

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

**”CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

**INFLUENȚA RECEPTORILOR ANDROGENICI LA
PACIENTELE CU NEOPLASM MAMAR TRIPLU NEGATIV:
CERCETĂRI EPIDEMIOLOGICE, CLINICE ȘI
HISTOPATOLOGICE
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

Conducător de doctorat:

PROF.UNIV.DR. Ioana- Anca Bădărau

Student-doctorand:

Irina Radu (căs. Niță)

2022

Cuprins

Listă lucrări științifice publicate

Listă abrevieri și simboluri

I.	PARTEA GENERALĂ	1
1	Neoplasmul de sân la femei	2
1.1	Factorii de risc pentru apariția neoplasmului de sân	2
1.2	Diagnosticul neoplasmului de sân	11
1.3	Tratamentul cancerului de sân incipient sau local avansat	14
1.4	Neoplasmul mamar triplu negativ	25
2	Evaluarea markerilor predictivi și de prognostic în cancerul mamar	32
2.1	Tipul histologic și grading-ul tumorilor mamare maligne	32
2.2	Expresia receptorilor estrogenici și progesteronici	33
2.3	Expresia oncoproteinei HER2/neu	34
2.4	Impactul expresiei indicelui Ki67	35
2.5	Subtiparea moleculară a cancerului de sân	37
3	Caracteristicile și rolul receptorilor androgenici în neoplasmul mamar	38
3.1	Fiziologia androgenilor la femei	38
3.2	Rolul hormonilor androgenici în apariția neoplasmului mamar	40
3.3	Particularitățile receptorilor androgenici în neoplasmul mamar	43
3.4	Semnalizarea genomică a receptorilor androgenici	45
3.5	Localizarea receptorilor androgenici, semnalizarea non genomică și aspecte funcționale	52
3.6	Influența receptorilor androgenici pe subtipuri moleculare	57
3.7	Stadiul actual al terapiei țintite anti androgenice în cancerul mamar	61
II.	PARTEA SPECIALĂ - CONTRIBUȚII PERSONALE	65
4	Ipoteză de lucru și obiective generale	66
4.1	Motivația subiectului tratat în teza de doctorat și ipoteza de lucru	66
4.2	Scopul și obiectivele tezei de doctorat	66
5	Metodologia generală a cercetării-alcătuirea bazei de date și analiza statistică	69
5.1	Aspecte generale	69

5.2	Criterii de selecție a pacienților incluși în studiu	70
5.3	Material și Metodă	71
5.4	Înregistrarea și analiza statistică a rezultatelor	74
5.5	Alcătuirea studiilor	75
6	Studiul 1. Analiza descriptivă, interferențială și a receptorilor androgenici pe lotul pacientelor cu neoplasm mamar triplu negativ, lotul pacientelor non-triplu negativ și pe lotul întreg	77
6.1	Introducere, ipoteză de lucru și obiective specifice	77
6.2	Material și metodă specifice	78
6.3	Rezultate	82
6.4	Discuții	95
7	Studiul 2. Impactul factorilor de prognostic pe supraviețuirea generală pentru pacientele cu neoplasm mamar	104
7.1	Introducere, ipoteză de lucru și obiective specifice	104
7.2	Materiale și metode specifice	105
7.3	Rezultate	106
7.4	Discuții	125
8	Studiul 3. Impactul factorilor de prognostic pe intervalul liber de boală pentru pacientele cu neoplasm mamar	130
8.1	Introducere, ipoteză de lucru și obiective specifice	130
8.2	Materială și metodă	131
8.3	Rezultate	134
8.4	Discuții	150
9	Contribuție personală și concluzii	155
	Bibliografie	158

Listă abrevieri și simboluri

ARE	Elemente de răspuns androgenic
CTC	Celule tumorale circulante
CXCL12	Ligandul chemokinei 12
CXCR4	Receptorul chemokinei 4
DHT	Dihidrotestosteron
HER2/neu +/-	Receptor 2/ neu al factorului de creștere epidermică umană pozitiv sau negativ
HR	Rata de hazard
IHC	Imunohistochimie
NMTN	Neoplasm mamar triplu negativ
OS	Supraviețuirea generală
PFS	Supraviețuirea fără semne de boală
RA ^{+/-}	Receptori androgenici pozitivi sau negativi
RE ^{+/-}	Receptorul estrogenic pozitivi sau negativi
RMST	Media restrictivă de supraviețuire

Introducere

Neoplasmul mamar reprezintă cel mai frecvent tip de cancer diagnosticat în întreaga lume, incidența sa fiind aproximativ egală cu cea a cancerului pulmonar, reprezentând peste două milioane cazuri noi/ an [1]. În Statele Unite ale Americii, cancerul de sân este cel mai frecvent cancer feminin și a doua cea mai frecventă cauză de deces prin cancer la femei. Conform statisticilor internaționale, rata mortalității prin cancer de sân a scăzut progresiv începând din anul 1970 [2]. Această scădere se datorează îmbunătățirii modalităților de screening, dar și a terapiei adjuvante [3]. Terapia oncologică salvează vieți și vindecă procesele neoplazice cu atât mai mult cu cât diagnosticul este stabilit mai devreme, în faze incipiente.

Motivația alegerii acestei teme se datorează faptului că neoplasmul mamar triplu negativ (NMTN) reprezintă subtipul molecular cu prognosticul cel mai sever și care afectează preponderent femeile tinere. Rolul receptorilor androgenici este incomplet elucidat pentru tumorile mamare maligne și consecutiv impactul pe care aceștia îl au asupra prognosticului.

Cercetarea noastră vizează entități clinice frecvent întâlnite în practica clinică, dar cu impact asupra supraviețuirii persoanelor de sex feminin. Această teză de doctorat reprezintă o lucrare de pionierat la nivel național, încadrându-se în direcțiile de cercetare ale lumii medicale contemporane.

Neoplasmul de sân triplu negativ reprezintă aproximativ 15% din totalul cancerelor mamare [4], fiind frecvent diagnosticat la paciente sub 40 ani. Acest subtip tumoral prezintă un comportament mai agresiv decât celelalte tipuri de cancer de sân. Spre deosebire de tumorile care supraexprimă receptori hormonali și pentru care există terapii țintite, pentru pacientele cu NMTN fără metastaze, tratamentul se rezumă doar la câteva citostatice și, recent, la imunoterapie (în combinație cu chimioterapie) doar pentru tumorile de tip triplu negativ avansate local care exprimă PD-L1 (ligandul 1 asociat cu moartea celulară programată), însă acest tratament nu este în prezent aprobat în România pentru această patologie. Având în vedere aceste aspecte, se impune găsirea unor ținte terapeutice care să prelungească supraviețuirea acestor paciente.

Receptorii androgenici (RA) sunt prezenți în proporții variate, putând fi detectați împreună cu ceilalți receptori pe care îi asociază celulele tumorale (receptori estrogenici (RE), receptori progesteronici (RP), HER2/neu), însă conform datelor din literatură asocierea RA-RE este cel mai frecvent întâlnită [5, 6]. Cu toate că prezența acestora este atât de frecventă, mecanismele prin care determină progresia cancerului sau induc apoptoza nu sunt încă pe deplin cunoscute. Mai mult,

există date care susțin că aceste mecanisme pot fi interconectate cu altele, determinând progresia cancerului.

I. PARTEA GENERALĂ

3.3 Particularitățile receptorilor androgenici în neoplasmul mamar

3.3.1 Incidența receptorilor androgenici în neoplasmul mamar

Numeroase studii au raportat că RA sunt prezenți în până la 80% dintre tumorile mamare maligne, fiind detectați în toate subtipurile moleculare de cancer mamar [217, 218, 242, 243]. Se consideră că aproximativ 80% dintre tumorile mamare primare și 60% dintre metastaze supraexprimă RA, dar expresia variază între subtipurile moleculare de neoplasm mamar [219, 244]. De menționat este că nivelul RA diferă în funcție de etnie, așa cum și incidența neoplasmului mamar diferă în funcție de regiunea geografică [245, 246].

Depistarea simultană a RE și RA poate fi întâlnită frecvent, fiind prezentă la aproximativ 90% din cazuri. Un aspect foarte important este că RA pot fi prezenți la aproximativ jumătate dintre tumorile triplu negativ, acestea fiind tumorile mamare cu prognosticul cel mai rezervat [6, 247]. Expresia RA a fost asociată cu evoluția favorabilă a pacientelor, explicația fiind ca RA pot bloca stimularea genică prin intermediul RE și astfel inhibă transcrierea [248].

În ultimii ani a existat un interes major în detectarea unei terapii țintite pentru pacientele care supraexprimă RA. Astfel, s-a încercat anihilarea acestei căi fie prin agonisți precum enobosarmul, fie prin antagonisți precum bicalutamida, enzalutamida sau abiraterona. Cu toate că antagoniștii RA sunt utilizați pe scară largă pentru tratamentul cancerului de prostată și că au existat studii pozitive pentru cancerul de sân, în prezent nu există recomandări pentru tratamentul neoplasmului mamar. Un obstacol major pentru utilizarea acestor preparate pe scară largă este reprezentat de modul dihotomic de răspuns tumoral în prezența receptorului androgenic.

Studiile de imunohistochimie au demonstrat că există procente diferite de expresie a proteinei membranare pentru androgeni în cadrul aceleași tumori, practic procentul cuantificat putând varia în funcție de numărul de celule analizate. Cu toate acestea, o metaanaliză recentă publicată de Ricciardelli și colaboratorii a subliniat importanța detectării RA pentru prognosticul pacientelor cu neoplasm mamar [242], dar și utilitatea acestor receptori și interesul ce trebuie acordat pentru stabilirea unui protocol de lucru.

3.6 Influența receptorilor androgenici pe subtipuri moleculare

- **Receptorii androgenici și neoplasmul mamar triplu negativ**

În cadrul lotului de tumori triplu negative, pozitivitatea RA variază între 12 și 55% [158, 193, 355], fiind adesea evidențiați în tumorile de mici dimensiuni sau fără metastaze [356]. Asocierea RA cu prognosticul pacientelor reprezintă un subiect încă în dezbatere deoarece există studii care indică un prognostic favorabil pentru pacientele RA+ [357, 358], în timp ce altele sugerează că acești receptori sunt responsabili de proliferarea tumorală și evoluția tardivă a tumorii [356].

Un studiu recent pe diferite cohorte clinice a relevat o asociere semnificativă între expresia RA și recurența loco-regională pentru pacientele cu NMTN care au efectuat radioterapie [359]. Această observație subliniază utilizarea potențială a RA ca biomarker pentru radiorezistență și ca marker pentru terapia țintită. Analiza IHC a 190 probe de tumori triplu negative a relevat un prognostic mai bun în rândul pacientelor cu RA pozitivi [360].

Influența RA pentru pacientele cu NMTN a fost studiată de mai multe grupuri de cercetători. În studiul publicat de Ieni și colaboratorii s-a analizat impactul pe care această asociere o are, concluzionând că pacientele care supraexprimă RA prezintă o rata mai mică a recidivelor locale, deși, per ansamblu, procesul malign a fost apreciat ca fiind chimioresistent [361]. Rezultate asemănătoare au fost raportate și în metaanaliza grupului condus de Wang care a analizat rezultatele provenite din 13 studii, numărul total fiind de 2826 paciente cu NMTN. Astfel, cercetătorii au concluzionat că pacientele RA pozitive prezintă tumori mai bine diferențiate, risc de recurență mai scăzut, însă au fost asociate cu un grad mai mare de invazie ganglionară [362].

4 Ipoteză de lucru și obiective generale

Cancerul mamar reprezintă neoplazia întâlnită cel mai frecvent în rândul femeilor, lumea medicală fiind axată pe o continuă cercetare în vederea identificării unor noi ținte terapeutice. Scopul acestor descoperiri se axează pe evitarea dezvoltării metastazelor pentru pacientele cu intenție curativă sau pe creșterea duratei de supraviețuire fără semne de boală pentru pacientele ce prezintă boală metastatică.

4.1 Motivația subiectului tratat în teza de doctorat și ipoteza de lucru

Incidența și prevalența neoplasmului mamar sunt în continuă creștere, consecutiv și mortalitatea, în ciuda numeroaselor posibilități terapeutice. În acest context pare firească inițierea unei cercetări științifice asupra existenței unor noi mecanisme moleculare care să analizeze

impactul pe care acestea îl pot avea asupra evoluției pacientelor cu neoplasm mamar, iar ulterior pot fi studiate ca posibile ținte terapeutice. În prezenta lucrare am studiat impactul pe care receptorii androgenici îl au asupra pacientelor diagnosticate cu neoplasm mamar, împreună cu alți factori de risc, precum aspecte demografice, histologice sau moleculare, cu scopul de a identifica noi corelații clinico morofologice și imunohistochimice, dar și implicațiile clinice pe care le impune caracterizarea heterogenității leziunilor mamare maligne.

Având în vedere necesitățile din practica curentă, am efectuat analiza biomarkerilor celulari care sunt detectați în mod curent prin imunohistochimie, dar și a RA, cu scopul de a identifica o stratificare prognostică a pacientelor diagnosticate cu neoplasm mamar în stadiu incipient sau avansat local, în special pentru subtipul triplu negativ, în vederea stabilirii tratamentului sistemic individual optim, în funcție de stadiul bolii și caracteristicile moleculare.

Rezultatele studiului vor completa cunoștințele referitoare la particularitățile prognosticului pacientelor cu neoplasm mamar și pot servi drept reper pentru conduita terapeutică, dar și reper pentru identificarea unor terapii antiandrogenice benefice pentru acest grup de paciente.

4.2 Scopul și obiectivele tezei de doctorat

Scopul studiului doctoral a fost de a analiza particularitățile tumorilor mamare triplu negative din punct de vedere al RA și de a identifica posibile corelații între diverși factori personali, clinici sau tumorali, cu impact asupra evoluției și prognosticului.

Studiul de față a urmărit caracterizarea pacienților din perspectivă exhaustivă, căutând să găsească noi corelații cu valoare prognostică utile practicii clinice. Pentru ca acest scop să fie atins am început caracterizarea tumorilor în conformitate cu protocoalele în vigoare, urmând în capitolele ce se vor derula să vedem încadrarea lor în tot contextul patologic, epidemiologic și habitual.

Ipoteza cercetării a pornit de la identificarea unor argumente statistice în sprijinul ipotezei conform căreia există factori personali și tumorali ce pot influența supraviețuirea pacientelor cu neoplasm de sân triplu negativ, dar și pentru celelalte subtipuri tumorale.

Am pornit de la premisa că, analizând RA pentru pacientele cu neoplasm mamar, vom putea identifica noi particularități tumorale și că studiind corelațiile dintre diverși parametri personali, clinici și biologici vom putea identifica noi date, utile în alcătuirea unor algoritmi de diagnostic și tratament. Astfel, am alcătuit un lot reprezentativ de paciente cu neoplasm mamar, inclusiv cu NMTN.

Scopul studiului a fost de a analiza particularitățile tumorilor triplu negative din punctul de vedere al RA și de a identifica posibile corelații între diverși factori personali, clinici sau tumorali, cu impact asupra evoluției și prognosticului.

Această cercetare doctorală încearcă să clarifice aspectele neclare și controversate privind rolul RA în evoluția pacientelor cu NMTN, dar și pentru celelalte subtipuri. De asemenea, sunt cercetați și alți factori care influențează prognosticul, cu scopul dezvoltării medicale în domeniul oncologiei și în final cu un impact pozitiv pentru paciente.

Obiectivele propuse ale tezei de doctorat au fost următoarele:

Obiectivul general a constat în evaluarea principalilor parametri clinico- morfologici- imunohistochimici pentru lotul de paciente cu neoplasm de sân și stabilirea corelațiilor semnificative între acești parametri și impactul pe care îl au asupra prognosticului. În vederea studiului și îndeplinirii obiectivului general, am cercetat și am încercat să răspundem la următoarele întrebări:

1. Pacientele cu NMTN prezintă trăsături epidemiologice și clinice particulare?
2. Se poate stabili faptul că pacientele cu NMTN prezintă o rată de supraviețuire mai mică comparativ cu celelalte subtipuri de neoplasm mamar?
3. RA de la nivelul celulelor tumorale influențează evoluția neoplasmului mamar? Ei pot fi utilizați ca markeri de prognostic?
4. Care dintre parametrii personali, clinici sau tumorali, pot influența prognosticul pacientelor cu neoplasm mamar? Statusul socio-economic și demografic poate fi corelat cu evoluția negativă a pacientelor cu neoplasm mamar?
5. Care este intervalul prag al markerului Ki67 pentru încadrarea pacientelor în grupe de prognostic? Care este procentul minim care agravează prognosticul?
6. Se pot stabili corelații între tratamentul sau secvențierea terapeutică și prognosticul pacientelor cu neoplasm mamar?
7. Care sunt predictorii independenți de hazard pentru supraviețuirea generală și fără semne de boală?

Directii de cercetare:

Pentru a realiza obiectivele cercetării doctorale am alcătuit următoarele studii:

Studiul 1: Analiza descriptivă și interferențială și a receptorilor androgenici, pe lotul pacientelor cu NMTN, lotul pacientelor non-triplu negativ și pe lotul întreg.

Studiul 2: Impactul factorilor de prognostic pe supraviețuirea generală pentru pacientele cu neoplasm mamar.

Stadiul 3: Impactul factorilor de prognostic pe timpul liber de boală pentru pacientele cu neoplasm mamar.

5 Metodologia generală a cercetării- alcătuirea bazei de date și analiza statistică

5.1 Aspecte generale

Privitor la metodologia de lucru, teza doctorală a constat într-un studiu retrospectiv, observațional, nerandomizat, non experimental desfășurat în perioada ianuarie 2014 decembrie 2019, cu includerea a 143 paciente diagnosticate cu neoplasm de sân în stadiu incipient sau local avansat, tratate și urmărite pentru boala lor oncologică. Lotul a fost atent selecționat pentru a acoperi o plajă cât mai largă de histotipuri, stadii și vârste de manifestare. Considerăm că acest eșantion este reprezentativ pentru o populație de paciente cu neoplasm de sân, investigate și tratate într-un centru specializat în tratamentul afecțiunilor oncologice.

Grupul țintă a fost reprezentat de paciente diagnosticate cu neoplasm mamar în cadrul spitalului și care la momentul diagnosticului nu prezentau determinări secundare la distanță. Au fost selectate astfel deoarece obiectivele studiului implică evaluarea timpului până la progresia bolii sau deces. Studiul a fost bazat pe analizarea foilor de observație și a documentelor asociate diagnosticului și stadializării bolii neoplazice: mediul de proveniență, teste imunohistochimice și investigații imagistice care să ateste răspunsul la tratament și evoluția bolii. Pacientele au fost urmărite până la apariția evenimentului (deces sau identificarea imagistică a metastazelor) sau pe o perioadă de 36 luni din momentul admisie în cadrul secției de oncologie medicală. Evaluarea periodică s-a realizat prin examen clinic complet, CT torace, abdomen, pelvis, mamografia sânelui restant sau bilaterală pentru cele operate conservator și prin examen scintigrafic. În cazuri de incertitudine diagnostică s-au efectuat și alte investigații precum ecografia mamară sau IRM-ul cerebral, mamar sau de coloană sau PET-CT.

Pacientele admise în cadrul cercetării doctorale au fost selecționate în concordanță cu principiile enunțate în Declarația de la Helsinki din 1975, revizuită în 2000, precum și în legislația națională. Adițional, obiectivele și protocolul cercetării au fost explicate participantelor, acestea semnând consimțământul informat. Protocolul studiului doctoral a fost aprobat de către Comisia de Etică a Spitalului Universitar de Urgență Elias București (nr. 5925/ 24.08.2018) și de Comisia de Etică a UMF “Carol Davila” (nr. 223/15.10.2019).

Am efectuat colectarea retrospectivă a datelor pacienților diagnosticați și tratați în cadrul secției de Oncologie Medicală din cadrul SUU Elias din foile de observație și din dosarele electronice ale pacientelor. Analiza RA a fost solicitată la prima prezentare a pacientelor, simultan cu analiza IHC indispensabilă tratamentului cancerului mamar.

5.2 Criterii de selecție a pacienților incluși în studiu

Studiul doctoral a constat în analiza observațională, retrospectivă a dosarelor medicale scrise și electronice ale pacientelor diagnosticate cu neoplasm mamar în stadiul incipient sau avansat local. Astfel au fost înregistrate într-o bază de date de numeroase aspecte demografice, date privind antecedentele patologice personale și familiale, rezultatele anatomo-patologice și IHC, rapoartele chirurgicale, aspectele legate de tipul tratamentului oncologic administrat și complicațiile acestuia și datele legate de localizarea metastazelor pentru pacientele care au progresat. Am urmărit de asemenea durata de timp de la diagnostic și până la confirmarea imagistică de progresie a bolii sau deces.

Pentru cazurile investigate din perspective moleculare, am folosit testarea receptorilor hormonal, ER și PR, am cuantificat indicele de proliferare folosind markerul Ki67 și am verificat expresia oncoproteinei HER2/neu, apelând în rare cazuri de incertitudine la tehnici de hibridizare in situ. Suplimentar, s-a adăugat la bateria de teste IHC și antigenul pentru testarea RA.

Pacientele evaluate în acest studiu au fost selectate folosind anumite criterii în vederea demonstrării obiectivelor generale și ipotezelor de lucru:

Criterii de includere:

- vârsta la momentul internării peste 18 ani;
- diagnosticul de neoplasm mamar stadiul TNM I-III
- paciente tratate și monitorizate la Spitalul Universitar de Urgență Elias, Secția Oncologie Medicală, în perioada ianuarie 2014 - decembrie 2019;
- disponibilitatea documentelor medicale sursă, din care să reiasă informațiile ce alcătuiesc variabilele studiate precum: buletin histopatologic și IHC, prezența/absența menopauzei, paritatea, gradul de școlarizare, investigațiile imagistice care să ateste absența bolii metastatice
- urmărirea pacienților pe parcursul a 36 luni sau până la apariția evenimentului (deces sau detecția metastazelor)
- detecția IHC a receptorilor androgenici;

- absența comorbidităților cardiace, pulmonare, hepatice;
- absența sarcinii în ultimele 6 luni.

Criterii de excludere:

- paciente pentru care nu au fost disponibile informațiile corespunzătoare variabilelor descrise mai sus;
- prezența unui al doilea cancer concomitent sau apariția unei alte boli neoplazice pe parcursul perioadei de urmărire;
- tumori inoperabile după terapia neoadjuvantă
- prezența bolii metastatice;
- paciente aflate în perioada de lactație sau înțarcare mai devreme de 6 luni până la momentul diagnosticului.

Pe baza criteriilor de includere și excludere a fost alcătuit lotul general de studiu, în care au fost incluse toate pacientele înrolate, inclusiv cele cu NMTN.

Prognosticul și evoluția clinică au fost analizate prin perioada de supraviețuire generală (OS) și durata de supraviețuire fără semne de boală/ timpul liber de boală (PFS). OS și PFS reprezintă indicatori folosiți frecvent în cadrul trialurilor clinice pentru a estima răspunsul la tratamentele oncologice. În prezentul studiu am estimat timpul de la stabilirea de certitudine a diagnosticului de cancer, respectiv data înscrisă pe buletinul histopatologic și până la decelarea imagistică a determinarilor secundare ca fiind PFS, respectiv deces pentru OS, timp exprimat în luni.

Este de menționat că s-au luat în considerare numai decesele pacienților care au survenit în contextul bolii de bază sau în urma complicațiilor metastazelor loco-regionale sau la distanță.

Studiul a fost gândit pe trei axe principale, respectiv descrierea aspectelor legate de RA și lotul pacientelor cu NMTN, aprecierea factorilor de risc pentru OS, respectiv PFS. Contingentele au fost selecționate pentru a avea o variabilitate a parametrilor histopatologici și clinici cât mai mare, pe care să studiem expresia unor markeri cu potențial prognostic. Studiile alcătuite se completează reciproc pentru a oferi un aspect de ansamblu asupra lotului de paciente cu neoplasm mamar.

6. Studiul 1. Analiza descriptivă, interferențială și a receptorilor androgenici pe lotul paciențelor cu neoplasm mamar triplu negativ, lotul paciențelor non-triplu negativ și pe lotul întreg

6.1 Introducere, ipoteză de lucru și obiective specifice

Am pornit acest studiu de la observația că paciențele cu tumori triplu negativ prezintă evoluție nefavorabilă grevată frecvent de prezența metastazelor și deces precoce. Ne-am gândit să studiem existența unor markeri tumorali care să ne ajute să aprecim suplimentar prognosticul acestor paciențe și să ne orienteze decizia terapeutică privind intensitatea tratamentului citostatic. Ne-am oprit atenția asupra RA și am efectuat determinarea IHC a acestora pentru întreg lotul de pacienți.

Conform literaturii de specialitate, RA sunt supraexpresiți la nivelul celulelor de cancer mamar, fiind prezenți în până la 80% dintre tumorile mamare [218, 219, 243, 244], procentul fiind diferit pentru subtipurile moleculare. Pentru tumorile triplu negative, acest procent variază între 12 și 55% [159, 194, 356], fiind adesea evindețiați în tumorile de mici dimensiuni sau fără metastaze [357]. Rolul RA în cancerul mamar nu este pe deplin elucidat, așadar nici implicațiile acestora pentru prognosticul paciențelor.

Din punct de vedere epidemiologic, NMTN reprezintă aproximativ 15% din totalul tumorilor mamare și este mai frecvent diagnosticat înaintea vârstei de 40 ani, riscul atribuit acestei categorii fiind de două ori mai mare față de cel al femeilor peste 50 ani [4]. Printre factorii de risc asociați acestei patologii se numără prezența mutației BRCA [143], aceasta fiind responsabilă de până la 20% de tumorile încadrate în acest subtip. Suspiciunea de diagnostic poate fi ridicată încă de la examenul clinic, când pacienta se prezintă la medic pentru o formațiune mamară cu creștere accelerată, în timp ce la anamneză pacienta poate prezenta antecedente heredocolaterale de cancer mamar, ovarian, colon, pancreas sau prostată aparărut la vârste tinere și la mai multe rude. Pentru abordarea terapeutică a NMTN este necesar un management specializat, efectuat în cadrul unei comisii de oncologie multidisciplinară.

Ipoteza de lucru a derivat din considerentul cunoscut că NMTN reprezintă un subtip aparte de neoplasm mamar, este frecvent diagnosticat la vârste tinere, iar evoluția este agresivă, caracterizată prin recidivă locală și/sau apariția metastazelor. Astfel, spre deosebire de celelalte

subtipuri, tumorile triplu negative tind să recadă în primii trei ani de la diagnostic. Localizarea metastazelor prezintă particularități, astfel reșutele în cazul pacientelor cu NMTN apar mai frecvent local sau la nivelul organelor viscerale, rar fiind diagnosticate metastaze osoase [179]. În acest context pare firească încercarea de a găsi noi markeri care să ajute la aprecierea evoluției acestor paciente cu scopul de a ghida resursele terapeutice și, ulterior, descoperirea unei ținte terapeutice prin intermediul căii de semnalizare a RA.

Această cercetare doctorală vizează studierea următoarelor aspecte, răspunzând la următoarele întrebări și respectând *obiectivele specifice*:

1. care sunt caracteristicile epidemiologice și clinice ale pacientelor diagnosticate cu NMTN?
2. există particularități legate de stadiul la diagnostic pentru pacientele cu NMTN?
3. ce corelații se pot identifica între prezența RA pe întreg lotul de paciente și particular pentru cele cu NMTN?
4. Ce corelații privind supraviețuirea generală și fără semne de boală se pot identifica între parametrii clinici, paraclinci și terapeutici pentru lotul cu NMTN?
5. Există parametrii specifici care influențează supraviețuirea pacientelor cu NMTN față de lotul pacientelor non- NMTN și lotul întreg?

6.2 Material și metodă specifice

6.2.1 Elaborarea diagnosticului imunohistochimic

Pentru realizarea obiectivelor de cercetare stabilite, am efectuat un studiu clinic analitic observațional, caz-control, retrospectiv, care și-a propus să răspundă la obiectivele specifice pentru lotul de paciente cu neoplasm mamar incipient sau avansat local, internate în perioada ianuarie 2014-decembrie 2019 la SUU Elias București.

Conform criteriilor de includere și de diagnostic, după obținerea consimțământului informat am înrolat în studiu 143 paciente. Am efectuat analiza parametrilor incluși în studiu pe lotul general ($n= 143$), dar și prin împărțirea acestuia în patru loturi create în funcție de caracteristicile moleculare:

- Lotul I: paciente cu neoplasm triplu negativ ($n= 39$)
- Lotul II: receptori hormonali negativi (ER, PR), HER2/neu pozitiv ($n= 22$)
- Lotul III: receptori hormonali pozitivi (ER, PR), HER2/neu negativ ($n= 68$)
- Lotul IV: receptori hormonali pozitivi (ER, PR), HER2/neu pozitiv ($n= 14$)

Datele de macroscopie și microscopie au fost preluate din buletinele histopatologice deja elaborate de laboratoare acreditate. Analizele IHC, de asemenea, au fost lucrate în laboratoare acreditate, fiind cerută suplimentar, pentru fiecare caz, analiza RA. Pentru cazurile investigate din perspectiva subtipurilor moleculare, am cerut testarea receptorilor hormona ER, PR, cuantificarea indicelui de proliferare Ki67 și verificarea expresiei oncoproteinei HER2/neu, iar în caz de incertitudine s-au aplicat tehnici de hibridizare in situ (pentru rezultatele cuantificate 1+/2+).

Toate preparatele histopatologice analizate au fost prelucrate conform unui protocol internațional și în conformitate cu recomandările în vigoare ale Ministerului Sănătății. Astfel, toate preparatele histopatologice analizate, biopsii, piese de rezecție mamară sau de mastectomie, au parcurs aceleași etape, respectiv fixare în formaldehidă tamponată și colorare standard/uzual în hematoxilină-eozină, la care ulterior au fost aplicate tehnici de diagnostic prin IHC sau hibridizare in situ.

Tehnica de IHC se bazează pe folosirea anticorpilor pentru a localiza o enzimă, un receptor celular sau un constituent tisular la situsurile de exprimare ale antigenului în secțiunile de țesut. Se adaugă apoi un cromogen adecvat, cu proprietatea de a dezvolta o culoare pentru evidențierea complexului anticorp-antigen. Situsul legării cu anticorpul poate fi identificat fie prin legarea directă a antigenului de un anticorp marcat (de regulă fluorescent) fie printr-o metodă indirectă de legare, cu anticorpi secundari. Reacția este vizibilă numai când anticorpii sunt etichetați cu un marker care fie absoarbe, fie emite lumină producând astfel contrast sau culoare. Vizualizarea epitopilor se realizează prin aplicarea unui substrat cromogen (uzual diaminobenzidină-DAB).

Analizele IHC pentru subiecții din studiu s-au realizat din blocurile de parafină ce conțin zone tumorale reprezentative. S-au efectuat secțiuni de parafină de aproximativ 4-6 micrometri, deparafinate în băi de xilen și băi de alcool și aplicate pe lame special tratate cu o mare adezivitate. Pentru a realiza colorarea anticorpilor, parafina trebuie îndepărtată din probă și proba trebuie rehidratată.

Protocolul pentru tehnica de IHC a inclus următorul algoritm:

- deparafinarea secțiunilor s-a realizat prin plasarea acestora în termostat la temperatura de 57°C timp de 60 minute. Secțiunile au fost apoi transferate în băi de alcool, câte două succesive pentru fiecare preparat, a câte 3 minute fiecare, cu scopul de a dizolva parafina. Lamele au fost lăsate câte 10 minute în această soluție, la temperatura camerei și apoi rehidratate prin treceri în băi succesive de agent de deparafinare (benzen, toluen,

- xilen sau alte substanțe asemănătoare), cu concentrații descrescânde (100%, 96%, 80%, 70%,) și ulterior băi succesive de apă distilată sau apă curentă. Secțiunile trebuie păstrate în apă până în momentul începerii procesului de recuperare a antigenului. Începând din acest punct este interzis ca secțiunile să se usuce deoarece legarea anticorpilor va fi nespecifică. Numărul băilor și timpul de expunere variază în funcție de desfășurarea manuală sau automată a procesului, cu un timp minim de 25 de minute.
- pentru următoarea etapă s-a efectuat recuperarea antigenelor (demascarea) din secțiunile tisulare prin plasarea lamelor cu secțiuni într-un vas cu conține soluția pentru recuperarea antigenului (Epitope Retrieval Solution, Dako), la temperatura de 93°C, timp de 5 minute și răcirea acestora la temperatura camerei. Metoda are ca scop expunerea siturilor antigenice pentru a permite anticorpilor să se lege.
 - Urmează incubarea în cuptorul cu microunde la 95-97°C timp de 30 min. Lamele au fost apoi transferate într-un alt vas și spălate din abundență cu apă de la robinet și apoi cu apă distilată. Etapa următoare a constat în blocarea peroxidazei endogene cu apă oxigenată 3% timp de 5 min, cu scopul de a interfera cu detecția semnalului. Fără spălare, doar prin îndepărtarea soluției de blocare, s-a efectuat incubarea cu anticorpii monoclonali (anticorpi pentru RE, RP, HER2/neu, Ki 67, RA), Tabel 6.1. Pentru cazurile cu aspecte histologice incerte, au fost folosiți și alți anticorpi cu scopul de a stabili diagnosticul de certitudine.

Tabel 6.1. Anticorpul folosiți pentru analiza probelor studiate

Anticorpul utilizat	Proveniență	Clona	Izotipul	Sediul reacției	Producătorul
RE	Monoclonal, iepure	SP1	IgG	nuclear	Biocare
RP	Monoclonal, iepure	SP2	IgG	nuclear	Biocare
HER2/neu	Monoclonal, iepure	EP3	IgG	Membranal, citoplasmatic	Biocare
Ki67	Monoclonal, iepure	SP6	IgG	nuclear	Biocare
RA	Monoclonal, șoarece	R441	IgG	nuclear	Biocare

Detecția RA în probele analizate

RA este localizat membranal, dar cu detecție și pozitivitate nucleară. Colorarea nucleară a fost evaluată IHC utilizând anticorp monoclonal de șoarece (clona, AR441, izotipul IgG, producător Biocare). Cuantificarea RA am efectuat-o prin calculul scorului semicantitativ al fracțiilor (0, 1-10, 11-50, 51-75 și 76-100%) de nuclee colorate pozitiv, indiferent de intensitatea colorării nucleare. Tumorile cu colorare nucleară de 1% sau mai mult au fost acceptate ca RA- pozitive, fiind cuantificat gradul de pozitivitate.

Detecția HER2/neu

HER2/neu este un anticorp monoclonal ce exprimă gena ERBB2 (HER2), fiind extrem de util pentru clasificarea moleculară a tumorilor mamare maligne, aprecierea prognosticului și administrarea tratamentului. Pozitivitatea acestui marker se raportează în scoruri de la 0 la 3+, fiind uzual ca pentru scoruri de 1+ și 2+ testarea să fie completată prin tehnici de citogenetică de hibridizare in situ. Metoda are ca principiu identificarea unei secvențe specifice de ADN de la nivel cromozomial. Se folosesc 2 cromogeni, unul pentru marcarea cromozomului 17 centromeric (CEP 17) și altul pentru marcarea genei HER2 care se găsește la acest nivel. Conform recomandărilor ASCO/CAP pentru testarea HER2, reacția este interpretată drept pozitivă pentru amplificare la un raport HER2: CEP17 >2.

6.2.2. Analiza statistică a datelor

Pentru redarea rezultatelor am folosit fie diagrame, fie tabele, încercând o exemplificare cât mai fidelă a datelor obținute. Pentru a corela semnificația statistică a parametrilor folosiți în acest studiu, am folosit statistica inferențială. Aceasta reprezintă metoda de comparație a două sau mai multe populații prin intermediul unor variabile observate ale lor. Pentru lotul studiat, datele sunt prezentate sub forma medie \pm deviație standard (D.S.) pentru variabilele continue și sub formă frecvență absolută (frecvență relativă–procente) pentru variabilele de categorie.

Pentru a determina predictorii independenți pentru progresie am folosit regresia Cox multiplă pentru variabilele cu semnificație statistică la analiza simplă, algoritmul folosit a fost cel al selecției retrograde cu scopul de a evidenția factorii de predicție negativi pentru lotul de pacienți cu NMTN.

6.3 Rezultate

6.3.1 Analiza imunohistochimică a lotului studiat

Lotul pacienților cu neoplasm mamar a fost constituit din totalitatea pacienților identificate conform criteriilor de includere și excludere, tratate în cadrul SUU Elias în perioada ianuarie 2014- decembrie 2019.

În mod uzual analiza IHC interpretează 4 markeri importanți pentru prognostic și tratament precum și încadrarea tumorii în 4 tipuri moleculare ce testează prezența receptorilor hormonalni de estrogen și progesteron, indexul de proliferare cuantificat prin Ki67 și prezența sau absența HER2/neu (care în circumstanțe particulare a fost testată prin metode adiționale de biologie moleculară de tipul FISH, SISH sau CICH)

Am studiat lotul de pacienți în principal din perspectiva receptorilor hormonalni și al oncoproteinei HER2/neu, segregându-le și obținând corelații între profilul IHC și impactul pe supraviețuirea generală și fără semne de boală. Am împărțit pacienții în 4 grupuri, Tabel 6.2.:

Tabel 6.2 Grupurile și caracteristicile moleculare pentru lotul analizat

Grupul	Caracteristicile moleculare	Numărul de cazuri	Procent
I	NMTN	39	27%
II	ER ⁻ , PR ⁻ , Her 2 ⁺	22	15%
III	ER ⁺ , PR ⁺ , Her 2 ⁻	68	48%
IV	ER ⁺ , PR ⁺ , Her 2 ⁺	14	10%

Pentru a analiza impactul pe care subtipul molecular îl are asupra evoluției pacientei, am analizat OS și PFS pentru întreg lotul de paciente. În cohorta analizată, cea mai scurtă supraviețuire, deci prognosticul cel mai prost, a fost întâlnit în cadrul lotului cu NMTN. Atât RMST (32.30 luni) cât și procentul de evenimente (20.51%) influențează semnificativ, dezaforabil, prognosticul acestor paciente, la testul log-rank: $\chi^2= 9.20$, grade de libertate= 3, $p= 0.0270$, Tabel 6.3.

Tabel 6.3. Date de supraviețuire în funcție de IHC pentru OS

Strata	Procent evenimente (%)	RMST PFS	Supraviețuire Mediană [IC95%]
Triplu Negativ	20.51	32.30	N/A
R (-) & HER (+)	9.09	35.20	N/A
R (+) & HER (-)	7.35	32.40	N/A
R (+) & HER (+)	0.00	36.00	N/A

Notăm evoluția favorabilă, fără evenimente, a grupului IV, receptori hormonali pozitiv (ER, PR), HER2/neu pozitiv, Figura 6.4

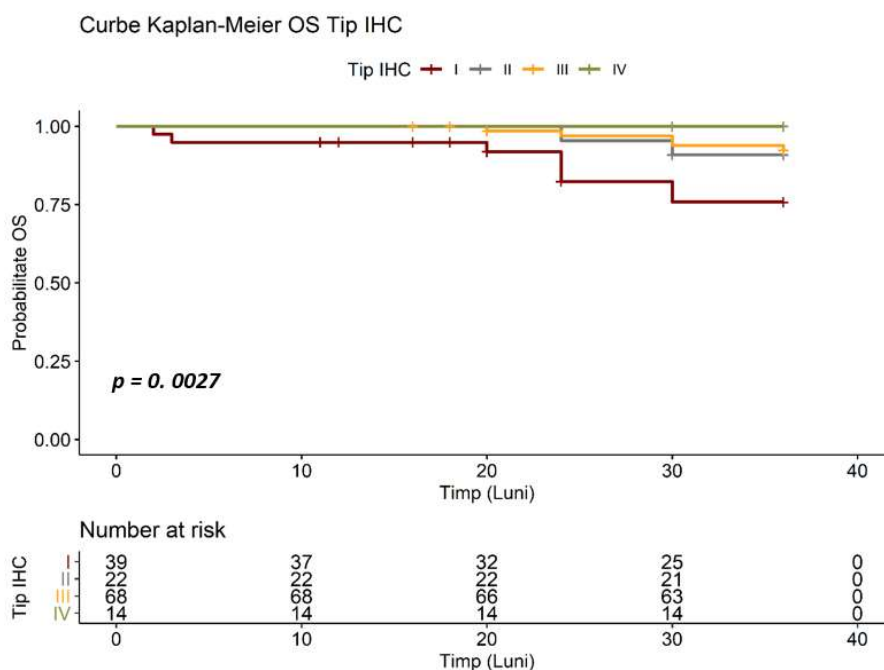


Figura 6.4. Curba de supraviețuire pentru OS tip IHC

Sursa: contribuție proprie.

Pentru a evalua impactul pe care tipul IHC îl aduce perioadei de supraviețuire fără semne de boala, ca și în cazul OS, am împărțit pacientele în patru categorii, Figura 6.5. În lotul analizat, nu au fost evidențiate diferențe cu semnificație statistică, la testul log-rank: $\chi^2= 5.80$, grade de libertate= 3, $p= 0.1200$.

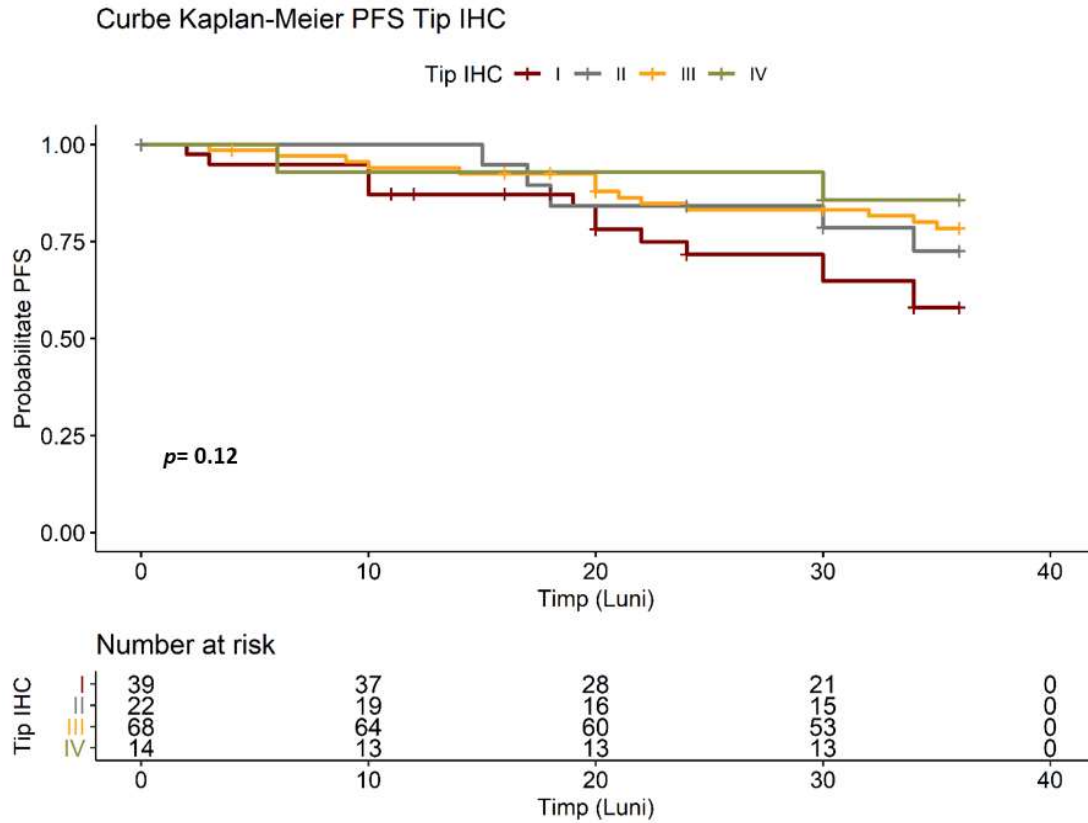


Figura 6.5. Curba de supraviețuire pentru PFS în funcție de IHC.

Sursa: contribuție proprie.

Decesul a fost raportat la 35.89% dintre pacientele cu NMTN, iar perioada RMST PFS a fost de 29.40 luni pentru aceste paciente, comparativ cu perioada minimă observată de 14.28 luni în grupul pacientelor cu receptori hormonal, HER2/neu pozitiv, Tabel 6.4.

Tabel 6.4. Date de supraviețuire în funcție de IHC pentru PFS.

Strata	Procent Evenimente (%)	RMST PFS	Supraviețuire Mediană [IC95%]
Triplu Negativ	35.89	29.40	N/A [34.00 la N/A]
R (-) & HER (+)	22.72	32.50	N/A
R (+) & HER (-)	20.58	32.50	N/A
R (+) & HER (+)	14.28	33.40	N/A

6.3.2. Nivelul de expresare al receptorilor androgenici (%)

Cercetarea s-a axat pe impactul prognostic pe care expresia RA îl au pentru pacientele incluse în studiu, în funcție de OS și PFS. Am analizat nivelul de expresare al RA și cum pot aceștia influența supraviețuirea generală a pacientelor cu neoplasm mamar. În eșantionul analizat, nivelul de expresare al receptorilor androgenici nu este factor de hazard, $p > 0.05$, Tabel 6.6.

Tabel 6.6 Impactul gradului de expresare al receptorilor androgenici pentru OS

RA: receptorii androgenici

Strata	Coeficient	Valoare p	HR [IC95%]
RA	-0.002	0.7360	0.99 [0.98 la 1.01]

În cadrul lotului, nivelul de expresare al RA nu este factor de hazard pentru PFS, $p < 0.05$, Tabel 6.7.

Tabel 6.7 Impactul gradului de expresare al receptorilor androgenici pentru PFS

Predictor	Coeficient	Valoare p	HR [IC95%]
RA	0.004	0.3830	1.01 [0.99 la 1.02]

Ulterior, pentru a analiza corelația dintre prezența sau absența RA, am comparat grupul pacientelor cu receptori pozitivi vs. negativi, separat pentru cele două end-pointuri ale studiului.

1. Impactul RA pe OS

Figura 6.7 ilustrează supraviețuirea generală a pacientelor cu RA pozitivi comparativ cu cele fără receptori. Observăm că valoare $p = 0.027$, cu semnificație statistică.

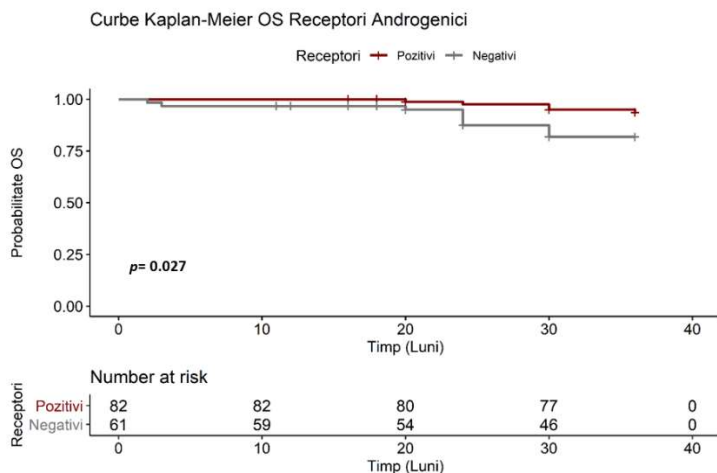


Figura 6.7 Analiza OS paciente cu receptori androgenici pozitivi vs receptori androgenici negativi

Sursa: contribuție proprie

În cadrul lotului de pacienți, evenimentul, respectiv decesul, a fost prezent după 35.50 luni în grupul pacientelor cu RA pozitivi, respectiv după 33.40 luni în grupul pacientelor RA negativi, respectiv, Tabel 6.8.

Tabel 6.8. Date de supraviețuire AR, OS

Strata	Procent evenimente (%)	RMST OS	Supraviețuire mediană [IC95%]
RA +	6.09	35.50	N/A
RA -	16.39	33.40	N/A

2. Impactul RA pe PFS

Prin comparația PFS-ului pentru pacientele cu receptori pozitivi vs. negativi, am observat că prezența acestora are un impact favorabil prin creșterea timpului liber de boală, Figura 6.8.

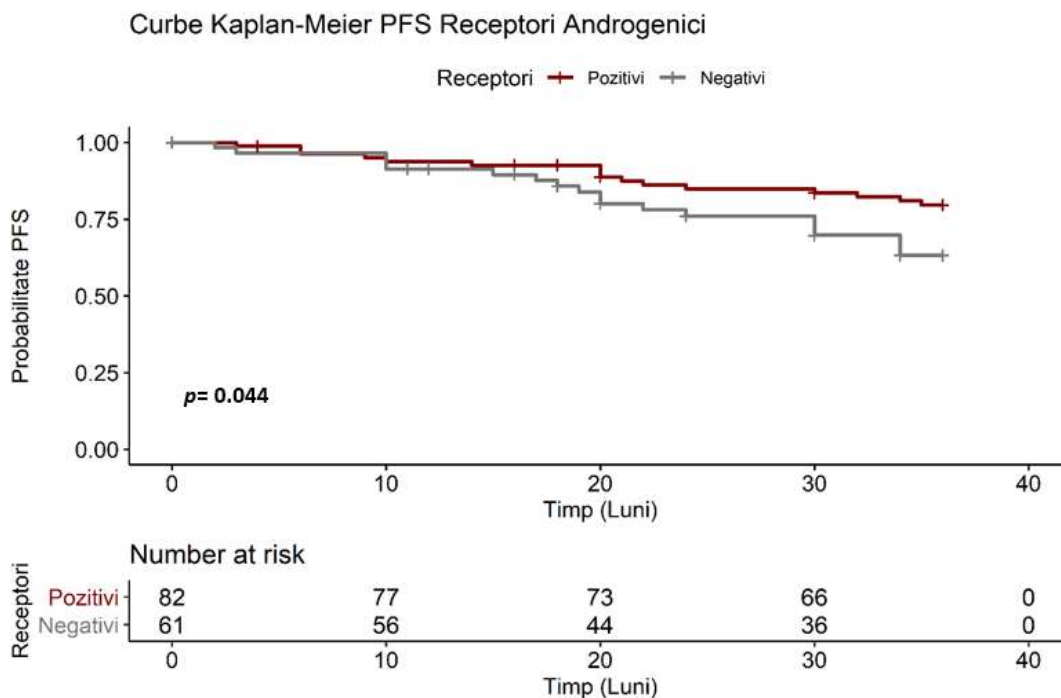


Figura 6.8. Analiza PFS paciente cu receptori androgenici pozitivi vs receptori androgenici negativi

Sursa: contribuție proprie

Conform datelor prezentate în Tabel 6.9., RMST PFS pentru grupul RA pozitivi fost de 32.60 luni, iar pentru grupul RA negativi a fost de 30.50 luni. Astfel, am observat că detecția metastazelor s-a realizat mai devreme pentru pacientele fără supraexpresie RA.

Tabel 6.9. Date de supraviețuire AR, PFS

Strata	Procent Evenimente (%)	RMST PFS	Supraviețuire Mediană [IC95%]
RA +	19.51	32.60	N/A
RA -	31.14	30.50	N/A

6.3.3 Analiza descriptivă și interferențială pe subploturi

Am folosit analiza descriptivă și inferențială pe lotul pacientelor cu NMTN, pacientelor non-NMTN și pe lotul global pentru a aprecia factorii de prognostic specifici lotului triplu negativ. Datele sunt prezentate sub forma medie \pm deviație standard pentru variabilele continue și sub formă de frecvență absolută (frecvență relativă= procente) pentru variabilele de categorie, Tabel 6.10.

Tabel 6.10. Caracteristicile lotului studiat

Variabila	Global	NMTN (-)	Non-NMTN (-)	Valoarea p
-----------	--------	----------	--------------	--------------

Vârsta – Medie ± D. S		52.45 ± 12.45	50.51 ± 12.76	53.07 ± 12.34	NS ¹
Mediu Rural		24/143 (16.78)	6/35 (17.14)	18/108 (16.66)	NS ²
Urban		119/143 (83.22)	29/35 (82.86)	90/108 (83.34)	-
Studii Gimnaziale		9/143 (6.29)	5/35 (14.28)	4/108 (3.70)	NS ³
Liceale		55/143 (38.46)	10/35 (28.57)	45/108 (41.66)	-
Superioare		79/143 (55.24)	20/35 (14.81)	59/108 (54.62)	-
AHC Nu		108/143 (75.52)	29/35 (82.86)	79/108 (73.15)	NS ²
Da		35/143 (24.48)	6/35 (17.14)	29/108 (26.85)	
APNO Nu		103/143 (61.17)	26/35 (74.28)	77/108 (71.30)	NS ²
Da		40/143 (38.83)	9/35 (25.72)	31/108 (28.70)	
APO Nu		128/143 (89.52)	30/35 (84.72)	98/108 (90.75)	NS ²
Da		15/143 (10.48)	5/35 (14.28)	10/108 (9.25)	
Menopauza Nu		46/143 (32.17)	12/35 (34.28)	34/108 (31.48)	NS ²
Da		97/143 (67.83)	23/35 (65.72)	74/108 (68.52)	
Paritate – Medie ± D.S		0.80 ± 0.58	0.94 ± 0.87	0.76 ± 0.45	NS ¹
Biopsie Preop. Nu		72/143 (50.34)	16/35 (45.71)	56/108 (51.85)	NS ²
Da		71/143 (49.66)	19/35 (54.29)	52/108 (48.15)	
Stadiul T T1		37/142 (26.05)	6/35 (17.14)	31/107 (28.97)	NS ³
T2		53/142 (37.32)	16/35 (45.71)	37/107 (34.57)	
T3		16/142 (11.26)	4/35 (11.42)	12/107 (11.21)	
T4		36/142 (25.35)	9/35 (25.71)	27/107 (25.32)	
Stadiul N N0		46/104 (44.23)	14/34 (41.17)	32/105 (30.47)	NS ³
N1		60/104 (57.69)	14/34 (41.17)	46/105 (43.80)	
N2		26/104 (25.00)	5/34 (14.70)	21/105 (20.00)	
N3		7/104 (6.73)	1/34 (2.94)	6/105 (5.71)	
Tip HP Ductal		103/143 (72.02)	25/35 (71.42)	78/108 (72.22)	0.01423
Lobular		12/143 (8.39)	0/35 (0.00)	12/108 (11.11)	
Alte Tipuri		28/143 (19.58)	10/35 (28.58)	18/108 (16.66)	
Grad Diferențiere G1		8/142 (5.63)	2/35 (5.71)	6/107 (5.60)	< 0.00013
G2		69/142 (48.59)	4/35 (11.42)	65/107 (60.74)	
G3		65/142 (45.77)	29/35 (82.85)	36/107 (33.64)	
R. Androgen–Medie± D. S		30.66 ± 30.20	33.86 ± 30.49	29.63 ± 30.30	NS ¹
Ki67 – Medie ± D. S		34.68 ± 22.77	55.59 ± 22.83	27.97 ± 17.92	< 0.00011
CA 15-3 – Medie ± D. S		22.20 ± 15.68	20.48 ± 13.20	22.71 ± 16.35	NS ¹
Chirurgie Sector		86/138 (62.31)	19/33 (57.57)	67/105 (63.80)	NS ²
Mastectomie		52/138 (38.69)	14/33 (42.43)	38/105 (36.20)	
RT Terapie Nu		50/143 (34.96)	12/35 (34.28)	38/108 (35.18)	NS ²
Da		93/143 (65.04)	23/35 (65.72)	70/108 (64.82)	
CHT NeoAdjuv Nu		71/139 (51.07)	17/35 (48.57)	54/104 (51.92)	NS ²
Da		68/139 (48.93)	18/35 (51.43)	50/104 (48.08)	

¹ Welch T Test bidirecțional pentru două eșantioane independente

² χ^2 Test bidirecțional pentru două proporții independente

³ G Test de independență bidirecțional

Vârsta medie a fost de 52 ani pentru întreg lotul de paciente, respectiv 50.51 ani pentru pacientele cu neoplasm triplu negativ și 53 ani pentru celelalte paciente.

Aspectele personale ale pacienților (mediul de proveniență, studiile, AHC, APO, APNO) nu au influențat evoluția pacienților cu NMTN față de celelalte tipuri. De asemenea, nici menopauza sau paritatea nu prezintă un impact asupra ratei de hazard comparativ pentru cele două grupuri.

Din punctul de vedere al aspectelor histologice, remarcăm lipsa carcinomului de tip lobular în grupul pacienților cu NMTN. Pacientele cu neoplasm mamar ductal și triplu negativ au avut o evoluție mai severă față de cele non-NMTN, $p= 0.0142$.

Observăm că pacientele cu NMTN au prezentat mai frecvent tumori nediferențiate, deci G3. Acest aspect a fost întâlnit la 82% dintre paciente, comparativ cu 33% dintre pacientele lotului non-TNBC. Valoarea $p < 0.0001$ este semnificativă statistic și se suprapune peste datele din literatură care susțin acest parametru ca fiind des întâlnit în cadrul acestor paciente, fiind marker de agresivitate.

Receptorii androgenici au fost distribuiți aproximativ la fel în cele două loturi, prezența sau absența acestora nu a influențat supraviețuirea, comparativ pe loturi.

Evoluția nefavorabilă a pacienților cu NMTN este subliniată și de indicele de proliferare Ki67, un alt marker de agresivitate. Nivelul de expresare a fost mai crescut la aceste paciente, Figura 6.9..

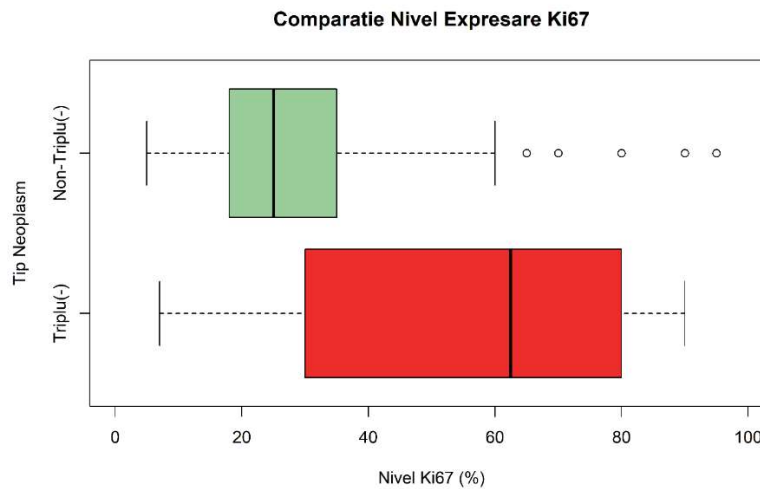


Figura 6.9. Nivel expresare Ki 67

Sursa: contribuție proprie

Recidivele locale au apărut la 7.04% dintre subiecți, în vreme ce metastazele au apărut la 19.58% dintre pacientele din studiu. Determinările secundare au avut următoarea distribuție:

12.58% osoase, 9.79% ganglionare (altele decât stațiile axilare I, II, III, supraclaviculare, infraclaviculare sau mamare interne), 4.89% hepatice, 4.19% cerebrale, 3.49% pulmonare și 2.79% alte localizări (cutanate, pleurale, musculare, pericardice).

Pentru pacientele cu NMTN, localizarea metastazelor a avut următoarea distribuție: 47% cerebrale, 15% pulmonare, 13% hepatice, 10% osoase, 4% ganglionare și 11% alte localizări.

9. Contribuție personală și concluzii

Cancerul de sân reprezintă cel mai frecvent tip de cancer la femei, fiind principala cauză de mortalitate prin cancer pentru populația de sex feminin. Această neoplazie poate afecta toate grupele de vârstă, cu preponderență în timpul decadei cinci-șase de viață, o vârstă la care femeile sunt foarte active din punct de vedere economic și socio-familial. Deși de-a lungul ultimilor ani supraviețuirea pacientelor cu neoplasm mamar a fost îmbunătățită prin individualizarea tratamentului, este necesară implicarea societății pentru ca aceste femei să rămână integrate socio-economic și familial pentru o perioadă cât mai lungă de timp.

Am pornit acest studiu de la observația că pacientele cu tumori triplu negativ prezintă evoluție nefavorabilă grevată frecvent de prezența metastazelor și deces precoce. Ne-am gândit apoi să determinăm dacă există markeri tumorali care să ne ajute să apreciem prognosticul acestor paciente și să ne orienteze decizia terapeutică privind intensitatea tratamentului citostatic. Ne-am oprit atenția asupra RA și am efectuat determinarea IHC a acestora pentru întreg lotul de pacienți. Ulterior am inclus parametri personali, tumorali și terapeutici pentru a observa care dintre aceștia poate influența prognosticul pacientelor cuantificat prin supraviețuirea generală sau timpul fără semne de boală.

Prin investigarea similară a 143 de paciente diagnosticate cu neoplasm mamar, acest studiu permite evaluarea obiectivă a markerilor implicați în prognostic. Am observat evoluția pacientelor prin cuantificarea supraviețuirii generale și a timpului liber de boală pentru niveluri diferite ale parametrilor analizați utilizând test log-rank cu nivel de sensibilitate statistică de 5% și RMST pentru a evalua timpul scurs între evenimente (deces/ apariția determinărilor secundare).

Rezultatele obținute sunt în mare parte congruente cu cele din literatura universală de specialitate, însă particularitățile acestei teze constau în paradigma pluriperspectivistă a cancerului mamar analizat într-un spital clinic universitar pe o perioadă de 6 ani pe un lot de studiu în care corelațiile personale, sociale, histopatologice, clinice și terapeutice au particularitățile generate de aspecte atât demografice, cât și ale managementului medical local/național.

Prin acest studiu de tip retrospectiv am analizat factorii de prognostic ce pot fi implicați în supraviețuirea pacienților cu neoplasm mamar și prezintă avantajul unor rezultate IHC sustenabile prin utilizare de probe de țesut tumoral recoltate prin biopsie cu ac fin sau prin mastectomie, fixate imediat după recoltare, lucrate și interpretate în laboratoare acreditate. Acest studiu oferă rezultate viabile prin aceeași abordare de diagnostic și terapeutică. Un alt aspect important este că toate probele au fost recoltate și prelucrate înaintea oricărui tratament oncologic.

Există și limitări ale studiului, una dintre cele mai importante fiind faptul că este un trial unicentric și acest lucru poate fi considerat bias de înrolare al bolnavilor, în conformitate cu profilul clinicii noastre. O altă limitare o reprezintă perioada de urmărire care a fost de 36 luni, fiind considerată relativ scurtă pentru neoplasmul mamar având în vedere că progresia poate apărea după mai mulți ani de la diagnostic și că recomandările NCCN actuale spun că tratamentul hormonal să fie administrat timp de 10 ani. Cu toate că datele au fost colectate pe o durată de 6 ani, doar 143 paciente au putut fi înrolate în studiu astfel încât să acopere criteriile de includere și absența celor de excludere. Fiecare caz a fost discutat în cadrul Comisiei de Oncologie, fiind abordat multidisciplinar, sub îndrumarea protocoalelor internaționale. Datele obținute în urma analizării informațiilor culese de la bolnavii înrolați în studiul nostru vor trebui dezvoltate și validate în lucrări de specialitate ulterioare.

Concluzii

1. Nu am evidențiat trăsături particulare epidemiologice și clinice pentru pacientele cu NMTN. Media de vârstă a fost de 50.51 ani, aproximativ la fel cu cea a celorlați subiecți incluși în studiu. De asemenea bolnavele cu NMTN au fost diagnosticate preponderent în stadiile T2 și T4, respectiv N1, N2.
2. Prezența subtipului tumoral triplu negativ este asociată cu un impact negativ asupra OS (32.30 vs 36 luni, $p=0.02$) comparativ cu grupul în care receptorii hormonali și HER2/neu au fost pozitivi. Predictorii independenți de progresie au fost gradul de diferențiere și valoarea Ki67. Remarcăm absența histiotipului lobular pentru acest subgrup.
3. Receptorii androgenici reprezintă punctul cheie al acestui studiu, conform rezultatelor statistice calculate. Am observat că prezența acestora prezintă un impact favorabil pe supraviețuirea generală și fără semne de boală pentru lotul întreg de paciente.

4. Mediul de proveniență al pacienților nu a fost corelat statistic cu o evoluție nefavorabilă, însă un procent ridicat de pacienți a provenit din mediul urban. Nivelul ridicat de educație prezintă un impact favorabil pe OS, dar nu și pe PFS.
5. Deși perioada de activitate endocrină a gonadelor reprezintă un factor de risc " per se" în dezvoltarea patologiei neoplazice mamare, nici instalarea menopauzei și nici paritatea nu s-au dovedit a constitui un factor de prognostic pentru evoluția pacienților.
6. O valoare crescută a CA 15-3 la diagnostic poate orienta clinicianul asupra gradului de impregnare neoplazică. În studiul prezent am observat că o creștere cu 1 unitate a valorii CA 15-3 este asociată cu o creștere cu 2% a hazardului de progresie a bolii.
7. OS și PFS pot fi influențate de niveluri crescute ale antigenului Ki67 și de gradul scăzut de diferențiere. Studiul nostru a evidențiat că o creștere a expresiei Ki67 cu 1% este asociată cu creșterea cu 2% a probabilității de hazard. Așadar, Ki67 reprezintă un marker util pentru aprecierea agresivității tumorale și, consecutiv, pentru practica clinică.
8. Predictorii independenți pentru hazardul de deces, au fost nivelul de studii gimnaziale, cu o creștere a HR de 10.2 ori, și tipul IHC triplu negativ, cu o creștere a HR de 6 ori, independent de nivelul de studii.
9. Predictorii independenți pentru progresia bolii au fost proporționali cu stația ganglionară suspectă de impregnare malignă (N2,N3), valoarea crescută a Ki67, gradul de diferențiere și nivelul CA 15-3 la diagnostic.

Bibliografie selectiva

1. Cancer WHOIAfRo. The Global Cancer Observatory. 2018 statistics. (Accessed on January 17, 2019). Available from: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>.
2. Kohler BA, Sherman RL, Howlader N, Jemal A, Ryerson AB, Henry KA, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(6):djv048.
3. De Gelder R, Heijnsdijk EA, Fracheboud J, Draisma G, de Koning HJ. The effects of population-based mammography screening starting between age 40 and 50 in the presence of adjuvant systemic therapy. *Int J Cancer.* 2015;137(1):165-72.
4. Trivers KF, Lund MJ, Porter PL, Liff JM, Flagg EW, Coates RJ, et al. The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race. *Cancer Causes Control.* 2009;20(7):1071-82.
5. Moinfar F, Okcu M, Tsybrovskyy O, Regitnig P, Lax SF, Weybora W, et al. Androgen receptors frequently are expressed in breast carcinomas: potential relevance to new therapeutic strategies. *Cancer.* 2003;98(4):703-11.
6. Beneficiile investiției într-un program de screening pentru cancerul de sân. București 2017. Studiu Deloitte realizat pentru Roche România mîCpSF. Povara cancerului de sân în România. .
143. Gonzalez-Angulo AM, Timms KM, Liu S, Chen H, Litton JK, Potter J, et al. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(5):1082-9.
158. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(5):R68.
159. Barton VN, D'Amato NC, Gordon MA, Christenson JL, Elias A, Richer JK. Androgen Receptor Biology in Triple Negative Breast Cancer: a Case for Classification as AR+ or Quadruple Negative Disease. *Horm Cancer.* 2015;6(5-6):206-13.
179. 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;68(9):3108-14.
193. Nelson AW, Groen AJ, Miller JL, Warren AY, Holmes KA, Tarulli GA, et al. Corrigendum to "Comprehensive assessment of estrogen receptor beta antibodies in cancer cell line models and tissue reveals critical limitations in reagent specificity" [*Mol. Cell Endocrinol.* 440 (2016) 138-150]. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;443:175.
194. Rahim B, O'Regan R. AR Signaling in Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2017;9(3).

217. Suzuki T, Miki Y, Takagi K, Hirakawa H, Moriya T, Ohuchi N, et al. Androgens in human breast carcinoma. *Med Mol Morphol*. 2010;43(2):75-81.
218. Christopoulos PF, Vlachogiannis NI, Vogkou CT, Koutsilieris M. The Role of the Androgen Receptor Signaling in Breast Malignancies. *Anticancer Res*. 2017;37(12):6533-40.
219. John E. Hall ACG. Guyton and Hall textbook of medical physiology. The 12th edition of Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology 12. Philadelphia, PA : Saunders Elsevier, ©2011.2011. p. 922- 34.
242. Collins LC, Cole KS, Marotti JD, Hu R, Schnitt SJ, Tamimi RM. Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. *Mod Pathol*. 2011;24(7):924-31.
243. Park S, Koo JS, Kim MS, Park HS, Lee JS, Lee JS, et al. Androgen receptor expression is significantly associated with better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancers. *Ann Oncol*. 2011;22(8):1755-62.
244. Bravaccini S, Ravaioli S, Amadori D, Scarpi E, Puccetti M, Rocca A, et al. Are There Differences in Androgen Receptor Expression in Invasive Breast Cancer in African (Tanzanian) Population in Comparison With the Caucasian (Italian) Population? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:137.
245. Riaz N, Idress R, Habib S, Azam I, Lalani EM. Expression of Androgen Receptor and Cancer Stem Cell Markers (CD44+)/CD24(-) and ALDH1(+): Prognostic Implications in Invasive Breast Cancer. *Transl Oncol*. 2018;11(4):920-9.
246. Cochrane DR, Bernales S, Jacobsen BM, Cittelly DM, Howe EN, D'Amato NC, et al. Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. *Breast Cancer Res*. 2014;16(1):R7.
248. Love RR, Philips J. Oophorectomy for breast cancer: history revisited. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(19):1433-4.
249. Huggins C, Bergenstal DM. Inhibition of human mammary and prostatic cancers by adrenalectomy. *Cancer Res*. 1952;12(2):134-41.
250. Huggins CB. Current cancer concepts. Adrenalectomy as palliative treatment. *Jama*. 1967;200(11):973.
251. Hickey TE, Robinson JL, Carroll JS, Tilley WD. Minireview: The androgen receptor in breast tissues: growth inhibitor, tumor suppressor, oncogene? *Mol Endocrinol*. 2012;26(8):1252-67.
252. Mohammed H, Russell IA, Stark R, Rueda OM, Hickey TE, Tarulli GA, et al. Progesterone receptor modulates ER α action in breast cancer. *Nature*. 2015;523(7560):313-7.
253. McNamara KM, Kannai A, Sasano H. Possible roles for glucocorticoid signalling in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2018;466:38-50.

254. Fujii R, Hanamura T, Suzuki T, Gohn T, Shibahara Y, Niwa T, et al. Increased androgen receptor activity and cell proliferation in aromatase inhibitor-resistant breast carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;144 Pt B:513-22.
255. Davies AH, Zoubeidi A. The Androgen Receptor Bridges Stem Cell-Associated Signaling Nodes in Prostate Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2016;2016:4829602.
256. Jiang L, Shan J, Shen J, Wang Y, Yan P, Liu L, et al. Androgen/androgen receptor axis maintains and promotes cancer cell stemness through direct activation of Nanog transcription in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(24):36814-28.
257. Ling K, Jiang L, Liang S, Kwong J, Yang L, Li Y, et al. Nanog interaction with the androgen receptor signaling axis induce ovarian cancer stem cell regulation: studies based on the CRISPR/Cas9 system. *J Ovarian Res*. 2018;11(1):36.
258. Barton VN, Christenson JL, Gordon MA, Greene LI, Rogers TJ, Butterfield K, et al. Androgen Receptor Supports an Anchorage-Independent, Cancer Stem Cell-like Population in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res*. 2017;77(13):3455-66.
259. Aceto N, Bardia A, Wittner BS, Donaldson MC, O'Keefe R, Engstrom A, et al. AR Expression in Breast Cancer CTCs Associates with Bone Metastases. *Mol Cancer Res*. 2018;16(4):720-7.
260. Azariadis K, Kiagiadaki F, Pelekanou V, Bempi V, Alexakis K, Kampa M, et al. Androgen Triggers the Pro-Migratory CXCL12/CXCR4 Axis in AR-Positive Breast Cancer Cell Lines: Underlying Mechanism and Possible Implications for the Use of Aromatase Inhibitors in Breast Cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44(1):66-84.
261. Liu YN, Liu Y, Lee HJ, Hsu YH, Chen JH. Activated androgen receptor downregulates E-cadherin gene expression and promotes tumor metastasis. *Mol Cell Biol*. 2008;28(23):7096-108.
262. Cimino-Mathews A, Hicks JL, Illei PB, Halushka MK, Fetting JH, De Marzo AM, et al. Androgen receptor expression is usually maintained in initial surgically resected breast cancer metastases but is often lost in end-stage metastases found at autopsy. *Hum Pathol*. 2012;43(7):1003-11.
263. Magklara A, Brown TJ, Diamandis EP. Characterization of androgen receptor and nuclear receptor co-regulator expression in human breast cancer cell lines exhibiting differential regulation of kallikreins 2 and 3. *Int J Cancer*. 2002;100(5):507-14.
- .
355. Liu YX, Zhang KJ, Tang LL. Clinical significance of androgen receptor expression in triple negative breast cancer-an immunohistochemistry study. *Oncol Lett*. 2018;15(6):10008-16.
356. McNamara KM, Moore NL, Hickey TE, Sasano H, Tilley WD. Complexities of androgen receptor signalling in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(4):T161-81.

357. Wang C, Kar S, Lai X, Cai W, Arfuso F, Sethi G, et al. Triple negative breast cancer in Asia: An insider's view. *Cancer Treat Rev.* 2018;62:29-38.
358. Speers C, Zhao SG, Chandler B, Liu M, Wilder-Romans K, Olsen E, et al. Androgen receptor as a mediator and biomarker of radioresistance in triple-negative breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* 2017;3:29.
359. Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, Tanaka S, Morisaki T, Takashima T, et al. Expression and Clinical Significance of Androgen Receptor in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2017;9(1).
360. Ieni A, Barresi V, Ricciardi GR, Adamo B, Adamo V, Tuccari G. Prognostic value of androgen receptor expression in triple negative breast carcinomas: personal experience and comments on a review about "Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions" by Collignon et al. *Breast Cancer (Dove Med Press).* 2016;8:157-9.
361. 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(29):46482-91.
411. Uno H, Wittes J, Fu H, Solomon SD, Claggett B, Tian L, et al. Alternatives to Hazard Ratios for Comparing the Efficacy or Safety of Therapies in Noninferiority Studies. *Ann Intern Med.* 2015;163(2):127-34.
412. A'Hern RP. Restricted Mean Survival Time: An Obligatory End Point for Time-to-Event Analysis in Cancer Trials? *J Clin Oncol.* 2016;34(28):3474-6.
413. Clavel-Chapelon F. Cumulative number of menstrual cycles and breast cancer risk: results from the E3N cohort study of French women. *Cancer Causes Control.* 2002;13(9):831-8.

Listă lucrări științifice publicate

Articole publicate în reviste de specialitate

1. Niță, I.; Nițipir, C.; Toma, Ș.A.; Limbău, A.M.; Pîrvu, E.; Bădărău, I.A.; Suci, I.; Suci, G.; Manolescu, L.S.C. Histological Aspects and Quantitative Assessment of Ki67 as Prognostic Factors in Breast Cancer Patients: Result from a Single-Center, Cross Sectional Study. *Medicina* 2020, 56, 600. <https://www.mdpi.com/1648-9144/56/11/600>, FI= 1.205, PubMed
2. Niță I, Nițipir C, Toma Ș A, Limbău AM, Pîrvu E, Bădărău IA, et al. Correlation between Androgen Receptor Expression and Immunohistochemistry Type as Prognostic Factors in a Cohort of Breast Cancer Patients: Result from a Single-Center, Cross Sectional Study. *Healthcare (Basel)*. 2021;9(3), FI= 1.916, PubMed
3. Niță I, Nițipir C, Toma ȘA, Limbău AM, Pîrvu E, Bădărău IA. The importance of androgen receptors in breast cancer. *Med Pharm Rep*. 2021 Jul;94(3):273-281. doi: 10.15386/mpr-1842. Epub 2021 Jul 29, PubMed
- 4, Niță I, Nițipir C, Toma Ș A, Limbău AM, Pîrvu E, Bădărău IA, et al. Level of education, background and clinical stage as prognostic factors according RMST function in patients with early and locally advanced breast cancer: a single institution experience from Romania. *Med Pharm Rep*. 2021 May, DOI: 10.15386/mpr-1988, PubMed

Lucrări prezentate la manifestări științifice:

Prezentare orală

Prognostic factors in a non-metastatic breast cancer cohort using RMST function: a single institution experience. Irina Niță, Cornelia Nițipir, Ioana Anca Bădărău, Zilele Medicale si Stiintifice ale IOB, 20 – 22 mai 2021, București, România.