

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI  
ȘCOALA DOCTORALĂ  
ONCOLOGIE MEDICALĂ**

***BIOMARKERI TUMORALI IMUNOHISTOCHIMICI CA SEMNATURĂ  
PROGNOSTICĂ ÎN CANCERUL MAMAR TRIPLU NEGATIV STADIU  
INCIPIENT***

***REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT***

**Conducător de doctorat:**

**PROF. UNIV. DR. ANGHEL RODICA MARICELA**

**Student-doctorand:**

**ILIE SILVIA MIHAELA**

**ANUL**

**2018**

## Introducere

Cancerul mamar, principală cauză de deces la femei [1] este un grup heterogen de tumori diferite atât din punct de vedere morfologic, bimolecular cât și din punct de vedere prognostic, diferențiindu-se în principal prin expresia anumitor receptori la nivelul membranelor celulare tumorale [2].

Cancerul mamar de tip triplu negativ este mai frecvent la vârstă tânără, se asociază cu index proliferativ crescut [3], reprezentând în sine un factor de prognostic negativ prezentând un risc crescut de recidivă precoce în primii 2-3 ani de la diagnostic [4], rata crescută de metastaze viscerale în principal la nivel pulmonar, hepatic și cerebral [5] și o mediană de supraviețuire scurtă după recidivă (9 luni) [6]. Chiar și în stadiile clinic incipiente precum T1N0-1, supraviețuirea fără recidivă (RFS, relapse-free survival) la 5 ani este scăzută, situându-se între 85% și 89% [7]. În fața unor evidențe de evoluție clinică agresivă a acestui tip de cancer mamar precum și în absența indicațiilor de tratamente hormonale sau terapii țintă prin lipsa expresiei receptorilor necesari la nivel celular tumoral [8, 9], se înregistrează o tendință la recomandări de regimuri de chimioterapie citostatică intensificate chiar și în situație postoperatorie și chiar și pentru stadii incipiente de boală; pentru exemplificare, ghidurile europene și nord americane de tratament în oncologie recomandă chimioterapia adjuvantă începând cu diametrul componentei infiltrative de 6 mm, sugerând regimurile de tip doze dense încă din stadiile incipiente [10, 11]. Trebuie menționat că fenotipul triplu negativ cuprinde și subtipuri de prognostic favorabil. Astfel, într-un studiu retrospectiv, două treimi dintr-un lot de 117 paciente care prezentau cancer mamar triplu negativ nu au dezvoltat recidiva cu toate că au fost supuse unui tratament exclusiv locoregional, fără tratament sistemic adjuvant [12]. Din punct de vedere histologic sunt descrise subtipuri precum carcinomul medular și carcinomul adenoid chistic care într-un procent important nu exprima receptorii hormionali și nici HER2, aparținând astfel subtipului triplu negativ, care nu prezintă chimiosensibilitate și care au un prognostic favorabil [13]. Pentru identificarea subtipurilor agresive și neagresive, secvențierea genică reprezintă cea mai sensibilă metodă, dar din motive economice și de fezabilitate evaluarea prin imunohistochimie rămâne cea mai convenabilă pentru practica oncologică de zi cu zi.

Spre deosebire de celelate subtipuri de cancer mamar, tumorile fără expresia receptorilor hormonal, fiind înalt proliferative, nu pot beneficia de aplicarea semnăturilor prognostice validate în vederea deciziei de tratament deoarece acestea se bazează pe expresia genelor reglatoare ale ciclului celular și ale multiplicării [14].

Evaluarea prin metode si tehnici de imunohistochimie reprezintă surogatul pentru măsurarea majorității proteinelor aberante rezultat al mutațiilor sau al delectiilor în interiorul genelor codificatoare, cu o specificitate ce se apropie de 80% [15]. Majoritatea studiilor translationale efectuate pentru acest tip de cancer au utilizat probe tisulare conservate prin parafinare [16].

În ultima vreme o paletă largă de biomarkeri sunt considerați specifici fenotipurilor triplu negativ sau bazal like dar numai câțiva au fost validați în serii independente, foarte puțini au fost comparați cu expresia genelor și niciun studiu nu a comparat mai mulți biomarkeri în paralel [17]. Câțiva dintre aceștia au fost studiați în ceea ce privește rolul lor prognostic în cancerul mamar triplu negativ și câteva studii care încearcă să evalueze grupuri de astfel de biomarkeri corelați în vederea creierii de scoruri prognostice, sunt în curs [18].

Având în vedere nevoile din practica clinică de zi cu zi, am procedat la analiza de biomarkeri celulari care pot fii evaluați prin imunohistochimie și care ar putea contribui la o stratificare prognostică a pacienților diagnosticați cu stadii incipiente de cancer mamar triplu negativ în vederea adaptărilor terapeutice adjuvante în principal cele sistemice.

## **I. Partea generală**

### **1. Epidemiologie, patogeniza și heterogenitatea cancerului mamar stadiu incipient**

Ca factori de risc generali au fost identificați: sexul feminin, menarha la vârstă precoce și menopauza la peste 50 de ani, primiparitatea la vârstă înaintată, nuliparitatea, absența sau durata redusă a alăptării, istoricul familial de cancer mamar la vârstă tânără, utilizarea constantă și de lungă durată a contraceptivelor de tip estrogenic, tratamentul de substituție hormonală prelungit, obezitatea la menopauză, antecedentele de iradiere la nivelul regiunii toracice anterioare, anumite patologii benigne mamară proliferative, mutații germinale ale genelor BRCA1 și BRCA2, iar dintre factorii alimentari, consumul zilnic de alcool [19].

Unul dintre scenariile de patogeneză ale carcinomului mamar ductal infiltrativ, principalul tip de carcinom mamar, este progresia treptată de la hiperplazia ductală atipică la carcinomul ductal în situ și ulterior la carcinomul infiltrativ. Carcinomul ductal în situ, întâlnit în 25% din cazurile nou diagnosticate de cancer mamar [20], reprezintă o proliferare a celulelor neoplazice provenite din epiteliul ductal, fără ruperea membranei bazale [21], fiind în sine non-infiltrativ, dar putând progresa către carcinom ductal infiltrativ într-un procent ce în literatură poate ajunge până la 50% pentru o perioadă de urmărire de 10 ani [22]. Riscul de evoluție către tipul infiltrativ este estimat de către gradul nuclear și prezența necrozei [23] fiind regăsit în indexul prognostic Van Nuys care cuprinde și statusul marginilor precum și diametrul tumoral [24]. Astfel carcinomul în situ este un factor de risc pentru dezvoltarea cancerului mamar infiltrativ [25].

Au fost raportate diferențe în supraviețuire invers corelate cu gradul histologic, fără aplicabilitate la toate subtipurile histopatologice: în subtipul lobular preponderent este identificat gradul II având în vedere că pentru formarea tubulilor în acest caz, este atribuit direct scorul 3 iar în subtipul medular frecvent diferențierea este slabă, în timp ce prognosticul este favorabil [26].

Deși cu o origine tisulară comună, cancerul mamar infiltrativ cuprinde mai multe subtipuri cu tratament și prognostic distinct.

Asistăm la expresia heterogenității încă de la evaluarea clinică a unei tumori maligne mamare, fiind raportate evoluții naturale rapide versus lente, continuată prin variantele de

prezentări radiologice de la calcificări pulverulente la macrocalcificări, prin diferențele în gradul invaziei ganglionare raportat la volumul tumoral și continuata de diferențe intertumorale și intratumorale la nivel ADN ( acid dezoxiribonucleic) și ARN (acid ribonucleic) puse în evidență prin noile tehnicilor de secvențiere genomică și proteică [68]. Heimann și Hellman susțineau, încă din 1998, caracterul heterogen al cancerului mamar, identificându-l ca un spectru de boli și nu ca o singură boală [27].

## **2. Cancerul mamar triplu negativ stadiu incipient heterogenitate și particularități de tratament**

Termenul de cancer mamar triplu negativ (TNBC) a fost conceput pentru a defini o categorie de carcinom ductal infiltrativ caracterizat prin expresia scăzută a receptorilor estrogenici, progesteronici și epidermal HER2(human epidermal growth factor receptor-2), fiind astfel caracterizat prin absență de răspuns la tratamente sistemice specifice [3].

TNBC a fost definit ca entitate taxonomică în 2005, ca surogat imunohistochimic al subtipului de cancer mamar bazal-like care fusese pus în evidență prin sentențiere ADN având în vedere lipsa de fezabilitate de teste ADN în practica clinică zilnică [28]. Fenotipul triplu negativ reprezintă aproximativ 20% din toate cancerurile mamare [29], corespunzând la aproximativ 170,000 cazuri noi pe an la nivel mondial și este corelat cu rasa afro-americană, vârstă tânără [30], statusul premenopauzal, obezitatea iar din punct de vedere histopatologic cu gradul tumoral și indexul mitotic crescut, prezența necrozei tumorale și a infiltratului limfocitar stromal [31].

Fenotipul triplu negativ este la rândul lui o boală heterogenă, fiind diferențiate mai multe subtipuri histopatologice și biomoleculare cu prognostic diferit și cu implicație terapeutică variabilă.

Unul dintre cele mai complete studii retrospective în ceea ce privește impactul asupra supraviețuirii a subtipurile histopatologice ce pot fi întâlnite în cadrul fenotipului triplu negativ tratat prin chirurgie primară (N=693) este cel condusă de Montagna și colegii. Conform acestei analize cel mai comun subtip, după carcinomul infiltrativ ductal, întâlnit în proporție de 5-15% este reprezentat de carcinomul infiltrativ lobular iar în proporție de 10-25% sunt regăsite alte subtipuri histologice precum mucinos, micropapilar, cribriform, neuroendocrin, mixt lobular-ductal, metaplazic (1,28%), apocrin (3,7%), adenoid chistic (1,28%) și medular (0,5%) dintre care ultimele trei fiind recunoscute de prognostic favorabil [32].

Heterogenitatea devine mai complexă la nivel biomolecular. Prin analiza Affymetrix în interiorul cancerului mamar triplu negativ Prat et al. au fost identificate subtipurile surogat ale cancerului mamar în general: în afara profilului biomoleculară bazal like care reprezintă 78,6 %, subtipurile normal-like, luminal B, luminal A și cu supraexpresia HER2 au fost identificate în proporții de 7%, 4,4%, 2,2% și respectiv 7,8%. În lumina acestei

clasificări recomandările de tratament adjuvant în cancerul mamar triplu negativ ar putea varia între hormonoterapie, anticorpi monoclonali antiHER2 sau chimioterapie sistemică pe baza Cisplatin [33]. În 2011, urmare a studiului lui Lehmann, prin analiza expresiei genice la nivelul a 587 de tumori mamare de tip triplu negativ, au putut fi identificate 6 subtipuri biomoleculare distincte: două bazal like unul dintre ele exprimând gene ale proteinelor reglatoare ale ciclului celular (BL1) iar celălalt, gene ale factorilor de creștere celulară și ale markerilor mioepiteliali (BL2) reprezentând subtipul bazal propriu zis, două tipuri mezenchimale care supraexprima gene asociate cu diferențierea și creșterea celulară (M mezenchimal, MSL mezenchimal stem like) IM imunomodulator și LAR subtipul luminal androgen receptor. În ceea ce privește valoarea prognostică a acestei clasificări, au fost înregistrate diferențe semnificative între subgrupurile identificate (log-rank test;  $p = 0.0083$ ). Cea mai scăzută supraviețuire fără recidivă a fost înregistrată pentru subtipul LAR: comparativ cu subtipul BL1, rata hazardului (HR) a fost de 2.9, comparativ cu IM rata hazardului a fost de 3.2, iar comparativ cu MSL de 10.5 ( $p < 0.05$ ). Diferențe au fost înregistrate și comparând subtipul M cu BL1 (HR = 2.6) precum și cu IM (HR = 2.9). În ceea ce privește supraviețuirea fără metastaze la distanță (DMFS) nu au fost înregistrate diferențe semnificative între cele 6 subtipuri TNBC (log-rank test;  $P = 0.2176$ ), totuși rata hazardului pentru subtipul M comparativ cu BL1 și IM fiind supraunitară (Hr = 2.4,  $P < 0.05$ , respectiv Hr = 1.9,  $P < 0.06$ )[34].

Absența de indicație a unui tratament sistemic ținută determină tendința de recomandare a chimioterapiei citotoxice încă din stadii foarte incipiente: astfel ghidurile europene și nord-americane de tratament recomandă chimioterapia adjuvantă încă de la 5mm diametrul histopatologic tumoral [35, 36].

Deși este evident că imunofenotipul triplu negativ este o boală heterogenă și deși există studii clinice care arată că două treimi din pacientele în stadiu incipient nu prezintă recidivă la 5 ani de la diagnostic, în absența unui tratament adjuvant sistemic, tendința rămâne în favoarea unei chimioterapii intensificate [37]. De reamintit că rata recidivei pentru stadiile I-III, este de 30% și mai puțin de o treime din pacientele cu recidivă supraviețuiesc peste 12 luni [38].

Regimurile de chimioterapie recomandate sunt în general pe bazate pe asocierea concomitentă sau secvențială a 3 agenți din clase diferite respectiv din clasa antraciclinelor din clasa taxanilor precum și din clasa agenților alchilanți. Astfel clasic recomandat este

asocierea de manieră secvențială a 4 cicluri din regimul Doxorubicina 60mg/m<sup>2</sup> - Ciclofosfamida 600 mg/m<sup>2</sup> Ziua 1, serie de tratament la 21 de zile urmate de 12 administrări de Paclitaxel 80mg/m<sup>2</sup> sau de 4 cicluri de Docetaxel 100mg/m<sup>2</sup> în administrare la 21 de zile. Există recomandări în favoarea regimurilor doză-dense în care se crește intensitatea dozei standard administrat în unitatea de timp, exprimată în mg/m<sup>2</sup>/săptămână, pentru a reduce riscul formării populațiilor celulare tumorale derivate din celulele reziduale post-intervenție chirurgicală și a rezistenței acestora la agenții citotoxici. [35].

### **3. Factori prognostici în cancerul mamar triplu negativ operabil per primam**

Fenotipul triplu negativ reprezintă un factor de prognostic negativ în sine dar anumiți parametrii clinici și biologici pot rafina evaluarea riscului de recidivă sau de reducere a supraviețuirii și în cadrul acestei subcategorii de pacienți [4].

Printre factorii de prognostic negativ clinici se numără vârsta tânără, rasă neagră și hispanică, statusul premenopauzal și obezitatea [39].

Din punct de vedere histopatologic parametrii prognostici clasici, în cancerul mamar în general sunt diametrul tumoral, în principal al componentei infiltrative, subtipul histopatologic, invazia ganglionară locoregională, gradul tumoral și invazia limfovasculară peritumorală [40].

Printre biomarkerii a caror valoare prognostica a fost studiată de maniera individuală, se numără antigenul nuclear Ki67, receptorul epidermal al factorului de creștere EGFR(epidermal growth factor receptor), citocheratina cu greutate moleculară mare (CK5/6), receptorul androgenic AR, proteina p53, proteină antiapoptotică Bcl2(B-cell lymphoma) și receptorul HER2[18,27].

## **II. Contribuții personale**

### **4. Ipoteza de lucru și obiectivele generale**

Utilizarea predictorilor clinico-patologici sau genomici oferă posibilitatea de identificare de subgrupe cu prognostic diferit și propunerea unui tratament complementar diferențiat și a unei urmăriri personalizate. Astfel în grupul cu risc foarte înalt de recidivă, pacienții ar putea beneficia de o intensificare a tratamentului sau de consultații de urmărire mai frecvente precum și de propunerea de tratamente experimentale în cadrul studiilor clinice iar în grupul cu factori de prognostic pozitiv s-ar putea efectua o deescaladă terapeutică, evitând toxicitățile acute sau cronice aferente.

Ghidurile ESMO, NCCN precum și convenția de la Saint Gallen din 2017 recomandă ca decizia tipului și secvenței de tratament adjuvant să țină cont de clasificarea fenotipică surogat bazată pe determinarea prin imunohistochimie a expresiei receptorilor ER, PR, HER2 și proteinei nucleare Ki67[10,35,41]. Cu un nivel de evidență I A-IIB, în conjuncție cu factorii clinico- patologici, semnaturile biomoleculare prognostice sunt propuse ca un instrument de decizie a tipului de tratament adjuvant hormonal versus citostatic în țările sau instituțiile unde sunt disponibile.

Contrar acestor evidențe, în cancerul mamar triplu negativ, valoarea prognostică a semnaturilor anterior menționate nu este confirmată, având în vedere că se bazează pe analiza expresiei unor gene codificatoare ale unor proteine ale mecanismului proliferării celulare iar acest fenotip este în principal înalt proliferativ.

În afara factorilor clinico-patologici anterior menționați care sunt deja validați în cadrul algoritmilor de tratament sistemic, la ora actuală nu există un biomarker sau un grup de biomarkeri validați care să permita formarea de subgrupuri prognostice cu scopul individualizării tratamentului sistemic adjuvant în cancerul mamar triplu negativ.

Relativ la metodele de analiză ale biomarkerilor tisulari în cancerul mamar, utilizarea tehnicilor de microarray, PCR/real-time PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) prezintă limitări din punct de vedere al acurateții și costurilor în timp ce analiza prin imunohistochimie este mai ușor de efectuat, este fezabilă din punct de vedere cost eficientă, fiind metoda de primă indicație pentru evaluarea biomarkerilor recomandată de societățile savante de histopatologie.

În fața prognosticului nefavorabil, vârstei tinere la diagnostic, procentului crescut de mutații BRCA1, ratei crescute de recidive în primii 2-3 ani de la diagnostic chiar și în stadiile precoce în ciuda unor practici terapeutice și de urmărire intensificate, în fața progreselor în domeniul analizei genomice a tumorilor deja concretizată prin clasificarea tipului studiat de cancer mamar în subtipuri moleculare cu prognostic diferit, dar dificultăților legate de fezabilitatea aplicării lor în practica curentă, proiectul de față și-a propus să identifice un panel de biomarkeri tumorali, care pot fi puși în evidență prin metode și tehnici clasice de imunohistochimie, cu scopul individualizării de subgrupe prognostice în rândul pacientelor cu diagnostic de cancer mamar primar stadiul I-III, de fenotip denumit triplu negativ, la care prima secvență terapeutică cu scop curativ a fost cea chirurgicală. Scopul a constat în gruparea celor mai semnificativi din punct de vedere al prezicerii recidivei și al supraviețuirii fără eveniment într-un scor prognostic ce ar putea fi aplicat pentru individualizarea tratamentului, a ritmului și modalităților de urmărire și crearea de algoritmi în acest sens.

**Obiectivul primar** a constat în identificarea unui grup de biomarkeri tumorali cu expresie la nivelul compartimentului celular, indentificabili și cuantificabili prin tehnici și metode de laborator de imunohistochimie a căror valoare prognostică individuală a fost deja studiată în populația specifică și care să permită stratificarea pacienților în subgrupuri prognostice.

**Obiectivele secundare** au constat în identificarea altor factori clinico-histopatologici în corelație directă sau inversă cu biomarkerii de interes precum și cu grupul-scor de biomarkeri tisulari imunohistochimici precum și identificarea de subgrupuri prognostice în populația țintă în funcție de expresia biomarkerilor cu semnificație prognostică și în intercorelație.

## 5. Metodologia generală a cercetării

Etapale lucrării de cercetare au constat în analiza generală a literaturii, crearea scorului prognostic și aplicarea lui într-o populația specifică precum și efectuarea unei metaanalize.

Într-o primă etapă am procedat la analiza generală a literaturii utilizând baza de date MEDLINE (Medical Literature Analysis and Retrieval System Online) cu scopul de a identifica biomarkerii care au fost studiați de către alte echipe în ceea ce privește rolul prognostic în cancerul mamar triplu negativ stadiu nemetastatic, tratat prin chirurgie primară.

În a doua etapă am procedat la analiza retrospectivă a unei populației țintă de 85 de cazuri de cancer mamar triplu negativ (TNBC, triple negative breast cancer), în cadrul unei cohorte de 631 de paciente cu diagnostic de cancer mamar stadiul incipient, care au beneficiat ca primă secvență terapeutică de tratament chirurgical și care au fost expuse unui tratament adjuvant sistemic.

Din lotul de biomarkeri analizați instituțional și conform datelor din literatură, au fost selecționați cei care au fost găsiți corelați cu recidiva și cu supraviețuirea fără eveniment, precum și intercorelați semnificativ statistic, s-a creat un scor cu intenție prognostică care a fost aplicat în populația țintă și au fost urmărite diferențele de supraviețuire fără eveniment între subgrupele create. Am procedat și la o comparație între expresia biomarkerilor în grupul de paciente TNBC care au recidivat și cele care nu au recidivat pe perioada de urmărire, precum și la o comparație între pacientele care au recidivat din populația țintă și din populația denumită non-triplu negativ.

Într-o ultimă etapă am procedat la analiza sistematică a literaturii în vederea unui metaanalize pentru identificarea de biomarkeri tisulari tumorali evaluabili prin imunohistochimie a căror valoare prognostică a fost studiată în cancerul mamar infiltrativ triplu negativ.

## **6. Biomarkeri prognostici cu potentiala utilitate clinica in cancerul mamar triplu negativ, stadiul incipient: analiza literaturii de specialitate**

### **6.1. Introducere**

Am procedat la analiza generală a literaturii cu scopul de a identifica factori biomoleculari imunohistochimici cu semnificație prognostică în cancerul mamar triplu negativ stadiul incipient sau non-metastatic.

Obiectivul specific principal a fost identificarea biomarkerilor tisulari tumorali identificabili și cuantificabili prin imunohistochimie la nivelul tumorii primitive la pacientele cu cancer mamar triplu negativ operat curativ per primam, în corelație cu parametrii de supraviețuire precum supraviețuirea fără recidivă sau supraviețuirea generală.

Obiectivul specific secundar a fost punerea în evidență de corelații ale biomarkerilor identificați cu alți factori prognostici deja validați la populația țintă.

### **6.2. Material și metodă**

Baza de căutare a articolelor a fost MedLine (PubMed) [42] iar pentru elaborarea strategiei de căutare a fost utilizat acronimul PICO a cărui semnificație este *P*=pacient, *I*=intervenție, *C*=comparație, *O*=outcome (efect) [43].

Populația ținta a fost reprezentată de paciente peste 18 ani cu diagnostic de cancer mamar infiltrativ de fenotip triplu negativ stadiul non-metastatic, a căror primă secvență terapeutică a fost tratamentul chirurgical curativ, intervenția a fost reprezentată de rezultatul analizei histopatologice sau imunohistochimice a markerului studiat, comparația a fost neobligatorie și a fost reprezentată de către paciente cu alt fenotip de cancer mamar infiltrativ și cu același stadiu clinic iar efectul principal urmărit a fost rata supraviețuirii fără recidivă la 3-5 ani, supraviețuirea fără recidivă locoregionala sau la distanță sau fără boală și supraviețuirea generală.

Secundar au fost raportate corelațiile biomarkeriilor reținuți cu alți factori clinico-patologici cu rol prognostic atât în cancerul mamar în general cât și în subtipul TNBC.

### 6.3. Rezultate

În urma analizei generale a literaturii științifice, mai mulți biomarkerii care pot fi puși în evidență prin tehnici de imunohistochimie au reieșit că fiind studiați din punct de vedere prognostic fie de manieră singulară, fie în coexpresie. Astfel au fost regăsiți biomarkeri clasici care definesc subtipul de prognostic negativ bazal-like precum citocheratina CK5/6, EGFR [44], fie biomarkeri care sunt recent studiați și validați ca factori atât prognostici cât și predictivi în cancerul mamar triplu negativ precum AR și infiltratul tumoral limfocitar TIL [45] și nu în ultimul rând clasicii Ki67 și p53 [46].

Evaluarea TIL se poate efectua și prin tehnici și metode de imunohistochimie care pot detecta markeri membranari limfocitari, în încercarea de a caracteriza din punct de vedere calitativ infiltratul limfocitar precum CD45, CD8, CD3(CD=cluster de diferențiere).

Astfel, în studiul prospectiv-retrospectiv condus de Liu și colegii în 2012 într-o cohortă de paciente cu cancer mamar stadiul incipient (N=3992) s-a analizat expresia CD8+ ca marker al infiltratului limfocitar citotoxic. Din punct de vedere al parametrilor de supraviețuire la pacientele cu fenotip triplu negativ rata hazardului pentru supraviețuirea specifică fără cancer mamar, BCSS (breast cancer specific survival) a fost de 0.48, IC 95% [0.34-0.67],  $p < 0.00$  iar rata supraviețuirii specifice la 15 ani a fost de 60% față de 74% ( $P=0.001$ ) în iTIL (infiltrat tumoral limfocitar interstitial) negativ fata de iTIL pozitiv iar, pentru subfenotipul bazal like, HR pentru BCSS a fost 0.35, IC 95% [0.23-0.54],  $p < 0.001$ , iar rata supraviețuirii la 15 ani de 52% față de 74%  $p < 0.001$  [47].

Prezența de infiltrat limfocitar tumoral, FOXP3+ s-a corelat cu absența expresiei receptorilor estrogenici și cu prezența infiltratelor dense de TIL de tip CD8+, factor cunoscut ca fiind de prognostic pozitiv [48]. În ceea ce privește rolul prognostic singular al FOXP3 rezultatele sunt discordante [49].

O atenție deosebită este acordată în ultima vreme receptorului androgenic, ce aparține familiei receptorilor nucleari steroidieni și este constituit din patru domenii cu rol funcțional distinct. Domeniul terminal amino- are rol reglator al transcripției iar celălalt domeniu terminal de tip carboxi- prezintă locusuri pentru fixarea liganzilor endogeni precum testosteronul și 5 $\alpha$  dihidrotestosteron [50].

În încercarea stabilirii rolului prognostic al AR în cancerul mamar triplu negativ non-metastatic a fost condusă o metaanaliză de date relativ recentă, apărută în revista de

specialitate Oncotarget, în Iunie 2016. Din cele 13 studii care au cuprins 2826 pacienți, în majoritatea (92, 3%) analiza expresiei nucleare a receptorului androgenic a fost efectuată prin metode de imunohistochimie. Valoarea prag pentru definirea pozitivității a fost raportată în 10 din 12 studii și a variat după cum urmează: într-un studiu (7.7%) a fost de 0%, în trei studii (23.1%) a fost de 1%, într-un singur studiu (7.7%) pragul a fost de 5% și în alte 4 studii (30.8%) pragul a fost de 10%. Heterogenitatea metanalizei a fost scăzută ( $I^2=33.9\%$ ,  $P=0.119$ ), doar patru dintre studii presupunând analize de subgrup iar diferențele între valorile de referință nu s-au asociat cu diferențe în supraviețuire.

Expresia AR s-a asociat semnificativ cu o supraviețuire fără boală mai bună, rata hazardului pentru supraviețuirea fără boală fiind de 0.789, IC 95% [0.629-0.991],  $p<0.005$ , fără diferențe în ceea ce privește supraviețuirea generală (HR=1.270, IC 95% [0.904-1.782],  $P=0.168$ [51].

Ki 67 fiind un marker al proliferării iar fenotipul triplu negativ fiind înalt proliferativ, în mod frecvent valorile medii sau mediane raportate sunt mai mari în această categorie de cancer mamar, fiind corelat cu gradul tumoral [52].

Rolul prognostic precum și propunerea unei valori prag predictive pentru recidivă a fost evaluată într-un studiu monocentric european la 83 de paciente cu fenotip triplu negativ, dintre care 48.2% cu subtip bazal-like operate primar care au fost urmărite pentru o perioadă mediană de 39 de luni. Pentru detecția lui Ki67 s-a utilizat anticorpii MIB 1 în diluție 1/200. În regresie multivariată, pentru o valoare prag de 61%, Ki67 a fost găsit predictiv pentru supraviețuirea fără boală, HR 3.813 [1.423-10.287],  $P=0.008$  și marginal pentru supraviețuirea generală, HR 2.351 [0.985-5.620],  $P=0.05$ [53].

Supraexpresia receptorului este frecvent asociată cu mutația genei codificatoare iar în cancerul mamar se asociază cu volum tumoral crescut și grad scăzut de diferențiere celulară. În fenotipul triplu negativ, alături de citocheratinele cu greutate moleculară mare, reprezintă un surogat imunohistochimic pentru subfenotipul agresiv bazal-like, expresia fiind raportată cu o frecvență de până la 90% [54].

Un alt biomarker identificat prin analiza literaturii de specialitate, cu potențial rol prognostic în cancerul mamar triplu negativ este proteina p53 codificată de către gena TP53 situată pe cromozomul 17, brațul p [55]. În cancerul mamar, mutația TP53 este raportată cu o incidență de 30% iar în fenotipul triplu negativ până la 75%, ajungând până la 90% în subfenotipul bazal like [56]. Ca urmare a mutației genei, proteina prezintă o degradare mai scăzută și se poate acumula chiar la nivelul citoplasmei, devenind

evidențiată prin imunohistochimie prin utilizarea de anticorpi antinucleari precum DO-7(Dako Danemarca) cu diluții cuprinse între 1/100 și 1/500. Într-o analiză prospectiv-retrospectivă a 1.113 paciente incluse în trialurile clinice BCSG VIII și IX care au evaluat eficiența hormonoterapiei adjuvante versus chimio-hormonoterapia secvențială pentru stadiile incipiente rezultatele valorii clinice a expresiei p53 au fost gasite contradictorii [57], în timp ce într-un studiu al cărei obiectiv a fost să evalueze rolul prognostic al p53 la pacientele tinere cu cancer mamar triplu negativ, tratate prin chirurgie radicală primară (N=197), pozitivitatea p53 a reieșit că factor de prognostic negativ în ceea ce privește supraviețuirea generală, HR 1.775, IC 95% [0.694-4.539],  $P=0.022$  fără influența asupra supraviețuirii fără recidivă[58].

## **7. Semnătura prognostică bazată pe biomarkeri imunohistochimici în cancerul mamar triplu negativ stadiu incipient: analiza retrospectivă pe un lot reprezentativ**

### **7.1. Introducere**

În practica de zi cu zi, pentru evaluarea prognostică și stratificarea terapeutică a cazurilor de pacienți cu neoplasm mamar triplu negativ stadiu incipient, este nevoie de parametrii clinico-biologici și de laborator accesibili, fiabili și necostisitori.

În acest scop am evaluat retrospectiv o cohortă de pacienți adresate pentru tratament chirurgical ca primă etapă terapeutică curativă în cadrul diagnosticului de cancer mamar localizat, efectuând o analiză de subgrup în rândul purtătoarelor de fenotip triplu negativ, pentru a determina în rândul unor markeri celulari tumorali, analizați prin tehnici uzuale de imunohistochimie și în mod curent la nivel instituțional, care ar fi cei cu utilitate prognostică în cadrul populației țintă.

Obiectivul principal specific al cercetării a fost de identificare a biomarkerilor testați instituțional cu valoare prognostică în rândul pacienților operate de cancer mamar triplu negativ stadiu incipient iar obiectivul secundar specific a fost de crearea unui model prognostic pe baza biomarkerilor semnificativi în acest sens și evaluarea diferențelor de supraviețuire între subgrupurile create.

### **7.2. Pacienți și metode**

Am procedat la un *studiu retrospectiv de cohortă* în rândul pacienților adresate pentru tratament chirurgical primar, pentru diagnostic de neoplasm mamar, la Institutul Oncologic Prof Dr Alexandru Trestioreanu din București, între Ianuarie 2005 și Decembrie 2012, care au beneficiat de o perioadă de urmărire de minim 36 de luni. Studiul a fost aprobat de către Comitetul de Etică al instituției și a fost condus conform Declarației Drepturilor Omului de la Helsinki.

Criteriile de includere generale au fost pacienți de sex feminin, vârsta egală sau mai mare de 18 ani, diagnostic de cancer mamar infiltrativ, efectuarea unui tratament chirurgical cu scop curativ, piesa de rezecție postoperatorie să fie evaluată atât prin metode și tehnici de histopatologie cât și de imunohistochimie, consimțământ informat pentru proceduri infiltrative și colectarea prospectivă a datelor, disponibil.

În cadrul acestei populații am efectuat o analiză de subgrup în rândul pacienților purtătoare de cancer mamar de fenotip „triplu negativ” definit prin absența expresiei

receptorilor hormonal precum și a supraexpresiei receptorului membranar epidermal HER2 conform criteriilor de laborator ASCO/CAP după cum a fost redat explicit anterior și pentru simplificarea taxonomică și a comparațiilor clinico-patologice cazurile care nu corespundeau criteriilor imunohistochimice și eventual de imunofluorescență anterior menționate au fost reunite în grupul non-triplu negativ (non-TNBC).

*Criteriile specifice* de includere ale studiului a fost anul de diagnostic, începând cu 2005 când conform Consensului de la Saint Gallen au fost recunoscute și recomandate pentru practică oncologică curentă cele 4 subtipuri surogat de cancer mamar, bazat pe expresia imunohistochimică a receptorilor hormonal, Ki67 și HER2 [28], stadiul clinic al bolii cT1-2N0-1 M0 conform celei de-a șaptea ediții a clasificării TNM a AJCC și UICC, rezecția chirurgicală curativă a tumorii primare și eventual a ganglionilor aferenți (R0=fără reziduu tumoral microscopic) conform criteriilor histopatologice ale AJCC și NCCN, perioada de urmărire minimă de cel puțin 36 de luni din momentul intervenției chirurgicale, tratament specific oncologic adjuvant postoperator care să comporte și chimioterapie citotoxică, în afară de iradiere locală externă și hormonoterapie, în cazul în care aceasta din urmă a fost indicată, conform ghidurilor internaționale ESMO și NCCN disponibile la momentul diagnosticului, aspect histopatologic infiltrativ al carcinomului mamar conform criteriilor Organizației Mondiale a Sănătății, WHO [59], analiza prin imunohistochimie a cel puțin un marker tumoral cu expresie la nivel celular, altul decât ER, PR, Ki67 și HER2 a căror cuantificare să fi fost efectuată conform recomandărilor CAP/ASCO[60].

*Co-criteriile de evaluare* pentru atingerea obiectivului principal au fost diferențele de supraviețuire fără eveniment între pacienții care exprimau biomarkerul de interes, gradul și tipul de corelație cu recidivă bolii și asocierea acestora cu supraviețuirea fără eveniment. Criteriile de evaluare pentru atingerea obiectivului secundar specific au fost gradul și tipul de corelație între biomarkerii de interes precum și diferențele de supraviețuire fără eveniment între subgrupurile prognostice nou constituite în cadrul populației țintă și gradul de semnificație al testului de supraviețuire log-rank Mantel-Cox.

În cadrul atingerii obiectivelor secundare generale au fost evaluați mai mulți parametri precum: rata expresiei fiecărui biomarker atât în rândul populației țintă cât și pentru comparație în rândul pacientelor denumite anterior non-triplu negative, gradul și tipul de corelații ale acestora cu alți parametri clinico-patologici reținuți ca variabile

independente, rata expresiei fiecărui biomarker identificat în funcție de statusul recidivat - non recidivat în cadrul populației țintă.

Variabila dependentă, supraviețuirea fără eveniment, a fost definită ca intervalul de timp exprimat în luni între momentul intervenției chirurgicale și apariția oricărui eveniment de tip recidivă local, recidivă la distanță, deces de orice cauză.

Pentru stabilirea numărului minim de pacienți din subgrupul țintă am aplicat formula pentru calcularea numărului de cazuri necesare în cazul studiilor descriptive [61].

$$\text{Numarul de cazuri} = Z_{1-\alpha/2}^2 p(1-p)/d^2$$

$Z_{1-\alpha/2}$  = constata standard

$P$  = proporția de pacienți de studiat, conform raportărilor anterioare

$D$  = gradul de eroare

În studiul de față am considerat riscul de eroare de 5% (eroare de tip I) ceea ce corespunde la o constantă  $Z$  de 1.96. Considerând prevalența subtipului triplu negativ în rândul pacientelor operate de cancer mamar incipient conform datelor din literatură la 15% [8] numărul de paciente de care era nevoie pentru obținerea de valori cu semnificație statistică pentru variabilele dependente a fost de 196.

*Din punct de vedere statistic*, pentru stabilirea corelației între diferitele variabile categoricale sau binare, cuprinzând biomarkerii analizați, s-au utilizat testul de corelație  $\chi^2$ , testul non-parametric Spearman sau testul exact Fisher și corecția Yates în cazul în care valoarea pe categorie a fost mai mică decât 5. Pentru compararea mediilor de supraviețuire între două categorii s-a aplicat testul Mann-Whitney dacă distribuția valorilor a fost normală și testul Student dacă distribuția a fost non-normală.

Parametrul de supraviețuire evaluat a fost *supraviețuirea fără eveniment*, EFS (event free survival) considerat ca timpul exprimat în luni cuprins între momentul intervenției chirurgicale și apariția unui eveniment de tip recidivă locală, recidivă la distanță, deces de orice cauză.

Asocierea între variabilele categoricale și supraviețuirea fără eveniment a fost testată folosind modelul de regresie logistică multivariată Cox. Curbele de supraviețuire au fost generate folosind metoda Kaplan-Meier iar comparația folosindu-se testul log-rank.

Intervalul de încredere, IC (confidence interval) considerat pentru variabilele cantitative calculate a fost de 95%, toate testele au fost bilaterale iar valoarea  $p$  considerată semnificativă a fost inferioară a 0.05 [62].

### 7.3. Rezultate

După ce s-a procedat la excluderea cazurilor cu perioada de urmărire mai scurtă de 36 de luni, în absența recidivei sau a decesului, sau care nu au beneficiat de tratamentul adjuvant standard sau fără indicație de tratament adjuvant sistemic în afară de hormonoterapie, sau care nu aveau date complete din rândul variabilelor imunohistochimice și terapeutice, din 5134 de dosare analizate, au fost reținute 631 pentru studiul retrospectiv.

Biomarkerii selecționați pentru analiza rolului prognostic, în funcție de practica laboratorului instituțional și al datelor din literatură de specialitate, au fost după cum urmează: receptorul epidermal EGFR (epithelial growth factor receptor), citocheratina CK5/6, proteina de transformare p53, E caderina, proteina Bcl2 (B-cell lymphoma 2), topoizomeraza II alfa TOP2A, ciclooxygenaza Cox2, receptorul epidermal HER2 și factorul Ki67.

Din punct de vedere imunohistochimic media pozitivității pentru ER a fost de 38.6% cu valori cuprinse între 0% și 80% iar media expresiei receptorului progesteronic a fost de 31.3% cu valori cuprinse între 0 și 95%, media Ki67 a fost de 25.2% cu valori cuprinse între 1 și 80% iar HER2 a fost supraexprimat sau echivoc cu pozitivitate în imunofluorescența la 18.71% (118) din cazuri.

Cu privire la distribuția pe fenotipurile surogat, 13.5% (85paciente) au prezentat fenotip de tip triplu negativ, 36.13% (228 paciente) fenotip luminal A, 41.36% (261 paciente) fenotip luminal B, 9.03% (57 paciente) prezentau supraexepresia HER2, dintre care 4.12% (26 paciente) prezentau și pozitivitate pentru receptorii hormonali. Astfel subgrupul comparator non-TNBC a fost constituit din 546 paciente, reprezentând 86.5% din toată cohorta.

În ceea ce privește grupul de paciente țintă expresia biomarkerilor a fost găsită corelată cu variate aspect histopatologice precum stadiul clinic pentru CK5/6 ( $P = 0.010$ ) și E-cad ( $P = 0.0016$ ), subtipul histopatologic ductal pentru EGFR ( $P = 0.041$ ), cu afectarea cadranului mamar extern în cazul p53 ( $P = 0.02$ ), cu statusul menopausal ( $P = 0.004$ ) și cu indicele de masă corporală BMI ( $P = 0.015$ ) pentru Bcl2 cu prezența componentei ductale

în situ pentru TOP2A ( $P = 0.013$ ), pozitivitatea pentru Cox-2 a fost marginal invers corelată cu efracția capsulară ( $P = 0.046$ ) iar expresia HER2 a fost corelată cu tipul histopatologic ( $P = 0.001$ ) și invazia limfovaculară ( $P = 0.072$ ) în timp ce Ki67 a fost corelat cu stadiile pT ( $P = 0.004$ ) și pN ( $P = 0.033$ ). Biomarkerii găsiți corelați direct de manieră marginal statistic au fost CK5/6 și E-cad ( $P = 0.071$ ).

La pacintele cu neoplasm triplu negativ, recidiva a fost gasita corelata cu statusul menopauzal ( $P = 0.016$ ), cu indexul de comorbidități Charlson ( $P = 0.065$ ), cu indicele de masă corporală ( $P = 0.002$ ), pN ( $P = 0.004$ ), cu efracția capsulară ( $P = 0.024$ ) și invers cu expresia CK5/6 ( $P = 0.006$ ). Prin efectuarea regresiei multivariate Cox, după ajustarea pentru statusul menopauzal, indexul Charlson, indicele de masă corporală și stadiul patologic ganglionar, singurul biomarker care a reieșit cu posibila valoare prognostica pentru supraviețuirea fără eveniment a fost CK5/6 HR 0.19 , IC 95% [0.43-0.91],  $P=0.038$ .

Aplicarea testului log-rank (Mantel-Cox) pentru evaluarea diferențelor de supraviețuire între cazurile pozitive față de cazurile negative pentru fiecare biomarker în parte, nu a înregistrat semnificatie statistica decât pentru CK5/6. Astfel pacintele care nu prezentau expresia markerului au avut supraviețuire medie fără eveniment de 68.84 luni, IC 95% [50.06–87.63] față de 98.84 luni, IC 95% [87.99–109.69] la pacintele CK5/6 pozitive (HR = 5.075; IC 95% , 1.09–23.53;  $P = 0.038$ ).

În baza corelației cu recidiva, a diferențelor semnificative de supraviețuire între pacintele pozitive față de cele negative precum și a intercorelației directe între biomarkeri, s-a procedat la propunerea unui scor prognostic care a asociat expresia CK5/6 și a E-caderinei.

Acesta a fost constituit din 3 categorii: CK5/6 pozitiv-E-caderina pozitiv, CK5/6 pozitiv sau negativ și inversul E-caderina negativ sau pozitiv și CK5/6 negativ-E-caderina negativ.

În urma stratificării populației triplu negative, în funcție de scorul anterior menționat, au fost constatate diferențe între valorile medii ale supraviețuirii fără eveniment 39.64 luni (IC 95%, 33.0–46.24) (HR = 2.09; IC 95%, 0.38–11.47;  $P = 0.397$ ) la pacintele CK5/6 negativ-E-caderina negativ, 64.23 mo (IC 95% , 50.50–77.96) (HR = 1.35; IC 95% , 0.25–7.37;  $P = 0.732$ ) la pacintele exprimând doar unul din cei doi markeri și 83.87 luni (IC 95% , 64.24–103.51;  $P = 0.667$ ) la pacintele CK5/6 pozitiv, E caderina pozitiv.

## **8. Biomarkeri care ar putea fi propuși ca pentru evaluare în cadrul unei semnături prognostică în cancerul mamar triplu negativ, stadiu incipient: rezultate preliminare ale unei metaanalize**

### **8.1. Introducere**

În fața diferențelor identificate între diferitele studii în ceea ce privește rolul prognostic al biomarkerilor anterior analizați, am procedat la o analiză sistematică a literaturii, cu scopul realizării unei metaanalize, având ca obiectiv primar specific selectarea de biomarkeri tumorali detectabili prin tehnici și metode de imunohistochimie care au fost studiați în cancerul mamar infiltrativ triplu negativ ca și clasificatori prognostici care ar putea fi propuși în cadrul unui scor prognostic.

Obiectivul secundar a constat în identificarea particularităților studiilor cu rezultate discordante pentru un biomarker dat.

### **8.2. Material și metodă**

Cercetarea în literatura de specialitate a fost efectuată electronic în baza de date MEDLINE, termenii utilizați pentru căutare au fost fie liberi, fie standardizați MeSH<sup>®</sup> (Medical Subject Heading) din vocabularul de termeni medicali creat și actualizat anual de Bibliotecia Națională de Medicină a Statelor Unite ale Americii (NLM, Național Library of Medicine) [63].

Criteriile de selecție în ceea ce privește studiile analizate au fost publicații de tip abstract sau text integral cu apariție după Ianuarie 2005, în limba engleză sau franceză, efectuate numai la subiecți umani, de tip retrospectiv sau prospectiv-retrospectiv sau observaționale, în cadrul trialurilor clinice. În ceea ce privește participanții, criteriile de selecție au fost persoane de sex feminin, adulți, cu diagnostic de cancer mamar infiltrativ cu stadiu clinic localizat sau incipient, care să fi beneficiat de intervenția chirurgicală cu scop curativ ca prim gest terapeutic, cu analiza imunohistochimică efectuată pentru evaluarea receptorilor estrogenici, progesteronici și a receptorului HER2, cu sau fără tratament sistemic, de fenotip triplu negativ denumit și TNBC fie ca și cohortă principală fie ca și subgrup.

În ceea ce privește intervenția/indicatorul, criteriul a fost reprezentat de analiza calitativă și cantitativă prin tehnici și metode de laborator de imunohistochimie a cel puțin unui biomarker la nivel celular tumoral cu scop prognosti, în cadrul studiului respectiv.

Din punct de vedere al efectului măsurat, criteriul a fost reprezentat de conținerea ratei hazardului cu interval de confidență de 95% pentru parametrul de supraviețuire.

Pentru constituirea frazelor de cautare, au fost utilizați operatorii de căutare BOOLEAN AND (și), OR (sau) și NOT (fără). Termenii de căutare pentru definirea populației ca și termeni MeSH au fost *Early stage AND Triple-Negative Breast Cancer OR ER-Negative PR-Negative HER2-Negative Breast Neoplasms* ca și termeni adiționali: *limited disease OR primary operable OR T1-3N0-1 AND hormone negative breast cancer OR basal-like breast cancer OR ER negative breast cancer*.

Pentru definirea intervenției/indicatorului ca și termeni MeSH au fost utilizați *Biological Tumor Markers* iar ca și termeni adiționali: *biomarkers OR biomolecular features OR tumour tissue biomarker* precum și numele științific complet sau non-formal sau abreviat care definesc biomarkerii anterior identificați ca fiind de interes atât în studiul general al literaturii de specialitate cât și în cadrul analizei retrospective precum *AR, EGFR, CK 5/6, E cadherine, TIL, Ki67, Bcl2, p53, TOP2A, Cox2*. Pentru definirea obiectivului s-au utilizat termeni MeSH: *Survival OR Prognosis* iar ca termeni adiționali, *prognostic*. Un exemplu de frază de căutare a fost după urmează „Early stage “AND „Triple-Negative Breast Cancer “AND „Prognostic Biological Tumor Markers “

În rândul datelor extrase și analizate s-au numărat informațiile legate de publicații precum numele primului autor, anul apariției și țara, caracteristicile participanților la studiu precum numărul total, numărul absolut și în procente reprezentat de pacientele cu fenotip de cancer mamar triplu negativ, vârsta medie sau mediană, perioada mediană de urmărire, informații despre criteriile imunohistochimice de definire a categoriei de tumori studiate precum gradul expresiei receptorilor estrogenici, progesteronici și HER2, informații despre biomarkerul studiat precum compartimentul celular, anticorpul și diluția utilizate pentru detecție prin imunohistochimie, valoarea prag stabilită pentru pozitivitate, rata pozitivității la pacientele țintă, informații legate de efectul urmărit precum valorile și intervalul de confidență de 95% pentru supraviețuirea fara boala, DFS sau echivalent precum supraviețuirea fără eveniment, EFS, supraviețuirea fără recidivă, RFS sau supraviețuirea far metastaze la distanță, DMFS și/sau supraviețuirea fără recidivă locoregionala, LRFS obținute preferențial prin regresie multivariată Cox.

Analiza statistică a fost efectuată cu ajutorul programului Review Manager 5.3 software (Rev-Man software, Version 5.3, Cochrane Collaboration, Oxford, UK) și valoarea  $p$  mai mică de 0,05 a fost considerată ca semnificație statistică iar calitatea publicațiilor a fost evaluată conform criteriilor Newcastle-Ottawa[64].

Analiza erorilor sistematice s-a efectuat la nivelul fiecărei publicații cât și transversal la nivelul publicațiilor grupate prin analiza *funnel plot*. A fost aplicat modelul de analiza *random effect* și s-a calculat suma ratelor hazardului după calcularea heterogenității între studii.

### 8.3. Rezultate

Din cele 1200 publicații care au fost inițial identificate în baza de date PubMed conform frazelor de cautare construite, după excluderea celor care nu corespundeau inițial în baza analizei titlului și ulterior în baza analizei rezumatului au fost identificate 265 de publicații relevante pentru analiza textului integral. După excluderea a 165 de studii datorită lipsei a unor date esențiale, efectului măsurat pentru evaluarea obiectivului primar diferit de DFS sau echivalent și a datelor incomplete de supraviețuire, au fost reținute 34 de studii.

Ca și caracteristici generale, au fost incluse un număr total de 8365 de pacienți în cadrul a 34 de studii, dintre care 25(73.5%) au evaluat exclusiv cohorte specifice de pacienți cu cancer mamar triplu negativ exclusiv.

Biomarkerii pentru care au fost regăsite publicații conform criteriilor anterior definite au fost AR, EGFR, Ki67, E caderina, CK5/6, p53, TIL, TOP2A și c-Kit. Dintre aceștia au fost reținuți pentru introducere în metaanaliza, doar cei pentru care au fost identificate cel puțin trei studii, indiferent de calitate, presupunând excluderea a 3 publicații care analizau rolul prognostic al c-Kit și TOP2A.

Rezultatele cu semnificație statistică au fost după cum urmează: pentru EGFR, HR 2.34, IC95% [1.69-3.23]  $p < 0.00001$ , cu o heterogenitate de 0%,  $P = 0.88$ , pentru E caderina HR = 0.39 IC95% [0.24-0.63]  $P = 0.0001$ , cu o heterogenitate de 0%,  $P = 0.86$  și pentru TIL HR = 0.51 IC95% [0.42-0.97]  $p < 0.00001$ , cu o heterogenitate de 0%,  $P = 0.50$ .

## 9. Concluzii și perspective

Lucrarea de cercetare de față și-a propus să identifice biomarkeri tumorali tisulari care pot fi puși în evidență și cuantificați prin metode și tehnici de imunohistochimie cu scopul de a propune un model prognostic utilizabil în practica oncologică zilnică, care să permită stratificarea corespunzătoare a pacienților cu neoplasm mamar de fenotip triplu negativ, stadiu incipient și personalizarea tratamentului adjuvant în principal sistemic.

În urma analizei retrospective monocentrice, am identificat un singur biomarker a cărui expresie a prezentat valoare prognostică semnificativă, un reprezentant al clasei moleculare citocheratine respectiv CK5/6, recunoscut ca un marker surrogat imunohistochimic de definire a subtipului de cancer mamar triplu negativ de prognostic defavorabil, bazal-like.

În urma testelor de corelație statistică a fost propus un scor prognostic bazat pe coexpresia CK5/6 precum și a proteinei de joncțiune E-caderina, fără atingerea unei semnificații statistice din punct de vedere al diferențelor de supraviețuire între subgrupurile formate.

Drept consecință, pentru recrutarea mai multor biomarkeri candidați, am procedat la analiza sistematică a rezultatelor publicate ale lucrărilor de cercetare ale altor echipe, pentru obținerea unei relevanțe statistice de calitate.

În urma metaanalizei efectuate pentru fiecare dintre biomarkerii selecționați, conform studiilor ale căror rapoarte au fost complete în urma criteriilor prestabilite, au fost reținuți ca având valoare prognostică semnificativă EGFR cu valoare predictivă negativă, E-caderina cu valoare predictivă pozitivă, consolidând rezultatele analizei de cohortă anterior efectuate și CD8, marker membranar al limfocitelor citotoxice ca surrogat imunohistochimic al parametrului histopatologic deja recomandat de experți ca factor de prognostic pozitiv, TIL.

În concluzie, rezultatele obținute în urma celor două proiecte de cercetare permit propunerea unui model prognostic care să cuprindă următorii biomarkeri: EGFR, E-caderina, CK5/6 identificabile la nivelul compartimentului celular tumoral și CD8 la nivel interstitial.

Contribuția expresiei receptorului androgenic precum și valoarea prag cu semnificație prognostică pentru Ki67 sunt subsecțiuni care vor fi analizate ulterior.

După extinderea bazei de căutare la nivelul Embase (Excerpta Medica database) și DARE în vederea definitivării analizei sistematice a literaturii de specialitate, în principal pentru definirea rolului prognostic al ER, KI67, p53 și CK5/6, biomarkerii reținuți vor fi grupați într-un scor ce va fi propus pentru evaluare de manieră prospectivă sau prospectiv-retrospectivă într-o cohortă reprezentativă de paciente cu cancer mamar de fenotip triplu negativ stadiu incipient, tratate prin chirurgie primară.

Obiectivele de cercetare științifică au fost atinse în majoritate, limitările fiind legate de numărul redus de paciente incluse în studiu, inferior numărului necesar calculat de 196, absența standardizării detecției unui număr important de biomarkeri analizați instituțional, conducând uneori la rezultate discordante față de literatură și accesului limitat la textul integral pentru un număr important de publicații în intenție de a fi analizate în vederea efectuării metaanalizei.

Lucrarea științifică de față reprezintă o propunere tehnico-economică importantă, având în vedere evoluția către personalizare a tratamentelor în Oncologie și a dificultăților legate de aplicarea practică a celor mai noi și performante metode de analiză de laborator a specimenelor tumorale sau a derivatelor atât din punct de vedere al fezabilității cât și din punct de vedere al costurilor.

## Bibliografie

1. Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, Lozano R, Lopez AD, Murray CJ, et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet*. 2011 Oct 22;378(9801):1461-84.
2. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* 2011;5:5–23.
3. Irvin WJ Jr, Carey LA. What is triple-negative breast cancer? *Eur J Cancer*. 2008 Dec;44(18):2799-805.
4. Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME, Theriault RL, Edge SB, Wong YN, et al. Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network. *Cancer* 2012;118:5463-72.
5. Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JG, et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res*. 2008 May 1;68(9):3108-14.
6. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007 Aug 1;13(15 Pt 1):4429-34.
7. Kaplan HG, Malmgren JA, Atwood M. T1N0 triple negative breast cancer: risk of recurrence and adjuvant chemotherapy. *Breast J*. 2009 Sep-Oct;15(5):454-60
8. Podo F, Buydens LM, Degani H, Hilhorst R, Klipp E, Gribbestad IS, et al. Triple-negative breast cancer: present challenges and new perspectives. *Mol Oncol*. 2010 Jun;4(3):209-29.
9. Alvarez RH, Valero V, Hortobagyi GN. Emerging targeted therapies for breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Jul 10;28(20):3366-79.
10. Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, F. Penault-Llorca, P. Poortmans, E. Rutgers, et al. ESMO guidelines working group. Primary breast cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013;24(Suppl. 6):vi7e23.
11. NCCN. NCCN Guidelines. Breast Cancer version 3.2017. Accesed April 2017. Available from: [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/breast.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf)

12. Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J, et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24:5652-5657.
13. Trendell-Smith NJ, Peston D, Shousha S. Adenoid cystic carcinoma of the breast: a tumour commonly devoid of oestrogen receptors and related proteins. *Histopathology*. 1999;35:241–248.
14. Pusztai L. Gene expression profiling of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2009;11(Suppl 3):S11.
15. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B, Hermitte F, Viens P, et al. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer* 2008;123:236–240.
16. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol* 2011;24:157–167.
17. Choo JR, Nielsen TO. Biomarkers for basal-like breast cancer. *Cancers* 2010;2:1040–1065.
18. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple negative breast cancer. *Cancer*. 2006;109:25–32.
19. Bonadonna G, Hortobagyi GN, Valagussa P. Textbook of breast cancer: a clinical guide to therapy. Third Edition. Taylor and Francis Group, London and New York 2006.
20. Desantis C, DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, et al. Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(1):52–62.
21. Allred DC, Wu Y, Mao S, Nagtegaal ID, Lee S, Perou CM, et al. Ductal carcinoma in situ and the emergence of diversity during breast cancer evolution. *Clin Cancer Res*. 2008;14(2):370–8.
22. Wellings SR, Jensen HM. On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast. *J Natl Cancer Inst*. 1973 May;50(5):1111-8.
23. Silverstein MJ, Poller DN, Waisman JR, et al. Prognostic classification of breast ductal carcinoma-in-situ. *Lancet* 1995;345:1154–1157.
24. Silverstein MJ, Lagios MD, Craig PH, et al. A prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer* 1996;77:2267–2274.
25. Allegra CJ, Aberle DR, Ganschow P, Hahn SM, Lee CN, Millon-Underwood S et al. National Institutes of Health State-of-the-Science Conference statement:

Diagnosis and Management of Ductal Carcinoma In Situ September 22-24, 2009. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Feb 3;102(3):161-9.

26. Ellis IO, Broughton N, Elston CW, Blamey RW. The relationship of histological type to survival and oestrogen receptor status in primary operable breast carcinoma. *J. Pathol.* 1987; 152: 2 19A.
27. Heimann R, Hellman S. Aging, progression, and phenotype in breast cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:2686–2692.
28. Goldhirsch A. J. H. Glick R. D. Gelber A. S. Coates B. Thürlimann H.-J. Senn Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005. *Annals of Oncology*, Volume 16, Issue 10, 1 October 2005, Pages 1569–1583.
29. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2010 Nov 11;363(20):1938-48.
30. Trivers KF, Lund MJ, Porter PL, Liff JM, Flagg EW, Coates RJ, Eley JW. The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race. *Cancer Causes Control.* 2009 Sep;20(7):1071-82. Epub 2009 Apr 3.
31. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, Perou CM. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol.* 2006;19(2):264.
32. Montagna E, Maisonneuve P, Rotmensz N, Cancelllo G, Iorfida M, Balduzzi A et al. Heterogeneity of triple-negative breast cancer: histologic subtyping to inform the outcome. *Clin Breast Cancer.* 2013 Feb;13(1):31-9.
33. Prat A, Adamo B, Cheang MC, Anders CK, Carey LA, Perou CM. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist.* 2013;18(2):123-33.
34. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietersen JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011 Jul;121(7):2750-67.
35. NCCN. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Breast Cancer Version 2.2018. Accessed October 2018 from [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/breast.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf)

36. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015 Sep;26 Suppl 5: v8-30.
37. Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J, et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2006, 24:5652-5657.
38. Podo F, Buydens LM, Degani H, Hilhorst R, Klipp E, Gribbestad IS, et al. Triple-negative breast cancer: present challenges and new perspectives. *Mol Oncol*. 2010 Jun;4(3):209-29.
39. Adami HO, Malker B, Holmberg L, Persson I, Stone B. The relation between survival and age at diagnosis in breast cancer. *N Engl J Med*. 1986 Aug 28;315(9):559-63.
40. Sabatier R, Jacquemier J, Bertucci F et al. Peritumoural vascular invasion: a major determinant of triple-negative breast cancer outcome. *Eur J Cancer*. 2011 Jul; 47(10):1537-45
41. Curigliano G, Burstein HJ, P Winer E, Gnant M, Dubsy P, Loibl S, Colleoni M, Regan MM et al. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Ann Oncol*. 2017 Aug 1;28(8):1700-12.
42. Lindberg DA. Internet access to the National Library of Medicine. *Eff Clin Pract*. 2000 Sep-Oct;3(5):256-60.
43. Schardt C, Adams MB, Owens T, Keitz S, Fontelo P. Utilization of the PICO framework to improve searching PubMed for clinical questions. *BMC Med Inform Decis Mak*. 2007 Jun 15;7:16.
44. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al: Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004, 10(16):5367-74.
45. Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, Shulman LN, Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol*. 2014 Sep 20;32(27):2959-66.

46. Wang W, Wu J, Zhang P, Fei X, Zong Y, Chen X, et al. Prognostic and predictive value of Ki-67 in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. 2016;7(21):31079-87
47. Liu S, Lachapelle J, Leung S, Gao D, Foulkes WD, Nielsen TO. CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2012 Mar 15;14(2):R48.
48. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2010 Nov 11;363(20):1938-48.
49. Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG et al. An evaluation of the clinical significance of FOXP3+ infiltrating cells in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011;127: 99–108
50. Zhu X, Li H, Liu JP, Funder JW. Androgen stimulates mitogen-activated protein kinase in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1999; 152(1–2):199–206.
51. Wang C, Pan B, Zhu H, Zhou Y, Mao F, Lin Y, et al. Prognostic value of androgen receptor in triple negative breast cancer: A meta-analysis. *Oncotarget* 2016;7: 46482–91.
52. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart-Gebhart MJ, Paesmans M. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 2007 May 21;96(10):1504-13.
53. Mrklič I, Čapkun V, Pogorelič Z, Tomić S. Prognostic value of Ki-67 proliferating index in triple negative breast carcinomas. *Pathol Res Pract*. 2013 May;209(5):296-301.
54. Siziopikou KP, Ariga R, Prousaloglou KE, Gattuso P, Cobleigh M. The challenging estrogen receptor-negative/ progesterone receptor-negative/HER-2-negative patient: a promising candidate for epidermal growth factor receptor-targeted therapy? *The breast journal*. 2006;12(4):360-2.
55. Lacroix M1, Toillon RA, Leclercq G. p53 and breast cancer, an update. *Endocr Relat Cancer*. 2006 Jun;13(2):293-325.
56. Olivier M, Langerød A, Carrieri P et al. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Feb 15; 12(4):1157-67.

57. Coates AS, Millar EK, O'Toole SA, Molloy TJ, Viale G, Goldhirsch A et al. Prognostic interaction between expression of p53 and estrogen receptor in patients with node-negative breast cancer: results from IBCSG Trials VIII and IX. *Breast Cancer Res.* 2012 Nov 5;14(6):R143.
58. Lee DS, Kim SH, Suh YJ, Kim S, Kim HK, Shim BY. Clinical implication of p53 overexpression in breast cancer patients younger than 50 years with a triple-negative subtype who undergo a modified radical mastectomy. *Jpn J Clin Oncol.* 2011 Jul;41(7):854-66.
59. Tavassoli FA, Devilee P (eds): *Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs.* Lyon, IARC Press, 2003
60. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131(1):18-43.
61. Charan J, Biswas T. How to calculate sample size for different study designs in medical research? *Indian J Psychol Med.* 2013 Apr;35(2):121-6.
62. Bradburn MJ, Clark TG, Love SB, Altman DG. Survival analysis Part III: multivariate data analysis -- choosing a model and assessing its adequacy and fit. *British journal of cancer.* 2003;89(4):605-11.
63. ROGERS FB. Medical subject headings. *Bull Med Libr Assoc.* 1963 Jan;51: 114-6.
64. Tierney JF, Stewart LA, Gherzi D, Burdett S, Sydes MR. Practical methods for incorporating summary time-to-event data into meta-analysis. *Trials.* 2007 Jun 7;8:16.