular individual, instabil de fiecare dată, din păcate la metastazare.

Celule p53 pozitive. Corpul uman și-a dezvoltat propriile mecanisme de apărare împotriva celulelor aberante, reflectate sistemic prin implicarea imunității și local prin includerea apoptozei. Unul din markeri, cu funcții multiple și un potențial predictiv înalt este proteina supresoare de tumori, p53. Aceasta, prin controlul direct al transcripției genetice este implicată în procese ce țin de adeziunea celulară, motilitate și invazie. În condiții obișnuite, proteina p53 acționează în faza G1 a ciclului celular, prin activarea p21 și blocarea BCL2. Drept răspuns la alterarea ADN-ului p53 declanșează repararea sau apoptoza, din care cauză a fost denumit „gardian al genomului celular”. În normă această proteină este expresată pentru câteva minute, ca apoi să fie distrusă de proteasome [273]. Studiul de față a confirmat absența expresiei p53 la toate nivelele de diferențiere a epiteliului mamar în glanda neafectată.

La moment, gena TP53 care codifică proteina p53 este considerată a fi aberantă în mai mult de 50% tumori umane. În carcinoamele mamare 1/3 cazuri au fost diagnosticate cu mutații de TP53, caracterizate prin parcurs agresiv al tumorii. Aceste mutații conduc spre formarea unei

proteine p53 stabile, nefuncționale și nedegradabile, iar efectul imunohistochimic cumulativ este reflectat prin grade +1 - +3 de colorare nucleară specifică.

Literatura de specialitate mediatizează pe larg importanța determinării expresiei p53 în tumorile mamare. Yamashita și coaut. (2004) au demonstrat că expresia pozitivă a p53 este asociată cu un pronostic nefavorabil [271]. Autorii au semnalat corelații semnificative a p53 cu HER2 și Ki67, corelații statistice, considerate de colegi a fi în detrimentul timpului de supraviețuire. Studiul prezent a confirmat caracterul agresiv proliferativ al tumorilor p53 pozitive.

Silwal-Pandit și coaut. (2014) consideră că, relevanța clinică a mutațiilor de TP53 este în funcție de subtipul molecular al tumorii, sugerând astfel roluri diferite ale TP53 în dezvoltarea carcinomului mamar [222]. Autorii au semnalat că, mutațiile de TP53 sunt asociate cu o incidență crescută a mortalității la pacienții cu tumori Luminal B, HER2⁺ și Normal-like, spre deosebire de cazurile Luminal A și Basal-like. Totuși expresia pozitivă a p53 s-a dovedit a fi un marker pronostic independent și nefavorabil în cazurile estrogen-pozitive. În studiul de față, spre fericirea pacienților a dominat corelația inversă dintre expresia p53 și prezența ER sau PR.

Dar realitatea pare a fi tristă și pentru acest marker: în cazul celor 43 de tumori NOS/44,3% depistate drept p53 negative putem afirma că, tumoarea s-a dezvoltat din cauza inactivității p53, iar scorificarea cazurilor pozitive precum +1 (13 cazuri/13,4%), +2 (23 cazuri/23,7%) și +3 (18 cazuri/18,6%) vorbește despre ineficiența proteinei p53, probabil aberante. Ba mai mult, în contextul obiectivelor prezentei lucrări aceste date susțin existența clonelor cu activitate p53 diferită.

Din cele 43 cazuri/44,3% considerate p53 negative, 6 cazuri/6,2% au fost concomitent și hormon-negative, clonele celulare prezentând combinații precum 5-NP, CK5⁺, HER2⁺ (2 cazuri), HER2⁺-CK5⁺ (2 cazuri). În ceea ce privește cazurile p53 negative dar hormon-pozitive, în majoritate am determinat combinații celulare unice (Anexa D). La compararea expresiei pozitive a p53 cu markerii incluși în studiu am constatat că toate combinațiile sunt aleatorii.

În cazul carcinomului lobular, majoritatea (13 tumori/72,2%) cazurilor au demonstrat ineficiența apoptozei, expresând proteina p53. Toate combinațiile dintre markerii utilizați în studiu au fost de ordin singular (Anexa D).

Eterogenitatea populației p53 s-a menținut și pe parcursul metastazării: tumorile de tip NOS, atât p53 negative cât și p53 pozitive își păstrează în majoritate fenotipul său, cu mici excepții: în 3 cazuri/3,4% metastaza a devenit p53 pozitivă, iar în 9 cazuri/10,3% p53 negativă. De asemenea, ca și în cazul markerilor precedenți, pierderea sau achiziția de p53 poate fi privită fie prin prisma eterogenității tumorii primare, fie includerea proceselor de

diferențiere/dediferențiere. La evaluarea imunohistochimică a tumorii am determinat că majoritatea cazurilor au fost hormon-pozitive. Totuși detalierea cazurilor a scos la lumină combinațiile: ER⁺, ER⁺-PR⁺, HER2⁺ a celor 3 tumori evaluate cu achiziționare de p53, și ER⁺-HER2⁺, ER⁺-PR⁺ (6 cazuri), ER⁺-CK5⁺, ER⁺-PR⁺-HER2⁺ în cazul pierderii de p53 la metastazare. Cele relatate subliniază iarăși instabilitatea covârșitoare a tumorilor hormon-pozitive, inclusiv la capitolul ce ține de apoptoză.

În cazul carcinoamelor lobulare 2 tumori/5,6% (CK5⁺) au evoluat cu achiziția de p53 la nivel de metastază, iar 3 tumori/16,7% și-au pierdut proteina p53. Ultimele cazuri au prezentat mixuri celulare precum ER⁺-PR⁺, ER⁺-PR⁺-CK5⁺ și ER⁺-PR⁺-HER2⁺.

Din cele relatate pot concluziona că, în structura carcinoamelor mamare ductal invaziv de tip NOS și lobular infiltrativ se atestă prevalența cazurilor p53 pozitive. În plus, expresia pozitivă a p53 nu este în funcție de vârsta pacientelor, gradul de diferențiere și tipul histologic al tumorii, marcând astfel caracterul aleatoriu al acestui gen de mutații. Totuși, acest receptor nu este stabil pe parcursul metastazării, evoluând fie cu pierdere, fie cu achiziționare de p53, însă transferurile de scor mai frecvent înregistrate țin de pierderea expresiei p53 în ambianța limfonodală.

Carcinomul mamar ține întâietatea în ceea ce privește mortalitatea și morbiditatea printre femei. În încercarea de lămuri cauza incapacității organismului de a stopa tumoarea am evidențiat mai sus ineficiența mecanismelor pro-apoptotice, p53 mediate. Totuși, multe exemple din viață, de mediu, precum și din filosofia chineză indică la existența unui echilibru dintre lucruri sau fenomene, diametral opuse după proprietăți. Altfel spus, dacă mecanismele pro-apoptotice nu funcționează potrivit de bine, care este situația cu factorii anti-apoptotici, cum ar fi receptorul BCL2.

Celule BCL2 pozitive. Markerul BCL2 este pe larg studiat datorită funcțiilor sale controversate, pro- și anti-apoptotice [245]. Inițial a fost determinat rolul anti-apoptotic. Implicarea BCL2 în oncogeneză este realizată grație capacității sale de a transforma și immortaliza celulele de comun acord cu genele c-myc, ras sau gene virale. Totuși, acest marker mai are proprietatea de a bloca celulele, fie în faza G₀ sau în punctul de restricție a G1, înainte de faza sintetică. Aceste funcții diametral opuse clasifică BCL2 atât în rândul markerilor anti-proliferativi, cât și pro-apoptotici.

Ferrieres și coaut. (1997) au determinat că, expresia acestui marker este în funcție de faza ciclului ovarian-uterin, evidențiind cote maxime ale pozitivității în faza foliculară, cu diminuare drastică în faza glandulară [80]. Aceste rezultate au fost susținute și în lucrarea lui Navarrete și coaut. (2005), care susțin sporirea proliferării celulare și diminuare a expresiei BCL2 în faza

luteală [164]. Influența hormonală asupra expresiei BCL2, a fost confirmată și în studiul lui Sabourin și coaut. (1994), care în plus au evidențiat expresia preferențială a BCL2 în epitelocitele lobulare, comparativ cu cele ductale [211]. Însă, conform datelor lui Nathan și coaut. (1994) acest receptor este expresat doar de celulele luminale, mioepitelocitele fiind o excepție [163]. Rezultate asemănătoare au prezentat Luna-More și coaut. (2004), care au specificat că, celulele BCL2 pozitive sunt doar în compartimentul luminal, formând grupuri BCL2⁺ înconjurate de celule luminale BCL2 negative [149]. Autorii au lansat ipoteza precum că aceste celule BCL2 pozitive sunt progenitoarele comitate luminal. În studiul de față am determinat că, expresia BCL2 în glanda mamară neafectată se realizează sub formă de grupuri sporadice sau fâșii continui, cu sediu predilect luminal. Celulele mioepiteliale nu au prezentat acest marker. Unicele celule BCL2 pozitive determinate în stroma lobulară au fost apreciate morfologic drept limfocite.

Conform datelor lui Hamilton A. (2000), expresia BCL2 deopotrivă cu prezența HER2 și p53 are ca punct de aplicare individualizarea managementului clinic pentru fiecare pacient în parte, prin prezicerea răspunsului adecvat la chimioterapie, tratamentul hormonal sau radioterapie [104]. Grație funcției sale anti-apoptotice BCL2 este considerat un factor important în modularea tratamentului hormonal, unde pacienții cu scor înalt al expresiei acestui marker beneficiază mai mult în cadrul terapiei endocrine [91]. Paradoxal, însă supra-expresia BCL2, comparativ cu p53, este asociată cu un diagnostic mai favorabil, mai ales în cazul tumorilor ER pozitive. Pe de altă parte datele lui Yang D. (2013) pledează pentru cuantificarea acestui marker, considerându-l drept factor predictiv, în special la selectarea chimioterapiei bazate pe antraciclone [272].

Totodată au fost prezentate și date controversate despre BCL2. Kavgaci H. (2010) consideră detectarea BCL2 drept nejustificată, explicând prin absența datelor statistice veridice cu impact asupra pronosticului [122]. Mai mult, au fost raportate opinii diametral opuse rolului favorabil al BCL2, în care se susține că prezența acestei proteine pledează în favoarea unui cancer agresiv, pro-metastatic. Date asemănătoare au fost propuse de Del Bufalo și coaut. (1997) care consideră, că supraexpresia BCL2 vorbește despre potențialul metastatic crescut al tumorii, ceea ce pledează iarăși în favoarea ipotezei precum, că scorul BCL2 ar caracteriza agresivitatea tumorii [63]. Totuși, datele prezentate de Rochaix și coaut. (1999), precum că tumorile cu gradul de diferențiere G1 prezintă BCL2 în 100%, iar cele G2, 81% sau G3 în 60% vorbesc elocvent în susținerea rolului benefic al BCL2 [205]. Acest date sunt susținute și de rezultatele prezentului studiu. În contradicție, Binder și coaut. (1995) au prezentat o corelație semnificativă, inversă dintre gradul histologic și expresia BCL2, confirmată mai târziu și de

Ermiah E. (2013) [25, 74]. Trebuie să menționăm că, în cadrul prezentului studiu corelația inversă nu a atins praguri statistice veridice. Totuși, Callagy și coaut. (2006) consideră că gradul histologic este mai relevant în asociere cu stadiul de implicare a nodurilor limfatici și dimensiunea tumorii, combinații cunoscute de morfologi drept Indice de Pronostic Nottingham [35]. Autorii consideră că, acest indice este cel mai elocvent factor de predicție, capabil de a atribui și un scor pronostic individual fiecărui pacient în parte, iar BCL2 are un rol pronostic adjuvant, valabil în special pentru primii 5 ani de la stabilirea diagnozei.

Deși majoritatea cercetătorilor susțin drept bază rolul anti-apoptotic al BCL2, funcție ce ar trebui teoretic să stimuleze proliferarea celulară și respectiv potențialul metastatic, expresia pozitivă a acestui marker este paradoxal evaluată drept un pronostic favorabil pentru pacient [35]. Relativ recent, Ermiah și coaut. (2013) au determinat că tumorile BCL2 pozitive au o incidență net inferioară a recurențelor comparativ cu carcinoamele BCL2 negative, exprimat și prin supraviețuire mai bună în decursul a 4 ani [74]. Rezultate contradictorii au fost postate de Yang D. și coaut. (2013), care au relatat corelații statistice semnificative dintre absența expresiei BCL2 și pronosticul favorabil [272].

Prezența datelor contradictorii despre rolul BCL2 în tumorile mamare poate fi explicat din mai multe puncte de vedere, precum funcție adițională, necunoscută a BCL2, eterogenitatea grupurilor de studii, diferențele dintre metodele imunohistochimice utilizate la depistarea BCL2 [278]. Neomogenitatea datelor de asemeni este susținută și de pragul pozitivității BCL2, diferit de la un caz la altul. Drept exemplu, Lee și coaut. (2007) au considerat tumoarea BCL2 pozitivă la un prag „>0%”, iar Dumontet și coaut. (2010) au atribuit carcinomul în grupul BCL2⁺ la un prag de „>70%” celule pozitive [68, 134].

BCL2 are un rol important în modularea tratamentului hormonal. Binder și coaut. (1995) au presupus că pierderea expresiei BCL2 trebuie considerată drept efect succesiv al pierderii ER și PR, a posibilitii dediferențieri sau proliferării anormale [25]. Gee și coaut. (1994) au determinat că expresia receptorilor hormoni este strict asociată de prezența BCL2, rezultate confirmate mai târziu și de alți cercetători [91, 142]. Cercetătorii au presupus că, activitatea acestei proteine, ca și PR poate fi reglată de către estrogeni, efect mediat prin receptorul ER. Această idee este susținută și prin efectul benefic al tratamentului anti-hormonal înregistrat în tumorile BCL2 pozitive, comparativ cu cele BCL2 negative. Mai mult, expresia BCL2 a prezis cu mai multă acuratețe efectul terapiei endocrine decât statusul receptorilor pentru estrogeni, iar pacienții cu tumori BCL2⁺-ER⁺ au răspuns cel mai bine la terapia endocrină. Rezultatele prezentului studiu confirmă datele publicate de Gee și coaut. (1995): în 63 cazuri/67.7% de tumori NOS a fost atestat fenotipul BCL2⁺-ER⁺, iar în 53 cazuri/57% fenotipul BCL2⁺-PR⁺. În

carcinomul lobular expresia BCL2⁺-ER⁺ s-a determinat în 10 cazuri/55.6%, iar fenotipul BCL2⁺-PR⁺ în 9 cazuri/50% [91].

În literatura de specialitate expresia BCL2 este considerată nespecifică pentru tumorile HER2⁺ și EGFR⁺ (25, 91). Petry și coaut. (2010) consideră că, ERBB2 poate bloca apoptoza, efect realizat prin alterarea expresiei BCL2 [183]. Autorii consideră că acțiunea în cauză are un pronostic nefast. Combinația BCL2⁺-HER2⁺ am determinat-o în 12 cazuri/12.9% de tumori NOS, iar fenotipul nefast BCL2⁻-HER2⁺ descris de autori, în 8 cazuri/8.6%. În cazul carcinomului lobular 2 cazuri/11.1% au prezentat supresia BCL2 de către HER2. În ceea ce privește implicarea EGFR, am determinat combinația BCL2⁻-EGFR⁺ în 3 cazuri/7.5% de carcinom NOS, fenotip neîntâlnit în tumorile lobulare. Trebuie să menționăm că, cazurile manifestate prin supresia BCL2 de către HER2 au evoluat fără implicarea EGFR, și vice versa.

Dawson și coaut. (2010) au stabilit că BCL2 are o valoare pronostică în funcție de subtipul molecular, iar expresia acestuia este independentă de stadiul bolii, gradul de diferențiere și dimensiunea tumorii [60]. Cazurile cu patern ER⁺/BCL2⁻ au fost considerate mai agresive decât cele semnate ER⁻/BCL2⁺. În studiul de față au predominat tumorile luminales, astfel majoritatea cazurilor BCL2 pozitive a revenit carcinoamelor Luminal B și Luminal A.

Funcția anti-apoptotică a BCL2 ar pleda în susținerea activității proliferative înalte a tumorii. Însă Gee și coaut. (1994) nu au determinat asocieri statistice cu markerul proliferativ Ki67 [91]. Mai mult, Binder și coaut. (1995) și Zaha și coaut. (2012) au semnalat corelații inverse dintre expresia BCL2 și Ki67 [25, 276]. În cadrul prezentului studiu cazurile BCL2 pozitive evaluate cu un indice proliferativ înalt, precum și combinația BCL2⁺-Ki67^{LOW} au prezentat incidențe egale, constituind 36 cazuri/38.3%. Însă trebuie să menționăm că, tumorile BCL2 negative au manifestat preponderent calități proliferative agresive (18 cazuri/19.1%). Spre deosebire de tumorile NOS, toate cazurile de carcinom lobular au fost considerate slab proliferante, indiferent de expresia BCL2.

În opinia lui Korsching E. (2002) tumorile mamare CK5 pozitive pot fi caracterizate imunohistochimic ca estrogen și progesteron negative, înalt proliferative și BCL2 negative [128]. În studiul de față majoritatea tumorilor NOS, BCL2 pozitive au fost CK5 negative (64 cazuri/71.1%), iar fenotipul CK5⁺-BCL2⁻ s-a manifestat în 7 cazuri/7.8%. Aceleași tendințe au fost semnalate și în cazul carcinomului lobular, unde doar 1 caz/5.6% a fost caracterizat ca CK5⁺-BCL2⁻.

Într-o poveste finalul de obicei este unul fericit, binele afirmându-și supremația asupra răului. În cazul carcinomului mamar, binomul pro/anti-apoptotic sugerează insuficiența ambelor mecanisme. În 14 cazuri/15.1% tumorile ductale au fost BCL2 negative, expresând totodată din

abundență p53. Varianta opusă, adică BCL2⁺-p53⁻ s-a determinat mai frecvent, în 31 cazuri/33.3%. Totuși apogeul (40 cazuri/43%) l-au atins tumorile cu dublă expresie, BCL2⁺-p53⁺, în care mecanismele anti-apoptotice, BCL2 intermediare „susțin” creșterea tumorii, în pofida prezenței p53. De ce? Cel mai probabil, după cum am expus mai sus proteina p53 în aceste cazuri este una aberantă, non-funcțională, obținută în urma mutației de genă p53. Aceleași interrelații procentuale BCL2-p53 s-au determinat și în cazul carcinomului lobular.

Scopul lucrării date a fost de a elucida dacă metastaza limfonodală este identică cu tumoarea primară, implicit și pentru markerii apoptotici. Cele 3 fenotipuri înregistrate la compararea BCL2/p53, precum și gradarea expresiei acestor proteine susține eterogenitatea celulelor din tumoarea primară, care posibil se va reflecta prin activități metastatice diferite. Zis și făcut: BCL2 este instabil pe parcursul metastazării, situație înregistrată în 23 cazuri/26.4%, dintre care pierderea acestui receptor în sediul limfonodal s-a determinat în 21 cazuri. În cazul tumorilor lobulare s-a determinat doar pierderea BCL2 în procesul de metastazare (4 cazuri/22.2%). Rezultatele prezentului studiu vin în contradicție cu datele raportate anterior de către alți cercetători, care susțin preponderent, fie achiziția de BCL2 de către metastază [130, 156, 234] fie afirmă stabilitatea acestui marker [11]. Drept explicație a acestor divergențe poate servi pragul diferit al pozitivității BCL2. În plus, pacienții din studiul dat nu au primit tratament neoadjuvant precum în lucrările precedente. De asemenea, drept cauză plauzibilă ar fi și numărul diferit de cazuri analizate, precum Mimori și coaut. (2005) au analizat 6 cazuri [156], iar Arun și coaut.(2003) [11] și Kristek și coaut. (2007) câte 60 cazuri [130]. Importantă e și metoda utilizată pentru evidențierea BCL2: Mimori și coaut.(2005), spre deosebire de celelalte lucrări au folosit tehnici *microarray* de evidențiere a markerilor [156].

Arun și coaut. (2003) au determinat că expresia p53 corelează invers față de prezența BCL2 [11]. În studiul de față această corelație nu a atins praguri statistic veridice (Anexa A). Totuși, dacă am compara numărul de cazuri instabile, BCL2 este lider al instabilității, comparativ cu p53. Ultimul însă își lasă amprenta asupra comportamentului BCL2: din cele 21 cazuri evolute cu pierderea BCL2 în metastază, în 11 cazuri p53 s-a menținut stabil pozitiv, în 2 cazuri a dispărut, în 2 cazuri s-a manifestat și în 6 cazuri a fost stabil negativ.

Una din proprietățile nefaste ale tumorilor maligne este caracterul proliferativ intens al celulelor tumorale, iar măsurarea acesteia până și după metastazare am considerat-o ca necesitate vădită a lucrării date.

Celulele Ki67 pozitive. Gradarea histologică reprezintă o evaluare a nivelului de diferențiere având la bază capacitatea tumorii de a forma structuri tubulare, pleomorfismul nuclear și activitatea proliferativă sau indicele mitotic al tumorii, considerat de mulți oncologi

drept indice al agresivității. Gradarea histologică are o valoare pronostică, pacienții cu gradul G1 având rata de supraviețuire mult mai mare comparativ cu G2 și G3. Totuși, determinarea gradului histologic are la bază și o anumită marjă de subiectivitate, depinzând vădit de gradul de calificare al morfologului. În plus, gradarea histologică poate fi aplicată doar la caracterizarea tumorii primare. Astfel a apărut necesitatea dezvoltării a unui marker evaluat cantitativ, capabil de a marca limita dintre tumori cu grad de proliferare diferit, cu aplicare și în sediul metastatic. Rolul i-a revenit markerului nuclear Ki67, ulterior acceptat pe larg în practica oncologică.

Ki67 este o proteină nucleară non-histonă, considerată drept marker al proliferării. În interfază aceasta este dispersată în tot nucleul, iar în mitoză se determină de-a lungul cromozomilor. Imunohistochimic acest marker se determină în toate fazele ciclului celular, cu excepția G0. Conform datelor raportate de Pavelic și coaut. (1992) procentul celulelor mamare activ proliferante este de cca $0,91 \pm 0,31\%$ [177]. În cadrul acestui studiu am confirmat prezența unicelor epiteliocite Ki67 pozitive în glanda mamară neafectată, indiferent de faza ciclului ovarian-uterin [279].

Numeroase studii de profil au pus în evidență valoarea pronostică a acestui marker în diverse tumori. În cazul carcinomului mamar, Ki67 a demonstrat o corelație înaltă cu gradul de diferențiere și vârsta pacientelor. Mai mult, în cazul prezentului studiu am determinat că intensitatea expresiei Ki67 nu este în funcție de tipul histologic al carcinomului mamar și vârsta pacientelor. Raportat la gradul de diferențiere al tumorii am stabilit că modelul clasic nu întocmai reflectă agresivitatea tumorii. Astfel orice grad de diferențiere G1, G2 sau G3 poate manifesta activitate proliferativă Ki67 măsurată, atât marcantă cât și redusă. Totuși, eseu statistic de corelare a pus în evidență legături veridice, pozitive dintre Ki67 și gradul de diferențiere histologică, astfel oferindu-i ultimului capacitatea de a mai fi încă utilizat, cel puțin în calitate de screening test.

Majoritatea cazurilor examinate în studiul dat au prezentat tumori cu activitate proliferativă înaltă. În opinia lui Keam și coaut. (2011) indicele Ki67 înalt vorbește în favoarea obținerii unui răspuns adecvat la chimioterapie comparativ cu tumorile slab proliferante, deși pronosticul rămâne a fi unul rezervat [123]. Conform datelor lui Joensuu și coaut. (2013) indicele Ki67 definește 2 tipuri de tumori: expresia sporită este caracteristică pentru tumori rapid-recurente, iar un Ki67 redus caracterizează un carcinom tardiv-recurent [120]. Rao și coaut. (2013) au evidențiat că carcinoamele mamare tind să prolifereze activ, iar această tendință este mai exprimată în cazul tumorilor CK5 negative [198].

Ki67 s-a dovedit a fi și un marker predictiv, în special pentru utilizarea chimioterapiei în dependență de faza ciclului celular, cum ar fi în cazul 5-fluoruracilului, antraciclinelor. Koda și

coaut.(2004) au raportat activitatea acestui marker drept direct proporțională de gradul de diferențiere al tumorii și statusul limfonodal [126]. Compararea tumorii primare cu metastaza limfonodală i-a permis lui Buxant și coaut.(2002) să susțină că celulele metastatice sunt mai activ proliferante, comparativ cu cele care formează masa principală a tumorii primare [32]. Autorii au lansat două ipoteze privind sursa celulelor metastatice: una presupune că aceste celule sunt din start agresive, din care motiv și metastazează, alta pledează pentru absența în sediul metastatic a unor factori de supresiune tumorală. Aceste date au fost susținute și de rezultatele lui Cabibi și coaut. (2006), pledând pentru agresivitatea mai mare a metastazelor [34]. Conform studiului de față, susținem statistic că Ki67 corelează pozitiv cu același marker nuclear din sediul metastatic, sugerând fie stabilitatea acestui marker sau omogenitatea celulelor tumorale în ceea ce privește expresia Ki67.

Cabibi și coaut. (2006) au evidențiat 16% de cazuri în care metastazele s-au dovedit a fi mai slab proliferante comparativ cu tumoarea primară [34]. Punctul slab al acelu studiu ar putea fi considerat grupul neomogen de tumori utilizat în studiu (tip NOS, apocrin, mucinos, lobular, tubulo-lobular). În cazul studiului de față au fost selectate doar cazuri de carcinom NOS și lobular invaziv, ceea ce conferă credibilitate celor 20 cazuri/22.8% de transfer al valorii Ki67 în LNM peste pragul de 14% definitiv. Rezultatele obținute, însă, susțin datele lui Cabibi și coaut. (2006), prezentând 17%/15 cazuri de diminuare a activității proliferative a celulelor metastatice derivate din tumoare NOS [34]. Restul, 5 cazuri/5.7% s-au manifestat prin proliferare sporită a metastazei față de tumoarea primară, ceea ce vine în susținerea posibilității de agravare a indicelui de proliferare propus de Bruyant și coaut. (2002) [32]. Trebuie de subliniat, că cazurile Ki67 instabile au inclus doar tumori cu grad G2 și G3 de diferențiere, iar divergențe dintre activitatea proliferativă a metastazelor și tumoarea primară mai frecvent se atestă la pacienți de „după 49” ani.

Tipul histologic al tumorii totuși, apare important în cazul carcinomului NOS evidențiind instabilitatea Ki67 atât în direcția pierderii, cât și achiziție, pe când în cazul tumorilor lobulare singurul caz diferit a evoluat doar în direcția intensificării proliferației tumorale în sediul metastatic. Considerăm că aceste divergențe necesită o confirmare suplimentară din partea altor cercetători pe un lot de cazuri mai mare. Cele raportate ne permit să susținem că Ki67 este instabil pe parcursul metastazării, iar determinarea lui la nivelul LNM ar putea avea un rol pronostic și predictiv.

Până la acest moment am discutat expresia markerilor utilizați în studiu la nivel de tumoare primară și LNM, iar compararea rezultatelor vorbește elocvent că receptorii celulelor canceroase nu sunt stabil exprasați, ori că tumoarea primară este formată din clone celulare cu diferit

potențial metastatic. În favoarea acestor ipoteze vorbesc și datele prezentate de Heitz și coaut. (2013) [107]. Autorii au stabilit că tumorile primare care inițial au fost ER sau PR sau HER2 pozitive, dezvoltând recurențe au devenit negative pentru ER în 22.8%, PR în 41.4% și HER2 40.8%! Da, nesăbuite sunt căile Domnului și profilul molecular al carcinomului mamar.

Dacă markerii nu sunt stabili, oare ce-o fi cu subtipurile moleculare ce au la bază acești markeri?

Subtipurile moleculare. Opiniile referitor la stabilitatea profilului molecular al carcinomului de sân sunt împărțite. Perou și coaut. (2000) au determinat că „programul molecular” al tumorii primare se menține și la nivelul metastazelor [180]. Altfel spus, dacă profilul molecular al tumorii primare are o anumită valoare predictivă, aceasta automat se va atribui și metastazei sale. Pe de altă parte există un șir de evidențe, inclusiv studiul de față care subliniază, că profilul molecular al celulei metastatice nu este stabil în evoluție. Weigelt și coaut. (2010) consideră că multiplele expresii morfologice ale carcinomului mamar, diversificate după gradul de diferențiere, expresia receptorilor presupune etiologia lor diferită [257, 258]. Falck și coaut. (2013) au determinat că, fenotipul carcinomului nu este stabil pe parcursul evoluției, prezentând diferențe de subtip între tumoarea primară și metastaza limfonodală la 11% pacienți, deși în cadrul prezentului studiu aceste diferențe sau atestat la ¼ din cazuri [77]. Prat și coaut. (2010) au subliniat că, carcinomul mamar este celular neomogen, iar unele celule, în special cu fenotip-stem (CD44⁺/CD24⁻) sunt mai rezistente la terapie și mai activ metastatic [189]. În plus, după Weber și coaut. (2006), microambianța tumorală nu numai că are semnătură genetică diferită în funcție de fenotipul carcinomului, dar și promovează transformările neoplazice [256]. Korsching și coaut. (2002) consideră că în glanda mamară există diverse celule diversificate în subtipuri celulare capabile de a dezvolta tumori diferite după aspect, semnătura genetică și evoluție clinică [128]. Studiul profilului genetic i-a permis lui Perou și coaut. (2000) să definească molecular carcinomul mamar drept o patologie eterogenă, evidențiind câteva subtipuri moleculare, suplinate, modificate și diversificate cu fiecă an [180]. Majoritatea (80%) tumorilor mamare au fost considerate hormon-pozitive, evidențiind subtipurile Luminal A și Luminal B [190]. La fel și în cazul acestui studiu în structura moleculară a carcinomului mamar de tip NOS au prevalat combinațiile de markeri proprii grupului Luminal. De asemenea am stabilit că odată cu creșterea gradului de diferențiere a subtipului molecular, de la bazal spre luminal, tumorile pierd un șir de markeri precum HER2, Ki67, CK5, p53, EGFR și tind să expreseze ER, PR, BCL2, ceea ce corespunde cu conceptul de diferențiere a epitelului mamar neafectat, propus de Visvader J. (2009) [252]. Trebuie de menționat că tumorile Luminal A de rând cu caracteristicile sale de bază, precum că sunt hormon-dependente (ER, PR), HER2, CK5,

p53, EGFR negative, au afinitatea de a expresa din abundență BCL2 și E-cadherina. Astfel se conturează ipoteza că aceste tumori ar metastaza mai rar grație prezenței joncțiunilor aderente, și ar fi mai puțin agresive în cazul absenței p53 aberant și activității înalte a BCL2. Drept un paradox statistic am putea numi asocierea pozitivă, a expresiilor ER și p53 cu Ki67 în subtipul Luminal A: deși sunt caracterizate drept tumori cu predilecție slab proliferative, cazurile unde celulele tumorale prezintă din abundență receptorii pentru estrogeni și/sau p53 tind să fie mai agresive (după valoarea Ki67), presupunând „surprize” nefaste. Astfel subtipul Luminal A poate fi subdivizat, cel puțin în 2 subgrupuri, p53 pozitive și p53 negative. Deși una din caracteristici ale Luminal A a fost expresia din abundență a E-cadherinei, astfel de tumori oricum metastazează și în noul mediu tind să mențină expresia ER, PR, Ki67, BCL2, p53, EGFR și E-cadherina la nivel același nivel ca și în tumoarea primară. Mai mult, după cum am indicat unele tumori Luminal A au fost instabile pe parcursul metastazării, iar direcția transferurilor indica o posibilă dediferențiere. Sau poate nu, poate tumoarea primară a fost apriori neomogenă?

Tumorile Luminal B exprimă ER, PR, AR, BCL2, E-cadherina și sunt activ proliferante. Comparativ cu Luminal A, acest subtip înregistrează cote înfricoșătoare la capitolul prezența proteinei p53 aberante. În structura tumorilor Luminal B am determinat predominarea subtipului Luminal B/Ki67. Altfel spus, celulele generatoare de tumori Luminal B sunt agresiv proliferante, comparativ cu Luminal A. Totuși și acest subtip este neomogen. După Perou și coaut. (2000) acest subtip a fost subdivizat în Luminal B/Ki67 și Luminal B/HER2, care reflectă anumite stadii din diferențierea normală a epiteliului normal [180]. Neomogenitatea acestui subtip a fost punctată pentru prima dată în cadrul studiului de față, subdivizând cazurile cu expresie adițională a HER2 în Luminal B/HER2 (cu proliferare redusă) și Luminal B/HER2/Ki67 (cu proliferare marcată). Ultimul subtip a prezentat chiar o incidență net superioară față de cazurile cu indice Ki67 redus. Proliferarea activă a tumorilor Luminal B este susținută și de prevalența numerică a subtipului Luminal B/HER2/Ki67 față de Luminal B/HER2. Similar cazurilor Luminal A, tumorile Luminal B în pofida expresiei E-cadherinei metastazează, iar tumorile nou formate exprimă similaritate cu sediul primar, cel puțin statistic. Oricum subtipul Luminal B de asemeni este instabil la metastazare, care în majoritatea cazurilor a „evoluat” într-un subtip mai diferențiat, Luminal A. Importanța proliferării active în comportamentul tumorii s-a evidențiat încă odată, cazurile activ proliferante fiind cele mai instabile la metastazare.

Ambele subtipuri Luminale discutate până acum, pot fi diversificate și mai mult dacă am analiza pozitivitatea CK5 comparativ cu expresia ER, PR, HER2. Astfel se conturează după cum am descris mai sus subtipurile BasoLuminal și BasoLuminalHER2, primul pe larg mediatizat de

cercetători, altul presupus acum. Rămâne neclar dacă același tip de celule prezintă simultan CK5 cu alți receptori, sau sunt clone diferite. O posibilă soluție ar fi dubla, tripla imunocolorare.

Tumorile HER2 pozitive s-ar presupune a fi omogene și de ce nu? Un singur marker îi definește numele și tratamentul, HER2. În lucrarea dată am stabilit că acest subtip tinde să piardă expresia BCL2 odată cu înaintarea în vârstă a pacientelor, astfel diversificând pronosticul și subtipul în HER2-BCL2⁺ și HER2-BCL2⁻.

Prezența HER2 a corelat statistic cu diminuarea gradului de proliferare Ki67 și expresia CK5, totodată sporind șansele de achiziție de către celulele tumorale a markerului p53. Totuși expresia concomitentă a CK5 în unele cazuri, presupune delimitarea unui nou subtip, BasoHER2. Puțin? Atunci HER2 mai poate fi activ și slab proliferant. În plus, un paradox statistic, poate fi spus chiar caracteristic lui HER2, ar putea fi considerată corelația pozitivă a BCL2 și p53 în cadrul acestui subtip. Metastazele dezvoltate de tumorile HER2 am demonstrat că își păstrează același profil molecular, cu excepția că devin mai agresiv proliferante. Acest fapt pledează încă odată în favoarea divizării HER2 după valoarea indicelui Ki67. Neomogenitatea subtipului HER2 presupune și comportament diferit la metastazare: acest subtip nu este stabil pe parcursul metastazării, transferurile evaluând doar cu achiziționarea de receptori hormonali.

Tumorile Triplu negative în opinia lui Prat și coaut. (2011) sunt confirmate prin absența expresiei receptorilor hormonali și HER2, subtipul Basal-like fiind separat de 5NP odată cu prezentarea a CK5/6 și/sau EGFR [190]. Am evidențiat grupul de cuvinte și/sau fiindcă prin asta apriori subliniem eterogenitatea acestui subtip, indicând cel puțin 3 fenotipuri de tumori Basal-like: CK5/6⁺, EGFR⁺, CK5/6/EGFR⁺. În plus, Badve și coaut. (2011) în 18-40% cazuri de carcinom Basal-like definit după profilul genetic au definit imunohistochimic un alt fenotip, și invers în 8-29% din carcinoamele Basal-like, definite cu markeri surogați, nu au coincis după profilul genetic [15]. Eterogenitatea acestui tip poate fi descoperită și prin prisma evoluției definiției sale imunohistochimice, precum: absența expresiei ER, PR și HER2, expresia a uneia sau mai multe citokeratine bazale (CK 5/6, CK14, CK17), absența expresiei ER și HER2 în concordanță cu expresia pozitivă a CK5/6 și/sau EGFR [97].

De menționat, că EGFR pozitiv a fost determinat în 54% cazuri concomitent cu CK5/6 pozitiv și în 11% cazuri cu CK5/6 negativ. Prezența acestui marker (EGFR) a fost asociată unui pronostic nefavorabil, indiferent de statusul limfonodal.

În plus, însăși Prat and Perou (2011) au certificat eterogenitatea subtipului Basal-like, punând în discuție cauza prezenței în 10% cazuri și a receptorilor hormonali, adică Luminali [190]! În ceea ce privește stabilitatea acestor subtipuri am determinat un singur caz de transfer

de la Basal-like la 5NP în urma metastazării. O cauză posibilă ar fi numărul mic de tumori ce dezvoltă subtipuri Triplu negative.

Cele relatate până acum au ținut de subtipurile moleculare dezvoltate de carcinomul de tip NOS. Care ar fi specificul celui de-al doilea după incidență carcinom mamar, lobular? Cel puțin morfologic îl deosebim. Drept caracteristică imunohistochimică clasică acestui subtip poate fi considerată absența expresiei E-cadherinei, ceea ce ar predispuce acest tip de tumori să metastazeze mai ușor și precoce. Deși absența acestui marker e tipică, totuși diagnosticarea tumorilor lobulare care sunt E-cadherin pozitive presupune existența subtipurilor intrinseci în cadrul acestui tip de cancer. În plus am putea delibera doar întrebând: sunt aceste tumori E-cadherin pozitive lobulare, precum și cazurile de tumori NOS E-cadherin negative? În urma comparării rezultatelor imunohistochimice ale acestor 2 tipuri de carcinom, NOS și lobular am delimitat o serie de rezultate ce le fac diferite imunohistochimic:

1. Tumorile Luminal A dezvoltate de carcinomul lobular spre deosebire de cel ductal sunt p53 pozitive;
2. Metastazele cu transfer de scor a subtipului HER2 dezvoltat de tumorile lobulare evoluează nu în direcție luminală, ci bazală;
3. Subtipul Luminal B dezvoltat de carcinomul lobular invaziv spre deosebire de cel ductal nu expresează E-cadherina.

În baza celor expuse putem concluziona că carcinomul mamar are o mulțime de expresii morfologice, numărul cărora poate fi ușor depășit prin expresiile imunohistochimice variate. Drept dovadă elocventă servește încercarea autorului de a grupa subtipurile moleculare în dependență de expresia markerilor incluși în studiu (Anexa D). Astfel nu am depistat o combinație sau legitate proprie unui subtip. Fiecare tumoare s-a prezentat imunohistochimic ca un caz individual, ceea ce indică necesitatea stringentă de dezvoltare a tratamentului personalizat.

Studiul de față are și câteva restricții. Tumorile au fost clasificate în conformitate cu statusul imunohistochimic a markerilor surogați pentru receptorii ER, PR, Ki67, CK5 și HER2, ceea ce reprezintă doar o aproximație a studiilor genetice de determinare a fenotipului de carcinom mamar. Însă, testele IHC sunt mai atractive în aspect financiar și utilizarea lor în clinică a fost certificată de majoritatea specialiștilor în domeniu. Un alt aspect este că, subtipul Basal-like după Carey și coaut.(2006), este definit ca „ER negativ, PR negativ, Her-2 negativ, citokeratina 5/6 pozitivă și/sau HER-1 pozitiv” [38]. Datorită faptului că în studiul de față, markerul EGFR nu a fost utilizat în toate cazurile, este posibil ca unele cazuri 5-NP de facto să aparțină subtipului molecular Basal-like. În literatură subtipul molecular 5-NP a fost descris

drept mai puțin agresiv decât Basal-like, dar mult mai periculos după evoluția bolii decât tumorile cu subtip Luminal A. Dat fiind faptul că scopul acestei lucrări nu a constat în stabilirea unor indici pronostici sau predictivi, nu ne permite să continuăm această idee. Mai mult ca atât, e posibil ca alte subtipuri moleculare din grupurile non-luminale să fi fost cuantificate ca tumori Basal-like. Acestea sunt subtipurile Claudin-low (ce se referă histologic la cancerul mamar metaplastic, cu particularități genetice similare celui cu celule stem-linkat și prin tranziție epitelio-mezenchimală), precum și subtipul molecular Apocrin, caracterizat prin reacție pozitivă la receptorii de androgeni. Oricum, la moment, nu este trasată o abordare diferită a conduitei terapeutice pentru subtipurile din grupul triplu negativ, aceasta reprezentând un domeniu de cercetare ce rămâne a fi explorat pe viitor.

Astfel, toate datele din literatură, suplimentate cu rezultatele prezentului studiu vorbesc elocvent că metastaza carcinomului mamar este diferită de tumoarea primară, cel puțin după un criteriu, morfologic sau imunohistochimic. În favoarea celor expuse vorbesc elocvent și rezultatele cultivării tumorii pe membrana corioalantoidă unde la compararea expresiei ER, PR, HER2 și CK5 din tumoarea primară cu celulele tumorale diseminate în implant am evidențiat schimbarea subtipului în 90,9% (20 cazuri), dintre care în 12 cazuri (54,4%) celulele invadate au dezvoltat un fenotip mai diferențiat, caracteristic subtipului Luminal A, iar în 7 cazuri (31,8%) au prezentat caracteristici proprii subtipului 5NP și într-un caz (5,4%) au prezentat fenotipul HER2, deși tumoarea primară, cât și metastaza au fost identificate drept Luminal B/HER2. Doar 2 cazuri, Luminal A și Luminal B/HER2 nu au suferit un transfer de subtip.

Până la acest moment am pus accent pe eterogenitatea celulară a tumorii primare, dar cred că o cota parte de vinovăție în problema stabilității carcinomului mamar la metastazare, revine și mediului microambiant, în care se pomenește celula canceroasă.

Mediul microambiant diferit. În opinia lui Schedin P. (2006) microambianța are un rol crucial în tumorigeneză [216]. Celulele stem mamare (CSM) sunt în permanență influențate de celule adiacente. Conform lui Spradling și coaut. (2001) în jurul acestor celule persistă o microambianță specializată, denumită nișa celulei stem, care pe de o parte susține profilul stem al acestor celule, pe de alta controlează diferențierea lor [231]. În plus Brisken et al. (2007) consideră că nișa este implicată și în promovarea invaziei metastatice a tumorilor bazale [31]. În opinia lui Visvader J. (2009) celulele stem din mugurii terminali al TDLU sunt în permanent contact cu stroma, datorită faptului că membrana bazală în acest segment este întreruptă [252]. De rând cu fibroblastele în vecinătatea nișei se regăsesc adipocite, celule endoteliale, limfocite, macrofage ceea ce face studierea nișei mult mai intrigantă. Dat fiind faptul că țesutul adipos conține celule stem pluripotente, cu efect stimulator asupra angiogenezei tumorale, este pe larg

mediatizat rolul țesutului adipos drept cauză posibilă a recurențelor [(21, 22)]. Prezența limfocitelor asociate-tumorii este un indice predictiv independent în favoarea antraciclinelor și taxanilor în tratamentul neoadjuvant [64]. În cazurile ER și HER2 negative asociate cu metastaze, asocierea infiltrației limfocitare în decursul tratamentului este considerat de Loi S. (2013) drept indice excelent de pronostic [146].

Importanța nișei CSM a fost demonstrată cu lux de amănunte de Boulanger și coaut. (2007) la infiltrarea în țesutul adipos al glandei mamare a celulelor cu potențial spermatogen [29]. Aceste celule testiculare, reprogramate au fost capabile să reconstituie întregul arbore mamar, chiar și după câteva transplantări succesive. O fi oare posibil ca în mediul LNM din aceste celule să obținem un nou fenotip tumoral? Posibil, dar trebuie de luat în calcul și gazdele metastazei – limfocitele. A dezvolta teoretic o posibilă influență a limfocitelor ar fi plauzibilă dacă a-și fi dispus, cel puțin de rezultate cantitative, comparative a conținutului lor din stroma mamară și LNM. Pe de altă parte dezvoltarea tumorii deja indică că imunitatea este compromisă, iar căutarea celui vinovat la acest capitol ar fi de domeniul a unei noi cercetări.

CONCLUZII GENERALE

1. Microambianța are o influență substanțială, imprevizibilă, stimulatorie sau inhibitorie în dezvoltarea tumorii. Schimbul profilului molecular la metastazare are valoare pronostică și predictivă – toate acestea argumentează necesitatea studiilor în domeniu (capitolul 1).
2. În glanda mamară neafectată celulele epitelului glandular prezintă o anumită garnitură de receptori în dependență de stadiul de diferențiere. Expresia receptorilor indică nivelul de origine a tumorii (capitolul 3.1).
3. Majoritatea tumorilor mamare derivă din celulele grupului Luminal de diferențiere. Toți markerii studiați (ER, PR, AR, HER2, CK5, EGFR, BCL2, p53, Ki67, E-cadherina) nu sunt stabili pe parcursul metastazării, ceea ce necesită revizuirea principiilor tratamentului personalizat (capitolele 3.2 – 3.9).
4. Transferurile de scor la metastazare a CK5, Ki67 și E-cadherinei sunt în funcție de tipul histologic al tumorii. Aceste date pot fi utilizate în calitate de criterii de diagnostic diferențial dintre tipurile ductale și lobulare de carcinoame invazive (capitolele 3.4, 3.5, 3.7).
5. Epiteliul glandular mamar antrenat în oncogeneză este predispus de a genera defecțiuni a mecanismelor apoptotice. Markerii apoptotici, BCL2 și p53 nu sunt stabili pe parcursul metastazării, iar transferurile de scor mai frecvent țin de pierderea expresiei în ambianța limfonodală (capitolul 3.6).
6. Relațiile statistice între markerii studiați a celulelor cu localizare primară și metastatică nu sunt identice. Aceasta indică că metastaza limfonodală are un fenotip imunohistochimic particular, ceea ce pledează pentru examinarea imunohistochimică concomitentă, obligatorie și a metastazei (capitolul 3.9).
7. În structura moleculară a carcinomului mamar invaziv numeric prevalează subtipurile Luminale. Toate subtipurile examinate sunt instabile la metastazare, iar întâietatea transferurilor o au tumorile activ proliferante (capitolul 4.1).
8. Instabilitatea fenotipului celular al carcinomului mamar a fost dovedită în majoritatea cazurilor de implant a celulelor tumorale în membrana corioalantoidă. Markerii analizați au evoluție diferită după implantare: ER și HER2 preponderent cu pierdere, PR stabil pozitiv, iar CK5 stabil negativ. Aceste date susțin necesitatea de a revedea schemele de tratament existente, cu includerea în algoritmul de diagnostic și a profilului molecular al metastazei (capitolul 4.2).

RECOMANDĂRI

1. Propunem determinarea profilului molecular al metastazei limfonodale prin metode imunohistochimice, concomitent cu evaluarea tumorii primare. Intru evitarea unor erori tehnice recomandăm procesarea tumorii și metastazei într-un singur bloc, într-o singură secțiune.
2. De utilizat preferențial Ki67 în locul gradului de diferențiere drept marker al agresivității tumorale.
3. Determinarea E-cadherinei în calitate de marker specific al tumorilor lobulare nu are valoare diagnostică, grație existenței fenotipurilor E-cadherin pozitive și E-cadherin negative în ambele tipuri de tumori studiate, ductal și lobular invazive.
4. De rând cu subtipul molecular al tumorii trebuie de indicat și markerii în baza cărora acesta a fost definit. Astfel expresia CK5 de rând cu HER2 și/sau receptorii hormonali ar evidenția necesitatea suplinirii schemelor terapeutice în conformitate cu recomandările existente pentru tumorile Triplu negative.
5. CK5 mai bine (80%) definește tumorile Triplu negative în comparație cu EGFR, a cărui incidență este de 50%.

BIBLIOGRAFIE

1. Abd El-Rehim D.M. et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. In: *J Pathol.* 2004, vol. 203, nr.2, p. 661-671.
2. Abdel-Fatah T.M. et al. High frequency of coexistence of columnar cell lesions, lobular neoplasia, and low grade ductal carcinoma in situ with invasive tubular carcinoma and invasive lobular carcinoma. In: *Am J Surg Pathol.* 2007, vol. 31, nr.3, p. 417-426.
3. Abdel-Fatah T.M. et al. Morphologic and molecular evolutionary pathways of low nuclear grade invasive breast cancers and their putative precursor lesions: further evidence to support the concept of low nuclear grade breast neoplasia family. In: *Am J Surg Pathol.* 2008, vol. 32, nr.4, p. 513-523.
4. Adamczyk A. et al. Expression of ER/PR/HER2, basal markers and adhesion molecules in primary breast cancer and in lymph nodes metastases: a comparative immunohistochemical analysis. In: *Pol J Pathol.* 2012, vol. 63, nr.4, p. 228-234.
5. Agelopoulos K, Buerger H, Brandt B. Allelic imbalances of the egfr gene as key events in breast cancer progression--the concept of committed progenitor cells. In: *Curr Cancer Drug Targets.* 2008, vol. 8, nr. 5, p. 431-45.
6. Al-Hajj M. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. In: *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; vol. 100, nr. 11, p. 3983-8.
7. Allred D.C. et al. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. In: *Mod Pathol.* 1998, vol. 11, nr.2, p. 155-168.
8. Amin S.A. et al. Paracrine-stimulated gene expression profile favors estradiol production in breast tumors. In: *Mol Cell Endocrinol.* 2006; vol. 253, nr.1-2, p. 44-55.
9. Anderson W.F. et al. Comparison of age-specific incidence rate patterns for different histopathologic types of breast carcinoma. In: *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004, vol.13, nr. 7, p. 1128-1135.
10. Andre F, Puzstai L. Molecular classification of breast cancer: implications for selection of adjuvant chemotherapy. In: *Nat Clin Pract Oncol.* 2006; vol. 3, nr. 11, p. 621-32.
11. Arun B. et al. Correlation of Bcl-2 and p53 expression in primary breast tumors and corresponding metastatic lymph nodes. In: *Cancer.* 2003; vol. 98, nr. 12, p. 2554-2559.
12. Asselin-Labat M.L. et al. Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. In: *Nat Cell Biol.* 2007, vol. 9, nr. 2, p. 201-209.
13. Asselin-Labat M.L. et al. Steroid hormone receptor status of mouse mammary stem cells. In: *J Natl Cancer Inst.* 2006, vol. 98, nr. 14, p. 1011-4.
14. Azoulay S. et al. KIT is highly expressed in adenoid cystic carcinoma of the breast, a basal-like carcinoma associated with a favorable outcome. In: *Mod Pathol.* 2005, vol.18,

- nr.12, p. 1623-31.
15. Badve S. et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. In: *Mod Pathol.* 2011, vol. 24, nr. 2, p. 157-67.
 16. Balic M et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. In: *Clin Cancer Res.* 2006, vol. 12, nr. 19, p. 5615–5621.
 17. Bassler R., Werner J. Pre-invasive tumors and precancerous conditions of the breast: pathologico-anatomic demarcation and clinical consequences. In: *Chirurg.* 1984, vol. 55, nr. 3, p. 133-41.
 18. Bear H.D. et al. The effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: Preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. In: *J Clin Oncol.* 2003; vol.21, nr. 22, p. 4165-4174.
 19. Bergamaschi A. et al. Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. In: *Genes Chromosomes Cancer.* 2006; vol. 45, nr. 11, p. 1033–1040.
 20. Berry DA et al. Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. In: *JAMA.* 2006, vol. 295, nr. 14, p. 1658–1667.
 21. Bertolini F. Adipose tissue and breast cancer progression: a link between metabolism and cancer. In: *The Breast.* 2013; vol. 22, Suppl 2:S48-9.
 22. Bertolini F. et al. Adipose tissue cells, lipotransfer and cancer: a challenge for scientists, oncologists and surgeons. In: *Biochim Biophys Acta.* 2012, vol. 1826, nr. 1, p. 209-214.
 23. Berx G, Van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. In: *Breast Cancer Res.* 2001, vol. 3, nr. 5, p. 289-93.
 24. Bhargava R et al. CK5 is more sensitive than CK5/6 in identifying the ‘basal-like’ phenotype of breast carcinoma. In: *Am J Clin Pathol.* 2008, vol. 130, nr. 5, p. 724–730.
 25. Binder et al. Bcl-2 protein expression in breast cancer in relation to established prognostic factors and other clinicopathological variables. In: *Ann Oncol.* 1995, vol. 6, nr. 10, p. 1005-10.
 26. Blackwell K.L. et al. Randomized study of lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer. In: *J Clin Oncol.* 2010, vol. 28, nr. 7, p. 1124–1130.
 27. Blows F.M. et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of

- data for 10,159 cases from 12 studies. In: *PLoS Med.* 2010, vol. 7, nr. 5, p. 1000279.
28. Bocker W et al. Ck5-positive cells are precursor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human breast epithelium. A new cell concept as a basis for a better understanding of proliferative breast disease? In: *Verh Dtsch Ges Pathol.* 2005, vol. 89, p. 45-7.
 29. Boulanger et al. Interaction with the mammary microenvironment redirects spermatogenic cell fate in vivo. In: *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007, vol. 104, nr. 10, p. 3871-6.
 30. Brankovic-Magic M. et al. Progesterone receptor status of breast cancer metastases. In: *J Cancer Res Clin Oncol.* 2002, vol. 128, nr. 1, p. 55–60
 31. Brisken C, Duss S. Stem cells and the stem cell niche in the breast: an integrated hormonal and developmental perspective. In: *Stem Cell Rev.* 2007, vol. 3, nr. 2, p. 147-56.
 32. Buxant F. et al. Ki-67 immunostaining activity is higher in positive axillary lymph nodes than in the primary breast tumor. In: *Breast Cancer Res Treat.* 2002, vol. 75, nr. 1, p. 1-3.
 33. Buzdar A.U. Data from the Arimidex, tamoxifen, alone or in combination (ATAC) trial: Implications for use of aromatase inhibitors in 2003. In: *Clin Cancer Res.* 2004, vol. 10, nr. 1, pt2, p. 355S-361S.
 34. Cabibi D. et al. Lymph node metastases displaying lower Ki-67 immunostaining activity than the primary breast cancer. In: *Anticancer Res.* 2006, vol. 26, nr. 6B, p. 4357-60.
 35. Callagy G.M. et al. Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index In: *Clin Cancer Res*, 2006, vol. 12, nr. 8, p. 2468–2475.
 36. Cardoso F. et al. Clinical application of the 70-gene profile: the MINDACT trial. In: *J Clin Oncol.* 2008, vol. 26, nr. 5, p. 729-735.
 37. Cardoso F. et al. Second and subsequent lines of chemotherapy for metastatic breast cancer: What did we learn in the last two decades? In: *Annals Oncol.* 2002, vol. 13, nr. 2, p.197-207.
 38. Carey L.A. et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. In: *JAMA.* 2006, vol. 295, nr.21, p. 2492-2502.
 39. Celis J.E. et al. Molecular characterization of apocrine carcinoma of the breast: validation of an apocrine protein signature in a well-defined cohort. In: *Mol Oncol.* 2009, vol. 3, nr. 3, p. 220-237.
 40. Chang H.Y. et al. Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival. In: *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005, vol. 102, nr. 10, p. 3531–3532.
 41. Cheang M.C. et al . Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009, vol. 101, nr.10, p. 736-750.
 42. Cheang M.C. et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior

- prognostic value than triple-negative phenotype. In: *Clin Cancer Res.* 2008, vol. 14, nr. 5, p. 1368–1376.
43. Chekhun S. et al. Expression of biomarkers related to cell adhesion, metastasis and invasion of breast cancer cell lines of different molecular subtype. In: *Exp Oncol.* 2013, vol. 35, nr. 3, p. 174-9.
 44. Chintamani et al. Androgen receptor status predicts response to chemotherapy, not risk of breast cancer in Indian women. In: *World J Surg Oncol.* 2010, vol. 8, p. 64.
 45. Cho S.H., Jeon J., Kim S.I. Personalized medicine in breast cancer: a systematic review. In: *J Breast Cancer.* 2012, vol. 15, nr. 3, p. 265-72.
 46. Chu K et al. The paradox of E-cadherin: role in response to hypoxia in the tumor microenvironment and regulation of energy metabolism. In: *Oncotarget.* 2013, vol. 4, nr. 3, p. 446-62.
 47. Cianfrocca M., Goldstein L.J. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. In: *Oncologist.* 2004, vol. 9, nr. 6, p. 606-16.
 48. Ciarloni L., Mallepell S., Brisken C. Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor alpha function in mammary gland development. In: *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007, vol.104, nr. 13, p. 5455-60.
 49. Clarke C.A. et al. Age-specific incidence of breast cancer subtypes: understanding the black-white crossover. In: *J Natl Cancer Inst.* 2012, vol. 104, nr.14, p. 1094-1101.
 50. Clarke K. et al. Mutant epidermal growth factor receptor enhances induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia and insulin-like growth factor-1 via a PI3 kinase dependent pathway. In: *Br J Cancer.* 2001, vol. 84, nr.10, p. 1322–1329.
 51. Clarke R.B. et al. A putative human breast stem cell population is enriched for steroid receptor-positive cells. In: *Dev Biol.* 2005, vol. 277, nr.2, p. 443–456.
 52. Collins L.C. et al. Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. In: *Mod Pathol.* 2011, vol. 24, nr.7, p. 924-931.
 53. Colombo P.E. et al. Microarrays in the 2010s: the contribution of microarray-based gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction. In: *Breast Cancer Res.* 2011, vol. 13, nr. 3, p. 212.
 54. Creighton C.J. et al. Development of resistance to targeted therapies transforms the clinically associated molecular profile subtype of breast tumor xenografts. In: *Cancer Res.* 2008, vol. 68, nr.18, p. 7493–501.
 55. Creighton C.J. et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. In: *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009, vol. 106, nr.33, p. 13820-13825.

56. Creighton C.J. The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics*. 2012, vol. 6, p. 289-97.
57. Cristofanilli M. et al. Invasive lobular carcinoma classic type: response to primary chemotherapy and survival outcomes. In: *J Clin Oncol*. 2005, vol. 23, nr. 1, p. 41-48.
58. Cuzick J. et al. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. In: *J Clin Oncol*. 2011, vol. 29, nr. 32, p. 4273-8.
59. Davies C. et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. In: *Lancet*. 2013, vol. 381, nr. 9869, p. 805-816.
60. Dawson et al. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. In: *Br J Cancer*. 2010, vol. 103, nr. 5, p. 668-75.
61. De Amicis F. et al. Androgen receptor overexpression induces tamoxifen resistance in human breast cancer cells. In: *Breast Cancer Res Treat*. 2009; vol. 121, nr. 1, p. 1–11.
62. Dedeurwaerder S., Fumagalli D., Fuks F. Unravelling the epigenomic dimension of breast cancers. In: *Curr Opin Oncol*. 2011, vol. 23, nr. 6, p. 559–565.
63. Del Bufalo et al. Bcl-2 overexpression enhances the metastatic potential of a human breast cancer line. In: *Faseb J*. 1997, vol. 11, nr. 12, p. 947-53.
64. Denkert C. et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. In: *J Clin Oncol*. 2010, vol. 28, nr. 1, p. 105-113.
65. Diaz L.K. et al. Triple negative breast carcinoma and the basal phenotype: from expression profiling to clinical practice. In: *Adv Anat Pathol*. 2007, vol. 14, nr. 6, p. 419-430.
66. Doane A.S. et al. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. In: *Oncogene*. 2006, vol. 25, nr. 28, p. 3994-4008.
67. Dumitrescu R.G., Cotarla I. Understanding breast cancer risk – where do we stand in 2005? In: *J Cell Mol Med*. 2005, vol. 9, nr. 1, p. 208–221.
68. Dumontet C. et al. BCIRG 001 molecular analysis: prognostic factors in node-positive breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. In: *Clin Cancer Res*. 2010, vol. 16, nr. 15, p. 3988-97.
69. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. In: *Lancet*. 2005, vol. 365, nr. 9472, p. 1687–1717.

70. Ellis I.O. et al. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. In: *Histopathology*. 1992, vol. 20, nr.6, p. 479-89.
71. Ellis M.J. et al. Neoadjuvant comparisons of aromatase inhibitors and tamoxifen: Pretreatment determinants of response and on-treatment effect. In: *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003, vol. 86, nr. 3-5, p. 301-307.
72. Ellis P. et al. WHO Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs, 2003, Lyon Press, Lyon.
73. Engstrøm M.J. et al. Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients. In: *Breast Cancer Res Treat*. 2013, vol. 140, nr. 3, p. 463-73.
74. Ermiah E. et al. Prognostic value of bcl-2 expression among women with breast cancer in Libya. In: *Tumour Biol*. 2013, vol. 34, nr. 3, p. 1569-78.
75. Evans J.D. Straightforward statistics for the behavioral sciences. Pacific Grove, CA: 1996, Brooks/Cole Publishing.
76. Fadare O. Wang S.A., Hileeto D. The expression of cytokeratin 5/6 in invasive lobular carcinoma of the breast: evidence of a basal-like subset? In: *Hum Pathol*. 2008, vol. 39, nr. 3, p. 331-336.
77. Falck A.K. et al. Biomarker expression and St Gallen molecular subtype classification in primary tumours, synchronous lymph node metastases and asynchronous relapses in primary breast cancer patients with 10 years' follow-up. In: *Breast cancer Res Treat*. 2013, vol. 140, nr. 1, p. 93-104.
78. Farmer P. et al. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. In: *Nat Med*. 2009, vol. 15, nr. 1, p. 68-74.
79. Farmer P. et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. In: *Oncogene*. 2005, vol. 24, nr. 29, p. 4660-4671.
80. Ferrieres et al. Variation of bcl-2 expression in breast ducts and lobules in relation to plasma progesterone levels: overexpression and absence of variation in fibroadenomas. In: *J Pathol*. 1997, vol. 183, nr. 2, p. 204-11.
81. Finak, G. et al. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. In: *Nat Med*. 2008, vol. 14, nr. 5, p. 518-27.
82. Fisher B. et al. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. In: *J Clin Oncol*. 1998; vol. 16, nr. 8, p. 2672-2685.
83. Fisher E.R. et al. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol no. 4). VI. Invasive papillary cancer. In: *Am J Clin Pathol*. 1980, vol. 73, nr. 3, p. 313-22.

84. Fisher E.R., Paleka A.S., Gregorio R.M. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Project for breast cancers IV. Significance of tumor necrosis. In: *Human Pathology*. 1978, vol. 9, nr. 5, p. 523-530.
85. Foulkes W.D. et al. The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53+/glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer. In: *Cancer Res*. 2004, vol. 64, nr. 3, p. 830-5.
86. Fritz P. et al. Clinical Impacts of Histological Subtyping Primary Breast Cancer In: *Anticancer Res*. 2010, vol. 30, nr. 12, p. 5137-44.
87. Fulford L.G. et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. In: *Histopathology*. 2006, vol. 49, nr.1, p. 22-34.
88. Galimberti V. et al. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23–01): a phase 3 randomised controlled trial. In: *Lancet Oncol*. 2013, vol. 14, nr. 4, p. 297-305.
89. Gallacchi P. et al. Increased expression of estrogen-receptor exon- 5-deletion variant in relapse tissues of human breast cancer. In: *Int J Cancer*. 1998, vol. 79, nr. 1, p. 44–48.
90. Garofalo C. et al. Encreased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli. In: *Clin Cancer Res*. 2006; vol. 12, nr. 5, p. 1447–1453.
91. Gee J.M. et al. Immunocytochemical localization of BCL-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. In: *Int J Cancer*. 1995, vol. 64, nr. 4, p. 269-73
92. Gevensleben H. et al. Noninvasive detection of HER2 amplification with plasma DNA digital PCR. In: *Clin Cancer Res*. 2013, vol. 19, nr. 12, p. 3276-84.
93. Ginestier C. et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. In: *Cell Stem Cell*. 2007, vol. 1, nr. 5, p. 555-67.
94. Giuliano A.E. et al. Axillary dissection versus no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis. In: *JAMA*. 2011, vol. 305, nr. 6, p. 569-575.
95. Going J.J., Mohun T.J. Human breast duct anatomy, the 'sick lobe' hypothesis and intraductal approaches to breast cancer. In: *Breast Cancer Res Treat*. 2006, vol. 97, nr. 3, p. 285-91.
96. Goldhirsch A. et al. Meeting Highlights: Updated International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. In: *J Clin Oncol*. 2003, vol. 21, nr. 17, p. 3357–3365.

97. Goldhirsch A. 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. In: *Ann Oncol.* 2013, vol. 24, nr. 9, p. 2206-23.
98. Grann V.R. et al. Hormone receptor status and survival in a population-based cohort of patients with breast carcinoma. In: *Cancer.* 2005, vol. 103, nr. 11, p. 2241–2251.
99. Guarneri V et al. Prognostic value of pathologic complete response after primary chemotherapy in relation to hormone receptor status and other factors. In: *J Clin Oncol.* 2006, vol. 24, nr. 7, p. 1037–1044.
100. Gusterson B. Do ‘basal-like’ breast cancers really exist? In: *Nat Rev Cancer.* 2009, vol. 9, nr. 2, p. 128-134.
101. Gusterson B.A. et al. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. In: *Breast Cancer Res.* 2005, vol. 7, nr. 4, p. 143-148.
102. Gutierrez M.C. et al. Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. In: *J Clin Oncol.* 2005, vol. 23, nr. 11, p. 2469–76.
103. Hadji P. et al. Practical guidance for the management of aromatase inhibitor-associated bone loss. In: *Ann Oncol.* 2008, vol. 19, nr. 8, p. 1407–1416.
104. Hamilton A., Piccart M. The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: a review of the literature on HER-2, p53 and BCL-2. In: *Ann Oncol.* 2000, vol. 11, nr. 6, p. 647-63.
105. Hammond M.E. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. In: *Arch Pathol Lab Med.* 2010, vol. 134, nr. 6, p. 907–922.
106. Heatley M. et al. Cytokeratin intermediate filament expression in benign and malignant breast disease. In: *J Clin pathol.* 1995, vol. 48, nr. 1, p. 26-32.
107. Heitz F. et al. Differences in the Receptor Status between Primary and Recurrent Breast Cancer - The Frequency of and the Reasons for Discordance. In: *Oncology.* 2013, vol. 84, nr. 6, p. 319-325
108. Helal T.E., Ibrahim E.A., Alloub A.I. Immunohistochemical analysis of tumor-infiltrating lymphocytes in breast carcinoma: relation to prognostic variables. Indian. In: *J Pathol Microbiol.* 2013, vol. 56, nr. 2, p. 89-93.
109. Henderson I.C. et al. Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. In: *J Clin Oncol.* 2003, vol. 21, nr. 6, p. 976-983.

110. Hennessy B.T. et al. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. In: *Cancer Res.* 2009, vol. 69, nr. 10, p. 4116-4124.
111. Herschkowitz J.I. et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. In: *Genome Biol.* 2007, vol. 8, nr. 5, p. R76.
112. Heys S.D. et al. Neoadjuvant docetaxel in breast cancer: 3-year survival results from the Aberdeen trial. In: *Clin Breast Cancer.* 2002; vol. 3(Suppl 2), p. S69-S74.
113. Holm K. et al. Molecular subtypes of breastcancer are associated with characteristic DNA methylation patterns. In: *Breast Cancer Res.* 2010, vol. 12, nr. 3, p. R36.
114. Hu Z. et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. In: *BMC Genomics.* 2006, vol. 7, p. 96.
115. Iorio M.V. et al. Breast cancer and microRNAs: therapeutic impact. In: *Breast.* 2011; vol. 20 Suppl 3, p. S63–S70.
116. Jemal A. et al. Cancer statistics, 2003. In: *CA Cancer J Clin.* 2003; vol. 53, p. 5-26.
117. Jeselsohn R. et al. Emergence of constitutively active estrogen receptor- α mutations in pretreated advanced estrogen receptor-positive breast cancer. In: *Clin Cancer Res.* 2014, vol. 20, nr. 7, p. 1757-67.
118. Jirstrom K. et al. Adverse effect of adjuvant tamoxifen in premenopausalbreast cancer with cyclin D1 gene amplification. In: *Cancer Res.* 2005, vol. 65, nr. 17, p. 8009–8016.
119. Jobsen J.J. et al. Synchronous, bilateral breast cancer: prognostic value and incidence. In: *Breast.* 2003, vol. 12, nr. 2, p. 83-8.
120. Joensuu K et al. ER, PR, HER2, Ki-67 and CK5 in early and Late Relapsing Breast cancer—Reduced CK5 expression in Metastases. In: *Breast Cancer.* 2013, vol. 7, p. 23-34.
121. Jones D.S., Hofmann L., Quinn S. A New Model for Medical Education and Practice. Gig Harbor: The Institute for Functional Medicine; In: *21st Century Medicine.* 2010, p. 23-87.
122. Kavgaci H. et al. The effects of E-cadherin and bcl-2 on prognosis in patients_with_breast cancer. In: *Bratisl Lek Listy.* 2010, vol. 111, nr. 9, p. 493-7.
123. Keam B. et al. Ki-67 can be used for further classification of triple negative breast cancer into two subtypes with different response and prognosis. In: *Breast Cancer Res.* 2011, vol. 13, nr. 2, p. R22
124. Kim H.S. et al. Overexpression of p53 is correlated with poor outcome in premenopausal women with breast cancer treated with tamoxifen after chemotherapy. In: *Breast Cancer Res Treat.* 2009, vol. 121, nr. 3, p. 777–788.
125. Klingbeil P. et al. CD44 is overexpressed in basal-like breast cancers but is not a driver of 11p13 amplification. In: *Breast Cancer Res Treat.* 2010, vol. 120, nr. 1, p. 95-109.

126. Koda M. et al. Expression of the apoptotic markers in normal breast epithelium, benign mammary dysplasia and in breast cancer. In: *Folia Morphol (Warsz)*. 2004, vol. 63, nr. 3, p. 337-41.
127. Kordon E.C., Smith G.H. An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. In: *Development*. 1998, vol. 125, nr. 10, p. 1921-30.
128. Korsching E. Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. In: *Lab Invest*. 2002, vol. 82, nr. 11, p. 1525-33.
129. Kowalski P.J., Rubin M.A., Kleer C.G. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. In: *Breast Cancer Res*. 2003; vol. 5, nr. 6, p. R217-22.
130. Kristek J. et al. Tumor growth fraction, expression of estrogen and progesterone receptors, p53, bcl-2 and cathepsin D activity in primary ductal invasive breast carcinoma and their axillary lymph node metastases. In: *Coll Antropol*. 2007, vol. 31, nr. 4, p. 1043–1047.
131. Laakso M. et al. Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to BRCA1 tumors. In: *Mod Pathol*. 2005, vol. 18, nr. 10, p. 1321-8.
132. Lakhani S.R. et al. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. In: *Clin Cancer Res*. 2005, vol. 11, nr. 14, p. 5175-80.
133. Laughner E. et al. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. In: *Mol Cell Biol*. 2001, vol. 21, nr. 12, p. 3995–4004.
134. Lee K.H. et al. Prognostic significance of bcl-2 expression in stage III breast cancer patients who had received doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel as adjuvant chemotherapy. In: *BMC Cancer*. 2007, vol. 7, p. 63.
135. Lehmann B.D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. In: *J Clin Invest*. 2011, vol. 121, nr. 7, p. 2750-2767.
136. Lehmann-Che J. et al. Molecular apocrine breast cancers are aggressive estrogen receptor negative tumors overexpressing either HER2 or GCDFP15. In: *Breast Cancer Res*. 2013, vol. 15, nr. 3, p. R37.
137. Lester S.C. et al. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. In: *Arch Pathol Lab Med*. 2009, vol. 133, nr. 10, p. 1515-38.
138. Li C.I., Moe R.E., Daling J.R. Risk of mortality by histologic type of breast cancer among women aged 50 to 79 years. *Arch Intern Med*. 2003, vol. 163, nr. 18, p. 2149–2153
139. Li C.I., Uribe D.J., Daling J.R. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. In: *Br J Cancer*. 2005, vol. 93, nr. 9, p. 1046-52.

140. Li S. et al. Endocrine-therapy-resistant ESR1 variants revealed by genomic characterization of breast-cancer-derived xenografts. In: *Cell Rep.* 2013, vol. 26, nr. 4(6), p. 1116-30.
141. Lim E. et al. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. In: *Nat Med.* 2009, vol. 15, nr. 8, p. 907-913.
142. Linjawi A. et al. Prognostic significance of p53, bcl-2, and Bax expression in early breast cancer. In: *J Am Coll Surg.* 2004, vol. 198, nr. 1, p. 83-90.
143. Liu R. et al. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N Engl J Med* 2007, vol. 356, nr. 3, p. 217-26.
144. Liu Z., Zhang X.S., Zhang S. Breast tumor subgroups reveal diverse clinical prognostic power. In: *Sci Rep.* 2014, vol. 4, p. 4002.
145. Livasy C.A. et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. In: *Mod Pathol* 2006, vol. 19, nr. 2, p. 264–271.
146. Loi S. et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02–98. In: *J Clin Oncol.* 2013, vol. 31, nr. 7, p. 860-867.
147. Loibl S. et al. Androgen receptor expression in primary breast cancer and its predictive and prognostic value in patients treated with neoadjuvant chemotherapy. In: *Breast Cancer Res Treat.* 2011, vol. 130, nr. 2, p. 477-487.
148. Luck A.A. et al. Breast carcinoma with basal phenotype: mammographic findings. In: *Am J Roentgenol.* 2008, vol. 191, nr. 2, p. 346-351.
149. Luna-More S. et al. Bcl-2 protein in normal, hyperplastic and neoplastic breast tissues. A metabolite of the putative stem-cell subpopulation of the mammary gland. In: *Histol Histopathol.* 2004, vol. 19, nr. 2, p. 457-63.
150. Lundgren K. et al. Gene products of chromosome 11q and their association with CCND1 gene amplification and tamoxifen resistance in premenopausal breast cancer. In: *Breast Cancer Res.* 2008, vol. 10, nr. 5, p. R81.
151. Malhotra G.K et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. In: *Cancer Biol Ther.* 2010, vol. 10, nr. 10, p. 955 –960.
152. Mallepell S. et al. Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. In: *Proc Natl Acad Sci USA,* 2006, vol. 103, nr. 7, p. 2196-201.
153. McCarthy A. et al. A mouse model of basal-like breast carcinoma with metaplastic elements. In: *J Pathol.* 2007, vol. 211, nr. 4, p. 389-398.

154. Meindl A. et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. In: *Nat. Genet.* 2010, vol. 42, nr. 5, p. 410-4.
155. Miller K.D. E2100: a phase III trial of paclitaxel versus paclitaxel/bevacizumab for metastatic breast cancer. In: *Clin Breast Cancer.* 2003, vol. 3, nr. 6, p. 421–422.
156. Mimori K. et al. Identification of molecular markers for metastasis-related genes in primary breast cancer cells. In: *Clin Exp Metastasis.* 2005, vol. 22, nr. 1, p. 59–67
157. Moasser M.M. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. In: *Oncogene.* 2007, vol. 26, nr. 45, p. 6469-6487.
158. Moinfar F. et al. Androgen receptors frequently are expressed in breast carcinomas.potential relevance to new therapeutic strategies. In: *Cancer.* 2003, vol. 98, nr. 4, p. 703–11.
159. Moinfar F. Is ‘basal-like’ carcinoma of the breast a distinct clinicopathological entity? a critical review with cautionary notes. In: *Pathobiology.* 2008, vol. 75, nr. 2, p. 119-131.
160. Montel V., Mose E.S., Tarin D. Tumor-stromal interactions reciprocally modulate gene expression patterns during carcinogenesis and metastasis. In: *Int J Cancer.* 2006, vol. 119, nr. 2, p. 251-63.
161. Muenst S. et al. The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. In: *Breast Cancer Res Treat.* 2013, vol. 139, nr. 3, p. 667-76.
162. Mulac-Jericevic B. et al. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. In: *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003, vol. 100, nr. 17, p. 9744-9.
163. Nathan B. et al. Expression of BCL-2 in the developing human fetal and infant breast. In: *Histopathology.* 1994, vol. 24, nr. 1, p. 73-6.
164. Navarrete M.A. et al. Assessment of the proliferative, apoptotic and cellular renovation indices of the human mammary epithelium during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. In: *Breast Cancer Res.* 2005; vol. 7, nr. 3, p. R306-13.
165. Neumeister V. et al. In situ identification of putative cancer stem cells by multiplexing ALDH1, CD44 and cytokeratin identifies breast cancer patients with poor prognosis. In: *Am J Pathol.*2010, vol. 176, p. 2131-8.
166. Neville A.M. et al. Factors predicting treatment responsiveness and prognosis in node-negative breast cancer. The International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. In: *J Clin Oncol.* 1992, vol. 10, nr. 5, p. 696–705.
167. Nielsen T.O. et al. 2004. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. In: *Clin Cancer Res.* 2004, vol. 10, nr. 16, p.

5367-5374.

168. Niemeier L.A. et al. Androgen receptor in breast cancer: expression in estrogen receptor-positive tumors and in estrogen receptor-negative tumors with apocrine differentiation. In: *Mod Pathol*. 2010, vol. 23, nr. 2, p. 205-212.
169. Niikura N. et al. Immunohistochemical Ki67 labeling index has similar proliferation predictive power to various gene signatures in breast cancer. In: *Cancer Sci*. 2012, vol. 103, nr. 8, p. 1508-12.
170. Obeid E. et al. The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review). In: *Int J Oncol*. 2013, vol. 43, nr. 1, p. 5-12.
171. O'Brien J., Schedin P.J. Macrophages in breast cancer: do involution macrophages account for the poor prognosis of pregnancy-associated breast cancer? In: *Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2009, vol. 14, nr. 2, p. 145-57.
172. Otterbach F. et al. Cytokeratin 5/6 immunohistochemistry assists the differential diagnosis of atypical proliferations of the breast. In: *Histopathology*. 2000, vol. 37, nr. 3, p. 232-40.
173. Park S. et al. Expression of androgen receptors in primary breast cancer. In: *Ann Oncol*. 2010, vol. 21, nr. 3, p. 488-492.
174. Park S.Y. et al. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. In: *Clin Cancer Res*. 2010, vol. 16, nr. 3, p. 876-87.
175. Parker J.S. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. In: *J Clin Oncol*. 2009, vol. 27, nr. 8, p. 1160-7.
176. Parry S. et al. Nestin is expressed in basal-like and triple negative breast cancers. In: *J Clin Pathol*. 2008, vol. 61, nr. 9, p. 1045-1050.
177. Pavelic Z.P. et al. c-myc, c-erbB-2, and Ki-67 expression in normal breast tissue and in invasive and noninvasive breast carcinoma. In: *Cancer Res*. 1992, vol. 52, nr. 9, p. 2597-602.
178. Pedersen L. et al. The prognostic influence of multifocality in breast cancer patients. In: *Breast*. 2004, vol. 13, nr. 3, p. 188-93.
179. Peppercorn J., Perou C.M., Carey L.A. Molecular subtypes in breast cancer evaluation and management: divide and conquer. In: *Cancer Invest*. 2008, vol. 26, nr. 1, p. 1-10.
180. Perou C.M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. In: *Nature*. 2000, vol. 406, nr. 6797, p. 747-52.
181. Perou C.M. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. In: *Oncologist*. 2011, vol. 16 Suppl 1, p. 61-70.
182. Petersen O.W., Polyak K. Stem cells in the human breast. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010, vol. 2, nr. 5, p. a003160.
183. Petry I.B. et al. ERBB2 induces an antiapoptotic expression pattern of Bcl-2 family

- members in node-negative breast cancer. In: *Clinical Cancer Research*. 2010, vol. 16, nr. 2, p. 451-460.
184. Pike M.C., Ross R.K. Progestins and menopause: epidemiological studies of risks of endometrial and breast cancer. In: *Steroids*. 2000, vol. 65, nr. 10-11, p. 659-64.
185. Pinder S.E. et al. Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. In: *Histopathology*. 1994, vol. 24, nr. 1, p. 41-47.
186. Pisani P., Bray F., Parkin D.N. Estimates of the worldwide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. In: *Int J Cancer*. 2002, vol. 97, nr. 1, p. 72-81.
187. Pivot X. et al. 6 months versus 12 months of adjuvant trastuzumab for patients with HER2-positive early breast cancer (PHARE): a randomised phase 3 trial. In: *Lancet Oncol*. 2013, vol. 14, nr. 8, p. 741-748.
188. Prat A. et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. In: *J Clin Oncol*. 2013, vol. 31, nr. 2, p. 203-209.
189. Prat A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. In: *Breast Cancer Res*. 2010; vol. 12, nr. 5, p. R68.
190. Prat A., Perou C.M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. In: *Molecular Oncology*. 2011, vol. 5, nr. 1, p. 5-23.
191. Pusztai L. et al. Gene expression profiles obtained from single passage fine needle aspirations (FNA) of breast cancer reliably identify prognostic/predictive markers such as estrogen (ER) and HER-2 receptor status and reveal large scale molecular differences between ER-negative and ER-positive tumors. In: *Clin Cancer Res*. 2003, vol. 9, nr. 7, p. 2406-2415.
192. Qureshi H.S. et al. E-Cadherin Status in Breast Cancer Correlates With Histologic Type but Does Not Correlate With Established Prognostic Parameters. In: *Am J Clin Pathol*. 2006, vol. 25, nr. 3, p. 377-85.
193. Raica M. et al. Hormone receptors and HER2 expression in primary breast carcinoma and corresponding lymph node metastasis: do we need both? In: *Anticancer Res*. 2014, vol. 34, nr. 3, p. 1435-40.
194. Rakha E., Reis-Filho J.S. Basal-like breast carcinoma: from expression profiling to routine practice. In: *Arch Pathol Lab Med*. 2009b, vol. 133, nr. 6, p. 860-868.
195. Rakha E.A. et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. In: *J Pathol*. 2006, vol. 208, nr. 4, p. 495-506.
196. Rakha E.A. et al. Patho-biological aspects of basal-like breast cancer. In: *Breast Cancer Res Treat*. 2009a, vol. 113, nr. 3, p. 411-422.

197. Rakha E.A., Reis-Filho J.S., Ellis I.O. Basal-like breast cancer: a critical review. In: *J Clin Oncol.* 2008, vol. 26, nr. 15, p. 2568-2581.
198. Rao C., Shetty J., Prasad K.H. Immunohistochemical profile and morphology in triple - negative breast cancers. In: *J Clin Diag Res.* 2013, vol. 7, nr. 7, p. 1361-5.
199. Rauser S. et al. Classification of HER2 receptor status in breast cancer tissues by MALDI imaging mass spectrometry. In: *J Proteome Res.* 2010, vol. 9, nr. 4, p. 1854-1863.
200. Reis-Filho J.S. et al. Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. In: *Histopathology.* 2006, vol. 49, nr. 1, p. 10-21.
201. Resetkova E. et al. Prognostic impact of ALDH1 in breast cancer: a story of stem cells and tumor microenvironment. In: *Breast Cancer Res Treat.* 2010, vol. 123, nr. 1, p. 97-108.
202. Reya T., Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. In: *Nature.* 2005; vol. 434, nr. 7035, p. 843–850.
203. Ribatti D. et al. The gelatin sponge-chorioallantoic membrane assay. In: *Nat Protoc.* 2006; vol. 1, nr. 1, p. 85-91.
204. Robinson D.R. et al. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. 2013, vol. 45, nr. 12, p. 1446-51.
205. Rochaix P. et al. In vivo patterns of Bcl-2 family protein expression in breast carcinomas in relation to apoptosis. In: *J Pathol.* 1999, vol. 187, nr. 4, p. 410-5.
206. Roodi N. et al. Estrogen receptor gene analysis in estrogen receptor-positive and receptor-negative primary breast cancer. In: *J Natl Cancer Inst.* 1995, vol. 87, nr. 6, p. 446-451.
207. Rosen P.P. et al. Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. In: *J Clin Oncol.* 1989, vol. 7, nr. 9, p. 1239–1251.
208. Ross J.S. et al. Commercialized multigene predictors of clinical outcome for breast cancer. In: *Oncologist* 2008, vol. 13, nr. 5, p. 477-93.
209. Roylance R. et al. Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer. In: *Cancer Res.* 1999, vol. 59, nr. 7, p. 1433–1436.
210. Rugo H.S. Bevacizumab in the treatment of breast cancer: rationale and current data. In: *The Oncologist.* 2004, vol. 9(suppl 1), p. 43–49.
211. Sabourin J.C. et al. bcl-2 expression in normal breast tissue during the menstrual cycle. In: *Int J Cancer.* 1994, vol. 59, nr. 1, p. 1-6.
212. Sainsbury J.R. et al. Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. In: *Lancet.* 1987, vol. 1, nr. 8547, p.1398-402.
213. Santagata S., Ince T.A. Normal cell phenotypes of breast epithelial cells provide the foundation of a breast cancer taxonomy. In: *Expert Rev Anticancer Ther.* 2014, vol. 14,

- nr. 12, p. 1385-9.
214. Santinelly A. et al. HER-2 status discrepancy between primary breast cancer and metastatic sites. Impact on target therapy. In: *Int J Cancer*. 2008, vol. 122, nr. 5, p. 999-1004.
 215. Schaapveld M. et al. The Prognostic Effect of the Number of Histologically Examined Axillary Lymph Nodes in Breast Cancer: Stage Migration or Age Association? In: *Ann Surg Oncol*. 2006, vol. 13, nr. 4, p. 465 - 474;
 216. Schedin P. Pregnancy-associated breast cancer and metastasis. In: *Nat Rev Cancer*. 2006, vol. 6, nr. 4, p. 281-91.
 217. Schnitt S.J. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. In: *Mod Pathol*. 2010, vol. 23 (suppl 2), p. S60-S64.
 218. Shackleton M. et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. In: *Nature*. 2006, vol. 439, nr.7072, p. 84-8.
 219. Shimizu C., Fujiwara Y. Personalized systemic treatment for breast cancer patients: is it a reality? In: *Breast Cancer*. 2008, vol. 15, nr. 2, p. 141-144.
 220. Shipitsin M. et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. In: *Cancer Cell*. 2007, vol. 11, nr. 3, p. 259-273.
 221. Silverstein M.J et al. Infiltrating lobular carcinoma. Is it different from infiltrating duct carcinoma? In: *Cancer*. 1994, vol. 73, nr.6, p. 1673-1677.
 222. Silwal-Pandit L. et al. TP53 mutation spectrum in breast cancer is subtype specific and has distinct prognostic relevance. In: *Clin Cancer Res*. 2014, vol. 20, nr. 13, p. 3569-80.
 223. Slamon D.J. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. In: *Science*. 1987; vol. 235, nr. 4785, p.177-182.
 224. Sleeman K.E. et al. Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland. In: *J Cell Biol*. 2007, vol. 176, nr. 1, p. 19-26.
 225. Smith G.H. Experimental mammary epithelial morphogenesis in an in vivo model: evidence for distinct cellular progenitors of the ductal and lobular phenotype. In: *Breast Cancer Res Treat*.1996, vol. 39, nr. 1, p. 21-31.
 226. Soliman H. Immunotherapy strategies in the treatment of breast cancer. In: *Cancer Control*. 2013, vol. 20, nr. 1, p. 17-21.
 227. Sorlie T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. In: *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001, vol. 98, nr. 19, p. 10869-74.
 228. Sorlie T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. In: *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; vol. 100, nr. 14, p. 8418-23.
 229. Sparano J.A., Paik S. Development of the 21-gene assay and its application in clinical

- practice and clinical trials. In: *J Clin Oncol*. 2008, vol. 26, nr. 5, p. 721-728.
230. Spear B.B., Heath-Chiozzi M., Huff J. Clinical application of pharmacogenetics. In: *Trends Mol Med*. 2001, vol. 7, nr. 5, p. 201–204.
 231. Spradling A., Drummond-Barbosa D., Kai T. Stem cells find their niche. In: *Nature*. 2001, vol. 414, nr. 6859, p. 98-104.
 232. Stalsberg H., Thomas D.B. Age distribution of histologic types of breast carcinoma. In: *Int J Cancer*. 1993, vol. 54, nr. 1, p. 1–7.
 233. Stingl J., Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. In: *Nat Rev Cancer*. 2007, vol. 7, nr. 10, p. 791-9.
 234. Subhawong A.P. et al. Heterogeneity of Bcl-2 expression in metastatic breast carcinoma. In: *Mod Pathol*. 2010, vol. 23, nr. 8, p. 1089-96.
 235. Suciuc C. et al. Semi-automated evaluation of Ki-67 index in invasive ductal carcinoma of the breast. In: *Oncol Lett*. 2014, vol. 7, nr. 1, p. 107-114.
 236. Tan S.H. et al. Pharmacogenetics in breast cancer therapy. In: *Clin Cancer Res*. 2008, vol. 14, nr. 24, p. 8027–8041.
 237. Tanei T. et al. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. In: *Clin Cancer Res*. 2009, vol. 15, nr. 12, p. 4234-41.
 238. Tang D. et al. The expression and clinical significance of the androgen receptor and E-cadherin in triple-negative breast cancer. In: *Med Oncol*. 2012, vol. 29, nr. 2, p. 526-33.
 239. Teschendorff A.E. et al. An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. In: *Genome Biol*. 2007, vol. 8, nr. 8, p. R157.
 240. Theissig F. et al. Histological grading of breast cancer. Interobserver, reproducibility and prognostic significance. In: *Pathol Res Pract*. 1990, vol. 186, nr. 6, p. 732-6.
 241. Tot T. DCIS, cytokeratins, and the theory of the sick lobe. In: *Virchows Arch*. 2005, vol. 447, nr. 1, p. 1-8.
 242. Tot T. The origins of early breast carcinoma. In: *Semin Diagn Pathol*. 2010, vol. 27, nr. 1, p. 62-8.
 243. Tot T. The theory of the sick breast lobe and the possible consequences. In: *Int J Surg Pathol*. 2007, vol. 15, nr. 4, p. 369-75.
 244. Toy W. et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. In: *Nat Genet*. 2013, vol. 45, nr. 12, p. 1439-45.
 245. Tsujimoto Y. et al. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. In: *Science*. 1984, vol. 226, nr. 4678, p. 1097–99.
 246. Turashvili G. et al. Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast

- cancer by laser microdissection and microarray analysis. In: *BMC Cancer*. 2007, vol. 7, p. 55-75.
247. Turner N.C. et al. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. In: *Oncogene*. 2007, vol. 26, nr. 14, p. 2126-2132.
248. Turner N.C., Reis-Filho J.S. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. In: *Oncogene*. 2006, vol. 25, nr. 43, p. 5846-5853.
249. Tworoger S.S. et al. Plasma adiponectin concentrations and risk of incident breast cancer. In: *J Clin Endocrinol Metab*. 2007, vol. 92, nr. 4, p. 1510–1516.
250. Umekita Y. et al. Expression of estrogen receptor alpha and progesterone receptor in normal human breast epithelium. In: *In Vivo*. 2007, vol. 21, nr. 3, p. 535-9.
251. Urquidi V. et al. Contrasting expression of thrombospondin-1 and osteopontin correlates with absence or presence of metastatic phenotype in an isogenic model of spontaneous human breast cancer metastasis. In: *Clin Cancer Res*. 2002, vol. 8, nr. 1, p. 61-74.
252. Visvader J.E. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. In: *Genes Dev*. 2009, vol. 23, nr. 22, p. 2563-77.
253. Vranic S. et al. ER- α 36, a novel isoform of ER- α 66, is commonly over-expressed in apocrine and adenoid cystic carcinomas of the breast. In: *J Clin Pathol*. 2011, vol. 64, nr. 1, p. 54-57.
254. Walker K.J. et al. Influence of the antioestrogen tamoxifen on normal breast tissue. In: *Br J Cancer*. 1991, vol. 64, nr. 4, p. 764-8.
255. Wang X. et al. Expression of androgen receptor and its association with estrogen receptor and androgenreceptor downstream proteins in normal/benign breast luminal epithelium. In: *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014, vol. 22, nr. 7, p. 498-504.
256. Weber F. Total-genome analysis of BRCA1/2-related invasive carcinomas of the breast identifies tumor stroma as potential landscaper for neoplastic initiation. In: *Am J Hum Genet*. 2006, vol. 78, nr. 6, p. 961–972.
257. Weigelt B. et al. The molecular underpinning of lobular histological growth pattern: a genome-wide transcriptomic analysis of invasive lobular carcinomas and grade- and molecular subtypematched invasive ductal carcinomas of no special type. In: *J Pathol*. 2010b, vol. 220, nr.1, p. 45-57.
258. Weigelt B., Geyer F.C., Reis-Filho J.S. Histological types of breast cancer: how special are they? In: *Mol Oncol*. 2010a, vol. 4, nr. 3, p. 192-208.
259. Weigelt B., Reis-Filho J.S. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? In: *Nat Rev Clin Oncol*. 2009, vol. 6, nr. 12, p. 718–730.
260. Weiss M.C. et al. Outcome of conservative therapy for invasive breast cancer by histologic subtype. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1992, vol. 23, nr. 5, p. 941-7.

261. Wellings S.R., Jensen H.M., Marcum R.G. An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. In: *J Natl Cancer Inst.* 1975, vol. 55, nr. 2, p. 231-73.
262. Wellings S.R., Jensen H.M. On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast. In: *J Natl Cancer Inst.* 1973, vol. 50, nr. 5, p. 1111-8.
263. West M. et al. Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. In: *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001, vol. 98, nr. 20, p. 11462-11467.
264. Wilson C.L. et al. Effects of oestrogen on gene expression in epithelium and stroma of normal human breast tissue. In: *Endocr Relat Cancer.* 2006, vol. 13, nr. 2, p. 617–628.
265. Wirapati P. et al. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. In: *Breast Cancer Res.* 2008, vol. 10, nr. 4, p. R65.
266. Wolff A.C. et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. In: *J Clin Oncol.* 2013, vol. 31, nr. 31, p. 3997-4013.
267. Woodward W.A. et al. On mammary stem cells. In: *J Cell Sci.* 2005, vol. 118, nr. Pt16, p. 3585-3594.
268. Xia W. et al. A model of acquired autoresistance to a potent ErbB2 tyrosine kinase inhibitor and a therapeutic strategy to prevent its onset in breast cancer. In: *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006, vol. 103, p. 7795–800.
269. Xuan Q.J. et al. Tumor-Associated Macrophages are Correlated with Tamoxifen Resistance in the Postmenopausal Breast Cancer Patients. In: *Pathol Oncol Res.* 2014, vol. 20, nr. 3, p. 619-24.
270. Yamaguchi Y. et al. Tumor-stromal interaction through the estrogen-signaling pathway in human breast cancer. In: *Cancer Res.* 2005, vol. 65, nr. 11, p. 4653–6462.
271. Yamashita H. et al. Coexistence of HER2 over-expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer. In: *Breast Cancer Res.* 2004, vol. 6, nr. 1, p. R24-30.
272. Yang D. et al. Bcl-2 expression predicts sensitivity to chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. In: *J Exp Clin Cancer Res.* 2013, vol. 32, p. 105.
273. Yang P. et al. The impact of p53 in predicting clinical outcome of breast cancer patients with visceral metastasis. In: *Sci Rep.* 2013, vol. 3, p. 2246.
274. Yee L.D. et al. Pilot study of rosiglitazone therapy in women with breast cancer: effects of short-term therapy on tumor tissue and serum markers. In: *Clin Cancer Res.* 2007, vol. 13, p. 246–252.

275. Yoshiji H., Harris S.R., Thorgeirsson U.P. Vascular endothelial growth factor is essential for initial but not continued in vivo growth of human breast carcinoma cells. In: *Cancer Res.* 1997, vol. 57, nr. 18, p. 3924–3928.
276. Zaha D.C., Lazăr E. Molecular characterization of apoptosis by the immunohistochemical evaluation of Bcl-2 in breast cancer. In: *Rom J Morphol Embryol.* 2012, vol. 53, nr. 1, p. 155-60.
277. Zhou W. et al. Molecular subtype classification is a determinant of non-sentinel lymph node metastasis in breast cancer patients with positive sentinel lymph nodes. In: *PLoS One.* 2012, vol. 7, nr. 4, p. e35881.
278. Zinkel S., Gross A., Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. In: *Cell Death Differ.* 2006, vol. 13, p.1351–1359.
279. Fulga V. Eterogenitatea tipurilor histologice a cancerului de sân: origini, cauze și aplicare practică. Chișinău.: Impressum, 2016, 178 p. ISBN 978-9975-3069-8-0.
280. Stolnicu S. et al. Factori prognostici și predictivi în cancerul mamar în Compendiu de patologie mamară. Târgu-Mureș, Casa de Editura „Mureșul”, 2000, 171 p.

ANEXE

Anexa 1. Valoarea expresiei receptorilor hormionali ER și PR în funcție de localizare și gradul de diferențiere.

| Expresie (după ERtm) | Scorul Allred | | | | Gradul de diferențiere | Cazuri | |
|----------------------------|---------------|------|------|------|---------------------------|--------|-----|
| | ERtm | ERmt | PRtm | PRmt | | n | % |
| negativă | 0 | 0 | 0 | 0 | G2 | 6 | 6,3 |
| | 0 | 0 | 0 | 0 | G3 | 7 | 7,4 |
| | 0 | 0 | 1 | 0 | G2 | 1 | 1,1 |
| | 0 | 0 | 1 | 1 | G2 | 1 | 1,1 |
| | 0 | 0 | 2 | 2 | G1 | 1 | 1,1 |
| | 0 | 0 | 3 | 2 | G3 | 1 | 1,1 |
| | 0 | 0 | 3 | 3 | G2 | 1 | 1,1 |
| | 0 | 1 | 0 | 0 | G3 | 1 | 1,1 |
| pozitivă | 1 | 0 | 0 | 0 | G3 | 1 | 1,1 |
| | 1 | 0 | 3 | 0 | G2 | 2 | 2,1 |
| | 1 | 2 | 0 | 0 | G3 | 1 | 1,1 |
| | 1 | 2 | 0 | 2 | G3 | 1 | 1,1 |
| | 2 | 0 | 2 | 1 | G2 | 1 | 1,1 |
| | 2 | 0 | 3 | 3 | G2 | 1 | 1,1 |
| | 2 | 1 | 0 | 0 | G3 | 1 | 1,1 |
| | 2 | 1 | 1 | 2 | G2 | 1 | 1,1 |
| | 2 | 2 | 0 | 1 | G2 | 1 | 1,1 |
| | 2 | 2 | 1 | 1 | G2 | 1 | 1,1 |
| | 2 | 2 | 2 | 3 | G3 | 1 | 1,1 |
| | 2 | 2 | 3 | 3 | G2 | 1 | 1,1 |
| | 2 | 2 | 3 | 3 | G3 | 1 | 1,1 |
| | 2 | 3 | 1 | 0 | G3 | 1 | 1,1 |
| | 3 | 0 | 2 | 0 | G2 | 1 | 1,1 |
| | 3 | 1 | 0 | 0 | G2 | 1 | 1,1 |
| | 3 | 1 | 0 | 2 | G2 | 1 | 1,1 |
| | 3 | 1 | 2 | 2 | G3 | 1 | 1,1 |
| | 3 | 1 | 3 | 3 | G1 | 1 | 1,1 |
| | 3 | 2 | 0 | 0 | G1 | 1 | 1,1 |
| | 3 | 2 | 2 | 0 | G2 | 1 | 1,1 |
| | 3 | 2 | 3 | 0 | G3 | 1 | 1,1 |
| | 3 | 2 | 3 | 2 | G2 | 1 | 1,1 |
| | 3 | 2 | 3 | 2 | G3 | 1 | 1,1 |
| | 3 | 2 | 3 | 3 | G2 | 2 | 2,1 |
| 3 | 3 | 0 | 0 | G2 | 2 | 2,1 | |
| 3 | 3 | 0 | 0 | G3 | 2 | 2,1 | |
| 3 | 3 | 0 | 1 | G3 | 1 | 1,1 | |

Anexa 1. Continuare.

| Expresie (după ERtm) | Scorul Allred | | | | Gradul de diferențiere | Cazuri | |
|----------------------------|---------------|------|------|------|---------------------------|--------|-------|
| | ERtm | ERmt | PRtm | PRmt | | n | % |
| | 3 | 3 | 0 | 2 | G2 | 1 | 1,1 |
| | 3 | 3 | 0 | 3 | G2 | 1 | 1,1 |
| | 3 | 3 | 1 | 1 | G2 | 1 | 1,1 |
| | 3 | 3 | 2 | 0 | G3 | 1 | 1,1 |
| | 3 | 3 | 2 | 1 | G3 | 1 | 1,1 |
| | 3 | 3 | 2 | 2 | G2 | 4 | 4,2 |
| | 3 | 3 | 2 | 2 | G3 | 1 | 1,1 |
| | 3 | 3 | 3 | 0 | G2 | 2 | 2,1 |
| | 3 | 3 | 3 | 1 | G2 | 2 | 2,1 |
| | 3 | 3 | 3 | 1 | G3 | 1 | 1,1 |
| | 3 | 3 | 3 | 2 | G1 | 1 | 1,1 |
| | 3 | 3 | 3 | 2 | G2 | 1 | 1,1 |
| | 3 | 3 | 3 | 3 | G1 | 1 | 1,1 |
| | 3 | 3 | 3 | 3 | G2 | 15 | 15,8 |
| | 3 | 3 | 3 | 3 | G3 | 11 | 11,6 |
| Total | | | | | | 95 | 100,0 |

ERtm, PRtm – valoarea scorului Allred pentru ER și PR în tumoarea primară; *ERmt, PRmt*

– valoarea scorului Allred pentru ER și PR în metastază.

Anexa 2. Descrierea amănunțită a expresiei receptorului p53 în dependență de localizare, gradul de diferențiere al tumorii și vârsta pacienților.

| Expresie (după p53tm) | p53tm | p53mt | Gradul de diferențiere | Grupa de vârstă | n | % | % cazurilor cu transfer de scor |
|-----------------------------|----------|----------|---------------------------|--------------------|----------|-------------|---|
| negativă | 0 | 0 | G1 | după 49 | 3 | 3,45 | 3 cazuri / 3,45% |
| | 0 | 0 | G1 | până la 49 | 1 | 1,15 | |
| | 0 | 0 | G2 | după 49 | 9 | 10,34 | |
| | 0 | 0 | G2 | până la 49 | 7 | 8,05 | |
| | 0 | 0 | G3 | după 49 | 11 | 12,64 | |
| | 0 | 0 | G3 | până la 49 | 1 | 1,15 | |
| | 0 | 1 | G2 | până la 49 | 1 | 1,15 | |
| | 0 | 1 | G3 | după 49 | 2 | 2,30 | |
| pozitivă | 1 | 0 | G2 | până la 49 | 1 | 1,15 | 9 cazuri / 10,34% |
| | 1 | 0 | G3 | după 49 | 1 | 1,15 | |
| | 1 | 0 | G3 | până la 49 | 1 | 1,15 | |
| | 1 | 1 | G2 | după 49 | 4 | 4,60 | |
| | 1 | 1 | G3 | după 49 | 2 | 2,30 | |
| | 1 | 2 | G2 | după 49 | 1 | 1,15 | |
| | 1 | 2 | G3 | după 49 | 1 | 1,15 | |
| | 1 | 3 | G3 | după 49 | 1 | 1,15 | |
| | 2 | 0 | G2 | după 49 | 2 | 2,30 | |
| | 2 | 0 | G2 | până la 49 | 1 | 1,15 | |
| | 2 | 1 | G2 | după 49 | 3 | 3,45 | |
| | 2 | 1 | G2 | până la 49 | 2 | 2,30 | |
| | 2 | 1 | G3 | după 49 | 1 | 1,15 | |
| | 2 | 2 | G2 | după 49 | 5 | 5,75 | |
| | 2 | 2 | G2 | până la 49 | 2 | 2,30 | |
| 2 | 2 | G3 | după 49 | 3 | 3,45 | | |

Cu **Bold** sunt selectate cazurile cu transfer de scor al expresiei p53 după metastazare.

Anexa 2.Continuuare

| Expresie (după p53tm) | p53tm | p53mt | Gradul de diferențiere | Grupa de vârstă | n | % | % cazurilor cu transfer de scor |
|-----------------------------|----------|----------|---------------------------|--------------------|----------|-------------|---|
| pozitivă | 2 | 3 | G2 | după 49 | 1 | 1,15 | |
| | 2 | 3 | G3 | după 49 | 2 | 2,30 | |
| | 3 | 0 | G2 | până la 49 | 1 | 1,15 | |
| | 3 | 0 | G3 | după 49 | 1 | 1,15 | |
| | 3 | 0 | G3 | până la 49 | 1 | 1,15 | |
| | 3 | 2 | G3 | după 49 | 1 | 1,15 | |
| | 3 | 3 | G1 | până la 49 | 1 | 1,15 | |
| | 3 | 3 | G2 | după 49 | 4 | 4,60 | |
| | 3 | 3 | G2 | până la 49 | 3 | 3,45 | |
| | 3 | 3 | G3 | după 49 | 6 | 6,90 | |
| Total | | | | | 87 | 100,0 | |

Cu **Bold** sunt selectate cazurile cu transfer de scor al expresiei p53 după metastazare.

Anexa 3. Studiul comparativ al expresiei BCL2 în funcție de localizare, primară (tm) sau metastatică (mt).

| Expresia (după BCL2tm) | BCL2tm | BCL2mt | Grupa de vârstă | Gradul de diferențiere | n | % | % cazurilor cu transfer de scor |
|------------------------------|----------|----------|--------------------|---------------------------|----------|------------|---|
| negativă | 0 | 0 | după 49 | G1 | 1 | 1,1 | 2 cazuri / 2,2% |
| | 0 | 0 | după 49 | G2 | 4 | 4,6 | |
| | 0 | 0 | după 49 | G3 | 6 | 6,9 | |
| | 0 | 0 | până la 49 | G1 | 1 | 1,1 | |
| | 0 | 0 | până la 49 | G2 | 2 | 2,3 | |
| | 0 | 1 | după 49 | G2 | 1 | 1,1 | |
| | 0 | 1 | după 49 | G3 | 1 | 1,1 | |
| | 0 | 1 | până la 49 | G2 | 1 | 1,1 | |
| | 1 | 0 | după 49 | G2 | 1 | 1,1 | |
| | 1 | 0 | după 49 | G3 | 1 | 1,1 | |
| | 1 | 0 | până la 49 | G3 | 1 | 1,1 | |
| | 1 | 2 | după 49 | G3 | 1 | 1,1 | |
| | 1 | 3 | după 49 | G3 | 1 | 1,1 | |
| pozitivă | 2 | 0 | după 49 | G2 | 1 | 1,1 | 21 cazuri / 24,1% |
| | 2 | 0 | după 49 | G3 | 3 | 3,4 | |
| | 2 | 0 | până la 49 | G2 | 2 | 2,3 | |
| | 2 | 2 | după 49 | G3 | 1 | 1,1 | |
| | 2 | 2 | până la 49 | G2 | 1 | 1,1 | |
| | 2 | 3 | după 49 | G3 | 1 | 1,1 | |
| | 3 | 0 | după 49 | G2 | 3 | 3,4 | |
| | 3 | 0 | după 49 | G3 | 5 | 5,7 | |
| | 3 | 0 | până la 49 | G2 | 3 | 3,4 | |
| | 3 | 1 | după 49 | G2 | 1 | 1,1 | |
| | 3 | 1 | după 49 | G3 | 2 | 2,3 | |

Cu **Bold** sunt selectate cazurile cu transfer de scor în urma metastazării.

Anexa 3.Continuare.

| Expresia (după BCL2tm) | BCL2tm | BCL2mt | Grupa de vârstă | Gradul de diferențiere | n | % | % cazurilor cu transfer de scor |
|------------------------------|---------------|---------------|----------------------------|-----------------------------------|-----------|------------|--|
| pozitivă | 3 | 1 | până la 49 | G2 | 1 | 1,1 | |
| | 3 | 2 | după 49 | G2 | 1 | 1,1 | |
| | 3 | 2 | după 49 | G3 | 1 | 1,1 | |
| | 3 | 2 | până la 49 | G1 | 1 | 1,1 | |
| | 3 | 2 | până la 49 | G3 | 2 | 2,3 | |
| | 3 | 3 | după 49 | G1 | 2 | 2,3 | |
| | 3 | 3 | după 49 | G2 | 17 | 19,5 | |
| | 3 | 3 | după 49 | G3 | 8 | 9,2 | |
| | 3 | 3 | până la 49 | G2 | 8 | 9,2 | |
| | 3 | 3 | până la 49 | G3 | 1 | 1,1 | |
| Total | | | | | 87 | 100 | |

Cu **Bold** sunt selectate cazurile cu transfer de scor în urma metastazării.

Anexa 4. Subtipul molecular al carcinomului mamar de tip NOS în tumoarea primară vs metastaza limfonodală.

| Subtip Tm | Subtip Mt | Grad | n | % |
|----------------------------|----------------------------|-----------|----------|------------|
| 5NP | 5NP | G2 | 2 | 2,2 |
| 5NP | 5NP | G3 | 1 | 1,1 |
| Basal-like | 5NP | G3 | 1 | 1,1 |
| Basal-like | Basal-like | G3 | 1 | 1,1 |
| HER2 | HER2 | G2 | 3 | 3,2 |
| HER2 | HER2 | G3 | 4 | 4,3 |
| HER2 | Luminal B/HER2/Ki67 | G3 | 1 | 1,1 |
| Luminal A | 5NP | G2 | 1 | 1,1 |
| Luminal A | 5NP | G3 | 1 | 1,1 |
| Luminal A | Luminal A | G1 | 3 | 3,2 |
| Luminal A | Luminal A | G2 | 15 | 16,1 |
| Luminal A | Luminal A | G3 | 7 | 7,5 |
| Luminal A | Luminal B/HER2 | G2 | 1 | 1,1 |
| Luminal A | Luminal B/Ki67 | G2 | 1 | 1,1 |
| Luminal A | Luminal B/Ki67 | G3 | 1 | 1,1 |
| Luminal B/HER2 | Luminal A | G2 | 1 | 1,1 |
| Luminal B/HER2 | Luminal B/HER2 | G2 | 2 | 2,2 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | Basal-like | G2 | 1 | 1,1 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | HER2 | G2 | 1 | 1,1 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | Luminal A | G2 | 1 | 1,1 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | Luminal B/HER2 | G2 | 1 | 1,1 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | Luminal B/HER2/Ki67 | G1 | 1 | 1,1 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | Luminal B/HER2/Ki67 | G2 | 1 | 1,1 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | Luminal B/HER2/Ki67 | G3 | 1 | 1,1 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | Luminal B/Ki67 | G2 | 1 | 1,1 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | Luminal B/Ki67 | G3 | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Basal-like | G2 | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal A | G2 | 3 | 3,2 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal A | G3 | 6 | 6,5 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | G1 | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | G2 | 16 | 17,2 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | G3 | 11 | 11,8 |
| Total | | | 93 | 100,0 |

Notă: cazurile cu transfer de scor în urma metastazării au fost selectate cu **BOLD**.

Anexa 5.. Stabilitatea subtipului Luminal B la metastazare.

| Tumoarea primară | | Metastaza | | n | % |
|---------------------|----------------------|---------------------|-------------------|----------|-------------|
| Subtip | Markerii | Subtip | Markerii | | |
| Luminal B/HER2 | ER,PR,HER2 | Luminal A | ER,PR | 1 | 1,7 |
| Luminal B/HER2 | ER,PR,HER2 | Luminal B/HER2 | ER,PR,HER2 | 3 | 5,1 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | ER,HER2,Ki67 | Luminal B/HER2/Ki67 | ER,PR,HER2, Ki67 | 2 | 3,4 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | ER,PR,HER2, CK5,Ki67 | Basal-like | CK5 | 1 | 1,7 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | ER,PR,HER2, CK5,Ki67 | Luminal B/HER2 | ER,PR,HER2 | 1 | 1,7 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | ER,PR,HER2, Ki67 | Luminal B/HER2/Ki67 | ER,PR,HER2, Ki67 | 1 | 1,7 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | ER,PR,HER2, Ki67 | HER2 | HER2,Ki67 | 1 | 1,7 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | ER,PR,HER2, Ki67 | Luminal A | ER,PR | 1 | 1,7 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | ER,PR,HER2, Ki67 | Luminal B/Ki67 | ER,PR,Ki67 | 1 | 1,7 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | PR,HER2,CK5, Ki67 | Luminal B/HER2/Ki67 | PR,HER2,CK5, Ki67 | 1 | 1,7 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | PR,HER2,Ki67 | Luminal B/Ki67 | PR,Ki67 | 1 | 1,7 |
| Luminal B/Ki67 | ER,CK5,Ki67 | Luminal A | ER,PR | 1 | 1,7 |
| Luminal B/Ki67 | ER,CK5,Ki67 | Luminal B/Ki67 | ER,Ki67 | 1 | 1,7 |
| Luminal B/Ki67 | ER,Ki67 | Luminal B/Ki67 | ER,Ki67 | 5 | 8,5 |
| Luminal B/Ki67 | ER,PR,CK5, Ki67 | Luminal B/Ki67 | ER,PR,CK5, Ki67 | 1 | 1,7 |
| Luminal B/Ki67 | ER,PR,CK5, Ki67 | Luminal B/Ki67 | PR,CK5,Ki67 | 1 | 1,7 |
| Luminal B/Ki67 | ER,PR,Ki67 | Luminal A | ER | 2 | 3,4 |
| Luminal B/Ki67 | ER,PR,Ki67 | Luminal A | ER,PR | 6 | 10,2 |
| Luminal B/Ki67 | ER,PR,Ki67 | Luminal B/Ki67 | ER,Ki67 | 2 | 3,4 |
| Luminal B/Ki67 | ER,PR,Ki67 | Luminal B/Ki67 | ER,PR,CK5, Ki67 | 1 | 1,7 |
| Luminal B/Ki67 | ER,PR,Ki67 | Luminal B/Ki67 | ER,PR,Ki67 | 22 | 37,3 |
| Luminal B/Ki67 | PR,CK5,Ki67 | Basal-like | CK5,Ki67 | 1 | 1,7 |
| Luminal B/Ki67 | PR,Ki67 | Luminal B/Ki67 | PR,Ki67 | 2 | 3,4 |
| Total | | | | 59 | 100,0 |

Notă: Subtip – subtipul molecular; Markerii – markerii în baza cărora a fost definit subtipul molecular. Cu **Bold** au fost selectate cazurile cu transfer de subtip la metastazare.

Anexa 6. Carcinom invaziv ductal de tip NOS: corelație după Spearman a valorilor expresiei markerilor implicați în studiu, de localizare primară și metastatică.

| | ERtm | ERmt | PRtm | PRmt | HER2tm | HER2mt | CK5tm | CK5mt | Ki67tm | Ki67mt | BCL2tm | BCL2mt | P53tm | P53mt | EGFRtm | EGFRmt | Ecadtm | Ecadmt | ARtm | ARmt |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------|--------------|--------------|
| ERtm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | | 0,84 | 0,48 | 0,47 | -0,26 | -0,28 | -0,25 | -0,37 | -0,13 | -0,22 | 0,43 | 0,40 | -0,16 | -0,25 | -0,24 | -0,22 | 0,03 | 0,03 | 0,60 | 0,55 |
| p | | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,003 | 0,001 | 0,001 | 0,085 | 0,018 | 0,001 | 0,001 | 0,062 | 0,011 | 0,024 | 0,095 | 0,374 | 0,378 | 0,009 | 0,018 |
| ERmt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,84 | | 0,46 | 0,51 | -0,30 | -0,24 | -0,38 | -0,32 | -0,09 | -0,10 | 0,38 | 0,34 | -0,13 | -0,19 | -0,25 | -0,10 | 0,06 | 0,00 | 0,34 | 0,45 |
| p | 0,001 | | 0,001 | 0,001 | 0,002 | 0,009 | 0,001 | 0,001 | 0,207 | 0,181 | 0,001 | 0,001 | 0,116 | 0,038 | 0,057 | 0,269 | 0,286 | 0,498 | 0,106 | 0,047 |
| PRtm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,48 | 0,46 | | 0,70 | -0,16 | -0,24 | -0,16 | -0,07 | -0,02 | -0,24 | 0,28 | 0,20 | -0,14 | -0,18 | -0,17 | -0,29 | 0,04 | -0,05 | 0,54 | 0,39 |
| p | 0,001 | 0,001 | | 0,001 | 0,026 | 0,010 | 0,034 | 0,247 | 0,408 | 0,012 | 0,003 | 0,031 | 0,083 | 0,049 | 0,083 | 0,041 | 0,301 | 0,311 | 0,018 | 0,073 |
| PRmt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,47 | 0,51 | 0,70 | | -0,21 | -0,16 | -0,28 | -0,09 | -0,16 | -0,19 | 0,23 | 0,29 | -0,19 | -0,24 | -0,30 | -0,18 | 0,24 | -0,08 | 0,52 | 0,50 |
| p | 0,001 | 0,001 | 0,001 | | 0,021 | 0,058 | 0,003 | 0,186 | 0,064 | 0,040 | 0,017 | 0,003 | 0,041 | 0,012 | 0,029 | 0,143 | 0,009 | 0,231 | 0,023 | 0,030 |
| HER2tm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | -0,26 | -0,30 | -0,16 | -0,21 | | 0,74 | 0,16 | 0,20 | 0,07 | 0,27 | -0,23 | -0,30 | 0,02 | 0,09 | 0,08 | 0,00 | 0,00 | 0,13 | -0,02 | 0,25 |
| p | 0,001 | 0,002 | 0,026 | 0,021 | | 0,001 | 0,030 | 0,026 | 0,243 | 0,006 | 0,012 | 0,002 | 0,419 | 0,195 | 0,263 | 0,497 | 0,483 | 0,114 | 0,465 | 0,186 |

Notă: Abrevierea **tm** reflectă valoarea markerului dat în tumoarea primară vs în metastaza limfonodală (**mt**). r_s – coeficientul de corelație Spearman. Cu **Bold** sunt selectate valorile statistic semnificative (p<0,05), la numărul de cazuri (n) examinate.

Anexa 6. Continuare.

| | ERtm | ERmt | PRtm | PRmt | HER2tm | HER2mt | CK5tm | CK5mt | Ki67tm | Ki67mt | BCL2tm | BCL2mt | P53tm | P53mt | EGFRtm | EGFRmt | Ecadtm | Ecadmt | ARtm | Armt |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|--------------|--------------|
| HER2mt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | -0,28 | -0,24 | -0,24 | -0,16 | 0,74 | | 0,18 | 0,17 | 0,10 | 0,32 | -0,29 | -0,38 | 0,13 | 0,17 | -0,08 | -0,13 | 0,01 | 0,21 | -0,07 | 0,25 |
| p | 0,003 | 0,009 | 0,010 | 0,058 | 0,001 | | 0,046 | 0,054 | 0,167 | 0,001 | 0,004 | 0,001 | 0,109 | 0,061 | 0,311 | 0,218 | 0,454 | 0,021 | 0,406 | 0,187 |
| CK5mt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | -0,25 | -0,38 | -0,16 | -0,28 | 0,16 | 0,18 | | 0,62 | 0,33 | 0,21 | -0,33 | -0,20 | 0,08 | 0,01 | 0,18 | 0,07 | -0,05 | 0,12 | -0,44 | -0,16 |
| p | 0,001 | 0,001 | 0,034 | 0,003 | 0,030 | 0,046 | | 0,001 | 0,001 | 0,023 | 0,001 | 0,035 | 0,237 | 0,460 | 0,067 | 0,339 | 0,290 | 0,127 | 0,052 | 0,281 |
| CK5mt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | -0,37 | -0,32 | -0,07 | -0,09 | 0,20 | 0,17 | 0,62 | | 0,32 | 0,25 | -0,35 | -0,16 | 0,04 | 0,09 | 0,06 | 0,29 | -0,02 | -0,01 | -0,26 | -0,36 |
| p | 0,001 | 0,001 | 0,247 | 0,186 | 0,026 | 0,054 | 0,001 | | 0,002 | 0,011 | 0,001 | 0,076 | 0,354 | 0,194 | 0,348 | 0,041 | 0,419 | 0,479 | 0,171 | 0,095 |
| Ki67tm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | -0,13 | -0,09 | -0,02 | -0,16 | 0,07 | 0,10 | 0,33 | 0,32 | | 0,61 | -0,19 | -0,16 | 0,36 | 0,19 | 0,13 | 0,24 | 0,05 | 0,19 | -0,35 | -0,52 |
| p | 0,085 | 0,207 | 0,408 | 0,064 | 0,243 | 0,167 | 0,001 | 0,002 | | 0,001 | 0,035 | 0,067 | 0,001 | 0,037 | 0,168 | 0,084 | 0,319 | 0,040 | 0,101 | 0,024 |
| Ki67mt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | -0,22 | -0,10 | -0,24 | -0,19 | 0,27 | 0,32 | 0,21 | 0,25 | 0,61 | | -0,13 | -0,13 | 0,27 | 0,38 | 0,27 | 0,16 | -0,15 | 0,28 | -0,62 | -0,63 |
| p | 0,018 | 0,181 | 0,012 | 0,040 | 0,006 | 0,001 | 0,023 | 0,011 | 0,001 | | 0,112 | 0,110 | 0,006 | 0,001 | 0,055 | 0,176 | 0,085 | 0,004 | 0,007 | 0,006 |

Notă: Abrevierea **tm** reflectă valoarea markerului dat în tumoarea primară vs în metastaza limfonodală (**mt**). r_s – coeficientul de corelație Spearman. Cu **Bold** sunt selectate valorile statistic semnificative (p<0,05), la numărul de cazuri (n) examinate.

Anexa 6. Continuare.

| | ERtm | ERmt | PRtm | PRmt | HER2tm | HER2mt | CK5tm | CK5mt | Ki67tm | Ki67mt | BCL2tm | BCL2mt | P53tm | P53mt | EGFRtm | EGFRmt | Ecadtm | Ecadmt | ARtm | Armt |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------|--------------|--------|--------|-------|--------------|
| BCL2tm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,43 | 0,38 | 0,28 | 0,23 | -0,23 | -0,29 | -0,33 | -0,35 | -0,19 | -0,13 | | 0,60 | -0,07 | -0,06 | -0,05 | -0,19 | 0,01 | -0,05 | 0,02 | 0,00 |
| p | 0,001 | 0,001 | 0,003 | 0,017 | 0,012 | 0,004 | 0,001 | 0,001 | 0,035 | 0,112 | | 0,001 | 0,253 | 0,292 | 0,387 | 0,135 | 0,447 | 0,337 | 0,467 | 0,496 |
| BCL2mt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,40 | 0,34 | 0,20 | 0,29 | -0,30 | -0,38 | -0,20 | -0,16 | -0,16 | -0,13 | 0,60 | | -0,16 | -0,23 | -0,12 | -0,07 | -0,06 | -0,07 | 0,04 | 0,14 |
| p | 0,001 | 0,001 | 0,031 | 0,003 | 0,002 | 0,001 | 0,035 | 0,076 | 0,067 | 0,110 | 0,001 | | 0,069 | 0,017 | 0,230 | 0,339 | 0,288 | 0,257 | 0,441 | 0,314 |
| p53tm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | -0,16 | -0,13 | -0,14 | -0,19 | 0,02 | 0,13 | 0,08 | 0,04 | 0,36 | 0,27 | -0,07 | -0,16 | | 0,76 | 0,16 | 0,30 | -0,02 | -0,04 | -0,19 | -0,40 |
| p | 0,062 | 0,116 | 0,083 | 0,041 | 0,419 | 0,109 | 0,237 | 0,354 | 0,001 | 0,006 | 0,253 | 0,069 | | 0,001 | 0,147 | 0,039 | 0,429 | 0,367 | 0,246 | 0,068 |
| p53mt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | -0,25 | -0,19 | -0,18 | -0,24 | 0,09 | 0,17 | 0,01 | 0,09 | 0,19 | 0,38 | -0,06 | -0,23 | 0,76 | | 0,16 | 0,30 | -0,17 | 0,12 | -0,34 | -0,55 |
| p | 0,011 | 0,038 | 0,049 | 0,012 | 0,195 | 0,061 | 0,460 | 0,194 | 0,037 | 0,001 | 0,292 | 0,017 | 0,001 | | 0,168 | 0,040 | 0,063 | 0,141 | 0,108 | 0,016 |
| EGFRtm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | -0,24 | -0,25 | -0,17 | -0,30 | 0,08 | -0,08 | 0,18 | 0,06 | 0,13 | 0,27 | -0,05 | -0,12 | 0,16 | 0,16 | | 0,63 | -0,10 | -0,09 | -0,51 | -0,76 |
| p | 0,024 | 0,057 | 0,083 | 0,029 | 0,263 | 0,311 | 0,067 | 0,348 | 0,168 | 0,055 | 0,387 | 0,230 | 0,147 | 0,168 | | 0,001 | 0,205 | 0,295 | 0,122 | 0,023 |

Notă: Abrevierea **tm** reflectă valoarea markerului dat în tumoarea primară vs în metastaza limfonodală (**mt**). r_s – coeficientul de corelație Spearman. Cu **Bold** sunt selectate valorile statistic semnificative (p<0,05), la numărul de cazuri (n) examinate.

Anexa 6. Continuare.

| | ERtm | ERmt | PRtm | PRmt | HER2tm | HER2mt | CK5tm | CK5mt | Ki67tm | Ki67mt | BCL2tm | BCL2mt | P53tm | P53mt | EGFRtm | EGFRmt | Ecadtm | Ecadmt | ARtm | Armt |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------|--------|--------------|--------------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|--------------|
| EGFRmt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | -0,22 | -0,10 | -0,29 | -0,18 | 0,00 | -0,13 | 0,07 | 0,29 | 0,24 | 0,16 | -0,19 | -0,07 | 0,30 | 0,30 | 0,63 | | -0,10 | -0,13 | | |
| p | 0,095 | 0,269 | 0,041 | 0,143 | 0,497 | 0,218 | 0,339 | 0,041 | 0,084 | 0,176 | 0,135 | 0,339 | 0,039 | 0,040 | 0,001 | | 0,282 | 0,227 | | |
| Ecadtm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,03 | 0,06 | 0,04 | 0,24 | 0,00 | 0,01 | -0,05 | -0,02 | 0,05 | -0,15 | 0,01 | -0,06 | -0,02 | -0,17 | -0,10 | -0,10 | | 0,12 | 0,76 | 0,75 |
| p | 0,374 | 0,286 | 0,301 | 0,009 | 0,483 | 0,454 | 0,290 | 0,419 | 0,319 | 0,085 | 0,447 | 0,288 | 0,429 | 0,063 | 0,205 | 0,282 | | 0,129 | 0,001 | 0,001 |
| Ecadmt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,03 | 0,00 | -0,05 | -0,08 | 0,13 | 0,21 | 0,12 | -0,01 | 0,19 | 0,28 | -0,05 | -0,07 | -0,04 | 0,12 | -0,09 | -0,13 | 0,12 | | -0,30 | -0,25 |
| p | 0,378 | 0,498 | 0,311 | 0,231 | 0,114 | 0,021 | 0,127 | 0,479 | 0,040 | 0,004 | 0,337 | 0,257 | 0,367 | 0,141 | 0,295 | 0,227 | 0,129 | | 0,141 | 0,186 |
| ARtm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,60 | 0,34 | 0,54 | 0,52 | -0,02 | -0,07 | -0,44 | -0,26 | -0,35 | -0,62 | 0,02 | 0,04 | -0,19 | -0,34 | -0,51 | | 0,76 | -0,30 | | 0,49 |
| p | 0,009 | 0,106 | 0,018 | 0,023 | 0,465 | 0,406 | 0,052 | 0,171 | 0,101 | 0,007 | 0,467 | 0,441 | 0,246 | 0,108 | 0,122 | | 0,001 | 0,141 | | 0,044 |
| ARmt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,55 | 0,45 | 0,39 | 0,50 | 0,25 | 0,25 | -0,16 | -0,36 | -0,52 | -0,63 | 0,00 | 0,14 | -0,40 | -0,55 | -0,76 | | 0,75 | -0,25 | 0,49 | |
| p | 0,018 | 0,047 | 0,073 | 0,030 | 0,186 | 0,187 | 0,281 | 0,095 | 0,024 | 0,006 | 0,496 | 0,314 | 0,068 | 0,016 | 0,023 | | 0,001 | 0,186 | 0,044 | |

Notă: Abrevierea **tm** reflectă valoarea markerului dat în tumoarea primară vs în metastaza limfonodală (**mt**). r_s – coeficientul de corelație Spearman. Cu **Bold** sunt selectate valorile statistic semnificative (p<0,05), la numărul de cazuri (n) examinate.

Anexa 7. Carcinom lobular invaziv: corelație după Spearman a valorilor expresiei markerilor implicați în studiu, de localizare primară și metastatică.

| | ERtm | ERmt | PRtm | PRmt | Her2tm | Her2mt | CK5tm | CK5mt | Ki67tm | Ki67mt | Bcl2tm | Bcl2mt | P53tm | P53mt | EGFRtm | EGFRmt | Ecadtm | Ecadmt |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------|--------------|-------|--------------|--------------|--------|--------|
| ERtm | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | | 0,60 | 0,78 | 0,68 | -0,24 | -0,06 | -0,41 | -0,46 | 0,54 | 0,41 | 0,46 | -0,06 | 0,47 | 0,28 | 0,47 | 0,35 | -0,24 | -0,09 |
| p | | 0,004 | 0,001 | 0,001 | 0,169 | 0,406 | 0,045 | 0,028 | 0,010 | 0,046 | 0,029 | 0,404 | 0,025 | 0,132 | 0,024 | 0,080 | 0,170 | 0,361 |
| ERmt | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,60 | | 0,56 | 0,48 | -0,22 | -0,39 | -0,04 | -0,27 | 0,44 | 0,38 | 0,64 | 0,34 | 0,08 | -0,20 | 0,57 | 0,33 | -0,23 | -0,11 |
| p | 0,004 | | 0,007 | 0,021 | 0,185 | 0,057 | 0,444 | 0,140 | 0,034 | 0,062 | 0,002 | 0,087 | 0,374 | 0,215 | 0,007 | 0,093 | 0,182 | 0,333 |
| PRtm | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,78 | 0,56 | | 0,62 | -0,15 | -0,09 | -0,07 | -0,18 | 0,51 | 0,65 | 0,50 | 0,04 | 0,38 | 0,17 | 0,58 | 0,42 | -0,10 | -0,04 |
| p | 0,001 | 0,007 | | 0,003 | 0,282 | 0,365 | 0,385 | 0,238 | 0,015 | 0,002 | 0,018 | 0,438 | 0,058 | 0,247 | 0,006 | 0,041 | 0,346 | 0,445 |
| PRmt | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,68 | 0,48 | 0,62 | | -0,22 | -0,15 | 0,00 | -0,22 | 0,25 | 0,26 | 0,48 | 0,16 | 0,46 | 0,34 | 0,15 | 0,32 | 0,04 | -0,01 |
| p | 0,001 | 0,021 | 0,003 | | 0,190 | 0,282 | 0,500 | 0,186 | 0,157 | 0,146 | 0,022 | 0,262 | 0,027 | 0,087 | 0,278 | 0,101 | 0,441 | 0,479 |

Notă: Abrevierea **tm** reflectă valoarea markerului dat în tumoarea primară vs în metastaza limfonodală (**mt**). r_s – coeficientul de corelație Spearman. Cu **Bold** sunt selectate valorile statistic semnificative (p<0,05), la numărul de cazuri (n) examinate.

Anexa 7. Continuare.

| | ERtm | ERmt | PRtm | PRmt | Her2tm | Her2mt | CK5tm | CK5mt | Ki67tm | Ki67mt | Bcl2tm | Bcl2mt | P53tm | P53mt | EGFRtm | EGFRmt | Ecadtm | Ecadmt |
|----------------|--------------|--------------|--------------|-------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------|--------|
| HER2tm | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | -0,24 | -0,22 | -0,15 | -0,22 | | 0,50 | -0,19 | 0,09 | -0,10 | -0,10 | -0,15 | -0,36 | -0,34 | -0,46 | -0,03 | -0,24 | -0,21 | 0,09 |
| p | 0,169 | 0,185 | 0,282 | 0,190 | | 0,017 | 0,228 | 0,361 | 0,343 | 0,344 | 0,280 | 0,070 | 0,084 | 0,027 | 0,448 | 0,172 | 0,201 | 0,367 |
| CK5tm | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | -0,41 | -0,04 | -0,07 | 0,00 | -0,19 | -0,25 | | 0,66 | -0,37 | 0,07 | -0,08 | 0,25 | -0,32 | -0,11 | -0,22 | -0,16 | 0,08 | -0,15 |
| p | 0,045 | 0,444 | 0,385 | 0,500 | 0,228 | 0,161 | | 0,002 | 0,063 | 0,394 | 0,381 | 0,155 | 0,099 | 0,336 | 0,195 | 0,266 | 0,383 | 0,279 |
| CK5mt | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | -0,46 | -0,27 | -0,18 | -0,22 | 0,09 | 0,15 | 0,66 | | -0,40 | 0,03 | -0,18 | 0,09 | -0,39 | -0,16 | -0,12 | 0,06 | -0,20 | -0,34 |
| p | 0,028 | 0,140 | 0,238 | 0,186 | 0,361 | 0,270 | 0,002 | | 0,049 | 0,455 | 0,239 | 0,356 | 0,050 | 0,262 | 0,314 | 0,405 | 0,212 | 0,081 |
| Ki67tm | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,54 | 0,44 | 0,51 | 0,25 | -0,10 | -0,08 | -0,37 | -0,40 | | 0,70 | 0,53 | 0,30 | 0,19 | 0,03 | 0,55 | 0,44 | -0,35 | -0,17 |
| p | 0,010 | 0,034 | 0,015 | 0,157 | 0,343 | 0,373 | 0,063 | 0,049 | | 0,001 | 0,012 | 0,114 | 0,226 | 0,449 | 0,009 | 0,035 | 0,076 | 0,254 |
| Ki67mt | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,41 | 0,38 | 0,65 | 0,26 | -0,10 | -0,13 | 0,07 | 0,03 | 0,70 | | 0,30 | 0,21 | 0,19 | 0,11 | 0,52 | 0,40 | -0,37 | -0,28 |
| p | 0,046 | 0,062 | 0,002 | 0,146 | 0,344 | 0,300 | 0,394 | 0,455 | 0,001 | | 0,116 | 0,204 | 0,222 | 0,328 | 0,013 | 0,051 | 0,067 | 0,135 |

Notă: Abrevierea **tm** reflectă valoarea markerului dat în tumoarea primară vs în metastaza limfonodală (**mt**). r_s – coeficientul de corelație Spearman. Cu **Bold** sunt selectate valorile statistic semnificative (p<0,05), la numărul de cazuri (n) examinate.

Anexa 7. Continuare.

| | ERtm | ERmt | PRtm | PRmt | Her2tm | Her2mt | CK5tm | CK5mt | Ki67tm | Ki67mt | Bel2tm | Bel2mt | P53tm | P53mt | EGFRtm | EGFRmt | Ecadtm | Ecadmt |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| BCL2tm | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,46 | 0,64 | 0,50 | 0,48 | -0,15 | -0,43 | -0,08 | -0,18 | 0,53 | 0,30 | | 0,51 | 0,08 | -0,12 | 0,53 | 0,39 | -0,07 | -0,02 |
| p | 0,029 | 0,002 | 0,018 | 0,022 | 0,280 | 0,037 | 0,381 | 0,239 | 0,012 | 0,116 | | 0,016 | 0,369 | 0,315 | 0,012 | 0,057 | 0,396 | 0,476 |
| BCL2mt | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | -0,06 | 0,34 | 0,04 | 0,16 | -0,36 | -0,35 | 0,25 | 0,09 | 0,30 | 0,21 | 0,51 | | -0,22 | -0,28 | 0,00 | 0,16 | -0,19 | -0,35 |
| p | 0,404 | 0,087 | 0,438 | 0,262 | 0,070 | 0,074 | 0,155 | 0,356 | 0,114 | 0,204 | 0,016 | | 0,188 | 0,129 | 0,493 | 0,260 | 0,225 | 0,077 |
| p53tm | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,47 | 0,08 | 0,38 | 0,46 | -0,34 | -0,12 | -0,32 | -0,39 | 0,19 | 0,19 | 0,08 | -0,22 | | 0,76 | 0,33 | 0,48 | 0,35 | 0,43 |
| p | 0,025 | 0,374 | 0,058 | 0,027 | 0,084 | 0,320 | 0,099 | 0,050 | 0,226 | 0,222 | 0,369 | 0,188 | | 0,001 | 0,088 | 0,021 | 0,078 | 0,037 |
| p53mt | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,28 | -0,20 | 0,17 | 0,34 | -0,46 | -0,11 | -0,11 | -0,16 | 0,03 | 0,11 | -0,12 | -0,28 | 0,76 | | 0,19 | 0,50 | 0,52 | 0,50 |
| p | 0,132 | 0,215 | 0,247 | 0,087 | 0,027 | 0,335 | 0,336 | 0,262 | 0,449 | 0,328 | 0,315 | 0,129 | 0,001 | | 0,219 | 0,017 | 0,013 | 0,018 |
| EGFRtm | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,47 | 0,57 | 0,58 | 0,15 | -0,03 | -0,24 | -0,22 | -0,12 | 0,55 | 0,52 | 0,53 | 0,00 | 0,33 | 0,19 | | 0,75 | 0,02 | 0,33 |
| p | 0,024 | 0,007 | 0,006 | 0,278 | 0,448 | 0,170 | 0,195 | 0,314 | 0,009 | 0,013 | 0,012 | 0,493 | 0,088 | 0,219 | | 0,001 | 0,466 | 0,088 |

Notă: Abrevierea **tm** reflectă valoarea markerului dat în tumoarea primară vs în metastaza limfonodală (**mt**). r_s – coeficientul de corelație Spearman. Cu **Bold** sunt selectate valorile statistic semnificative (p<0,05), la numărul de cazuri (n) examinate.

Anexa 7. Continuare.

| | ERtm | ERmt | PRtm | PRmt | Her2tm | Her2mt | CK5tm | CK5mt | Ki67tm | Ki67mt | Bcl2tm | Bcl2mt | P53tm | P53mt | EGFRtm | EGFRmt | Ecadtm | Ecadmt |
|----------------|-------|-------|--------------|-------|--------|--------|-------|-------|--------------|--------------|--------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------|--------------|--------------|
| EGFRmt | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | 0,35 | 0,33 | 0,42 | 0,32 | -0,24 | -0,03 | -0,16 | 0,06 | 0,44 | 0,40 | 0,39 | 0,16 | 0,48 | 0,50 | 0,75 | | 0,22 | 0,35 |
| p | 0,080 | 0,093 | 0,041 | 0,101 | 0,172 | 0,447 | 0,266 | 0,405 | 0,035 | 0,051 | 0,049 | 0,260 | 0,021 | 0,017 | 0,001 | | 0,187 | 0,080 |
| Ecadtm | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | -0,24 | -0,23 | -0,10 | 0,04 | -0,21 | -0,12 | 0,08 | -0,20 | -0,35 | -0,37 | -0,07 | -0,19 | 0,35 | 0,52 | 0,02 | 0,22 | | 0,84 |
| p | 0,170 | 0,182 | 0,346 | 0,441 | 0,201 | 0,320 | 0,383 | 0,212 | 0,076 | 0,067 | 0,396 | 0,225 | 0,078 | 0,013 | 0,466 | 0,187 | | 0,001 |
| Ecadmt | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r _s | -0,09 | -0,11 | -0,04 | -0,01 | 0,09 | -0,10 | -0,15 | -0,34 | -0,17 | -0,28 | -0,02 | -0,35 | 0,43 | 0,50 | 0,33 | 0,35 | 0,84 | |
| p | 0,361 | 0,333 | 0,445 | 0,479 | 0,367 | 0,346 | 0,279 | 0,081 | 0,254 | 0,135 | 0,476 | 0,077 | 0,037 | 0,018 | 0,088 | 0,080 | 0,001 | |

Notă: Abrevierea **tm** reflectă valoarea markerului dat în tumoarea primară vs în metastaza limfonodală (**mt**). r_s – coeficientul de corelație Spearman. Cu **Bold** sunt selectate valorile statistic semnificative (p<0,05), la numărul de cazuri (n) examinate.

Anexa 8. Carcinom invaziv ductal de tip NOS, subtipul HER2 pozitiv: corelație după Pearson a valorilor expresiei markerilor implicați în studiu, de localizare primară și metastatică.

| | Tumoarea primară | | | | | | | | | | Metastaza limfonodală | | | | | | | | | |
|--------|------------------|-------|------|------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------|-----------------------|--------------|------|--------------|--------------|--------------|--------|--------------|--------|--------|
| | Vârsta | Grad | ERtm | PRtm | Her2tm | Ki67tm | CK5tm | BCL2tm | p53tm | EGFRtm | Ecadtm | ERmt | PRmt | Her2mt | Ki67mt | CK5mt | BCL2mt | p53mt | EGFRmt | Ecadmt |
| Vârsta | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r | | -0,11 | 0,00 | 0,00 | 0,11 | 0,33 | 0,26 | -0,60 | -0,43 | 0,42 | -0,08 | 0,13 | 0,00 | -0,68 | 0,15 | 0,43 | -0,31 | -0,63 | 0,44 | 0,00 |
| p | | 0,38 | 0,50 | 0,50 | 0,38 | 0,19 | 0,25 | 0,03 | 0,13 | 0,12 | 0,42 | 0,38 | 0,50 | 0,03 | 0,36 | 0,15 | 0,21 | 0,05 | 0,28 | 0,50 |
| Grad | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r | -0,11 | | 0,00 | 0,00 | 0,10 | 0,29 | 0,22 | -0,16 | -0,02 | -0,15 | -0,38 | 0,29 | 0,00 | 0,15 | 0,54 | 0,13 | 0,25 | -0,12 | 0,33 | -0,29 |
| p | 0,38 | | 0,50 | 0,50 | 0,39 | 0,23 | 0,28 | 0,33 | 0,48 | 0,34 | 0,16 | 0,24 | 0,50 | 0,36 | 0,08 | 0,38 | 0,26 | 0,39 | 0,33 | 0,24 |
| ERtm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r | 0,00 | 0,00 | | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| p | 0,50 | 0,50 | | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| PRtm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r | 0,00 | 0,00 | 0,00 | | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| p | 0,50 | 0,50 | 0,50 | | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| HER2tm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r | 0,11 | 0,10 | 0,00 | 0,00 | | -0,59 | -0,78 | 0,19 | 0,58 | 0,38 | -0,19 | -1,00 | 0,00 | -0,22 | -0,72 | -0,94 | 0,13 | 0,51 | 0,00 | -0,14 |
| P | 0,38 | 0,39 | 0,50 | 0,50 | | 0,05 | 0,01 | 0,30 | 0,05 | 0,14 | 0,31 | 0,00 | 0,50 | 0,30 | 0,02 | 0,00 | 0,37 | 0,10 | 0,50 | 0,37 |
| Ki67tm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r | 0,33 | 0,29 | 0,00 | 0,00 | -0,59 | | 0,90 | -0,23 | -0,41 | 0,35 | 0,47 | 0,59 | 0,00 | -0,01 | 0,85 | 0,68 | -0,04 | -0,66 | -0,22 | 0,27 |
| P | 0,19 | 0,23 | 0,50 | 0,50 | 0,05 | | 0,00 | 0,27 | 0,16 | 0,17 | 0,10 | 0,06 | 0,50 | 0,49 | 0,00 | 0,03 | 0,46 | 0,04 | 0,39 | 0,26 |
| CK5tm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r | 0,26 | 0,22 | 0,00 | 0,00 | -0,78 | 0,90 | | -0,21 | -0,44 | 0,26 | 0,34 | 0,78 | 0,00 | 0,13 | 0,86 | 0,80 | -0,22 | -0,72 | -0,33 | 0,26 |
| p | 0,25 | 0,28 | 0,50 | 0,50 | 0,01 | 0,00 | | 0,29 | 0,14 | 0,25 | 0,19 | 0,01 | 0,50 | 0,38 | 0,00 | 0,01 | 0,28 | 0,02 | 0,33 | 0,27 |

Anexa 8. Continuare.

| | Tumoarea primară | | | | | | | | | | Metastaza limfonodală | | | | | | | | | |
|--------|------------------|-------|------|------|--------------|--------|-------------|-------------|-------------|--------|-----------------------|-------|------|--------|-------------|--------------|--------|-------------|--------------|-------------|
| | Vârsta | Grad | ERtm | PRtm | HER2tm | Ki67tm | CK5 | BCL2tm | p53tm | EGFRtm | Ecadtm | ERmt | PRmt | HER2mt | Ki67mt | CK5/6mt | Bcl2mt | P53mt | EGFRmt | Ecadmt |
| BCL2tm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r | -0,60 | -0,16 | 0,00 | 0,00 | 0,19 | -0,23 | -0,21 | | 0,66 | 0,10 | 0,18 | -0,36 | 0,00 | 0,11 | -0,28 | -0,48 | 0,41 | 0,43 | 0,00 | -0,22 |
| p | 0,03 | 0,33 | 0,50 | 0,50 | 0,30 | 0,27 | 0,29 | | 0,03 | 0,39 | 0,32 | 0,19 | 0,50 | 0,40 | 0,25 | 0,11 | 0,14 | 0,14 | 0,50 | 0,30 |
| p53tm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r | -0,43 | -0,02 | 0,00 | 0,00 | 0,58 | -0,41 | -0,44 | 0,66 | | 0,08 | 0,19 | -0,47 | 0,00 | 0,19 | -0,37 | -0,62 | 0,00 | 0,86 | 0,13 | -0,21 |
| P | 0,13 | 0,48 | 0,50 | 0,50 | 0,05 | 0,16 | 0,14 | 0,03 | | 0,42 | 0,32 | 0,12 | 0,50 | 0,32 | 0,18 | 0,05 | 0,50 | 0,00 | 0,43 | 0,31 |
| EGFRtm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r | 0,42 | -0,15 | 0,00 | 0,00 | 0,38 | 0,35 | 0,26 | 0,10 | 0,08 | | 0,11 | -0,34 | 0,00 | -0,52 | -0,12 | -0,15 | -0,29 | -0,40 | 0,17 | -0,11 |
| p | 0,12 | 0,34 | 0,50 | 0,50 | 0,14 | 0,17 | 0,25 | 0,39 | 0,42 | | 0,39 | 0,20 | 0,50 | 0,09 | 0,39 | 0,36 | 0,23 | 0,16 | 0,41 | 0,39 |
| Ecadtm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r | -0,08 | -0,38 | 0,00 | 0,00 | -0,19 | 0,47 | 0,34 | 0,18 | 0,19 | 0,11 | | 0,22 | 0,00 | 0,33 | 0,31 | 0,29 | 0,19 | 0,00 | -0,58 | 0,65 |
| p | 0,42 | 0,16 | 0,50 | 0,50 | 0,31 | 0,10 | 0,19 | 0,32 | 0,32 | 0,39 | | 0,30 | 0,50 | 0,21 | 0,23 | 0,24 | 0,31 | 0,50 | 0,21 | 0,04 |
| ERmt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r | 0,13 | 0,29 | 0,00 | 0,00 | -1,00 | 0,59 | 0,78 | -0,36 | -0,47 | -0,34 | 0,22 | | 0,00 | 0,22 | 0,72 | 0,94 | 0,00 | -0,51 | 0,00 | 0,14 |
| P | 0,38 | 0,24 | 0,50 | 0,50 | 0,00 | 0,06 | 0,01 | 0,19 | 0,12 | 0,20 | 0,30 | | 0,50 | 0,30 | 0,02 | 0,00 | 0,50 | 0,10 | 0,50 | 0,37 |
| PRmt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| p | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| HER2mt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r | -0,68 | 0,15 | 0,00 | 0,00 | -0,22 | -0,01 | 0,13 | 0,11 | 0,19 | -0,52 | 0,33 | 0,22 | 0,00 | | 0,29 | 0,00 | 0,00 | 0,26 | -1,00 | 0,65 |
| p | 0,03 | 0,36 | 0,50 | 0,50 | 0,30 | 0,49 | 0,38 | 0,40 | 0,32 | 0,09 | 0,21 | 0,30 | 0,50 | | 0,24 | 0,50 | 0,50 | 0,27 | 0,00 | 0,04 |

Anexa 8. Continuare.

| | Tumoarea primară | | | | | | | | | | | Metastaza limfonodală | | | | | | | | |
|--------|------------------|-------|------|------|--------------|--------------|--------------|--------|--------------|--------|-------------|-----------------------|------|--------------|-------------|--------------|--------|--------------|--------------|--------------|
| | Vârsta | Grad | ERtm | PRtm | HER2tm | Ki67tm | CK5 | BCL2tm | p53tm | EGFRtm | Ecadtm | ERmt | PRmt | HER2mt | Ki67mt | CK5/6mt | Bcl2mt | P53mt | EGFRmt | Ecadmt |
| Ki67mt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r | 0,15 | 0,54 | 0,00 | 0,00 | -0,72 | 0,85 | 0,86 | -0,28 | -0,37 | -0,12 | 0,31 | 0,72 | 0,00 | 0,29 | | 0,69 | 0,00 | -0,48 | -0,62 | 0,31 |
| p | 0,36 | 0,08 | 0,50 | 0,50 | 0,02 | 0,00 | 0,00 | 0,25 | 0,18 | 0,39 | 0,23 | 0,02 | 0,50 | 0,24 | | 0,03 | 0,50 | 0,12 | 0,19 | 0,22 |
| CK5mt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r | 0,43 | 0,13 | 0,00 | 0,00 | -0,94 | 0,68 | 0,80 | -0,48 | -0,62 | -0,15 | 0,29 | 0,94 | 0,00 | 0,00 | 0,69 | | 0,00 | -0,67 | 0,00 | 0,19 |
| p | 0,15 | 0,38 | 0,50 | 0,50 | 0,00 | 0,03 | 0,01 | 0,11 | 0,05 | 0,36 | 0,24 | 0,00 | 0,50 | 0,50 | 0,03 | | 0,50 | 0,03 | 0,50 | 0,33 |
| BCL2mt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r | -0,31 | 0,25 | 0,00 | 0,00 | 0,13 | -0,04 | -0,22 | 0,41 | 0,00 | -0,29 | 0,19 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| p | 0,21 | 0,26 | 0,50 | 0,50 | 0,37 | 0,46 | 0,28 | 0,14 | 0,50 | 0,23 | 0,31 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| p53mt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r | -0,63 | -0,12 | 0,00 | 0,00 | 0,51 | -0,66 | -0,72 | 0,43 | 0,86 | -0,40 | 0,00 | -0,51 | 0,00 | 0,26 | -0,48 | -0,67 | 0,00 | | 0,17 | -0,17 |
| P | 0,05 | 0,39 | 0,50 | 0,50 | 0,10 | 0,04 | 0,02 | 0,14 | 0,00 | 0,16 | 0,50 | 0,10 | 0,50 | 0,27 | 0,12 | 0,03 | 0,50 | | 0,41 | 0,34 |
| EGFRmt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r | 0,44 | 0,33 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | -0,22 | -0,33 | 0,00 | 0,13 | 0,17 | -0,58 | 0,00 | 0,00 | -1,00 | -0,62 | 0,00 | 0,00 | 0,17 | | -1,00 |
| p | 0,28 | 0,33 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,39 | 0,33 | 0,50 | 0,43 | 0,41 | 0,21 | 0,50 | 0,50 | 0,00 | 0,19 | 0,50 | 0,50 | 0,41 | | 0,00 |
| Ecadmt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| r | 0,00 | -0,29 | 0,00 | 0,00 | -0,14 | 0,27 | 0,26 | -0,22 | -0,21 | -0,11 | 0,65 | 0,14 | 0,00 | 0,65 | 0,31 | 0,19 | 0,00 | -0,17 | -1,00 | |
| p | 0,50 | 0,24 | 0,50 | 0,50 | 0,37 | 0,26 | 0,27 | 0,30 | 0,31 | 0,39 | 0,04 | 0,37 | 0,50 | 0,04 | 0,22 | 0,33 | 0,50 | 0,34 | 0,00 | |

Notă: Abrevierea **tm** reflectă valoarea markerului dat în tumoarea primară vs în metastaza limfonodală (**mt**). r – coeficientul de corelație Pearson. Cu **Bold** sunt selectate valorile statistic semnificative (p<0,05).

Anexa 9. Dinamica markerilor incluși în studiu în funcție de subtipul molecular al tumorii ductal invazive și stabilitatea acestuia la metastazare.

| Subtip TM | Subtip Mt | Dinamica receptorilor | | | | | | | | | n | % |
|-------------------|------------|-----------------------|-----------------|----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------|----------|----------|------------|
| | | ER | PR | AR | HER2 | E-cadherina | BCL2 | p53 | CK5 | EGFR | | |
| 5NP | 5NP | Stabil - | Stabil - | - | Stabil - | Ecad pierdere | Stabil - | Stabil + | Stabil - | Stabil + | 1 | 1,1 |
| 5NP | 5NP | Stabil - | Stabil - | - | Stabil - | Stabil + | Stabil - | Stabil + | Stabil - | Stabil + | 1 | 1,1 |
| 5NP | 5NP | Stabil - | Stabil - | - | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Basal-like | 5NP | Stabil - | Stabil - | - | Stabil - | Stabil + | Stabil - | Stabil - | CK5 pierdere | - | 1 | 1,1 |
| Basal-like | Basal-like | Stabil - | Stabil - | - | Stabil - | Stabil + | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil + | 1 | 1,1 |
| HER2 | HER2 | Stabil - | Stabil - | - | Stabil + | Stabil + | BCL2 pierdere | Stabil + | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| HER2 | HER2 | Stabil - | Stabil - | - | Stabil + | Stabil + | BCL2 pierdere | Stabil + | Stabil - | Stabil - | 1 | 1,1 |
| HER2 | HER2 | Stabil - | Stabil - | - | Stabil + | Stabil + | BCL2 pierdere | Stabil + | Stabil - | Stabil + | 1 | 1,1 |
| HER2 | HER2 | Stabil - | Stabil - | - | Stabil + | Stabil + | Stabil - | p53 achiziție | Stabil - | Stabil - | 1 | 1,1 |
| HER2 | HER2 | Stabil - | Stabil - | - | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil - | Stabil + | - | 1 | 1,1 |
| HER2 | HER2 | Stabil - | Stabil - | - | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil + | Stabil - | - | 1 | 1,1 |

Anexa 9. Continuare.

| Subtip TM | Subtip Mt | Dinamica receptorilor | | | | | | | | | n | % |
|-----------|---------------------|-----------------------|--------------|----------|----------|---------------|---------------|-------------|--------------|---------------|---|-----|
| | | ER | PR | AR | HER2 | E-cadherina | BCL2 | p53 | CK5 | EGFR | | |
| HER2 | HER2 | Stabil - | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil + | BCL2 pierdere | Stabil + | CK5 pierdere | EGFR pierdere | 1 | 1,1 |
| HER2 | Luminal B/HER2/Ki67 | ER achiziție | Stabil - | - | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil - | Stabil + | - | 1 | 1,1 |
| Luminal A | 5NP | ER pierdere | PR pierdere | - | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil - | CK5 pierdere | EGFR pierdere | 1 | 1,1 |
| Luminal A | 5NP | ER pierdere | Stabil - | - | Stabil - | Ecad pierdere | - | Stabil - | Stabil - | Stabil - | 1 | 1,1 |
| Luminal A | Luminal A | ER pierdere | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal A | Luminal A | Stabil + | PR achiziție | - | Stabil - | Stabil + | BCL2 pierdere | Stabil - | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal A | Luminal A | Stabil + | PR achiziție | - | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal A | Luminal A | Stabil + | PR pierdere | - | Stabil - | Stabil + | BCL2 pierdere | p53pierdere | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal A | Luminal A | Stabil + | PR pierdere | - | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal A | Luminal A | Stabil + | Stabil - | - | Stabil - | Ecad pierdere | Stabil + | Stabil - | Stabil - | Stabil + | 1 | 1,1 |
| Luminal A | Luminal A | Stabil + | Stabil - | - | Stabil - | Stabil + | Stabil - | Stabil - | Stabil - | - | 1 | 1,1 |

Anexa 9. Continuare.

| Subtip TM | Subtip Mt | Dinamica receptorilor | | | | | | | | | n | % |
|-----------|-----------|-----------------------|----------|----------|----------|---------------|----------------|---------------|---------------|----------|---|-----|
| | | ER | PR | AR | HER2 | E-cadherina | BCL2 | p53 | CK5 | EGFR | | |
| Luminal A | Luminal A | Stabil + | Stabil - | - | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil + | 1 | 1,1 |
| Luminal A | Luminal A | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Ecad pierdere | BCL2 pierdere | Stabil + | Stabil - | Stabil - | 1 | 1,1 |
| Luminal A | Luminal A | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | BCL2 achiziție | Stabil - | Stabil - | Stabil - | 1 | 1,1 |
| Luminal A | Luminal A | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | BCL2 pierdere | Stabil - | Stabil - | Stabil - | 2 | 2,2 |
| Luminal A | Luminal A | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | BCL2 pierdere | Stabil - | Stabil - | Stabil + | 1 | 1,1 |
| Luminal A | Luminal A | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | - | - | Stabil - | - | 2 | 2,2 |
| Luminal A | Luminal A | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil - | - | 4 | 4,3 |
| Luminal A | Luminal A | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil - | Stabil - | 1 | 1,1 |
| Luminal A | Luminal A | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil - | - | 2 | 2,2 |
| Luminal A | Luminal A | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil + | BCL2 pierdere | p53 achiziție | Stabil - | Stabil - | 1 | 1,1 |
| Luminal A | Luminal A | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil - | CK5 achiziție | - | 1 | 1,1 |
| Luminal A | Luminal A | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil - | Stabil - | 1 | 1,1 |

Anexa 9. Continuare.

| Subtip TM | Subtip Mt | Dinamica receptorilor | | | | | | | | | n | % |
|-------------------------|----------------|-----------------------|--------------|----------|----------------|---------------|---------------|--------------|--------------|---------------|---|-----|
| | | ER | PR | AR | HER2 | E-cadherina | BCL2 | p53 | CK5 | EGFR | | |
| Luminal A | Luminal B/HER2 | Stabil + | Stabil + | - | HER2 achiziție | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil - | 1 | 1,1 |
| Luminal A | Luminal B/Ki67 | Stabil + | PR achiziție | - | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal A | Luminal B/Ki67 | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Ecad pierdere | Stabil + | Stabil - | Stabil - | EGFR pierdere | 1 | 1,1 |
| Luminal B/HER2 | Luminal A | Stabil + | Stabil + | - | HER2 pierdere | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil - | Stabil + | 1 | 1,1 |
| Luminal B/HER2 | Luminal B/HER2 | Stabil + | Stabil + | - | Stabil + | Stabil + | BCL2 pierdere | Stabil - | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/HER2 | Luminal B/HER2 | Stabil + | Stabil + | - | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil + | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/HER2/ Ki67 | Basal-like | ER pierdere | PR pierdere | - | HER2 pierdere | Stabil + | - | - | Stabil + | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/HER2/ Ki67 | HER2 | ER pierdere | PR pierdere | - | Stabil + | Stabil + | BCL2 pierdere | Stabil + | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/HER2/ Ki67 | Luminal A | Stabil + | Stabil + | - | HER2 pierdere | Stabil + | Stabil + | p53 pierdere | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/HER2/ Ki67 | Luminal B/HER2 | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil + | CK5 pierdere | - | 1 | 1,1 |

Anexa 9. Continuare.

| Subtip TM | Subtip Mt | Dinamica receptorilor | | | | | | | | | n | % |
|----------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------|----------|------------|
| | | ER | PR | AR | HER2 | E-cadherina | BCL2 | p53 | CK5 | EGFR | | |
| Luminal B/HER2/Ki67 | Luminal B/HER2/Ki67 | Stabil - | Stabil + | - | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil + | Stabil + | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | Luminal B/HER2/Ki67 | Stabil + | PR achiziție | - | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil + | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | Luminal B/HER2/Ki67 | Stabil + | PR achiziție | - | Stabil + | Stabil + | Stabil + | p53 pierdere | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil - | Stabil + | - | HER2 pierdere | Ecad pierdere | - | - | Stabil - | EGFR pierdere | 1 | 1,1 |
| Luminal B/HER2/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil + | Stabil + | - | HER2 pierdere | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Basal-like | Stabil - | PR pierdere | AR pierdere | Stabil - | Stabil + | Stabil - | Stabil + | Stabil + | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal A | Stabil + | PR achiziție | - | Stabil - | Stabil + | Stabil + | p53 pierdere | CK5 pierdere | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal A | Stabil + | PR pierdere | - | Stabil - | Stabil + | Stabil - | Stabil + | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal A | Stabil + | PR pierdere | - | Stabil - | Stabil + | Stabil - | Stabil + | Stabil - | Stabil - | 1 | 1,1 |

Anexa 9. Continuare.

| Subtip TM | Subtip Mt | Dinamica receptorilor | | | | | | | | | n | % |
|----------------|----------------|-----------------------|-------------|--------------|----------|---------------|---------------|---------------|----------|---------------|---|-----|
| | | ER | PR | AR | HER2 | E-cadherina | BCL2 | p53 | CK5 | EGFR | | |
| Luminal B/Ki67 | Luminal A | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | Stabil - | Stabil - | Stabil - | EGFR pierdere | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal A | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | Stabil - | Stabil - | Stabil - | Stabil - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal A | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | Stabil + | p53 pierdere | Stabil - | - | 2 | 2,2 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal A | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil + | Stabil - | p53 pierdere | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal A | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | ER pierdere | Stabil + | - | Stabil - | Ecad pierdere | - | - | Stabil + | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil - | Stabil + | - | Stabil - | Ecad pierdere | - | - | Stabil - | Stabil - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil - | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil + | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil + | PR pierdere | - | Stabil - | - | Stabil + | Stabil + | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil + | PR pierdere | - | Stabil - | Stabil + | BCL2 pierdere | Stabil - | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil + | Stabil - | AR achiziție | Stabil - | Stabil + | BCL2 pierdere | p53 achiziție | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil + | Stabil - | AR pierdere | Stabil - | Stabil + | BCL2 pierdere | Stabil + | Stabil - | EGFR pierdere | 1 | 1,1 |

Anexa 9. Continuare.

| Subtip TM | Subtip Mt | Dinamica receptorilor | | | | | | | | | n | % |
|----------------|----------------|-----------------------|----------|----------|----------|-------------|----------------|--------------|--------------|----------|---|-----|
| | | ER | PR | AR | HER2 | E-cadherina | BCL2 | p53 | CK5 | EGFR | | |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil + | Stabil - | - | Stabil - | Stabil + | BCL2 pierdere | Stabil + | CK5 pierdere | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil + | Stabil - | - | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil + | Stabil - | Stabil + | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | - | Stabil + | Stabil - | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | BCL2 achiziție | Stabil + | Stabil - | Stabil - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | BCL2 pierdere | Stabil + | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | BCL2 pierdere | Stabil + | Stabil - | Stabil - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | BCL2 pierdere | Stabil + | Stabil - | Stabil + | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | - | - | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | Stabil - | Stabil + | Stabil - | Stabil - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | Stabil + | p53 pierdere | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil - | - | 2 | 2,2 |

Anexa 9. Continuare.

| Subtip TM | Subtip Mt | Dinamica receptorilor | | | | | | | | | n | % |
|----------------|----------------|-----------------------|----------|----------|----------|-------------|----------|----------|---------------|----------|----|------|
| | | ER | PR | AR | HER2 | E-cadherina | BCL2 | p53 | CK5 | EGFR | | |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil + | CK5 achiziție | - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil - | - | 3 | 3,2 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil + | Stabil + | - | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil - | 2 | 2,2 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil - | Stabil - | 1 | 1,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil - | Stabil + | Stabil + | Stabil + | Stabil - | - | 1 | 1,1 |
| Total | | | | | | | | | | | 93 | 100% |

Notă: Subtipurile moleculare instabile după metastazare au fost selectate cu **BOLD**. **Stabil +** - stabil pozitiv; **Stabil -** - stabil negativ (absent).

Anexa 10. Dinamica markerilor incluși în studiu în funcție de subtipul molecular al tumorii lobular invazive și stabilitatea acestuia la metastazare.

| Subtip TM | Subtip Mt | Dinamica receptorilor | | | | | | | | n | % |
|-------------------------------------|---------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|----------|------------|
| | | ER | PR | HER2 | E-cadherina | BCL2 | p53 | CK5 | EGFR | | |
| 5NP | 5NP | Stabil- | Stabil- | Stabil- | Stabil+ | Stabil+ | Stabil+ | Stabil- | Stabil- | 1 | 5,6 |
| Basal-like | Basal-like | Stabil- | Stabil- | Stabil- | Stabil- | Stabil- | p53 achiziție | Stabil+ | Stabil- | 1 | 5,6 |
| HER2 | Basal-like | Stabil- | Stabil- | HER2 pierdere | Stabil- | Stabil- | Stabil- | CK5 achiziție | Stabil- | 1 | 5,6 |
| HER2 | HER2 | Stabil- | Stabil- | Stabil+ | Stabil+ | Stabil- | Stabil+ | Stabil- | Stabil- | 1 | 5,6 |
| Luminal A | 5NP | ER pierdere | PR pierdere | Stabil- | Stabil+ | Stabil- | Stabil+ | Stabil- | Stabil- | 1 | 5,6 |
| Luminal A | Luminal A | Stabil+ | Stabil+ | Stabil- | Stabil- | Stabil+ | p53 pierdere | Stabil- | Stabil- | 1 | 5,6 |
| Luminal A | Luminal A | Stabil+ | Stabil+ | Stabil- | Stabil+ | BCL2 pierdere | Stabil+ | Stabil- | Stabil- | 1 | 5,6 |
| Luminal A | Luminal A | Stabil+ | Stabil+ | Stabil- | Stabil+ | Stabil- | Stabil+ | Stabil- | Stabil- | 1 | 5,6 |
| Luminal A | Luminal B/Ki67 | Stabil+ | Stabil+ | Stabil- | Ecad pierdere | Stabil+ | p53 pierdere | Stabil+ | Stabil- | 1 | 5,6 |
| Luminal B/HER2/ Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil+ | Stabil+ | HER2 pierdere | Ecad achiziție | BCL2 pierdere | p53 pierdere | Stabil- | EGFR pierdere | 1 | 5,6 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil+ | PR pierdere | Stabil- | Stabil- | BCL2 pierdere | Stabil- | Stabil- | EGFR pierdere | 1 | 5,6 |

Anexa 10. Continuare.

| Subtip TM | Subtip Mt | Dinamica receptorilor | | | | | | | | n | % |
|----------------|----------------|-----------------------|---------|---------|-------------|---------------|---------|---------------|---------|----|-------|
| | | ER | PR | HER2 | E-cadherina | BCL2 | p53 | CK5 | EGFR | | |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil+ | Stabil- | Stabil- | Stabil- | Stabil+ | Stabil- | Stabil- | Stabil- | 1 | 5,6 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil+ | Stabil+ | Stabil- | Stabil- | Stabil- | Stabil+ | Stabil- | Stabil- | 2 | 11,1 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil+ | Stabil+ | Stabil- | Stabil- | Stabil+ | Stabil- | Stabil- | Stabil- | 1 | 5,6 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil+ | Stabil+ | Stabil- | Stabil- | Stabil+ | Stabil+ | CK5 achiziție | Stabil+ | 1 | 5,6 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil+ | Stabil+ | Stabil- | Stabil+ | BCL2 pierdere | Stabil+ | Stabil- | Stabil+ | 1 | 5,6 |
| Luminal B/Ki67 | Luminal B/Ki67 | Stabil+ | Stabil+ | Stabil- | Stabil+ | Stabil+ | Stabil+ | Stabil- | Stabil+ | 1 | 5,6 |
| Total | | | | | | | | | | 18 | 100,0 |

Notă: Subtipurile moleculare instabile după metastazare au fost selectate cu **BOLD**. **Stabil +** - stabil pozitiv; **Stabil -** - stabil negativ (absent).

Anexa 11. Certificate de inovator





Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5356

Pentru inovația cu titlul

Protocolul manual al tehnicii imunohistochimice aplicate asupra materialului prelevat intraoperator cu utilizarea anticorpului FLEX CD20c, Clona L26, sistemul de vizualizare En Vision™ FLEX

Inovația a fost înregistrată pe data de **16.04.2014**
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**David Valeriu, Rudico Lucian,
Fulga Veaceslav, Grecichina Ecaterina,
Danilov Lucian, Loghin Maria**



Data eliberării

12.05.2014

(Semnătura autorizată)



Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5361

Pentru inovația cu titlul
**Protocolul tehnicii imunohistochimice manuale
cu utilizarea anticorpului FLEX CD56,
Clona 123C3, sistemul de vizualizare
En Vision™ FLEX**

Inovația a fost înregistrată pe data de **14.04.2014**
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

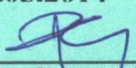
Se recunoaște calitatea de autor(i)

**David Valeriu, Șaptefrați Lilian,
Fulga Veaceslav, Rudico Lucian,
Danilov Lucian, Petrovici Virgil,
Cecoltan Svetlana**



Data eliberării

12.05.2014


(Semnătura autorizată)



Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5351

Pentru inovația cu titlul

Protocolul manual al tehnicii imunohistochemice aplicate asupra materialului prelevat intraoperator cu utilizarea anticorpilor CD3, clona F7.2.38 și Plasma Cell, clona VS38c, sistemul de vizualizare En Vision™ FLEX

Inovația a fost înregistrată pe data de **11.04.2014**
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**David Valeriu, Șaptefrați Lilian,
Fulga Veaceslav, Rudico Lucian, Petrovici
Vergil, Danilov Lucian, Grechin Maia**



Data eliberării

12.05.2014

(Semnătura autorizată)



Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5352

Pentru inovația cu titlul

*Protocolul manual al tehnicii imuno-
histochimice cu sistemul de vizualizare
En Vision™ FLEX*

Inovația a fost înregistrată pe data de **11.04.2014**
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**David Valeriu, Șaptefrați Lilian,
Rudico Lucian, Fulga Veaceslav,
Mazuru Vitalie, Sinițina Lilia**



Data eliberării

L.S.

12.05.2014

(Semnătura autorizată)



DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

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

Fulga Veaceslav

Semnătura

Data

CURRICULUM VITAE



Informații personale:

| | |
|----------------|---|
| Nume / Prenume | Fulga Veaceslav |
| Adresă(e) | Bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, MD-2004, Chișinău, Republica Moldova |
| Telefon | +373 22 205229 /+373 79538794 |
| E-mail | veaceslav.fulga@usmf.md |
| Cetățenia | Republica Moldova |
| Data nașterii | 26.01.1974 |

Experiența profesională:

| | |
|----------------------------|--|
| 2007-2008; 2012-prezent | Conferențiar universitar, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, MD-2004, Chișinău, Republica Moldova |
| 2002-2007 | Lector superior, catedra Histologie, Citologie și Embriologie, USMF „Nicolae Testemițanu” |
| 1999-2002 | Asistent universitar, catedra Histologie, Citologie și Embriologie, USMF „Nicolae Testemițanu” |
| 1999-2002 | Metodist, secția studenți de peste hotare, USMF „Nicolae Testemițanu” |

Educație și formare:

| <i>Perioada</i> | <i>Instituția, specialitatea</i> | <i>Calificarea</i> |
|-----------------|---|-------------------------------------|
| 2005 | Rezidențiat în Morfopatologie, USMF „Nicolae Testemițanu” | Morfopatolog |
| 1999-2002 | Doctorand, USMF „Nicolae Testemițanu”, catedra Histologie, Citologie și Embriologie | Doctor în medicină |
| 1997-1999 | Masterat la catedra Histologie, Citologie și Embriologie | Master în Histologie și Hematologie |
| 1991-1997 | Facultatea Medicină Generală, USMF „Nicolae Testemițanu” | Medic generalist |

Stagii:

| | |
|-------------------------------------|--|
| Iunie 2005 – Noiembrie 2005 | Stagiu practic în patologie, New World Laboratories Inc (381 Plantation str., Five Biotech, Worcester, MA 01605, USA; http://www.nwl.net); |
| Mai 2005 | Cursuri de perfecționare la Histologie, UMF „Gr. Popa”, Iași, România; |
| Septembrie 2013 – Februarie 2014 | Cursuri de perfecționare la Specialitatea Utilizarea mijloacelor informaționale de comunicare în învățământ, Universitatea Tehnică a Moldovei; |

| | |
|--|--|
| Septembrie 2013 – noiembrie 2013; Iunie 2014 | Stagiu de perfecționare în patologia glandei mamare și imunohistochimie, Departamentul de Morfologie Microscopică/Histologie, Centrul de Cercetări în Angiogenează, UMF „V. Babeș”, Timișoara, Romania; |
| Februarie 2014 | Practical training „Writing and management of innovation and technology transfer projects”, Academia de Științe a Moldovei; |
| Februarie 2017 | Mobilitate academică, Erasmus+ International Credit Programme, University of Chester, UK; |
| Septembrie 2017 | Cursul „Moderne ausbildung und verbesserung der lehre an der staaatlichen universitat fur medizin und pharmazie „Nicolae Testemițanu”, Moldova Institut Leipzig; |
| Octombrie 2017 | Cursul „Învățarea bazată pe probleme”, Moldova Institut Leipzig; |
| Domeniile de interes științific: Morfopatologie, imunohistochimie. | |
| Proiecte științifice naționale și internaționale | <ol style="list-style-type: none"> 1. Proiect bilateral de cercetare, RM-Romania, „Implementarea și rafinarea diagnosticului molecular al cancerului mamar în practica oncologică” 2013-2014; 2. Proiect instituțional al AȘM „Evaluarea imunofenotipică a subtipului molecular în tumoarea primară și metastazele limfonodale în carcinomul invaziv de glandă mamară”, 2015-2018. |
| Participări la foruri științifice (naționale și internaționale): | |
| <ul style="list-style-type: none"> ✓ Conferințele științifice anuale ale colaboratorilor IP USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, 2002-2017; ✓ Al XXXIII-lea Simpozion Național de Morfologie Normală și Patologică; II-lea Simpozion Științific de Morfologie Microscopică Normală și Patologică. Craiova, 2002; ✓ Simpozionul „Tehnologii biologice avansate și impactul lor în economia Moldovei”, Chișinău, 2002; ✓ Al XXXV-lea Simpozion Național de Morfologie Normală și Patologică; Al IV-lea Simpozion de Morfologie Microscopică. Craiova, 2004; ✓ Международная конференция „Инновационные обучающие технологии”, Москва, 2012; ✓ al XI-lea Simpozion Național cu Participare Internațională de Morfologie Microscopică. România, Craiova, 2013; ✓ The ninth international conference of anticancer research. Anticancer Res., Sithonia, 2014; ✓ Conferința științifico-practică a medicilor anatomo-patologi „Probleme actuale în patologie”, Chișinău, 2014; ✓ Al XIII-lea Simpozion Național de Morfologie Microscopică cu participare internațională, Craiova, 2015; ✓ II Scientific Conference „Fundamental and clinical medicine”, Kyiv, 2015; ✓ Euroregional Conference for PhD Students and Young Researchers in Biomedicine, Timisoara, 2015; ✓ International Scientific Conference „Actual issues of morphology”, Chisinau, 2015; ✓ Al XV-lea simpozion Național de Morfologie Microscopică cu Participare internațională, Oradea-Băile Felix, 2017; ✓ On-Line conference „Biological markers in fundamental and applied biology. From theory to practice” Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine, Brno, 2017. | |
| Lucrări științifice | 75 publicații științifice și metodicodidactice, inclusiv 51 la tema tezei |
| Apartenența la societăți/asociații științifice naționale, internaționale | |
| 1996 – prezent | Membru al Asociației Științifice de Morfologie din RM; |
| 2006 – prezent | Membru al Societății Române de Morfologie. |
| Competențe lingvistice | Engleza (B2) |