



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ CLAUDIN7, PDL-1,
PTEN, C-KIT, C-MET, CMYC, ALK, CK5/6, CK17, P53, EGFR,
KI67 ΚΑΙ P63 ΣΤΟΝ ΤΡΙΠΛΑ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

Χλόη Κωνσταντίνου

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ CLAUDIN7, PDL-1,
PTEN, C-KIT, C-MET, CMYC, ALK, CK5/6, CK17, P53, EGFR,
KI67 ΚΑΙ P63 ΣΤΟΝ ΤΡΙΠΛΑ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

Χλόη Κωνσταντίνου

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης της κ. Κωνσταντίνου Χλόης: 27-11-2009

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 677^α/9-2-2010

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Μπάτσης Χαράλαμος, Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Μπατιστάτου Άννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Χαρίσης Χαράλαμπος, Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 17-3-2010

«Κλινικά και μοριακά χαρακτηριστικά του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού»

Ανασυγκρότηση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 759^α/14-2-2014

Επιβλέπων

Χαρίσης Χαράλαμπος, Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Μπατιστάτου Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Αγνάντη Νίκη, ομότιμη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 859/21-6-2018

Μπατιστάτου Άννα	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γούσια Άννα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μήτσης Μιχαήλ	Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πενθερουδάκης Γεώργιος	Αναπληρωτής Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χαρίσης Χαράλαμπος	Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βλάχος Κωνσταντίνος	Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπαλή Χριστίνα	Επίκουρη Καθηγήτρια Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 18-12-2018

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατιστάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Επιθυμώ να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε μια σειρά από πρόσωπα που με βοήθησαν να ολοκληρώσω την εργασία αυτή.

Κατ' αρχήν ευχαριστώ τον κ. Σαββα Παπαδόπουλο, διευθυντή παθολογοανατομίας του Νοσοκομείου ΥΓΕΙΑ για τον σημαντικό χρόνο που διέθεσε και την συνεισφορά του στη δημιουργία, ανάγνωση και καταγραφή των μικροσυστοιχειών. Και την κυρία Ουρανία Δάφνη για την βοήθεια της στη στατιστική ανάλυση.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Επίκουρο Καθηγητή Χειρουργικής κ. Χαρίση Χαράλαμπο για την επίβλεψη της εργασίας μου, την υπομονή και κατανόηση του αλλά και την επίλυση πολλών διαδικαστικών δυσκολιών. Χωρίς την βοήθεια του δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της διατριβής αυτής.

Η ευγνωμοσύνη μου ανήκει στην Ομότιμη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας κυρία Νίκη Αγνάντη για την πολύτιμη καθοδήγηση της και για την αμέριστη υποστήριξη της σε κάθε βήμα μου απο την πρώτη μέρα που με γνώρισε.

Στους δυο καλούς μου θείους και ξεχωριστούς επιστήμονες και γιατρούς Ειρήνη Καρυδά και Θάνο Αλεξόπουλο απευθύνω με πολλή αγάπη ένα μεγάλο ευχαριστώ για την πολύτιμη βοήθεια και την αγάπη τους και για τη παραχώρηση του υλικού που χρησιμοποιήθηκε για τη διατριβή.

Πάνω απ' όλα ευχαριστώ το σύζυγο μου και τους γονείς μου που ήταν πάντοτε παρόντες όποτε τους χρειάστηκα.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στην Χειρουργική Κλινική του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το χρονικό διάστημα 2010 – 2018 με σκοπό την μελέτη των μοριακών δεικτών CLAUDIN7, PDL-1, PTEN, C-KIT, C-MET, CMYC, ALK, CK5/6, CK17, P53, EGFR, KI67 ΚΑΙ P63 στον Τριπλά Αρνητικό Καρκίνο του Μαστού (TNBC). Ο TNBC αντιπροσωπεύει το 10-20% όλων των καρκίνων του μαστού και σχετίζεται με υψηλό κίνδυνο υποτροπής και γενικά χειρότερη πρόγνωση.

Λόγω της έλλειψης στοχευμένης θεραπείας η χημειοθεραπεία αποτελεί την κύρια θεραπεία εκλογής. Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη επιπρόσθετων προγνωστικών δεικτών για τους τριπλά αρνητικούς καρκίνους του μαστού που να μπορούν να συσχετιστούν με επιθετική συμπεριφορά σε σχέση με τον υψηλότερο βαθμό κακοήθειας, τους θετικούς λεμφαδένες, τη διήθηση λεμφαγγείων (LVI), την τοπική υποτροπή, τις μεταστάσεις, την ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS) καθώς και την συνολική επιβίωση (OS).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Γενικό μέρος

1. Ανατομία του μαστού	5
1.1 Εμβρυολογία του μαστού	5
1.2 Δομή του μαζικού αδένα	5
1.3 Αρτηριακή παροχή του μαστού	6
1.4 Λεμφική παροχέτευση του μαστού	7
2. Βασικές αρχές καρκινογένεσης	8
2.1 Βιολογία του καρκίνου	8
2.2 Γενετικές αλλοιώσεις στον καρκίνο του μαστού	9
3. Επιδημιολογία του καρκίνου του μαστού	11
4. Παράγοντες κινδύνου του καρκίνου του μαστού	12
5. Ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού και βαθμός διαφοροποίησης	18
6. Μορφολογική ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού	26
7. Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού	30
8. Τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού	31
8.1 Επιδημιολογία	31
8.2 Κλινικά χαρακτηριστικά	33
8.3 Απεικόνιση των TNBC	33
8.4 Παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά	35
8.5 Μοριακό προφίλ του TNBC	41
8.6 Ορισμός του TNBC έναντι του BLBC	43
8.7 BRCA1 και TNBC	44
8.8 Χειρουργική θεραπεία του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού	45
8.9 Ακτινοθεραπεία των τριπλά αρνητικών καρκίνων του μαστού	46
8.10 Προεγχειρητική συστηματική θεραπεία των τριπλά αρνητικών καρκίνων του μαστού (NAC)	47
8.11 Συστηματική θεραπεία των τριπλά αρνητικών καρκίνων του μαστού	48

Ειδικό μέρος

1. Σκοπός	59
2. Υλικά και Μέθοδοι	60
3. Στατιστική ανάλυση	70
4. Αποτελέσματα	74
5. Συζήτηση-Συμπεράσματα	110
6. Περίληψη	171
7. Summary	173
8. Βιβλιογραφία	175

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ανατομία του μαστού

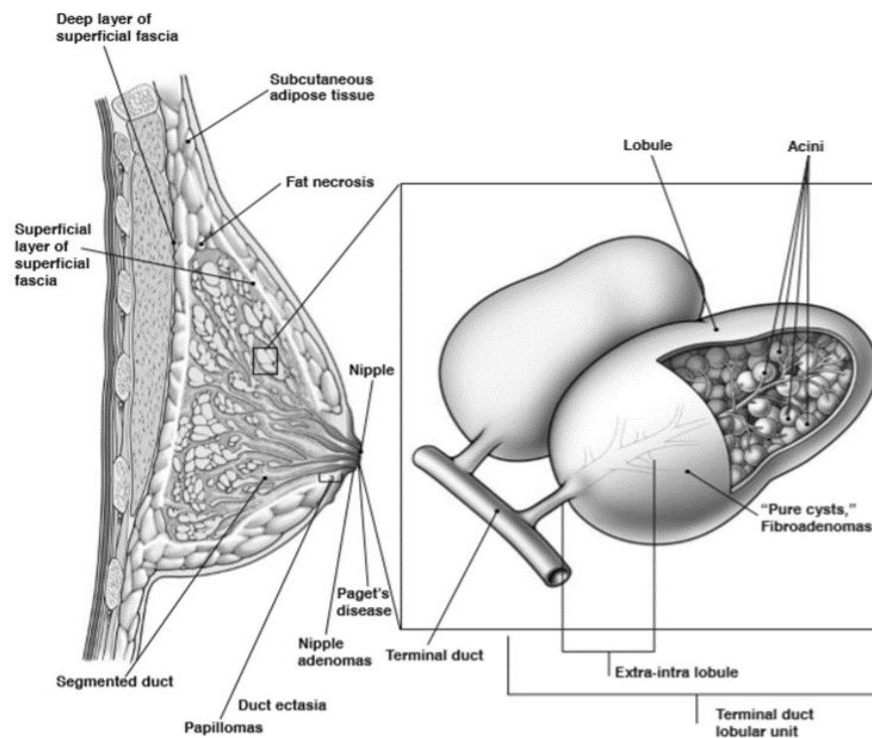
1.1 Εμβρυολογία

Ο μαζικός αδένας προέρχεται από παχύνσεις του εξωδέρματος κατά μήκος της γαλακτικής γραμμής. Η γαλακτική γραμμή εκτείνεται από τη μασχάλη σε όλη τη διαδρομή προς την βουβωνική χώρα. Μέσα από μία διαδικασία παλινδρόμησης και ωρίμανσης μεταξύ 6^{ης}-8^{ης} εμβρυικής εβδομάδας οι δύο θωρακικές παχύνσεις παραμένουν. Κατά την 12η-16^η εμβρυική εβδομάδα γίνεται ανάπτυξη της θηλής, που ακολουθείται κατά την 16^η εβδομάδα από διακλαδιζόμενες δοκιδώσεις και καταδύσεις του εξωδέρματος στο μεσέγχυμα. Η ανάπτυξη των λοβίων γίνεται μεταξύ 32^{ης} και 40^{ης} εβδομάδας. Παροδική έκκριση γάλακτος μπορεί να παρατηρηθεί στα νεογέννητα τους πρώτους 1-2 μήνες. Περιστασιακά πλήρης παλινδρόμηση των υπόλοιπων παχύνσεων αποτυγχάνει να συμβεί με αποτέλεσμα τον έκτοπο σχηματισμό μαζικού αδένος κατά μήκος αυτής της γραμμής. Η ανάπτυξη του μαζικού αδένος ξεκινά συνήθως με την έναρξη της εφηβείας, γύρω στην ηλικία των 11 ή 12 ετών, και ολοκληρώνεται μέχρι την ηλικία των 18-20 ετών. Μεταγενέστερες αλλαγές όσον αφορά το μέγεθος και το σχήμα του μαστού μπορεί να συμβούν υπό την επίδραση μιας μεγάλης ποικιλίας παραγόντων συμπεριλαμβανομένης της εγκυμοσύνης, της απώλειας ή αύξησης βάρους, ορμονικών αλλαγών, γήρανσης και θηλασμού. Η ανάπτυξη των πόρων του μαστού γίνεται με την επίδραση οιστρογόνων και προγεστερόνης που εκκρίνονται από τις ωοθήκες κατά τη διάρκεια της εφηβείας. Πλήρης δομική και λειτουργική ωρίμανση του μαζικού αδένος παρατηρείται μόνο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Μετά το πέρας του θηλασμού/γαλουχίας παρατηρείται ατροφία των αδενοκυψελών και των πόρων, ενώ ο μαστός μειώνεται αισθητά σε μέγεθος. Με την έναρξη της εμμηνόπαυσης, οι αδενοκυψέλες υποστρέφουν και η εμφάνιση του μαστού σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες είναι πολύ διαφορετική από εκείνη των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών.

1.2 Δομή του μαζικού αδένος

Ο μαζικός αδένας αναπτύσσεται στο πρόσθιο θωρακικό τοίχωμα εντός της περιτονίας του Scarpa. Αποτελείται από δέρμα, το μαζικό αδένος, την επιτολή και εν τω βάθει περιτονία και το περιμαστικό λίπος. Η επιτολής περιτονία χρησιμεύει ως πλάνο καθοδήγησης για πολλούς

χειρουργούς κατά τον διαχωρισμό του μαστικού αδένος από το υποδόριο λίπος κατά την εκτέλεση μιας μαστεκτομής. Η εν τω βάθει περιτονία διαχωρίζει τον μαστό από τον υποκείμενο μείζονα θωρακικό μυ. Μεταξύ των δύο περιτονιών εκτείνονται οι σύνδεσμοι του Cooper, οι οποίοι συμβάλλουν στη γενική υποστήριξη και σχήμα του στήθους. Η πλάγια προβολή του μαστού προς την μασχάλη ονομάζεται ουρά του Spence. Ο μαστικός αδένας είναι ένας σύνθετος σωληνοκυψελοειδής αδένας που συνίσταται από λοβία και πόρους. Τα λοβία αποτελούνται από πολλαπλές κυψελίδες. Τα κυψελιδικά γαλακτοπαραγωγικά του κύτταρα περιβάλλονται από συσπώμενα μυοεπιθηλιακά κύτταρα, μαζί με σημαντικό αριθμό λιποκυττάρων. Κάθε μαστός έχει 15-20 λοβούς, οι οποίοι αποτελούνται από πολλά μικρά λοβία. Κάθε λοβίο τροφοδοτεί ένα τερματικό πόρο ο οποίος με τη σειρά του τροφοδοτεί έναν τμηματικό πόρο, που όλοι μαζί τροφοδοτούν τελικά τους 15-20 γαλακτοφόρους πόρους οι οποίοι συγκλίνουν κάτω από την θηλαία άνω πάνω στην επιφάνεια της θηλής μέσω χωριστών στομιών.

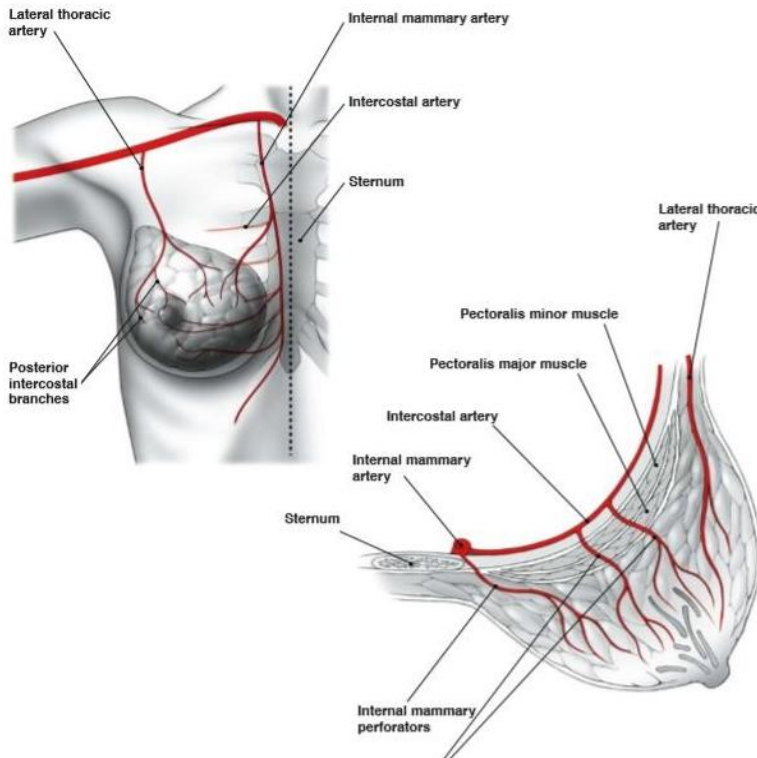


Εικόνα 1. Δομή του μαστικού Αδένος [1]

1.3 Αρτηριακή παροχή του μαστού

Η παροχή αίματος στο μαστό προέρχεται κατά κύριο λόγο από την έσω μαστική αρτηρία (έσω και κεντρικό τμήμα του μαστού) και από την πλάγια θωρακική αρτηρία (άνω έσω τεταρτημόριο) οι οποίες εκφύονται από την μασχαλιαία αρτηρία. Κλάδοι αυτών των

αρτηριών αναστομώνονται μεταξύ τους. Επιπρόσθετα, από την έσω μαστική αρτηρία εκφύονται οι μεσοπλεύριες αρτηρίες, και κλάδοι των μεσοπλεύριων αρτηριών διατιτραίνουν την εν τω βάθει επιφάνεια του μαστού (διατιτραίνουσες αρτηρίες).



Εικόνα 2: Αρτηριακή παροχή του μαστού [1]

1.4 Λεμφική παροχέτευση του μαστού.

Περίπου το 75% της λεμφικής αποχέτευσης του μαστού γίνεται από τους λεμφαδένες της μασχάλης, με το μεγαλύτερο μέρος του υπόλοιπου 25% στους έσω μαστικούς κόμβους και στα λεμφαγγεία του δέρματος. Οι λεμφαδένες της μασχάλης χωρίζονται σε τρία ανατομικά επίπεδα: Επίπεδο I, πλαγίως από τον ελάσσονα θωρακικό μυ, επίπεδο II, εν τω βάθει από τον ελάσσονα θωρακικό μυ, και επίπεδο III εκ των έσω του ελάσσονα θωρακικού. Οι λεμφαδένες του Rotter βρίσκονται ανάμεσα στις μυϊκές ίνες του μείζονα θωρακικού και ελάσσονα θωρακικού. Η λεμφική παροχέτευση περνά διαδοχικά από τα επίπεδα I-III. Οι έσω μαστικοί λεμφαδένες βρίσκονται στα μεσοπλεύρια διαστήματα στην παραστερνική περιοχή.

2. Βασικές αρχές καρκινογένεσης

2.1 Βιολογία του καρκίνου

Ο καρκίνος αποτελεί μία σύνθετη και πολυπαραγοντική νόσο. Αφορά κάθε κακοήθες νεόπλασμα ή όγκο, περικλείοντας μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών νοσημάτων (>200) που προσβάλλουν περισσότερα από 60 όργανα και ιστούς του ανθρώπινου σώματος [2].

Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από:

- 1) ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση-πολλαπλασιασμός (αθανатоποίηση)
- 2) ικανότητα διήθησης γειτονικών ιστών και δημιουργία απομακρυσμένων μεταστάσεων
- 3) αντίσταση σε μονοπάτια αναστολής της κυτταρικής αύξησης
- 4) μειωμένη ανάγκη σε αυξητικούς παράγοντες
- 5) αποφυγή απόπτωσης
- 6) ικανότητα αγγειογένεσης

Ο καρκίνος ως γενετική ασθένεια μπορεί να προκληθεί από γενετικές (γενομικές) βλάβες του DNA που αφορούν αλλαγές στην αλληλουχία του DNA γονιδίων που ρυθμίζουν βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η επιδιόρθωση του DNA, η διαφοροποίηση και η απόπτωση. Αλλά και από επιγενετικές βλάβες του DNA που περιλαμβάνουν τροποποιήσεις του DNA και επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση χωρίς να μεταβάλλεται η αλληλουχία των βάσεων στο γονιδίωμα. Οι κυριότερες επιγενετικές αλλαγές είναι η μεθυλίωση της κυτοσίνης, η τροποποίηση της δομής της χρωματίνης με μεθυλίωση ή απακετυλίωση των ιστόνων καθώς και η απώλεια γενομικής εγγραφής ή αποτυπώματος (genomic imprinting) [2, 3]

Οι πιο πάνω βλάβες μπορεί να κληρονομηθούν ή να είναι επίκτητες και προκαλούνται κυρίως από τη δράση περιβαλλοντικών παραγόντων (διάφοροι τύποι ακτινοβολίας, χημικές ουσίες, κακή διατροφή, κάπνισμα, υπερκατανάλωση αλκοόλ, αλλά και από την επιμόλυνση φυσιολογικών κυττάρων με ορισμένους τύπους ιών).

Καρκινογένεση καλείται η διαδικασία μετατροπής ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό. Για την έναρξη της καρκινογένεσης δύο είναι τουλάχιστον οι απαραίτητες προϋποθέσεις: α) η ενεργοποίηση ενός ογκογονιδίου και β) η απενεργοποίηση ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου είτε, για παράδειγμα, με μετάλλαξη είτε με μεθυλίωση του υποκινητή του. Τα γονίδια αυτά αποτελούν τους πρωταγωνιστές της διαδικασίας αφού είναι γονίδια που ρυθμίζουν την διαδικασία της απόπτωσης καθώς και την επιδιόρθωση του DNA.

Για να μετατραπεί ένα κύτταρο σε καρκινικό περνά από τα εξής τρία στάδια:

1^ο Αθανατοποίηση (Immortalization): συνεχής διαίρεση και ανεξέλεγκτη αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού χωρίς αναγκαστικά να συμβαίνουν άλλες φαινοτυπικές αλλαγές.

2^ο Μετασχηματισμός (Transformation): έλλειψη των φυσιολογικών περιορισμών αύξησης.

3^ο Μετάσταση (Metastasis): ικανότητα των κυττάρων να μεταναστεύουν από τον ιστό που πρωτοεμφανίστηκαν σε κάποιο διαφορετικό ιστό του οργανισμού όπου, αφού διεισδύσουν, σχηματίζουν νέες αποικίες.

Η πορεία της καρκινογένεσης γενικά μπορεί να διακριθεί σε τρία στάδια:

1. Έναρξη (Initiation): κατά το στάδιο αυτό συμβαίνουν ποικίλες βλάβες σε συγκεκριμένα γονίδια των σωματικών κυττάρων, λόγω δράσης χημικών καρκινογόνων, επίδραση ακτινοβολιών ή μόλυνσης από ιό. Το κύτταρο στο στάδιο αυτό βρίσκεται σε λανθάνουσα κατάσταση και δε μετατρέπεται σε νεοπλασματικό.

2. Προαγωγή (Promotion): τα αδρανή κύτταρα ωθούνται σε κυτταρική διαίρεση υπό την επίδραση ειδικών παραγόντων που επηρεάζουν την αύξηση. Οι παράγοντες αυτοί, που δεν είναι καρκινογόνοι από τη φύση τους (αυξητικοί παράγοντες, ορμόνες, διάφοροι υποκινητές γονιδίων, φλεγμονές κτλ.), εμπλέκονται στη διαφοροποίηση διαιρούμενων ή μη κυττάρων.

3. Πρόοδος (Progression): η διέγερση της διαίρεσης των κυττάρων κατά το στάδιο της προαγωγής καταλήγει σε μια ανεξέλεγκτη πορεία πολλαπλασιασμού με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία νεοπλασμάτων.

2.2 Γενετικές αλλοιώσεις στον καρκίνο του μαστού

Τόσο ογκοκατασταλτικά γονίδια όσο και ογκογονίδια έχουν ενοχοποιηθεί ότι εμπλέκονται στην έναρξη αλλά και στην μετάσταση του καρκίνου του μαστού (**Ογκοκατασταλτικά:** BRCA1, BRCA2, TP53, και PTEN/MMAC1 Rb-1, TP53, p16 (CDKN2A), E-cadherin (Cdh1). **Ογκογονίδια:** c-myc, c-erb-B2, κυκλίνη D1 (CCND1)).

Οι κυριότεροι μηχανισμοί ενεργοποίησης περιλαμβάνουν:

- 1) γονιδιακή ενίσχυση (αύξηση του αριθμού των αντιγράφων ενός γονιδίου στο γονιδίωμα του κυττάρου λόγω λαθών που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του DNA),
- 2) διαγραφές γονιδίων

3) σημειακές μεταλλάξεις (ενεργοποιούν τα πρωτο-ογκογονίδια μέσω δομικών αλλαγών των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν)

4) απώλεια της ετεροζυγωτίας, όταν ένα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο κληρονομείται, με επακόλουθη απώλεια της ετεροζυγωτίας στο άλλο αλληλόμορφο, τότε συμβάλλει στην έναρξη της νόσου (σε 5% έως 10% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού), με αυξημένο κίνδυνο και στους δύο μαστούς και σε νεαρή ηλικία 5) χρωμοσωματικών αναδιατάξεων (κυρίως μεταθέσεις και σε μικρό βαθμό αναστροφές)

6) συνολική ανευπλοειδία.

7) μεθυλίωση του υποκινητή τους σε CpG νησίδες της αλληλουχίας του (προκαλεί απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και καταστολή της έκφρασής τους) [4].

Η σημειακή μετάλλαξη δεν φαίνεται να είναι ένας κοινός μηχανισμός για την ογκογόνο ενεργοποίηση στον καρκίνο του μαστού. Ο μηχανισμός που κυριαρχεί είναι κυρίως η ενίσχυση του γονιδίου.

3. Επιδημιολογία του καρκίνου του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την συχνότερα διαγιγνωσόμενη κακοήθεια στις γυναίκες παγκοσμίως και τη κύρια αιτία θανάτου γυναικών από καρκίνο. Υπάρχει σημαντική διακύμανση στα ποσοστά καρκίνου του μαστού μεταξύ των διαφόρων χωρών, με υψηλά ποσοστά στη Βόρεια Αμερική και τη Δυτική Ευρώπη, ενδιάμεσα ποσοστά στη Νότια Αμερική και την Ανατολική Ευρώπη, και χαμηλά ποσοστά στην Ασία (με εξαίρεση την Ιαπωνία). Το 2008 διαγνώστηκαν σχεδόν 1,4 εκατομμύρια γυναίκες με καρκίνο του μαστού σε όλο τον κόσμο και καταγράφηκαν περίπου 459.000 θάνατοι. Οι εκτιμήσεις για την πενταετή επιβίωση κυμαίνονται από 12% σε ορισμένες περιοχές της Αφρικής μέχρι σχεδόν 90% στις Ηνωμένες Πολιτείες, την Αυστραλία και τον Καναδά λόγω της έγκαιρης διάγνωσης με τη χρήση μαστογραφίας και τη συστηματική χρήση των επικουρικών θεραπειών [5].

Η διεθνής επίπτωση του καρκίνου του μαστού προβλέπεται να αυξηθεί στα 3,2 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις μέχρι το έτος 2050 [6].

4. Παράγοντες κινδύνου του καρκίνου του μαστού

1. Φύλο και ηλικία

Το φύλο και η ηλικία αναγνωρίζονται ως οι ισχυρότεροι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση του καρκίνου του μαστού. Μόνο περίπου 0,5% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού εμφανίζονται σε άνδρες. Η πλειοψηφία των καρκίνων του μαστού διαγιγνώσκονται μετά την ηλικία των 50. Η πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του μαστού είναι 1 στις 208 για την ηλικία των 39 ετών, 1 στις 26 για τις ηλικίες μεταξύ 40 και 59 χρόνων, 1 στις 29 για τις ηλικίες μεταξύ 60 και 69 ετών και 1 στις 16 για την ηλικία των 70 ετών και άνω ενώ στην ηλικία των 85 ετών φθάνει τη 1 στις 8 [7].

2. Φυλή και γεωγραφική προέλευση

Οι καυκάσιες γυναίκες έχουν το υψηλότερο ποσοστό του διηθητικού καρκίνου του μαστού (130,6/100.000), ακολουθούμενες από τις Αφροαμερικανίδες (117,5/100.000) και τις ισπανόφωνες (90,1/100.000). Έχει αναγνωριστεί εδώ και αρκετό καιρό ότι οι Αφροαμερικανίδες νεότερες των 40 ετών διαγιγνώσκονται συχνότερα με διηθητικό καρκίνο του μαστού (15,5/100.000) σε σχέση με τις καυκάσιες γυναίκες (13,1/100.000). Αυτό αντιστρέφεται μετά την ηλικία των 40 ετών όπου οι καυκάσιες γυναίκες διαγιγνώσκονται συχνότερα με διηθητικό καρκίνο του μαστού (281,3/100.000 έναντι 239,5/100.000) [8, 9].

3. Γεγονότα της πρώιμης ζωής

Μελέτες έχουν δείξει ότι ο κίνδυνος του καρκίνου του μαστού μπορεί να επηρεαστεί από γεγονότα κατά την ενδομήτρια ζωή, την παιδική ηλικία και την εφηβεία. Μια πρόσφατη μεταανάλυση έδειξε ότι γυναίκες με υψηλότερο βάρος γέννησης είχαν αυξημένο σχετικό κίνδυνο (RR) 23% (95% CI = 1,13 - 1,34) [10]. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε μελέτες για το ύψος κατά τη γέννηση, όπου μεγαλύτερο ύψος παρουσίαζε θετική συσχέτιση με τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού, έχουν σε σύγκριση με μικρότερα βρέφη (RR 1,28; 95% CI=1,11 - 1,48).

4. Ηλικία εμμηναρχής και εμμηνόπαυσης

Όσο μικρότερη η ηλικία εμφάνισης της εμμηναρχής και όσο μεγαλύτερη η ηλικία της εμμηνόπαυσης, τόσο υψηλότερος είναι ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού [11]. Πράγμα που υποδηλώνει ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος μεταξύ της εμμηναρχής και

της εμμηνόπαυσης, τόσο μεγαλύτερος είναι ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού λόγω μεγαλύτερης έκθεσης στα προεμμηνοπαυσιακά επίπεδα ορμονών. Ωστόσο, μια πρόσφατη μελέτη από την ομάδα PLCO έδειξε ότι η ηλικία της εμμηναρχής και της εμμηνόπαυσης ίσως να μην είναι τόσο ισχυροί προγνωστικοί παράγοντες για τον καρκίνο του μαστού [12].

5. Ηλικία πρώτης ολοκληρωμένης κύησης

Αποτελεί έναν άλλο παράγοντα κινδύνου του καρκίνου του μαστού [13]. Γυναίκες των οποίων η πρώτη ολοκληρωμένη κύηση ήταν στην ηλικία των 30 χρόνων και άνω έχουν 50% αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με εκείνες των οποίων η πρώτη ολοκληρωμένη κύηση ήταν πριν από την ηλικία των 20 ετών [11]

6. Τεκνοποίηση

Αυξημένος αριθμός τέκνων σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο καρκίνου του μαστού [11]. Η προστατευτική δράση φαίνεται περισσότερο σε ηλικιωμένες μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες [11].

7. Θηλασμός

Η ανάλυση 47 μελετών από 30 χώρες με στοιχεία για 50.302 περιπτώσεις καρκίνου του μαστού και 96.973 ελέγχους έδειξε ότι ο σχετικός κίνδυνος για καρκίνο του μαστού ήταν μειωμένος κατά 4,3% για κάθε 12 μήνες θηλασμού, επιπρόσθετα προς η μείωση κατά 7,0% για κάθε γέννα.

8. Οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού

Το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού έχει αναγνωριστεί ως παράγοντας κινδύνου για τον καρκίνο του μαστού αν και μόνο το 11% όλων των περιπτώσεων έχουν οικογενειακό ιστορικό της ασθένειας. Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού είναι περίπου διπλάσιος όταν υπάρχει οποιαδήποτε συγγενής πρώτου βαθμού (μητέρα ή αδελφή) με καρκίνο του μαστού. Ο κίνδυνος αυξάνεται σε συνάρτηση με τον αριθμό των προσβεβλημένων συγγενών, με σχετικό κίνδυνο 1,80 (95% CI 1,69 - 1,91), 2,93 (95% CI 2,36 - 3,64) και 3,90 (95% CI 2,03 - 7,49) όταν υπάρχει ένας, δύο και τρεις ή περισσότεροι προσβεβλημένοι συγγενείς, αντίστοιχα [14].

Ο κίνδυνος αυξάνεται επίσης όταν στο οικογενειακό ιστορικό υπάρχουν πολλαπλοί καρκίνοι, νεαρή ηλικία διαγνώσεως, εβραϊκή καταγωγή, καρκίνος μαστού σε άρρενες, αμφοτερόπλευρος καρκίνος του μαστού, καρκίνος ωοθηκών, καρκίνος του προστάτη σε νεαρή ηλικία καθώς και σπάνια είδη καρκίνου (όπως καρκίνος εγκεφάλου, σάρκωμα, γαστρικοί καρκίνοι).

9. Γενετική

Το θετικό οικογενειακό ιστορικό είναι διαφορετικό από την περίπτωση του κληρονομούμενου καρκίνου που οφείλεται σε γενετική μετάλλαξη. Το υποπτευόμαστε αν υπάρχουν στο ιστορικό της γυναίκας συγγενείς που εκδήλωσαν καρκίνο του μαστού σε μικρή ηλικία, αμφοτερόπλευρος καρκίνος του μαστού ή και ιστορικό καρκίνου των ωοθηκών. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού.

Πίνακας 1: Γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού.

Σύνδρομο	Γονίδιο	Καρκίνος	Lifetime κίνδυνος για καρκίνο του μαστού
Μαστός-Ωοθηκών	BRCA1	Μαστού και στις γυναίκες, ωοθηκών	40-80%
Μαστός-Ωοθηκών	BRCA2	Μαστού και ωοθηκών στις γυναίκες, μαστού, προστάτη και παγκρέατος στους άντρες,	20-80%
Li- Fraumeni	TP53	Μαστού, σάρκωμα, λευχαιμία, εγκεφάλου, πνεύμονα	56-90%
Cowden's	PTEN	Μαστού, θυρεοειδή, ενδομητρίου	25-50%
Peutz-Jepfers	STK11	Μαστού, ωοθηκών, τραχήλου, μήτρας, όρχεων, παχέως εντέρου.	32-54%
Κληρονομούμενος διάχυτος γαστρικός καρκίνος.	CDH1	Νεαρή ηλικία έναρξης, λοβιακός καρκίνος του μαστού.	60%

10. Διατροφικοί παράγοντες

Μια πρόσφατη μελέτη (NIH-AARP) που εξέτασε τη διατροφή και την υγεία σε μία μεγάλη ομάδα μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών έδωσε ενδείξεις ότι μπορεί να υπάρχει μια μέτρια συσχέτιση του ποσοστού του συνολικού λίπους με τον καρκίνο του μαστού [14]. Σε μια άλλη μελέτη προεμμηνοπαυσιακών γυναικών (Nurses' Health Study II -NHSII) παρατηρήθηκε μια μέτρια συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης ζωικού λίπους και του κινδύνου ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού.

11. Αλκοόλ

Πολυάριθμες μελέτες έχουν παρατηρήσει μέτρια αύξηση του κινδύνου για καρκίνο του μαστού σε συνάρτηση με μέτρια κατανάλωση αλκοόλ. Μία συνολική ανάλυση των πρόδρομων μελετών (prospective studies) έδειξε ότι ο κίνδυνος για καρκίνο του μαστού δεν επηρεάζεται από τον τύπο του αλκοόλ αλλά από την ποσότητα πρόσληψης με τον κίνδυνο να αυξάνεται κατά 1,09 για κάθε 10 g/d (95% CI 1.4 έως 1.13) [15, 16]. Δεν είναι ξεκάθαρο με ποιο μηχανισμό η κατανάλωση αλκοόλ αυξάνει τον κίνδυνο.

12. Κάπνισμα

Η σχέση του καρκίνου του μαστού με το κάπνισμα είναι αρκετά αμφιλεγόμενη. Και τούτο γιατί το κάπνισμα έχει συσχετιστεί με χαμηλότερα επίπεδα οιστρογόνων και μικρότερη ηλικία εμμηνόπαυσης, δύο παράγοντες που σχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Η California Teacher's study έδειξε αυξημένη αναλογία κινδύνου, 1,32 (95% CI 1,10 - 1,57), για καπνιστές σε σύγκριση με μη καπνιστές [17]. Η μεταανάλυση των δεδομένων από 53 επιδημιολογικές μελέτες έδειξε ότι το κάπνισμα συσχετίζεται με τον καρκίνο του μαστού, αλλά μόνο μεταξύ γυναικών που κατανάλωναν αλκοόλ [16]. Το πιο πιθανό είναι ότι κάποιες γυναίκες που είναι πιο επιρρεπείς στο κάπνισμα έχουν επίσης μεγαλύτερο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού.

13. Δείκτης Μάζας Σώματος (BMI)

Υψηλότερο BMI στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες σχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού.

14. LCIS και άτυπη υπερπλασία

Η εύρεση LCIS και ADH συνδέεται με υψηλότερο κίνδυνο για ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Ο κίνδυνος αυτός αυξάνεται περαιτέρω όταν συνδέεται με ένα θετικό οικογενειακό ιστορικό [17, 18].

15. Πυκνότητα του μαστού

Η υψηλή πυκνότητα του μαστού αποτελεί έναν από τους ισχυρότερους παράγοντες κινδύνου του καρκίνου του μαστού. Γυναίκες που το στήθος τους αποτελείται από πυκνό ιστό σε ποσοστό πέραν του 75% έχουν τέσσερις με έξι φορές μεγαλύτερο κίνδυνο σε σχέση με γυναίκες με πολύ χαμηλή πυκνότητα του μαστού [20].

16. Ενδογενείς ορμόνες

Οι ορμόνες των ωοθηκών, περιλαμβανομένης της οιστραδιόλης, της ελεύθερης οιστραδιόλης και της SHBG, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του καρκίνου του μαστού. Μια συγκεντρωτική ανάλυση εννέα πρόδρομων μελετών έδειξε ότι ο κίνδυνος για καρκίνο του μαστού αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης όλων των ορμονών του φύλου [21]. Αυτή η συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των στεροειδών και του κινδύνου για καρκίνο ισχύει τόσο για τις προεμμηνοπαυσιακές όσο και τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

17. Αυξητικοί παράγοντες

Εκτός από τις στεροειδείς ορμόνες υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού. Υψηλά επίπεδα προλακτίνης του πλάσματος σχετίζεται με RR 1,93 (95% CI 1,16 να 3.22) για τον καρκίνο του μαστού μετά την εμμηνόπαυση [22]. Ο IGF-1 έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με κίνδυνο ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού στις προεμμηνοπαυσιακές αλλά όχι στις εμμηνοπαυσιακές γυναίκες [23].

18. Εξωγενείς ορμόνες

Αντισυλληπτικά

Μια μεταανάλυση των δεδομένων από 54 μελέτες έδειξε ότι η χρήση αντισυλληπτικών κατά το παρόν και εντός 10 ετών από την διακοπή τους σχετίζεται με μικρή αύξηση του σχετικού κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Δεν υπάρχει καμία ένδειξη για αύξηση όταν έχουν περάσει πάνω από 10 χρόνια από τη διακοπή της χρήσης.

Μετεμμηνοπαυσιακή ορμονική θεραπεία υποκατάστασης

Η ορμονική θεραπεία υποκατάστασης μπορεί να είναι μόνο με οιστρογόνα ή με συνδυασμό οιστρογόνων και προγεστερόνης. Ανάλυση των δεδομένων από 51 μελέτες έδειξε ότι η συνδυαστική θεραπεία με οιστρογόνα και προγεστερόνη συνδεόταν με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του μαστού. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με εκείνα πολλών προηγούμενων μελετών που εξέτασαν την μετεμμηνοπαυσιακή χρήση ορμονών και τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού.

Σε μια μελέτη για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της ορμονικής υποκατάστασης όπου οι γυναίκες κατανεμηθηκαν στην τύχη σε μια ομάδα με οιστρογόνα μόνον και σε μια δεύτερη με οιστρογόνα συν προγεστερόνη, η δεύτερη ομάδα έκλεισε νωρίς λόγω του υψηλού αριθμού συμβάντων με αυτή τη θεραπεία.

Παρατηρήθηκε όχι μόνο αυξημένος κίνδυνος καρκίνου του μαστού αλλά και άλλες ασθένειες [24].

5. Ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού και βαθμός διαφοροποίησης

Λοβιακό καρκίνωμα in situ (LCIS)

Το LCIS αποτελεί μια σπάνια, πολυκεντρική οντότητα που διαπιστώνεται μικροσκοπικά. Ανευρίσκεται συχνότερα σε νέες, προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και η μέση ηλικία διάγνωσης είναι 44-46 ετών. Με τη χρήση της μαστογραφίας η συχνότητα του έχει αυξηθεί [25]. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι το LCIS είναι συνήθως αμφοτερόπλευρο (23%-69%) και πολυκεντρικό 60-85% [26-29]. Αποτελεί συνήθως τυχαίο εύρημα, σε μια βιοψία του μαστού για κάποια άλλη μαστογραφική αλλοίωση όπως μικροαποτιτανώσεις, παρακείμενες σκληρυντικής αδένωσης ή άλλων πολλαπλασιαστικών βλαβών.

Ιστολογικά οι λοβιακές κυψελίδες πληρούνται και μεγεθύνονται από κύτταρα με αφρώδη κυτταρόπλασμα και αμβλείς πυρήνες. Οι διατεταμένες κυψελίδες εκτείνονται κατά μήκος των λοβιακών πόρων (pagetoid spread) (εικόνες 5, 9). Μια παραλλαγή του LCIS είναι το πλειομορφικό LCIS όπου τα κύτταρα χαρακτηρίζονται από μεγάλη πυρηνική ατυπία. Η διάκριση μεταξύ ALH και LCIS είναι ποσοτική.

Το ER υπερεκφράζεται συνήθως στα LCIS κύτταρα τα οποία είναι συνήθως Her2/neu αρνητικά [30]. Η E-cadherin που εκφράζεται κατά προτίμηση στο πορογενές καρκίνωμα in situ (DCIS) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διάκριση μεταξύ των δύο [31].

Το LCIS θεωρείται παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη διηθητικού καρκίνου του μαστού και όχι προκαρκινική αλλοίωση παρέχοντας σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος 6,9 έως 12. Τα καρκινώματα που αναπτύσσονται είναι συνήθως διηθητικά πορογενή [32][33-35]. Διηθητικά λοβιακά καρκινώματα συμβαίνουν σε 25% έως 37% των ασθενών. Η συχνότητα αυτή είναι υψηλότερη από τη συχνότητα των 5% έως 10% που παρατηρείται στο γενικό πληθυσμό.

Δυστυχώς δεν υπάρχουν κάποια μορφολογικά ή μοριακά χαρακτηριστικά βάσει των οποίων θα μπορούσες να προβλέψεις με ακρίβεια ποιες περιπτώσεις LCIS θα αναπτύξουν διηθητικό καρκίνωμα. Ως εκ τούτου στην χειρουργική αντιμετώπιση του LCIS δεν χρειάζονται αρνητικά όρια ενώ η ακτινοθεραπεία δεν έχει κανένα ρόλο στη διαχείριση των LCIS. Το National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project

(NSABP) έδειξε σημαντική μείωση καρκινώματος με τη χρήση της **ταμοξιφένης** για χημειοπροφύλαξη.

Πορογενές καρκίνωμα in situ (DCIS)

Στο πορογενές καρκίνωμα in situ (DCIS) τα νεοπλασματικά κύτταρα περιορίζονται εντός του συστήματος των πόρων χωρίς να διηθούν την βασική μεμβράνη. Το DCIS θεωρείται ότι είναι πρόδρομη αλλοίωση του διηθητικού καρκινώματος. Σε αντίθεση με το LCIS, το διηθητικό καρκίνωμα συμβαίνει πάντα στον ομόπλευρο μαστό. Διαγιγνώσκεται συνήθως μαστογραφικά με την παρουσία μικροαποτιτανώσεων, μπορεί όμως να εκδηλωθεί κλινικά και ως ψηλαφητή μάζα με ή χωρίς ρύση θηλής. Η επίπτωση εμφάνισης του DCIS είχε αυξηθεί δραματικά μεταξύ των ετών 1973-1992 (587%) και σίγουρα αυτή η μεγάλη αύξηση δεν μπορεί να εξηγηθεί μόνο με τη χρήση της μαστογραφίας [36].

Τα νεοπλασματικά κύτταρα μπορεί να έχουν διάφορους βαθμούς διαφοροποίησης και αρχιτεκτονικά πρότυπα. (Πίνακας 2)

Πίνακας 2: Ιστολογικοί τύποι DCIS

Τύπος	Χαρακτηριστικά	Επιθετικότητα	Ανάπτυξη
Φαγεσωρικό (Comedo)	Ψηλαφητή μάζα Πολυκεντρικό >30% Αμφώ 10% High grade	Πιο επιθετικός τύπος DCIS με πιθανότητα μικροδιήθησης 24%	Συμπαγής με νέκρωση. Παρουσία ασβεστοποίησης. Έντονη πυρηνική ατυπία. Μεγάλα κύτταρα με αυξημένες μιτώσεις. Σημαντική ίνωση και ελάστωση του στρώματος.
Μικροθηλώδες (Micropapillary)	Πολυκεντρικό (80%)	Μέτρια	Κύτταρα με μέτρια ατυπία και ομαλούς πυρήνες. Επιμήκεις προσεκβολές στον αυλό των πόρων και απουσία αγγειοσυνδετικών αξόνων.
Θηλώδες (papillary)	Σπανιότερος τύπος	Πολύ μικρή πιθανότητα διήθησης	Απουσία μυοεπιθηλιακών κυττάρων και επένδυση αγγειοσυνδετικών αξόνων με καρκινικά κύτταρα.
Ηθμοειδές (cribriform)	Ενίοτε πολυκεντρικό	Σπάνια πιθανότητα μικροδιήθησης	Μικρά κύτταρα με μικρή ατυπία και λίγες μιτώσεις. Οι πόροι πληρούνται από κύτταρα που σχηματίζουν αυλούς.
Συμπαγές (Solid)	Ενίοτε πολυκεντρικό	Σπάνια πιθανότητα μικροδιήθησης	Μεσαίου μεγέθους κύτταρα με μέτρια ατυπία. Πλήρωση των πόρων με καρκινικά κύτταρα.

Στη διάγνωση του DCIS πρέπει πάντα να αναφέρεται ο βαθμός πυρηνικής ατυπίας χαμηλή (low grade DCIS (LG DCIS)), μέση (intermediate grade DCIS (IG DCIS)) και υψηλή (high grade DCIS (HG DCIS)) - καθώς και η παρουσία νέκρωσης [37].

Το LG DCIS τείνει να είναι πιο συχνά ER/PR positive (91%) και HER2/neunegative (18%), ενώ το HG DCIS είναι λιγότερο πιθανό να είναι ER/PR positive (57%) και Her2/neu-positive (69%) [38, 39].

Συνιστάται εκτεταμένη δειγματοληψία και μικροσκοπική εξέταση για να αποκλειστεί η διήθηση. Στη NSABP B-17, η παρουσία ενός και μόνο πόρου από καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζεται ως θετικό όριο [40]. Μία μελέτη των Silverstein *et al.* έδειξε ότι το μέγεθος του ελεύθερου ορίου είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας υποτροπής. Στη μελέτη αυτή δεν υπήρχε διαφορά στο ποσοστό υποτροπής στις περιπτώσεις DCIS που αντιμετωπίζονταν με ογκεκτομή ή ογκεκτομή και ακτινοθεραπεία εφόσον το καθαρό όριο εκτομής ήταν 1 εκατοστό. Για όρια μεταξύ 1-10 mm το ποσοστό υποτροπής ήταν υψηλότερο. Αρνητικό όριο για το DCIS θεωρείται σήμερα το 2 mm.

Μικροδιήθηση ορίζεται η διήθηση που εκτείνεται σε 1 mm.

Διηθητικός καρκίνος του μαστού

Το πορογενές διηθητικό μη ειδικού τύπου (NST) καρκίνωμα αποτελεί τον πιο συχνό ιστολογικό τύπο και αντιστοιχεί στο 70% έως 80% όλων των καρκινωμάτων του μαστού [41, 42]. Το υπόλοιπο 20% έως 30% αποτελείται από τους ειδικούς τύπους και περιλαμβάνει το λοβιακό, το σωληνώδες, το μυελώδες και το βλενωδες. Αυτοί οι ειδικοί τύποι σχετίζονται με καλύτερη βιολογική συμπεριφορά. Για να χαρακτηριστεί ένα καρκίνωμα ως κάποιο από αυτούς τους τύπους πρέπει στην πλειοψηφία του (90%) να έχει τα ειδικά χαρακτηριστικά ενώ το NST ποικίλει σε εμφάνιση και μπορεί να έχει μικρής έκτασης περιοχές από διάφορους τύπους.

Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μη ειδικού τύπου (IDC NST)

Το IDC μπορεί να παρουσιαστεί ως ψηλαφητή μάζα ή μαστογραφική ανωμαλία. Ο εντοπισμός κεντρικά μπορεί να σχετίζεται με εισολκή θηλής ενώ μπορεί να διηθεί το υπερκείμενο δέρμα ή την υποκείμενη περιτονία και τους θωρακικούς μυς. Μακροσκοπικά εμφανίζεται συνήθως ως μάζα με ασαφή όρια και αστεροειδή παρυφή, γκριζωπή χροιά και σκληρή σύσταση. Μικροσκοπικά υπάρχει άφθονος συνδετικός ιστός εντός του οποίου

περικλείονται πεπαχυμένοι και αποφραγμένοι πόροι. Τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται είτε μεμονωμένα διάσπαρτα ή σε μυριάδες σχέδια αδενοειδή είτε σχηματίζοντας σωληνώδεις συμπαγείς ή δοκιδώδεις αρθροίσεις ενώ μπορεί να παρουσιάζει περιοχές αιμορραγικής διήθησης ή κυστικής εκφύλισης. Μικροαποτιτανώσεις μπορεί να ανευρίσκονται στο τοίχωμα των πόρων ή διάσπαρτες στο στρώμα. Το DCIS συνήθως συνυπάρχει, και συνήθως ο βαθμός κακοήθειας των δύο είναι σύμφωνος. Καλά διαφοροποιημένο καρκίνωμα έχει συνήθως θετικούς ορμονικούς υποδοχείς και HER2/neu-αρνητικό, και κακώς διαφοροποιημένο όγκοι έχουν το αντίθετο μοτίβο.

Λοβιακό διηθητικό καρκίνωμα (ILC)

Αποτελεί το 5%-10% περίπου των καρκινωμάτων του μαστού [43, 44]. Συχνά συνυπάρχει με το πορογενές καρκίνωμα. Μπορεί να είναι πολυκεντρικό ενώ πολύ συχνά έχει σύγχρονη ή μετάχρονη αμφοτερόπλευρη εμφάνιση [45]. Το ILC μπορεί να παρουσιαστεί ως ψηλαφητή μάζα ή μαστογραφική ανωμαλία (διαταραχή της αρχιτεκτονικής, σκίαση ασαφών ορίων, εντοπισμένη ασυμμετρία στην πυκνότητα του μαστού). Ενώ μπορεί να μην είναι εμφανές στην μαστογραφία. Μικροσκοπικά, στο κλασσικό ILC, τα κύτταρα είναι μικρά με στρογγυλό πυρήνα και λίγες μιτώσεις, παρόμοια με εκείνα του LCIS, σχηματίζοντας αλύσους (“Indian file pattern”). Λιγότερο συχνά παίρνουν την μορφή σφραγιστήρα δακτυλίου (“Signet ring type”) οπότε είναι πιο επιθετικό και έχει χειρότερη πρόγνωση [46]. Το κλασσικό ILC έχει συνήθως θετικούς ορμονικούς υποδοχείς και είναι HER2/neu-αρνητικό [47]. Δίνει συχνότερα μεταστάσεις στις εγκεφαλικές μήνιγγες, στο περιτόναιο και τα αναπαραγωγικά όργανα από ότι το IDC. Μεταστάσεις στους πνεύμονες, το ήπαρ και τον εγκέφαλο είναι λιγότερο συχνές [48].

Νόσος του Paget της θηλής

Αποτελεί συνήθως το 1 % των καρκινωμάτων του μαστού. Κλινικά, η νόσος του Paget παρουσιάζεται ως ερυθρηματώδες έκζεμα του συμπλέγματος θηλής και θηλαίας άλω. Μπορεί να συνοδεύεται από κνησμό και ρύση θηλής. Η βιοψία δέρματος δείχνει καρκινικά κύτταρα. Σε 95% των περιπτώσεων της νόσου του Paget υπάρχει υποκείμενη μάζα που είναι είτε διηθητικό πυρογενές καρκίνωμα ή φαγεσωρικό DCIS. Πολύ σπανιότερα μπορεί να βρεθεί και ανεξάρτητο διηθητικό νεόπλασμα μέσα στο μαζικό αδένα. Μαστογραφικά μπορεί να παρατηρηθεί εισολκή θηλής ή οίδημα θηλαίας άλω ή και παρουσία υποθηλαίας αστεροειδούς βλάβης ή ανάδειξη καρκινώματος σε άλλη κεντρική θέση του μαστού.

Οριστική διάγνωση τίθεται με βιοψία της θηλής. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις είναι απαραίτητες για να γίνει διάκριση της νόσου του Paget από μελάνωμα [49, 50] Αντιμετωπίζεται η με κεντρική εκτομή, αν ο όγκος περιορίζεται εκεί, ή και μαστεκτομή. Έχει παρόμοια πρόγνωση με το διηθητικό πορογενές.

Φλεγμονώδες καρκίνωμα του μαστού

Ο όρος αυτός χρησιμοποιείται για όγκους που παρουσιάζονται με τη μορφή οξείας φλεγμονής, λόγω της εκτεταμένης διήθησης των δερματικών λεμφαγγείων από καρκινικά κύτταρα. Συνήθως υπάρχει μία υποκείμενη διάχυτη διηθητική μάζα η οποία λόγω του εκτεταμένου οιδήματος είναι δύσκολο να ψηλαφηθεί. Η διάγνωση τίθεται με βιοψία δέρματος ή με βιοψία του υποκείμενου όγκου. Αποτελεί το 1-2% καρκινωμάτων του μαστού.

Μαστογραφικά παρατηρείται πάχυνση δέρματος και αυξημένη πυκνότητα του μαζικού παρεγχύματος.

Έχει πολύ κακή πρόγνωση με συνήθως σύγχρονη διήθηση επιχώριων λεμφαδένων και εμφάνιση γενικευμένης μεταστατικής νόσου. Για την αντιμετώπιση του χρειάζεται προεγχειρητική χημειοθεραπεία η οποία ακολουθείται από χειρουργική επέμβαση και ακτινοθεραπεία ανάλογα με την ανταπόκριση.

Σωληνώδες διηθητικό καρκίνωμα

Το σωληνώδες διηθητικό καρκίνωμα έχει συχνότητα 1%-4% και διαγιγνώσκεται με συχνότητα 7,7% -27% στο μαστογραφικό έλεγχο πληθυσμών [51, 52]. Μπορεί να διαγνωστεί κλινικά ως μικρή μάζα (συνήθως <1 cm) ή σε μαστογραφία ως μαζική βλάβη ή σπανιότερα ως μικροαποτιτανώσεις [53]. Τα σωληνώδη καρκινώματα παρατηρούνται συχνότερα σε μεγαλύτερης ηλικίας, μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Απαραίτητο χαρακτηριστικό για την διάγνωση του είναι μικροσκοπικά η παρουσία σωληνοειδών δομών με επένδυση από μία μόνο στοιβάδα επιθηλιακών κυττάρων με πυρήνες χαμηλού βαθμού ατυπίας στο 90% της έκτασης του. Το στρώμα του συνήθως χαρακτηρίζεται από δεσμοπλαστική αντίδραση και φέρει μία περιοχή κεντρικής ίνωσης από όπου ξεκινούν ακτινωτά οι σωληνώδεις σχηματισμοί. Χαμηλού βαθμού DCIS μπορεί επίσης να παρατηρηθεί. Αν υπάρχουν σωληνώδεις σχηματισμοί αλλά εκτείνονται σε λιγότερο από το 90% τότε διαγιγνώσκεται ως NST με σωληνώδη χαρακτηριστικά. Το σωληνώδες

καρκίνωμα είναι συνήθως ER θετικό και Her2/neu-αρνητικό [54]. Η διάγνωση του είναι σημαντική αφού σχετίζεται με καλή πρόγνωση. Η επιβίωση ελεύθερη νόσου αλλά και η συνολική επιβίωση είναι μεγαλύτερη, ακόμη και όταν υπάρχουν μεταστάσεις στους μασχαλιαίους λεμφαδένες [55].

Ηθμοειδές καρκίνωμα

Το ηθμοειδές διηθητικό καρκίνωμα έχει επίσης πολύ καλή πρόγνωση. Μπορεί να συνδυάζεται με το σωληνώδες. Δυστυχώς πολλές φορές μπορεί να μην είναι εμφανές στη μαστογραφία [56]. Μικροσκοπικά, ο όγκος έχει ηθμοειδή αρχιτεκτονική, και τυπικά τα κύτταρα έχουν χαμηλή πυρηνική ατυπία. Οι Page *et al.*[57], έδειξαν ότι το ηθμοειδές διηθητικό αποτελεί έναν όγκο που αποτελείται εξ ολοκλήρου από ηθμοειδή αρχιτεκτονική ή τουλάχιστον 50% ηθμοειδή και 50% σωληνώδες διηθητικό. Η διαφορική διάγνωση του από το ηθμοειδές DCIS μπορεί να είναι δύσκολη. Στο διηθητικό καρκίνωμα υπάρχει σχεδόν πάντα μια δεσμοπλαστική αντίδραση, ενώ τα κύτταρα αναπτύσσονται τυχαία και δεν είναι διατεταγμένα σε ένα λοβιακό ή πορογενές μοτίβο. Λεμφαγγειακή διήθηση σπανίως παρατηρείται στο διηθητικό ηθμοειδές όπως και παρουσία μασχαλιαίων μεταστάσεων. Η παρουσία ενός ή δύο θετικών μασχαλιαίων λεμφαδένων πρώτου επιπέδου έχει αναφερθεί να μην επηρεάζει τη συνολική επιβίωση [58]. Η συνολική επιβίωση για το ηθμοειδές καρκίνωμα έχει αναφερθεί να είναι 100% σε 5 χρόνια και 91% σε 10 χρόνια [58, 59].

Βλεννώδες καρκίνωμα

Το βλεννώδες καρκίνωμα χαρακτηρίζεται από εξωκυττάρια βλέννη και έχει εξαιρετική πρόγνωση με χαμηλά ποσοστά υποτροπής και αυξημένη επιβίωση ειδικά όταν οι λεμφαδένες είναι αρνητικοί [60, 61]. Εμφανίζεται συνήθως σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας (έβδομη δεκαετία). Μαστογραφικά παρουσιάζεται ως μία καλά περιγεγραμμένη μάζα [62]. Κλινικά εκδηλώνεται ως μία καλά περιγεγραμμένη μάζα. Μικροσκοπικά αποτελείται από εξωκυττάρια συλλογές βλέννης με μικρές αρθροίσεις κυττάρων χαμηλής πυρηνικής ατυπίας. Για να τεθεί η διάγνωση του πρέπει η μορφολογία αυτή να καταλαμβάνει το 90% έως 100% της έκτασης του όγκου. DCIS παρατηρείται συχνά με το βλεννώδες καρκίνωμα. Τα κύτταρα του βλεννώδους καρκινώματος είναι τυπικά θετικά για ορμονικούς υποδοχείς και αρνητικά για Her2/neu [54].

Μυελοειδές καρκίνωμα

Εμφανίζεται συχνότερα σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και αποτελεί το 4% περίπου των καρκίνων του μαστού. Είναι περισσότερο κοινό σε γυναίκες με μεταλλάξεις BRCA1 και αυτό μπορεί εν μέρει να εξηγήσει την εκδήλωση του σε χαμηλότερο μέσο όρο ηλικίας [63]. Στη μαστογραφία εμφανίζεται συνήθως ως μία καλή οριοθετημένη μάζα δίνοντας την εντύπωση καλοήθειας. Ιστολογικά η περιφέρεια τους είναι διηθητική αλλά ομαλή με λίγες προσεκβολές. Τα κύτταρα είναι ευμεγέθη, με πυρηνική ατυπία και πολλές μιτώσεις και σχηματίζουν αρθροίσεις που διαχωρίζονται με συνδετικό ιστό εντός του οποίου παρατηρείται φλεγμονώδης διήθηση από λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα. Ο όγκος πιέζει το γύρω παρέγχυμα του μαστού, αντί να εισβάλλει σ' αυτό. Είναι συνήθως αρνητικό για ορμονικούς υποδοχείς και η υπερέκφραση του HER2/neu είναι συχνή [64,65].

Μασχαλιαίες μεταστάσεις είναι λιγότερο συχνές από ό, τι στο πορογενές διηθητικό καρκίνωμα [64]. Έχει γενικά καλή πρόγνωση.

Θηλώδες καρκίνωμα

Σπάνιο διηθητικό καρκίνωμα του μαστού, που παρουσιάζεται συνήθως σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ως οζώδης μάζα [66]. Τα θηλώδη καρκινώματα έχουν συνήθως θετικούς ορμονικούς υποδοχείς και έχουν αναφερθεί να έχουν καλή πρόγνωση και σπάνια μεθίστανται στους επιχώριους λεμφαδένες [60, 66].

Μεταπλαστικό καρκίνωμα

Πολύ σπάνιο διηθητικό καρκίνωμα του μαστού που αντιπροσωπεύει μια ετερογενή ομάδα νεοπλασιών στην οποία τα κύτταρα του πόρου έχουν μετατραπεί σε άλλα επιθηλιακά ή μεσεγχυματικά στοιχεία. Η πιο κοινή μεταπλασία είναι σε πλακώδη κύτταρα. Έχει συνήθως αρνητικούς ορμονικούς υποδοχείς και η πρόγνωση του είναι παρόμοια με εκείνη του διηθητικού πορογενούς [67].

Αδενοκυστικό καρκίνωμα

Η ιστολογία είναι ταυτόσημη με εκείνη του όγκου που παρατηρείται συχνά στους σιελογόνους αδένες, στο μαστό όμως έχει μια καλή πρόγνωση σε αντίθεση με τη βιολογική συμπεριφορά του στους σιελογόνους αδένες [68].

Άλλες σπάνιες μορφές καρκινωμάτων

Μυοεπιθηλιακά Αποκρινή

Λιποεκκριτικά

Βλεννο-επιδερμοειδή

Καρκινοειδή

Άλλες σπάνιες κατηγορίες καρκινωμάτων του μαστού**Μικτά καρκινώματα:**

Τμήμα του καρκινώματος αποτελείται από πορογενές διηθητικό και τμήμα από λοβιακό διηθητικό.

Μη ταξινομούμενα καρκινώματα:

Αποτελούν συνήθως το 3 % των διηθητικών καρκινωμάτων

Μεσεγχυματικοί διηθητικοί όγκοι (σαρκώματα) του μαστού ~ 5%:

Πρόκειται για όγκους που προέρχονται από το στρώμα ή λίπος του μαστού και πιο συγκεκριμένα από το ενδοθήλιο των αγγείων και λεμφαγγείων του μαστού. Συνήθως μεθίστανται αιματογενώς και σπανιότατα στους επιχώριους λεμφαδένες. Η κλασσική αντιμετώπιση τους είναι η απλή μαστεκτομή. Λεμφαδενικός καθαρισμός δεν είναι απαραίτητος εκτός από το λιποσάρκωμα που διηθεί τους σύστοιχους λεμφαδένες σε ποσοστό 10%. Η επικουρική χημειοθεραπεία δεν φαίνεται να έχει κάποιο ρόλο όπως και η ακτινοθεραπεία. Γενικά έχουν πολύ κακή πρόγνωση.

6. Μορφολογική ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί μια ετερογενή ομάδα ασθενειών με βάση τα φαινοτυπικά και γενετικά τους χαρακτηριστικά. Με τη βοήθεια των μεθόδων ανοσοϊστοχημείας και FISH (φθορίζων *in situ* υβριδισμός) γίνεται ο προσδιορισμός προγνωστικών παραγόντων και δεικτών, απαραίτητων για την μορφολογική ταξινόμηση και την ειδική θεραπευτική αντιμετώπιση των όγκων. Κυριότεροι δείκτες είναι:

1. Ορμονικοί υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης (Estrogen Receptors, ER, και Progesterone Receptors, PgR)

Estrogen receptors, ER

Οι περισσότεροι ανθρώπινοι καρκίνοι του μαστού είναι αρχικά ER θετικοί, και η ανάπτυξή τους μπορεί να διεγερθεί από οιστρογόνα και να ανασταλεί από αντιοιστρογόνα. Οι οιστρογονικοί υποδοχείς ανευρίσκονται στα επιθηλιακά κύτταρα αυλικού τύπου (luminal epithelial cells) εντοπισμένα στα λοβία του μαζικού αδένου.

Υπάρχουν δύο ισομορφές οιστρογονικών υποδοχέων: οι ERα και ERβ. Ο ERα υποδοχέας έχει μελετηθεί εκτενώς ενώ ο ERβ έχει παρόμοια δομή και λειτουργία με τον ERα, αλλά η σημασία του για τον καρκίνο του μαστού δεν είναι ακόμη γνωστή [69].

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο ERβ μπορεί να διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο ενάντια στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού αφού τα επίπεδα mRNA του ERβ υποδοχέα φαίνεται να μειώνονται στο διηθητικό καρκίνωμα σε σχέση με το φυσιολογικό μαζικό αδένου και μάλιστα σε πολλούς όγκους του μαζικού αδένου χάνεται η έκφραση του ERβ υποδοχέα, πιθανόν μέσω του μηχανισμού μεθυλίωσης του υποδοχέα του γονιδίου [70].

Ο ERα έχει την τυπική δομή στεροειδούς υποδοχέα. Αποτελείται από έξι λειτουργικές περιοχές (domains) εκ των οποίων μία είναι εξειδικευμένη για την πρόσδεση με το συνδέτη (ligand-binding domain) και η οποία συμπεριλαμβάνει την περιοχή AF-2 (activation function-2 domain) [69]. Ο συνδέτης, 17-β οιστραδιόλη, εισέρχεται στο κύτταρο διαμέσου της μεμβράνης και συνδέεται στην ειδική περιοχή σύνδεσης του οιστρογονικού υποδοχέα. Η σύνδεση αυτή οδηγεί στο διμερισμό των ER και τη σύνδεση τους σε ειδικές αλληλουχίες του DNA, τα ειδικά στοιχεία ανταπόκρισης στα οιστρογόνα (SERE, specific estrogen response elements) που εντοπίζονται στον υποκινητή διαφόρων γονιδίων, των οποίων η έκφραση ελέγχεται από τα οιστρογόνα μέσω των ER υποδοχέων. Τα οιστρογόνα ρυθμίζουν

την ανάπτυξη, διαφοροποίηση και λειτουργία των οργάνων του γυναικείου και ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος αλλά και άλλων ιστών του ανθρώπινου σώματος [71, 72]. Γενικότερα η οιστραδιόλη επάγει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, συμπεριλαμβανομένων της κυκλίνης A, της κυκλίνης D1 και της survivin, και μειώνει την έκφραση (downregulates) γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση όπως οι κασπάσες 2 και 9 ενώ μία άλλη περιοχή του ERα υποδοχέα, η AF1, ρυθμίζεται από αυξητικούς παράγοντες που χρησιμοποιούν μονοπάτια σηματοδότησης των MAP κινασών (mitogen activated protein kinase) [73, 74]. Μέχρι πρότινος το μοντέλο ενεργοποίησης και αναστολής των στεροειδών υποδοχέων ήταν σχετικά απλό. Ο συνδετής συνδέεται στον υποδοχέα προκαλώντας διαμορφωτικές μεταβολές, ο οποίος στη συνέχεια συνδέεται ως διμερές στα γονίδια στόχους και επάγει την έκφρασή τους. Πρόσφατα, έχει ταυτοποιηθεί ένας αυξανόμενος αριθμός συν-ρυθμιστικών παραγόντων που δεσμεύονται με ERα προκαλώντας διέγερση ή αναστολή της ενεργοποίησης των γονιδίων-στόχων [75]. Η αντικαρκινική επίδραση της ταμοξιφένης έχει άμεση σχέση με τα επίπεδα του ERα στους όγκους του μαστού. Μετά από παρατεταμένη θεραπεία με ταμοξιφένη οι όγκοι μπορεί να γίνονται ανθεκτικοί. Διάφοροι μηχανισμοί που προκαλούν γενετικές και επιγενετικές αλλαγές στο γονίδιο του ER βρίσκονται υπό διερεύνηση. Ένα παράδειγμα είναι η μεθυλίωση των περιοχών προαγωγού του γονιδίου του ER, πράγμα που οδηγεί σε αναστολή της μεταγραφής του και θα μπορούσε να εξηγήσει την αποσιώπηση της έκφρασης του ER και την απώλεια του ER στον καρκίνο του μαστού [76,77].

Progesterone receptors, PgR

Οι προγεστερονικοί υποδοχείς (PgR) έχουν επίσης σημαντικό ρόλο για την ανάπτυξη του μαστικού αδένα. Η ενεργοποίηση των PgR είναι πανομοιότυπη με αυτή των ER υποδοχέων και προκαλεί ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων, όπως της κυκλίνης D1, των εξαρτώμενων από κυκλίνες κινασών, των c-fos και c-myc [78]. Η σύνθεση του ρυθμίζεται από τα οιστρογόνα και η παρουσία του στον καρκίνο του μαστού υποδηλώνει μία ισχυρή οιστρογονική επίδραση.

2. HER2 υποδοχέας

Γνωστός επίσης και ως CD340 ή HER2/neu, κωδικοποιείται από το γονίδιο erbB2 που βρίσκεται στο μακρό άκρο του χρωμοσώματος 17 (17q12). Ο HER2 ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων τυροσίνης κινάσης μαζί με τους HER1 (που είναι γνωστός ως υποδοχέας

του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, (epidermal growth factor receptor, EGFR), HER3 και HER4. Και οι τέσσερις περιέχουν μία εξωκυττάρια περιοχή δέσμησης συνδέτη, μια διαμεμβρανική περιοχή και μία ενδοκυττάρια περιοχή. Κατά την πρόσδεσή τους με το συνδέτη οι HER1, HER3 ή HER4 ομοδιμερίζονται ή ετεροδιμερίζονται μεταξύ τους είτε με τον HER2 οδηγώντας στη φωσφορυλίωση μιας τυροσίνης μέσα στην κυτοπλασματική περιοχή του υποδοχέα που με τη σειρά της οδηγεί στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών όπως για παράδειγμα αυτού των MAPK κινασών και εμφανίζουν δραστηριότητα τόσο εξαρτώμενη όσο και ανεξάρτητη από τον συνδετήρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι για το HER2 δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί συνδέτες αλλά μπορεί να ετεροδιμεριστεί με οποιοδήποτε από τα άλλους τρεις υποδοχείς και θεωρείται ότι προτιμάται από τους άλλους υποδοχείς ErbB [79-81].

Έχει καταδειχθεί ότι η ενίσχυση ή υπερ-έκφραση αυτού του ογκογονιδίου παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη ορισμένων επιθετικών μορφών καρκίνου όπως μαστού, ωοθηκών και ενδομητρίου. Η ενίσχυση του HER2 γονιδίου οδηγεί στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K μέσω του οποίου τα καρκινικά κύτταρα αποφεύγουν την απόπτωση, ενώ η ενεργοποίηση των HER2 υποδοχέων οδηγεί στην έκκριση μεταλλοπρωτεϊνών του στρώματος (matrix metalloproteinases), οι οποίες προωθούν την κυτταρική διήθηση και μετάσταση [8284]. Στο μαστό υπερεκφράζεται στο 30% περίπου των ασθενών, γεγονός που τον έχει καταστήσει ένα σημαντικό βιοδείκτη και στόχο θεραπείας.

Η μορφολογική ταξινόμηση γίνεται με τη βοήθεια των μεθόδων ανοσοϊστοχημείας και FISH/D-DISH (φθορίζων *in situ* υβριδισμός) με σκοπό τον προσδιορισμό προγνωστικών παραγόντων και την ειδική θεραπευτική αντιμετώπιση των όγκων και αποτελείται από τους:

- 1) ER θετικούς όγκους (60-70% των καρκίνων του μαστού) που συνήθως εκφράζουν και τον υποδοχέα προγεστερόνης (PR), ένα άλλο μοριακό δείκτη του καρκίνου του μαστού, και συνήθως ανταποκρίνονται σε ER-στοχευμένη θεραπεία, όπως με εκλεκτικούς ρυθμιστές ER (π.χ. ταμοξιφένη) ή αναστολείς αρωματάσης.
- 2) HER2/neu θετικούς όγκους (15-20% των καρκίνων του μαστού) που μπορεί να είναι ER θετικοί ή αρνητικοί. Αντιμετωπίζονται επίσης με στοχευμένη θεραπεία (trastuzumab, pertuzumab).

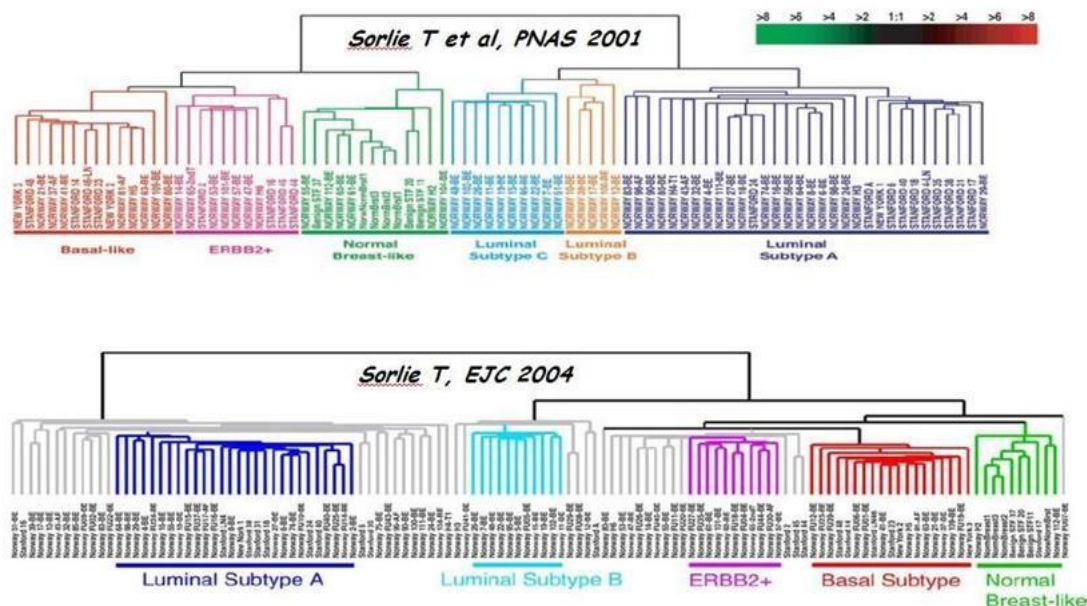
3) Τριπλά αρνητικοί όγκοι (triple negative breast cancer TNBC) (10-15% όλων των καρκίνων του μαστού) που είναι HER2/neu και ER αρνητικοί.

Για να θεωρηθεί ένας όγκος ER (-) και PR(-) πρέπει τα καρκινικά κύτταρα να εκφράζουν τους ορμονικούς υποδοχείς σε ποσοστό $<1\%$ και όχι $<10\%$ όπως εθεωρείτο παλαιότερα [85].

7. Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού

Με τη συμβολή καινοτόμων μοριακών τεχνικών, όπως αυτής των μικροσυστοιχιών έκφρασης (expression microarrays), έγινε μια ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού με βάση το μοριακό προφίλ γονιδιακής έκφρασης. Έτσι, σύμφωνα με τις πρώτες έρευνες των Perou *et al.* [86] και Sorlie *et al.* [87], ο καρκίνος του μαστού ταξινομήθηκε σε πέντε διαφορετικές οντότητες, με ξεχωριστό μοριακό προφίλ που εμφανίζουν διαφορετική πληθυσμιακή κατανομή (εικόνα 3):

- 1) Luminal A: αφορά ER-θετικούς όγκους με χαμηλό δείκτη πολλαπλασιασμού, Ki67.
- 2) Luminal B: αφορά ER-θετικούς όγκους με υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού, Ki67.
- 3) HER2/neu: αφορά θετικούς όγκους.
- 4) Basal-like: στην πλειονότητα τους είναι TNBC αλλά όχι αποκλειστικά.
- 5) Normal-like: το καρκινικό κύτταρο είναι πολύ παρόμοιο με το φυσιολογικό επιθηλιακό κύτταρο



Εικόνα 3. Ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού με βάση το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης [87].

Στη συνέχεια οι Prat *et al.* [88] έδειξαν την ύπαρξη άλλου ένα υποτύπου:

- 6) Claudin-low: στην πλειονότητα τους είναι TNBC αλλά όχι αποκλειστικά. Τα κύτταρα εδώ είναι εμπλουτισμένα με χαρακτηριστικά μεσεγχυματικών και βλαστικών κυττάρων.

8. Τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού

TNBC συνδέεται με μια υψηλότερη θνησιμότητα από τους άλλους υποτύπους του καρκίνου του μαστού λόγω της επιθετικής κλινικής συμπεριφοράς του, της κακής πρόγνωσης και της έλλειψης στοχευμένων θεραπειών [89].

8.1 Επιδημιολογία

TNBCs αντιπροσωπεύουν το 10-20% όλων των καρκίνων του μαστού. Οι παραδοσιακοί παράγοντες κινδύνου για τον καρκίνο του μαστού έχουν διαφορετικό αντίκτυπο στους TNBCs σε σύγκριση με τους luminal A και B.

1. BRCA1

Η παρουσία των μεταλλάξεων BRCA1 βλαστικής γραμμής είναι ένας από τους πιο ισχυρούς παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη του TNBC, αυξάνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού κατά τη διάρκεια της ζωής των φορέων του έως και 85%, με το 90% αυτών να είναι TNBC [90]. 24% των Εβραίων Ashkenazi που διαγιγνώσκονται σε ηλικία νεότερη των 65 φέρουν BRCA1 μετάλλαξη [91]. Οι Young *et al.* εξέτασαν την έκφραση των παθογενετικών μεταλλάξεων BRCA1 & BRCA2 σε 54 TNBC χωρίς οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού και βρήκαν έκφραση του BRCA1 σε ποσοστό 11% και του BRCA2 1.8%. Κατά συνέπεια, ο γενετικός έλεγχος για BRCA1 πρέπει να εξετάζεται για τις γυναίκες με πρώιμη έναρξη TNBC, ακόμη και εν απουσία του θετικού οικογενειακού ιστορικού, σε αντίθεση με το BRCA2 που σπανίως σχετίζεται με TNBC.

2. ΗΛΙΚΙΑ

Οι TNBCs είναι πιο διαδεδομένοι σε νεότερες προεμμηνοπαυσιακές ασθενείς ηλικίας κάτω των 50 ετών, αυξάνοντας τις πιθανότητες υποτροπής της νόσου [92-94]. Σε μια μελέτη 1601 όγκων, 180 ήταν TNBCs. Η μέση ηλικία των ασθενών κατά τη διάγνωση ήταν μικρότερη κατά 5 έτη από εκείνη των ασθενών με μη-TNBC. Στη μελέτη του μαστού CAROLINA οι ασθενείς BLBC είχαν περισσότερες πιθανότητες να είναι κάτω των 40 ετών. Με βάση το Αρχείο Καρκίνου της Καλιφόρνια, οι Bauer *et al.* ανέφεραν ότι από 6370 ασθενείς TNBC που διαγνώστηκαν μεταξύ 1999 και 2003, 778 ήταν κάτω των 40

ετών, 1553 ήταν ηλικίας 40-49, και 1690 50 έως 59 ετών (63% ήταν κάτω των 60 ετών) [93]. Μια μελέτη από Ihemelandu *et al.* 372 Αφροαμερικανίδων ασθενών έδειξε ότι στο 57% των γυναικών ηλικίας κάτω των 35 ετών αναπτύχθηκε BLBC [95]. Συνολικά ωστόσο, τα περισσότερα TNBCs ανιχνεύονται σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ηλικίας >59 ετών [96, 97].

3. ΦΥΛΗ ΚΑΙ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ

Οι TNBCs είναι πιο συχνοί σε Αφροαμερικανίδες γυναίκες όπου εκπροσωπούν 2147% σε σύγκριση με 11%-21% στο γενικό πληθυσμό [93, 95, 98]. Ορισμένες μελέτες δείχνουν επίσης μια υψηλότερη συχνότητα μεταξύ των ισπανόφωνων γυναικών. Σύμφωνα με τον Bauer *et al.*, TNBC παρατηρείται στο 17% των ισπανόφωνων γυναικών σε σύγκριση με 11% στις μη-ισπανόφωνες λευκές γυναίκες [93]. Μια άλλη μελέτη 2074 ισπανόφωνων ασθενών με καρκίνο του μαστού, η συχνότητα εμφάνισης των TNBC ήταν 23% [99]. Σε αντίθεση, μια μικρότερη μελέτη 415 ασθενών με καρκίνο του μαστού έδειξε παρόμοια συχνότητα εμφάνισης ανάμεσα σε ισπανόφωνες και μη-ισπανόφωνες γυναίκες [100]. Στον ιαπωνικό πληθυσμό μόνο 7% των διαγνωσμένων καρκίνων του μαστού είναι TNBC και τούτο σχετίζεται με 5ετή συνολική επιβίωση 86.2% [101]. Οι κινέζοι αναφέρουν μεγαλύτερο ποσοστό TNBC, 19%, και οι Κορεάτες 14.7% [102, 103]. Παραμένει αβέβαιο κατά πόσο αυτές οι φυλετικές και εθνικές διαφορές σχετίζονται με γενετικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες, ή και τα δύο.

4. ΑΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Αυξημένη τεκνοποίηση, νεαρή ηλικία στην πρώτη ολοκληρωμένη κύηση, απουσία ιστορικού θηλασμού, καταστολή γαλουχίας με φαρμακευτική αγωγή και πρόωμη έναρξη της εμμηναρχής θεωρούνται παράγοντες κινδύνου για TNBC [104]. Σε μια μελέτη 2473 ασθενών με καρκίνο του μαστού από τους Shinde *et al.* βρέθηκε ότι ο TNBC σχετιζόταν με μικρότερη διάρκεια του θηλασμού [105]. Οι Dolle *et al.* ανέφεραν ότι η χρήση αντισυλληπτικών χαπιών για >1 έτους συσχετίστηκε με 4,5 φορές αυξημένο κίνδυνο TNBC σε γυναίκες κάτω των 40 ετών, ενώ δεν υπήρχε αυξημένος κίνδυνος για τους ασθενείς μη-TNBC [106].

Οι καρκίνοι TNBC και BLBC είναι πιο συχνοί σε γυναίκες με κοιλιακή παχυσαρκία [107]. Σε μια αναδρομική μελέτη 418 ασθενών TNBC από Ademuyiwa *et al.*, 31% των ασθενών ήταν υπέρβαροι και το 39% παχύσαρκοι [108]. Σε μια άλλη μελέτη από τη Δυτική Βιρτζίνια το 49% των 117 ασθενών TNBC ήταν υπέρβαροι [109].

Το χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο έχει επίσης συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο TNBC [110]. Μια μελέτη στην πόλη Ατλάντα εδειξε σχεδόν 2 φορές πιο αυξημένο κίνδυνο TNBC μεταξύ των γυναικών που ζουν κάτω από το όριο της φτώχειας [98].

8.2 Κλινικά χαρακτηριστικά

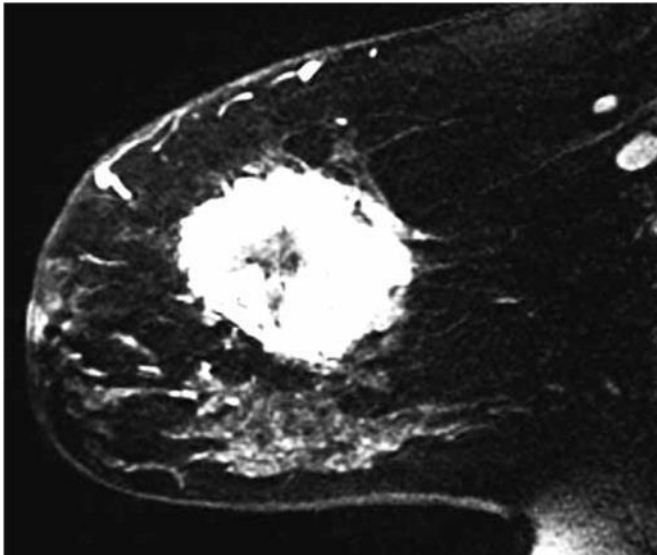
Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω μεγάλο ποσοστό των TNBCs συμβαίνουν σε νεότερες γυναίκες, ειδικότερα στις Αφροαμερικανίδες, καθώς επίσης και σε γυναίκες με χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο [111]. Τα καρκινώματα του μαστού που διαγιγνώσκονται στις Αφροαμερικανίδες έχουν διπλάσια πιθανότητα να είναι TNBC απ' ό τι τα καρκινώματα που διαγιγνώσκονται στις λευκές γυναίκες. Οι TNBCs φαίνεται να είναι συχνότεροι και στις ισπανόφωνες γυναίκες σε σχέση με τις λευκές [112]. Οι TNBCs είναι πιο επιθετικοί από τους άλλους τύπους, αφού υποτροπιάζουν συχνότερα δίνοντας μεταστάσεις το κεντρικό νευρικό σύστημα και στα σπλάχνα. Σε μία μελέτη 1,601 γυναικών με καρκίνο του μαστού, 180 γυναίκες με TNBC είχαν απομακρυσμένες μεταστάσεις σε ποσοστό 33.9% σε σχέση με 20.4% σε μη-TNBCs [113].

8.3 Απεικόνιση των TNBC

Μαστογραφία

Η διάγνωση του TNBC με μαστογραφία μπορεί να αποδειχθεί δύσκολη λόγω της αυξημένης πυκνότητας του μαστού στις εμμηνοπαυσιακές ηλικίες. Η πιο κοινή παρουσίαση των TNBC στη μαστογραφία είναι με τη μορφή μάζας, μη καλά περιγεγραμμένης χωρίς την παρουσία αποτιτανώσεων (49%-100% των περιπτώσεων). Συχνά μαστογραφικά χαρακτηριστικά των TNBCs περιλαμβάνουν: μάζα υψηλής πυκνότητας (89,3%) με οβάλ (68,9%) ή λοβιακό σχήμα (28,6%) και μη διακριτά (42,9%) ή περιγεγραμμένα όρια (32,1%) [114] (εικόνα 4). Μη τυπικά ακτινολογικά χαρακτηριστικά των TNBCs αποτελούν το ασαφές σχήμα, τα ακτινωτά όρια και οι ύποπτες αποτιτανώσεις [115]. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, παρά το συχνά μεγάλο μέγεθος τους, οι TNBCs μπορεί να μην είναι εμφανή στη μαστογραφία

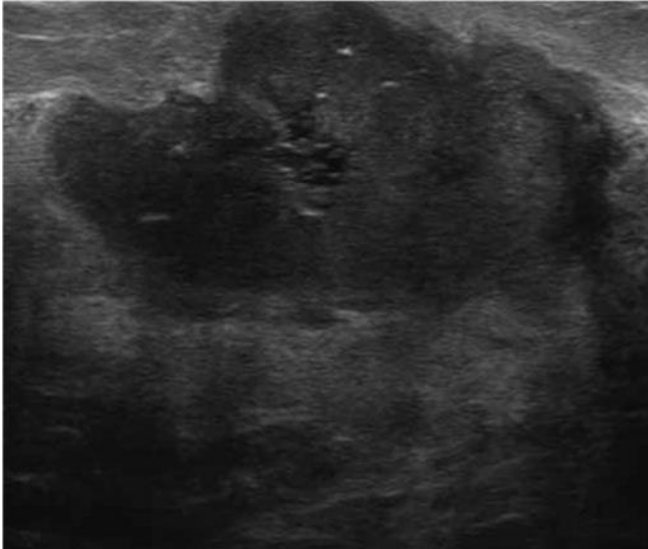
(18% των περιπτώσεων). Σε αυτές τις περιπτώσεις καλό είναι οι ασθενείς να υποβάλλονται σε μαγνητική τομογραφία (MRI). Έχει παρατηρηθεί επίσης μεγαλύτερη συχνότητα ανάπτυξης τους στο μεσοδιάστημα 2 μαστογραφιών υποδηλώνοντας ταχύτερο ρυθμό ανάπτυξης [116].



Εικόνα 4. Μαστογραφική απεικόνιση TNBC [117].

Υπερηχογράφημα μαστών

Το υπερηχογράφημα έχει 92% έως 100% ευαισθησία για την ανίχνευση των TNBCs [115]. Παρουσιάζονται ως διακριτή μάζα καλά περιγεγραμμένη στο 21% έως 27% των περιπτώσεων. Οπίσθια ακουστική ενίσχυση παρατηρείται σε 24% έως 41% των περιπτώσεων και μπορεί να είναι ενδεικτική νέκρωσης, που αποτελεί ένα κοινό χαρακτηριστικό των TNBCs (εικόνα 5). Ωστόσο αυτά τα χαρακτηριστικά (καλά οριοθετημένη βλάβη με οπίσθια ακουστική σκιά) μπορεί να παρατηρηθούν και σε καλοήθεις βλάβες όπως καλοήγη νεοπλάσματα, κύστεις και αποστήματα. Οι TNBCs μπορεί να παρουσιαστούν ως ασαφής βλάβη (68,9%) ή ωοειδής βλάβη (28,9%) με λοβωτό περίγραμμα στο 46,7%, καλά περιγεγραμμένη στο 17,8%, ή μη διακριτή βλάβη στο 17,8% [118].



Εικόνα 5 υπερηχογραφική απεικόνιση των TNBC [117].

MRI

Έχει την υψηλότερη ευαισθησία για TNBC [115]. Γραμμική ενίσχυση στη μαγνητική τομογραφία θεωρείται εξαιρετικά κακό προγνωστικό σημείο κακοήθειας, και αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό του TNBC (παρατηρείται στο 76% των περιπτώσεων[115]). Άλλα χαρακτηριστικά τους στην MRI περιλαμβάνονται η ενίσχυση σήματος με τη μορφή μάζας, περιοχές υψηλής εντός του όγκου έντασης σήματος T2, λοβώδες σχήμα και ομαλά όρια [119]. Παρά την αυξημένη ευαισθησία τόσο του υπερηχογραφήματος όσο και του MRI στην ανίχνευση καρκίνων του μαστού, και οι δύο συνδέονται με ένα υψηλό ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων [120]. Ο συνδυασμός και των μεθόδων, μαστογραφίας, υπερηχογραφήματος και MRI, παρέχει τη μεγαλύτερη ευαισθησία για την ανίχνευση των καρκίνων του μαστού, αλλά η μέθοδος αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων και μειωμένη θετική προγνωστική αξία. Δυστυχώς, πολλοί καρκίνοι δεν ανιχνεύονται νωρίς μέσω απεικόνισης και ο ασθενής παρουσιάζεται είτε με ψηλαφητή μάζα ή με συμπτώματα πόνου στο στήθος ή τη θηλή [121].

8.4 Παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά

Τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του TNBC δεν είναι συγκεκριμένα και μπορεί να παρατηρηθούν και σε άλλους όγκους HR+ υψηλής ποιότητας. Οι τριπλά αρνητικοί όγκοι συχνά περιέχουν μεγάλες περιοχές κεντρικής νέκρωσης και ίνωσης, πράγμα που αποτελεί επίσης ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό μερικών διηθητικών πορογενών καρκινωμάτων υψηλού βαθμού κακοήθειας και κακής πρόγνωσης που συνδέονται με την πρόωρη εμφάνιση

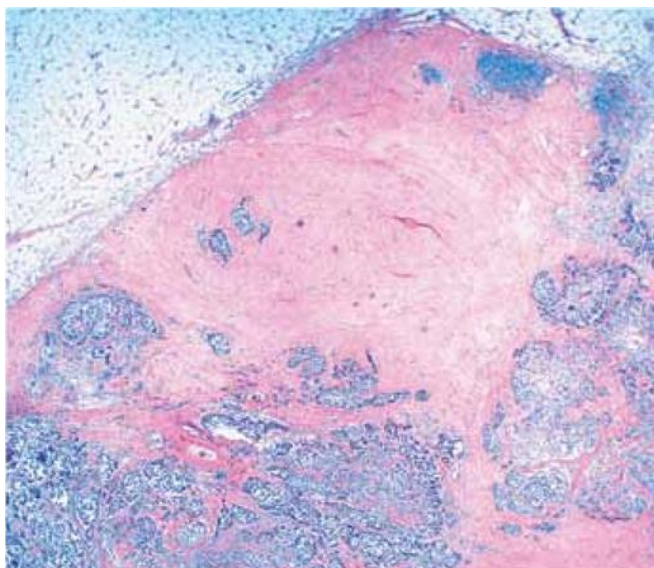
εγκεφαλικών και πνευμονικών μεταστάσεων και, ως εκ τούτου, θεωρείται ένας ανεξάρτητος κακός προγνωστικός παράγοντας [122] [123][26]. Ένας άλλος ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας αποτελεί η λεμφοκυτταρική διήθηση η οποία, σε αντίθεση με την κεντρική ίνωση, συνδέεται με ευνοϊκή πρόγνωση [122]. Σε μια μελέτη 97 ασθενών TNBC, οι Kreike *et al.* έδειξαν ότι όγκοι με μεγάλες ποσότητες λεμφοκυτταρικής διήθησης και απουσία κεντρικής ίνωσης σχετίζονταν με καλύτερη ελεύθερη νόσου επιβίωση [122].

Οι περισσότεροι TNBCs ταξινομούνται ως διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μη ειδικού τύπου [127]. Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, ο TNBC ορίζεται από την έλλειψη της έκφρασης των ER, PR και HER2 στη ανοσοϊστοχημική χρώση ενώ χαρακτηρίζεται από την μεταβλητή έκφραση αρκετών δεικτών (Πίνακας 3).

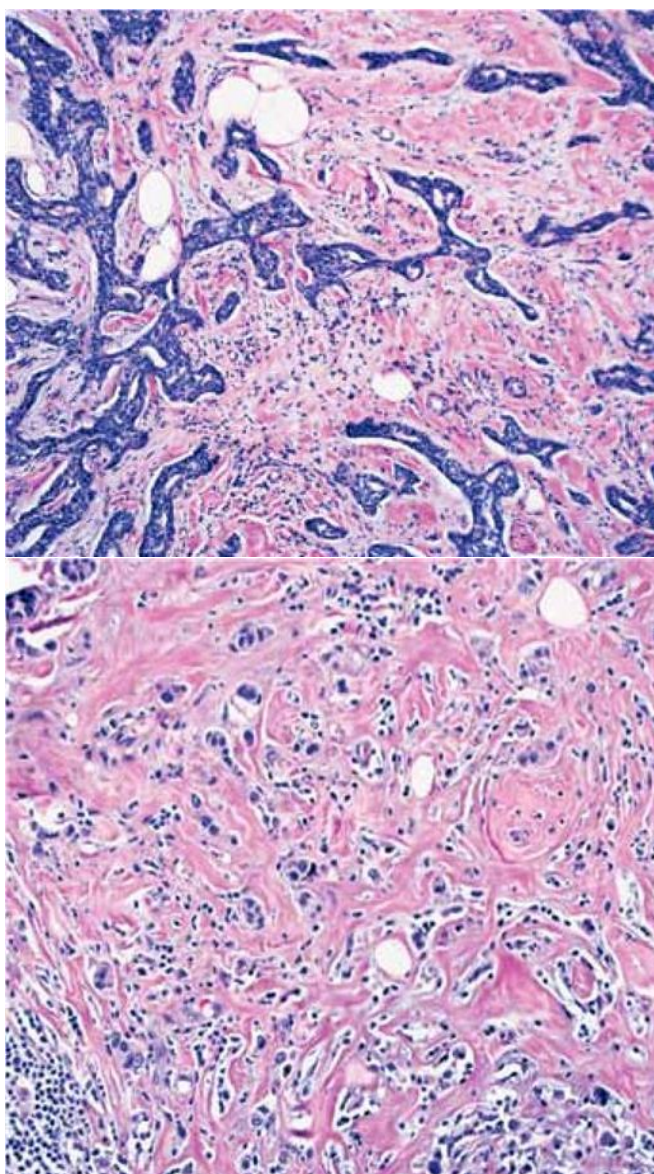
Πίνακας 3: Ανοσοϊστοχημικοί δείκτες που εκφράζονται στους TNBC [128]

ΔΕΙΚΤΕΣ	ΕΚΦΡΑΣΗ
CK 5, CK14, CK17	Στην πλειονότητα των TNBC εκφράζεται μία από αυτές τις κυτταροκερατίνες.
VIMENTIN	55%
P-cadherin	93%
EGFR	27-37%
PDGFR	31%
IGF-IR	36%
c-KIT	11-38%
S-100 protein	22%
p63	10%
Smooth muscle actin	8%
P53	50-56%

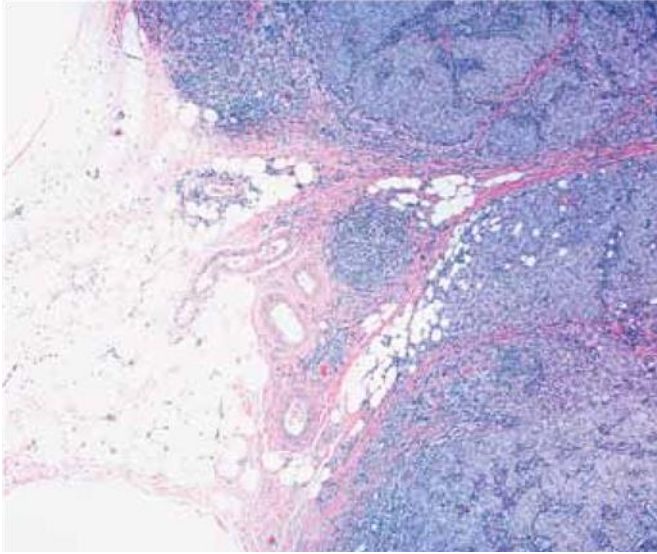
Υπάρχουν όμως και ιστολογικά χαρακτηριστικά που υποδηλώνουν ένα τριπλά αρνητικό ανοσοφαινότυπο. Οι TNBCs συνήθως χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερο μέγεθος, αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα, άτυπες μιτώσεις, υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού (Ki67 =>μόνο το 20% των όγκων TNBC έχουν Ki67 <20% [128] και χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης με κεντρική νέκρωση και πιεστικά όρια [123]. Επίσης συχνά επιδεικνύουν αυξημένη κυτταρική διήθηση του στρώματος. Το μέγεθος των αιμοφόρων αγγείων ποικίλει στον TNBC και πολλές φορές περιλαμβάνει αγγεία με πεπαχυμένα τοιχώματα (Εικόνες 6-9)



Εικόνα 6. TNBC όγκοι με πιεστικά όρια [117].

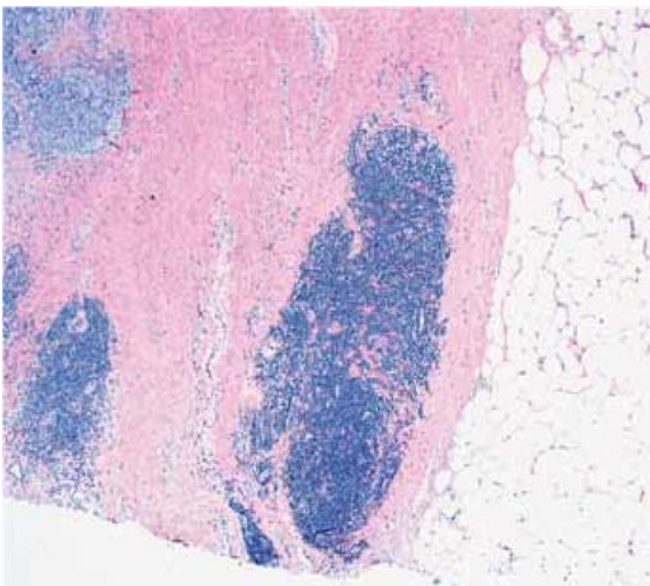


Εικόνες 7-8. Αυξημένη κυτταρική διήθηση του στρώματος [117].

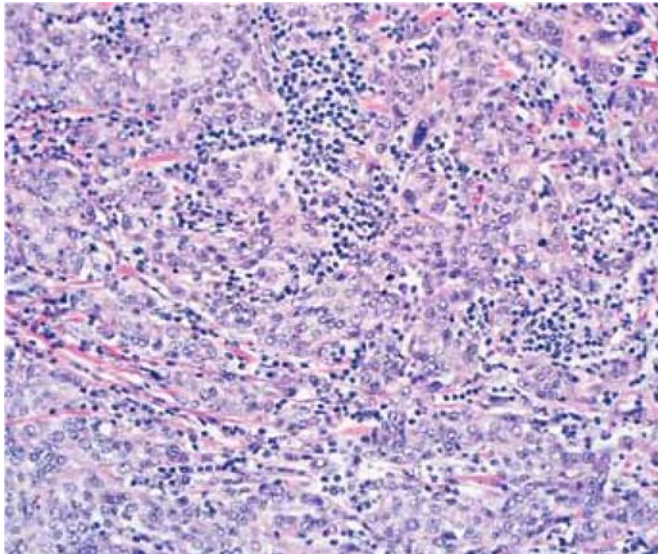


Εικόνα 9. TNBC με νεαγγείωση με αυξημένου πάχους [117].

DCIS παρατηρείται σπάνια στους TNBCs και αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το υψηλό ποσοστό πολλαπλασιασμού που παρατηρείται στους τριπλά αρνητικούς όγκους, οδηγώντας σε ταχεία εξέλιξη του DCIS σε διηθητικό καρκίνο[129]. Μια μελέτη αυστηρώς σε ασιατικό πληθυσμό έδειξε μεγαλύτερη ηλικία ενώ τα όρια των όγκων ήταν πιο διηθητικά παρά πιεστικά, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο τρόπος παρουσίασης, τόσο κλινικά όσο και ιστολογικά, μπορεί να ποικίλει ανάλογα με την φυλή. Άλλα επιπλέον χαρακτηριστικά που παρατηρούνται συνήθως στους TNBCs είναι περιλοβιακή λεμφοκυτταρική διήθηση στον παρακείμενο μαζικό ιστό από τον όγκο ενώ εντός του όγκου μπορεί να υπάρχει έντονη λεμφοκυτταρική φλεγμονώδης διήθηση (εικόνα 10).



Εικόνα 10. Έντονη λεμφοκυτταρική διήθηση παρακείμενα του όγκου [117].



Εικόνα 11. Αυξημένη λεμφοκυτταρική διήθηση εντός του όγκου [117].

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα B και T λεμφοκύτταρα μπορούν να αυξάνουν την επιθετικότητα του όγκου έμμεσα με τη ρύθμιση της δραστηριότητας των μυελοειδών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, των μονοκυττάρων και των μαστοκυττάρων [130]. Τα M1 μακροφάγα διεγείρουν την απόκριση Th1 (Τβοηθητικά κύτταρα του 1) ενώ τα M2 μακροφάγα καταστέλλουν τη δραστηριότητα των Th 1, προωθώντας έτσι την εισβολή και την μετανάστευση των κυττάρων του όγκου, προάγοντας την αγγειογένεση. Γι'αυτό και η πυκνή διήθηση του στρώματος του όγκου από M2 μακροφάγα συσχετίζεται συχνότερα με TNBC/basal –like καρκίνο του μαστού ενώ συνήθως δεν παρατηρείται στα luminal A καρκινώματα του μαστού [131]. Η σχέση μεταξύ αυτού του ευρήματος και του υψηλότερου ποσοστού υποτροπής του TNBC αποτελεί μία περιοχή συνεχιζόμενης έρευνας. Ιστολογική ανομοιογένεια μπορεί να παρατηρηθεί συχνά και εντός του όγκου, γεγονός που καθιστά πιο δύσκολη την θεραπευτική προσέγγιση.

Ειδικοί TNBC ιστολογικοί τύποι:

Οι TNBCs είναι κυρίως διηθητικά πορογενή καρκινώματα μη ειδικού τύπου με δεύτερο σε συχνότητα το διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα. Λιγότεροι συχνοί ιστολογικοί τύποι είναι το μυελοειδές, το μεταπλαστικό και το αδενοκυστικό καρκίνωμα.

1. Μεταπλαστικό

Σπάνιος τύπος που αποτελεί, λιγότερο από το 1% του συνόλου των καρκινωμάτων του μαστού [132]. Ο ανοσοφαινότυπος του είναι πιο συχνά τριπλά αρνητικός ενώ γονιδιακά είναι συνήθως basal-like [132]. Ιστολογικά μπορεί να αποτελείται μόνο από επιθηλιακά κύτταρα ή να είναι μικτός και να αποτελείται από επιθηλιακά και μεσεγχυματικά κύτταρα. Εκφράζει συχνά τον EGFR και έχει φτωχή πρόγνωση [132]. Σε μεταπλαστικά καρκινώματα με θετικούς λεμφαδένες που υποβλήθηκαν σε επικουρική χημειοθεραπεία, η 3ετης επιβίωση ανερχόταν μόλις στο 44,4% σε σχέση με 72,5% που είναι για τον τριπλά-αρνητικό πορογενές διηθητικό καρκίνο [133].

2. Μυελοειδές

Αποτελεί το 3%-5% των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού [134]. Είναι συνήθως καλά περιγεγραμμένος όγκος που χαρακτηρίζεται από ένα έντονο συγκυτιακό πρότυπο ανάπτυξης, υψηλή πυρηνική ατυπία, έντονη μιτωτική δραστηριότητα, διάχυτη λεμφική διήθηση, ενώ τα αδενικά χαρακτηριστικά απουσιάζουν και in situ καρκίνωμα συνήθως δεν παρατηρείται [135]. Ο ανοσοφαινότυπος του είναι πιο συχνά τριπλά αρνητικός ενώ γονιδιακά είναι συνήθως basal-like. Έχουν καλύτερη πρόγνωση από διηθητικά καρκινώματα μαστού μη ειδικού τύπου.

3. Αδενοκυστικό

Τα αδενοκυστικά καρκινώματα είναι σπάνια στο μαστό και αντιπροσωπεύουν περίπου το 2% των πρωτοπαθών καρκινωμάτων του μαστού. Είναι χαρακτηριστικά τριπλά αρνητικά [136]. Οι περισσότεροι από αυτούς τους όγκους αποτελούνται από επιθηλιακά αλλά και μυοεπιθηλιακά κύτταρα και το ποσοστό αναλογίας των 2 κυτταρικών πληθυσμών ποικίλλει από περίπτωση σε περίπτωση. Είναι παρόμοια με τα νεοπλάσματα που συμβαίνουν στους σιελογόνους αδένες αλλά με κάποιες σημαντικές διαφορές [137]. Για παράδειγμα, στο μαστό υπάρχει διάκριση μεταξύ καλοήθους αδενομυοεπιθελιώματος (adenomyoepithelioma) και κακοήθους αδενομυοεπιθελιώματος. Αντίθετα, στους σιελογόνους αδένες η διάκριση μεταξύ καλοήθους και κακοήθους αδενομυοεπιθελιώματος δεν γίνεται και όλες οι βλάβες χαρακτηρίζονται ως αδενομυοεπιθελιώματα..

Το αδενοκυστικό καρκίνωμα όπως αναφέρεται πιο πάνω είναι αρκετά ασυνήθιστο στο μαστό γι' αυτό και δεν έχει ακόμα πλήρως χαρακτηριστεί. Ανοσοϊστοχημικά, εκτός του ότι είναι τριπλά αρνητικός, τα αδενοκυστικά καρκινικά κύτταρα εκφράζουν την p63 ογκοπρωτεΐνη (TP63) και c-kit. Υπερέκφραση του TP53 δεν παρατηρείται. Σε αντίθεση με

την επιθετική κλινική πορεία των TNBCs το αδενοκυστικό καρκίνωμα έχει εξαιρετική πρόγνωση με μια μικρή σειρά ασθενών να αναφέρει μέχρι και 87.5% επιβίωση σε 6.5 χρόνια παρακολούθησης [138]. Η θεραπεία του τις περισσότερες φορές απαιτεί απλή μαστεκτομή.

8.5 Μοριακό προφίλ του TNBC

Πρόσφατες μελέτες έχουν υποδιαιρέσει τους TNBCs σε διάφορους υποτύπους. Οι Lehmann *et al*, μελετώντας την γονιδιακή έκφραση σε 587 TNBCs έδειξαν την ύπαρξη 6 διαφορετικών υποτύπων (The Vanderbilt subtype) που χαρακτηρίζονται από διαφορετική βιολογία και ευαισθησία στους θεραπευτικούς παράγοντες [139] (πίνακας 4).

Πίνακας 4. Μοριακοί υποτύποι των TNBC

The Vanderbilt subtype		
Υποομάδα	Χαρακτηριστικά	Ευαισθησία σε θεραπευτικούς παράγοντες
Βασικού τύπου 1 (Basal-Like 1(BSL1))	Βαριά εμπλουτισμένοι με γονίδια που εμπλέκονται 1) στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό 2) στην απόκριση βλάβης DNA, 3) στην αυξημένη έκφραση του αυξητικού παράγοντα, 4) 4) στα μονοπάτια, γλυκόλυσης, και γλυκογένεσης 5) υψηλότερη έκφραση του TP63 και μεταλλοενδοπεπτιδάσης μεμβρανική πρωτεΐνη σηματοδότησης (MMK)	ευαίσθητα στη cisplatin
Βασικού τύπου 2 (Basal-Like 2(BSL2))		
Μεσεγχυματικός τύπος (Mesenchymal subtype (M)) Μεσεγχυματικός βλαστικού τύπου (Mesenchymal stemlike(MSL))	Εμπλουτισμένα με μονοπάτια που εμπλέκονται στην κυτταρική κινητικότητα, τη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη. Ο MSL εκφράζει επίσης επιπλέον γονίδια όπως τα γονίδια που συνδέονται με σηματοδότηση του αυξητικού παράγοντα EGFR, ενώ έχει χαμηλά επίπεδα έκφρασης γονιδίων κυτταρικού πολλαπλασιασμού και claudins 3,4, και 7	Ευαίσθητα στο dasatinib αναστολέα SRC και η κινάση φωσφοϊνοσιτόλης3 (PI3K)/αναστολέα mTOR NVP-BEZ235.

Ανοσορυθμιστικό τύπο (immunomodulatory type(IM))	Εμπλουτισμένος με 1)γονίδια που εμπλέκονται στην σηματοδότηση κυτοκινών και ανοσοποιητικών κυττάρων, όπως T-βοηθητικά 1, T-βοηθητικά 2, Φυσικό κύτταρο δολοφόνο. 2) Γονίδια που εμπλέκονται στην παρουσίαση αντιγόνων, και στην πυρηνική σηματοδότηση, όπως τον πυρηνικό παράγοντα του.	
Αυλικός Ανδρογονικός τύπος (luminal androgen subtype)LAR	Χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση του ανδρογονικού υποδοχέα (AR) (μέχρι και 10 φορές περισσότερο σε σχέση με τους υπόλοιπους τύπους)	Ευαίσθητα στην βικαλουταμίδη (ένα αντιανδρογόνο) και alvespimycin (αναστολέα Hsp90)

Το 2014, προτάθηκε μια άλλη ταξινόμηση των TNBCs από τους ερευνητές του Baylor University (The Baylor subtype) [140]. Αυτοί περιλαμβάνουν τους ακόλουθους τέσσερις υποτύπους: (1) LAR, (2) μεσεγχυματικό (MES), (3) ανοσοκατασταλτικό βασικό τύπο (BLIS), και (4) άνοσο-ενεργοποιημένο βασικό τύπο (BLIA). Ο BLIS έδειξε τη χειρότερη πρόγνωση ενώ ο BLIA είχε την καλύτερη πρόγνωση. Σύγκριση του Baylor subtype και του Vanderbilt subtype έδειξε ότι ο υπότυπος LAR της ταξινόμησης Baylor ήταν ταυτόσημος με τον υπότυπο LAR της ταξινόμησης Vanderbilt. Επιπλέον, οι περισσότερες περιπτώσεις του υποτύπου MES περιείχε τους υποτύπους MSL και M, σύμφωνα με την ταξινόμηση Vanderbilt. Ωστόσο, υπήρχε ασυμφωνία μεταξύ των υποτύπων BL1, BL2, και IM της ταξινόμησης Vanderbilt με εκείνες του υποτύπου Baylor, με τους BL1 και BL2 υποτύπους να κατανέμονται και στους 2 BLIS και BLIA υποτύπους, ενώ όγκοι με IM ταξινομούσαν ως MES και BLIA. Συμπερασματικά οι ερευνητές Vanderbilt ταξινομήσαν τους TNBCs σε 4 κύριους υποτύπους με διαφορετική πρόγνωση και ευαισθησία σε θεραπευτικούς παράγοντες. (Πίνακας 5).

Ερευνητές από το Unicancer center στη Γαλλία πρότειναν μια άλλη μέθοδο ταξινόμησης των TNBCs. Με την ανάλυση γονιδιακού προφίλ σε 197 τριπλά αρνητικούς καρκίνους ταυτοποίησαν 3 υποτύπους: C1, αυλικό (luminal) AR, 22.4%. C2, βασικό τύπο (basal-like) με χαμηλή ανοσοποιητική απόκριση και υψηλή συγκέντρωση M2 μακροφάγων, 44.9%. C3, βασικό τύπο (basal-like) με υψηλή ανοσοποιητική απόκριση και χαμηλή συγκέντρωση M2

μακροφάγων, 32.7%. Οι C2 και C3 σχετίζονταν με χαμηλότερο βαθμό διαφοροποίησης και υψηλότερο Nottingham prognostic index απ' ό τι ο C1. Η επιβίωση ήταν υψηλότερη στους C3 σε σχέση με τους C1 ή C2 όγκους [141].

Πίνακας 5. Ταξινόμηση υποτύπων TNBC

ΥΠΟΤΥΠΟΣ	ΘΕΡΑΠΕΙΑ
LAR	Στοχευμένη θεραπεία για AR και cell surface mucin (MUC1)
MES	inhibiting growth factor signalling such as platelet-derived growth factor (PDGF) receptor A and c-Kit
BLIS	inhibiting an immunosuppressing molecule such as V-set domain containing T cell activation inhibitor 1 (VTCN1)
BLIA	targeting stat signal transduction molecules and cytokine

Η σύγκριση αυτής της (γαλλικής) ταξινόμησης σε σχέση με τις υπόλοιπες έδειξε, ότι οι C1 όγκοι είναι παρόμοιοι με τον LAR στην Vanderbilt και Baylor ταξινόμηση. Ο C2 τύπος αποτελείτο μόνο από βασικού τύπου όγκους. Το 26% των C3 αποτελείτο από claudin-low αλλά και από βασικού τύπου. Ακόμα οι C3 όγκοι παρουσίαζαν ομοιότητες, με τον IM υποτύπο της Vanderbilt ταξινόμησης ή τον BLIA της Baylor ταξινόμησης όσον αφορά την υψηλή ανοσοποιητική απόκριση και χαμηλή συγκέντρωση M2-like μακροφάγων.

Παρ'όλες τις διαφορετικές μεθοδολογίες αυτές οι μελέτες ουσιαστικά εισηγήθηκαν την ύπαρξη 4 κύριων υποτύπων.

8.6 Ορισμός του TNBC έναντι του BLBC

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, ο basal-like αποτελεί το κύριο μοριακό υποτύπο του TNBC αλλά όχι τον μοναδικό. Αν και οι ιστολογικοί και ανοσοϊστοχημικοί φαινότυποι των TNBCs και BLBCs επικαλύπτονται, οι 2 αυτοί όροι συχνά χρησιμοποιούνται εναλλακτικά από τους

κλινικούς γιατρούς αλλά στην πραγματικότητα δεν είναι συνώνυμοι. Μια ασυμφωνία μέχρι 30% έχει περιγραφεί μεταξύ των δύο ομάδων. Σε μια πρόσφατη δημοσίευση, 15-45% των BLBCs ήταν ER θετικοί και το 14% ήταν HER2 θετικοί [142-145]. Ο TNBC διαγιγνώσκεται όταν δεν υπάρχει ανοσοϊστοχημική έκφραση των ER, PgR και HER2, ενώ ο BLBC υπερεκφράζει γονίδια που χαρακτηρίζουν τη βασική επιθηλιακή στιβάδα κυττάρων του μαστού [143]. Λόγω της πολυπλοκότητας αυτών των μοριακών υπογραφών, τα BLBC ορίζονται ανοσοϊστοχημικά με τη χρήση 5 δεικτών: ER-αρνητικότητα, PgRαρνητικότητα, HER2-αρνητικό, χαμηλό επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGFR) και θετικότητα κυτταροτοκερατίνη-5/6 και κυτταροκερατίνη 17. Αυτή η προσέγγιση έχει ευαισθησία μέχρι και 83% και ειδικότητα έως 100% για την ακριβή ταξινόμηση του υποτύπου BLBC [123, 146, 147]. Οι BLBCs φέρουν συχνά μετάλλαξη του p53 [87].

Μια πρόσφατη μελέτη από Bingazoli *et al.* όπου εξέτασαν 1709 TNBCs, οι TNBCs υποδιαιρέθηκαν σε 2 υποομάδες: 1) BLBCs (p53-θετικοί) και 2) normal -like (p53αρνητικοί). Οι ασθενείς με έκφραση του p53 παρουσίαζαν χειρότερη συνολική και ελεύθερη νόσου επιβίωση [148]. Η έλλειψη λειτουργίας p53 σε συνδυασμό με την αστάθεια του γονιδιώματος του BLBC μπορεί να είναι ζωτικής σημασίας για την κυτταρική επιβίωση.

8.7 BRCA1 και TNBC

Εκτός από τον BLBC, υπάρχει επίσης μία σημαντική επικάλυψη μεταξύ TNBCs και BRCA1 μεταλλαγμένων όγκων. Πάνω από το 75% των BRCA1 μεταλλαγμένων όγκων (αλλά όχι των BRCA2) είναι TNBC ή έχουν φαινότυπο BLBC, ή και τα δύο, ιδιαίτερα σε γυναίκες νεότερες των 50 ετών [149-151]. Ένας από τους κύριους ρόλους της πρωτεΐνης BRCA1 είναι η επιδιόρθωση του DNA και η απώλεια της λειτουργίας της προωθεί κατά συνέπεια την χρωμοσωμιακή αστάθεια οδηγώντας συχνά στην καρκινογένεση [152, 153]. BRCA1 όγκοι έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με σποραδικά BLBCs (πίνακας 6).

Πίνακας 6: Κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ όγκων BLBCs και BRCA1 [122, 129, 144, 154]

1.Υψηλός βαθμός κακοήθειας
2. Χρωμοσωμιακή αστάθεια
3.Συχνή έκφραση των κυταροκερατινών (CK5/6,14,17)
5.Συχνή έκφραση των μυοεπιθηλιακών δεικτών (caveolin 1 and 2, c-kit and P cadherin)
6.Υψηλή έκφραση του EGFR

Ο όρος «BRCAness» χρησιμοποιείται για να περιγράψει μία ομάδα σποραδικών BLBCs που στερούνται σωματικών μεταλλάξεων του γονιδίου BRCA1, παρ' όλα αυτά όμως χαρακτηρίζονται από μια δυσλειτουργία της οδού του BRCA1 [155, 156]. Σε μια πρόσφατη μελέτη των Turner *et al.* όπου εξετάστηκε η οδός BRCA1 σε 37 σποραδικούς όγκους, παρατηρήθηκε δυσλειτουργία της οδού BRCA1 και χαμηλά επίπεδα της BRCA1 πρωτεΐνης [155]. Ο αιτιολογικός βιολογικός μηχανισμός της BRCAness δεν είναι ακριβώς γνωστός. Μελέτες έχουν δείξει ότι η μεθυλίωση του υποκινητή μπορεί να συμβάλει σε αυτή την μειωμένη έκφραση BRCA1 που εμφανίζεται σε 10-15% των σποραδικών καρκίνων του μαστού συνολικά, και το 40-50% των TNBCs [155, 157]. ID4, ένας αρνητικός ρυθμιστής του BRCA1, έχει αναφερθεί ότι υπερεκφράζεται σε BLBCs, υποδηλώνοντας ένα πιθανό μηχανισμό για αρνητική ρύθμιση του BRCA1. Ανεξάρτητα από τον υποκείμενο μηχανισμό της BRCAness, η σύνδεσή της με τους TNBCs έχει οδηγήσει σε μία από τις πλέον υποσχόμενες στοχευμένες θεραπείες σε ορισμένες σποραδικές υποομάδες του καρκίνου του μαστού (αναστολείς PARP) [158].

8.8 Χειρουργική θεραπεία του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού

Συχνά οι TNBCs παρουσιάζονται ως τοπικά προχωρημένοι καρκίνοι του μαστού λόγω του ταχύτερου ρυθμού πολλαπλασιασμού και της δυσκολίας διάγνωσης τους με την μαστογραφία. Πολλοί από αυτούς τους ασθενείς είναι καλοί υποψήφιοι για NAC με σκοπό την συρρίκνωση του όγκου. Μία μικρή μελέτη με 117 ασθενείς, που συνέκρινε την ογκεκτομή με ακτινοθεραπεία (BCS+RT) στους TNBCs και nonTNBCs δεν βρήκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην τοπική υποτροπή μεταξύ των δύο ομάδων [159]. Παρόλα αυτά σε μια συστηματική ανάλυση της βιβλιογραφίας για την τοπική υποτροπή που περιέλαβε 14 μελέτες και 7174 ασθενείς, το ποσοστό τοπικής υποτροπής ήταν υψηλότερο στους TNBCs [160]. Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, οι Abdulkarim *et al.* [161] συνέκριναν το ποσοστό τοπικής υποτροπής σε 762

ασθενείς με T1/T2 TNBC όγκους που υπεβλήθησαν είτε σε BCS+RT είτε σε μαστεκτομή. Μετά από 7.2 χρόνια παρακολούθησης κατά μέσο όρο το ποσοστό 5ετους επιβίωσης χωρίς τοπική υποτροπή ήταν 96% για BCS+RT σε σχέση με 90% στις ασθενείς που υποβλήθηκαν σε μαστεκτομή. Βέβαια μόλις 33% των ασθενών που υποβλήθηκαν σε BCS+RT είχαν T2 όγκους σε σχέση με 47% στις ασθενείς με μαστεκτομή. Ακόμα μεγαλύτερο ποσοστό (74%) των ασθενών που υποβλήθηκαν σε BCS+RT έλαβαν μετεγχειρητική χημειοθεραπεία σε

σχέση με τους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε μαστεκτομή (61%). Περαιτέρω τυχαιοποιημένες, μελέτες χρειάζονται για να μελετήσουν περαιτέρω την χειρουργική θεραπεία στους TNBCs.

Όσον αφορά τους λεμφαδένες, ο πλήρης λεμφαδενικός καθαρισμός σε θετικό λεμφαδένα φρουρό (SLNB) αποτελεί την κύρια θεραπεία. Και τούτο, κυρίως, γιατί η μελέτη Z0011, βάσει της οποίας έχει αλλάξει ο τρόπος χειρισμού της μασχάλης σε θετικό SLNB, απέκλεισε ασθενείς με NAC ενώ περιελάμβανε ER θετικούς ή αρνητικούς όγκους χωρίς όμως να αναφέρεται το HER2 status, κάνοντας την εφαρμογή της πολύ δύσκολη στους TNBCs. Επίσης, μόνο 17% των ασθενών ήταν ER(-), άρα, αν το HER2 status ήταν επίσης διαθέσιμο, ο αριθμός των TNBCs θα ήταν στην πραγματικότητα πολύ μικρός για την αξιολόγηση της οποιαδήποτε θεραπείας σε αυτή [162] [163].

Η καθιερωμένη θεραπεία των TNBCs στα στάδια I/II είναι BCS+RT και τα ευρήματα της National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-06, χρησιμοποιούνται για να καθησυχάσουν τους ασθενείς ότι δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των 2 χειρουργικών θεραπειών [163].

8.9 Ακτινοθεραπεία των τριπλά αρνητικών καρκίνων του μαστού

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι TNBCs έχουν υψηλότερο κίνδυνο τοπικής υποτροπής και μεταστάσεως σε σχέση με άλλους υποτύπους [164-166]. Κάποιες πιο πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει αυξημένη ευαισθησία των TNBCs στην ακτινοθεραπεία (RT) και ότι η RT μπορεί να προσφέρει καλύτερο τοπικό έλεγχο. Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, στην μελέτη των Haffty *et al.*, που συνέκρινε την ογκεκτομή συν ακτινοθεραπεία (BCS+RT) στους TNBCs και non-TNBCs δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην τοπική υποτροπή μεταξύ των δύο ομάδων [159]. Βάσει αυτού ο Haffty εισηγήθηκε ότι οι TNBCs μπορεί να είναι πιο ακτινοευαίσθητοι όπως παρουσιάζουν και μεγαλύτερη ευαισθησία στους DNA βλαπτικούς παράγοντες. Όμως παρά την επίδειξη ισότιμου τοπικού ελέγχου μεταξύ των 2 ομάδων με την προσθήκη RT και συστηματικής θεραπείας, οι TNBCs εμφάνιζαν πιο γρήγορα απομακρυσμένες μεταστάσεις σε σχέση με την άλλη ομάδα [159].

Οι Abdulkarim *et al.* μελέτησαν τους παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο τοπικής υποτροπής σε 768 ασθενείς με TNBC που υπεβλήθησαν σε BCS, μαστεκτομή και μαστεκτομή συν RT. Οι συγγραφείς παρατήρησαν ότι σε σχέση με BCS η μαστεκτομή χωρίς

ακτινοθεραπεία αποτελούσε ένα ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα τοπικής υποτροπής. Ενώ δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ BCS και μαστεκτομής ακολουθούμενης από RT, υποδηλώνοντας ότι η RT αποτελεί ένα πολύ σημαντικό παράγοντα που μπορεί να μειώσει την τοπική υποτροπή στους TNBCs. Βάσει των διεθνών κατευθυντηρίων γραμμών, η χορήγησή RT αποφασίζεται με βάση το μέγεθος του όγκου και τον αριθμό των θετικών λεμφαδένων. Οι Abdulkarim *et al.* αμφισβητούν αυτές τις κατευθυντήριες γραμμές και εισηγούνται ότι η βιολογία του όγκου πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψη [161].

Το Danish Breast Cancer Cooperative Group δημοσίευσε μια ανάλυση όπου η χορήγηση RT στους TNBCs μετά από μαστεκτομή έδειξε μικρή αλλά σημαντική βελτίωση στην τοπική υποτροπή [167].

8.10 Προεγχειρητική συστηματική θεραπεία των τριπλά αρνητικών καρκίνων του μαστού (NAC)

Η προεγχειρητική χημειοθεραπεία χρησιμοποιείται πολύ συχνά για τους τριπλά αρνητικούς καρκίνους του μαστού με στόχο την μετατροπή μη χειρουργήσιμων καρκίνων σε χειρουργήσιμους ή την διατήρηση του μαστού σε μεγάλους όγκους. Με τη χρήση της NAC στους TNBCs παρατηρείται το παράδοξο φαινόμενο της μειωμένης επιβίωσης παρά την πολύ καλή ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία. Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως ο TNBC αποτελεί μία ετερογενή ασθένεια και είναι πιθανό κάποιοι υποτύποι να έχουν καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία. Για αυτούς τους όγκους η πλήρης παθολογική απόκριση αποτελεί καλό προγνωστικό σημείο. Άλλοι υποτύποι μπορεί να μην είναι τόσο χημειοευαίσθητοι και στην παρουσία υπολειπόμενης νόσου μετά από NAC έχουν χειρότερη πρόγνωση. Στην πιο μεγάλη μελέτη μέχρι τώρα με 1118 ασθενείς με καρκίνο του μαστού με στάδια III (μεταξύ αυτών και 255 άτομα ή 23% με TNBC), οι οποίοι έλαβαν NAC (ανθρακυλίνες ή/και ταξάνες), επιβεβαιώθηκε ότι ασθενείς με TNBC είχαν υψηλότερο ποσοστό πλήρους παθολογικής απόκρισης σε σχέση με τους μη-TNBC (22% vs 11%, $p=0.034$) αλλά είχαν μειωμένη 3-ετή ελεύθερη νόσου επιβίωση ($p=0.0001$) αλλά και μειωμένη 3-ετή ολική επιβίωση ($p=0.0001$). Μεταξύ αυτών που είχαν πλήρη παθολογική απόκριση, οι TNBC και οι non-TNBC είχαν παρόμοια επιβίωση ($P=0.24$), σε αντίθεση με αυτούς που είχαν μερική ανταπόκριση οι οποίοι είχαν χειρότερη OS [168].

8.11 Συστηματική θεραπεία των τριπλά αρνητικών καρκίνων του μαστού

Παραδοσιακή χημειοθεραπεία

Δεδομένης της έλλειψης στοχευμένης θεραπείας για τους TNBCs, η χημειοθεραπεία αποτελεί επί του παρόντος τη μόνη εγκεκριμένη συστηματική θεραπεία που βελτιώνει την έκβαση των TNBCs. Διάφορες άλλες επιλογές συστηματικής θεραπείας όπως στοχευμένη μοριακή θεραπεία, θεραπείες που στοχεύουν τον κυτταρικό σκελετό ή την κυτταρική μετανάστευση ή το αγγειακό σύστημα, ανοσοθεραπεία καθώς επίσης και εμβόλια είναι επί του παρόντος υπό διερεύνηση (όπως αναφέρεται λεπτομερώς στη συνέχεια).

Οι TNBCs μπορεί να είναι ευαίσθητοι στη χημειοθεραπεία, όπως αποδεικνύεται από τα υψηλά ποσοστά παθολογικής ανταπόκρισης (pCR) μετά από προεγχειρητική χημειοθεραπεία [169-171].

Μία αναδρομική ανάλυση των μεγάλων κλινικών μελετών έδειξε ότι η έλλειψη έκφρασης ER προβλέπει μεγαλύτερη απόκριση στην χημειοθεραπεία σε σχέση με ER-θετικούς όγκους [172].

Η μεταανάλυση από το Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), έδειξε ότι γυναίκες με ασθενές ER θετικό καρκίνο του μαστού που έλαβαν πολυχημειοθεραπεία είχαν σημαντική μείωση του κινδύνου τοπικής υποτροπής, θανάτου από τον καρκίνο του μαστού ή από οποιαδήποτε αιτία με ποσοστό υποτροπής 33% μετά από 10ετή παρακολούθηση σε γυναίκες ηλικίας μικρότερης των 50 ετών σε σύγκριση με 45% για εκείνους που δεν έλαβαν χημειοθεραπεία ($p < 0.00001$) ενώ για τις γυναίκες ηλικίας 50-69 ετών, τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 42 έναντι 52% ($p < 0.00001$). Η pCR μπορεί ακόμα να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης για τη μακροπρόθεσμη ανταπόκριση και επιβίωση των ασθενών [173]. Αυτό βέβαια ισχύει μόνο όταν pCR ορίζεται ως μη ύπαρξη υπολειμματικής νόσου τόσο στο μαστό όσο και στην μασχάλη. Μια μελέτη από τους Liedtke *et al.* που κάλυψε 1.118 ασθενείς με καρκίνο του μαστού, διαπιστώθηκε ότι τα ποσοστά PCR με προεγχειρητική χημειοθεραπεία ήταν υψηλότερα σε ασθενείς με TNBC σε σχέση με τους μη-TNBC (22 έναντι 11%, $p=0.034$) [168]. Επισημάνθηκε επίσης ότι η απόκριση στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία για τους TNBCs, μπορεί να είναι πολύ πιο γρήγορη, ακόμη και μετά από μόνο δύο κύκλους θεραπείας σε σχέση με τους μη TNBC. [175]. Σε μια πρόσφατη μεταανάλυση πέντε μελετών επικουρικής θεραπείας που συνέκριναν σχήματα που περιέχουν ανθρακυκλίνη με το σχήμα κυκλοφωσφαμίδη, μεθοτρεξάτη και

φθοροουρακίλη (CMF), βρέθηκε μια υπεροχή των σχημάτων που περιέχουν ανθρακυκλίνη σε σχέση με το σχήμα CMF [175]. Ωστόσο, η προσθήκη του epirubicin σε CMF, σε μια τυχαιοποιημένη μελέτη Φάσης III, τείνει να είναι ανώτερη από το απλό CMF για την ελεύθερη νόσου 5ετή επιβίωση καθώς επίσης και για την συνολική 5ετή επιβίωση για τους ασθενείς με TNBC [176]. Μια άλλη μεταανάλυση τυχαιοποιημένων μελετών αξιολόγησε την προσθήκη των ταξάνων σε σχήματα με ανθρακυκλίνη και έδειξε ανωτερότητα του συνδυασμού αυτού από την άποψη της ελεύθερης νόσου επιβίωσης και συνολικής επιβίωσης [177]. Ως εκ τούτου, σχήματα με συνδυασμό ανθρακυκλίνης/ταξάνης αποτελούν τη καθιερωμένη επικουρική θεραπεία για τους ασθενείς με TNBC είτε σε προεγχειρητική είτε σε μετεγχειρητική βάση. Μια άλλη ανάλυση έδειξε την αποτελεσματικότητα του συνδυασμού ανθρακυκλίνη/ταξάνη που βασίζεται σε ανοσοενισχυτικά σχήματα με την capecitabine σε ένα υποσύνολο 202 ασθενών με TNBC εγγεγραμμένων στο FinXX study [178]. Ακόμα η προσθήκη της erothilone B analog ixabepilone στην capecitabine, που έχει ως αποτέλεσμα τον διπλασιασμό της μέσης ελεύθερη νόσου επιβίωσης για τους TNBC, εξετάζεται σε σύγκριση με την προσθήκη capecitabine μόνο [179].

Οι von Minckwitz *et al.* μελέτησαν τα χαρακτηριστικά δοσολογίας του συνδυασμού αυτού και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι για τους ασθενείς με TNBC, ειδικότερα, η θεραπεία με υψηλότερες αθροιστικές δόσεις ανθρακυκλινών (C300 mg/m² doxorubicin ή ισοδύναμο) και ταξάνες (C400 mg/m² docetaxel ή ισοδύναμο) είχε υψηλότερα ποσοστά pCR (OR = 1,49 και 1,73, αντίστοιχα) σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της θεραπείας με χαμηλότερες αθροιστικές δόσεις. Στην GeparSepto, μια επικουρική, τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III που περιλάμβανε 1204 ασθενείς με καρκίνο του μαστού (cT2-cT4d με το 23% να έχει TNBC), οι ασθενείς κατανεμήθηκαν στην τύχη 1:1 για να λάβουν είτε nab-paclitaxel ή μόνο paclitaxel εβδομαδιαίως για 12 εβδομάδες, ακολουθούμενη από τέσσερις κύκλους epirubicin και κυκλοφωσφαμίδης. Το πρωτεύον τελικό σημείο ήταν το pCR (ypT0 ypN0). Το pCR ήταν σχεδόν διπλάσιο με nab-paclitaxel για τους ασθενείς με TNBC, με το ποσοστό pCR να είναι 48,2% στην ομάδα nab-paclitaxel σε σχέση με το 25,7% για το σχήμα με paclitaxel μόνο ($p=0.001$).

Όπως έχει ήδη συζητηθεί, ο TNBC συνδέεται στενά με μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA-1 αλλά ακόμα και όταν οι μεταλλάξεις απουσιάζουν υπάρχει μια δυσλειτουργία της οδού BRCA-1 (BRCAness). Κύτταρα με μεταλλάξεις BRCA1 έχουν έλλειψη των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA γεγονός που τα καθιστά ευαίσθητα σε παράγοντες πλατίνας. Η

χρήση μονοθεραπείας με σισπλατίνη προεγχειρητικά για τους BRCA-1 μεταλλαγμένους όγκους είχε πολύ υψηλά ποσοστά pCR, 72-90%, αν και ο αριθμός των ασθενών που περιλήφθηκαν σε αυτές τις μελέτες ήταν περιορισμένος (n = 10 και 25) [180], [181, 182].

Σε μη-BRCA-1 μεταλλαγμένους TNBCs, η χρήση της πλατίνας χρειάζεται να μελετηθεί περαιτέρω. Η προσθήκη καρβοπλατίνης στην προεγχειρητική επικουρική θεραπεία για TNBC βελτιώνει αισθητά τα ποσοστά pCR και μπορεί να αυξήσει το ποσοστό των ασθενών που είναι κατάλληλες για BCS, αν και αυτό δεν μεταφράζεται κατ' ανάγκην σε αυξημένο dfs and OS. Έτσι η προεγχειρητική επικουρική θεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την αξιολόγηση νέων φαρμάκων με βάση την pCR και τελικώς την OS. Παρόλα αυτά η συμβατική χημειοθεραπεία, σχήματα με ανθρακυκλίνες και ταξάνες, αποτελεί την κύρια θεραπεία των TNBCs σύμφωνα με την πλειονότητα των διεθνών κατευθυντήριων γραμμών (π.χ., NCCN, St Gallen και ESMO).

Χημειοθεραπεία για μεταστατικό TNBC

Δυστυχώς στη μεταστατική υποτροπή του TNBC υπάρχει έλλειψη επιλογών στοχευμένης θεραπείας λόγω της απουσίας των ER/PR /HER2. Ωστόσο, το status των υποδοχέων πρέπει να επιβεβαιώνεται ξανά με βιοψία της μεταστατικής εστίας. Η χημειοθεραπεία παραμένει κύρια θεραπεία για την συστηματική υποτροπή των TNBCs με κύριο στόχο την παράταση της επιβίωσης και ανακούφισης των συμπτωμάτων. Δυστυχώς, η ανταπόκριση στην θεραπεία καθώς και η πρόγνωση είναι κατώτερη σε σύγκριση με άλλους υποτύπους [171], [183].

Στο μεταστατικό καρκίνο το μαστού δεν υπάρχει κάποια ένδειξη ότι συγκεκριμένα χημειοθεραπευτικά σχήματα είναι καλύτερα από άλλα σε συγκεκριμένους υποτύπους. Οι επιλογές μονοχημειοθεραπείας για μεταστατικό TNBC περιλαμβάνουν ανθρακυκλίνες (doxorubicin, epirubicin, κ.α.), ταξάνες (paclitaxel, docetaxel, κ.α.), αντι-μεταβολίτες (capecitabine, gemcitabine) και άλλους αναστολείς μικροσωληνίσκων και/ή σταθεροποιητές (vinorelbine, ixabepilone, eribulin) ή παράγοντες πλατίνας (cisplatin, carboplatin) η οποία μπορεί να έχει ιδιαίτερη αξία σε ένα υποσύνολο TNBCs (εκείνους με δυσλειτουργία BRCA). Συνδυασμός χημειοθεραπευτικών παραγόντων που μπορεί να έχουν αποτέλεσμα σε ασθενείς που έχουν ήδη πάρει θεραπεία με ανθρακυκλίνη ανεξαρτήτως από τον υποτύπο περιλαμβάνουν paclitaxel με gemcitabine και docetaxel με capecitabine. Στους TNBCs, η προσθήκη ixabepilone (αναστολέας μικροσωληνίσκων) με capecitabine βελτιώνει τα ποσοστά ανταπόκρισης και την επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου [179]. Η Eribulin έχει

πάρει έγκριση από την αμερικανική FDA για την χορήγηση σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του μαστού που στο παρελθόν έχουν ήδη λάβει τουλάχιστον δύο χημειοθεραπευτικά σχήματα, τα οποία περιλαμβάνουν μια ανθρακυκλίνη και μια ταξάνη. Η έγκριση αυτή βασίστηκε στα αποτελέσματα μιας μελέτης κλινικής φάσης III (EMBRACE) όπου το eribulin δινόταν σαν μονοθεραπεία έναντι της θεραπείας επιλογής του γιατρού (TPC), και είχε σαν αποτέλεσμα την στατιστικά σημαντική αύξηση της OS σε σύγκριση με το TPC (διάμεση OS 13.1 έναντι 10,6 μηνών, $p= 0.041$). Το 19% των ασθενών ήταν TNBC. Η μελέτη των υποτύπων του καρκίνου του μαστού στην EMBRACE έδειξε ότι η eribulin ήταν γενικά πιο αποτελεσματική σε ασθενείς με ER-αρνητικούς καρκίνους, με μείωση του κινδύνου θανάτου κατά 34% σε σχέση με το TPC, και, ειδικά σε ασθενείς με TNBC, η μείωση του κινδύνου θανάτου ήταν 29%. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η eribulin ήταν λιγότερο αποτελεσματική σε ασθενείς που δεν είχαν υποβληθεί σε χημειοθεραπεία με capecitabine.

Γενικά η καθιερωμένη χημειοθεραπεία μπορεί να είναι αποτελεσματική για μια υποομάδα ασθενών με πρώιμη νόσο TNBC. Ωστόσο, ασθενείς με προχωρημένη νόσο έχουν γενικά μικρή ανταπόκριση στους τρέχοντες χημειοθεραπευτικούς παράγοντες και, ακόμα και μετά από καλή ανταπόκριση, υπάρχει ταχεία εξέλιξη της νόσου. Υπάρχει λοιπόν μια επιτακτική ανάγκη για την εύρεση νέων, στοχευμένων θεραπειών γι' αυτόν τον πληθυσμό των ασθενών με TNBC, ανεξάρτητα από το στάδιο της νόσου κατά τη διάγνωση. Η χημειοθεραπεία παραμένει η κύρια θεραπεία για τους TNBCs, ειδικά όμως για τον μεταστατικό TNBC το πρόβλημα είναι ότι η συνεχής θεραπεία με χημειοθεραπεία μπορεί να αυξήσει την αντίσταση του όγκου σε αυτούς τους παράγοντες.

Στοχευμένη θεραπεία και νέες συστηματικές θεραπείες για TNBC

Οι αναστολείς PARP (Poly [ADP Ribose] polymerase)

Οι PARPs αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια πολυλειτουργικών ενζύμων, με τον PARP1 τον πιο συχνά ανευρισκόμενο. Ο PARP1 και ο PARP2 εμπλέκονται στο μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA με μηχανισμούς όπου συνεργούν και BRCA1/BRCA2. Το DNA μπορεί να υποστεί ποικίλες βλάβες, όπως διακοπή μονής έλικας ή διπλή διακοπή ή έλλειψη του ομόλογου ανασυνδυασμού [184]. Οι Αναστολείς των PARPs είναι υπό διερεύνηση ως πιθανή θεραπεία του TNBC. Είναι ήδη γνωστό ότι αναστολή των PARPs έχει εκλεκτική αντικαρκινική δράση σε BRCA1 και BRCA2 καρκίνους με 100-1000 φορές μεγαλύτερη δύναμη θανάτωσης στους BRCA1 μεταλλαγμένους όγκους παρά σε μη μεταλλαγμένους όγκους [185,186]. Η δυσλειτουργία των BRCA1 ή BRCA2 οδηγεί στην έλλειψη του

ομόλογου ανασυνδυασμού του DNA που έχει ως αποτέλεσμα την ευαισθητοποίηση των καρκινικών κυττάρων στους αναστολείς. Οι PARPs θα μπορούσαν να επισκευάσουν βλάβες του DNA που προκαλούνται από τη χρήση χημειοθεραπευτικών παραγόντων, αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο την δράση τους. Και, με την αναστολή των PARPs, οι TNBCs που είναι BRCA1-μεταλλαγμένοι μπορεί να ευαισθητοποιηθούν σε αυτούς τους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες [186]. Επί του παρόντος, διάφοροι αναστολείς PARP όπως olaparib, veliparib, rucaparib, niraparib και talazoparib (BMN673) διερευνώνται σε διάφορες κλινικές μελέτες. Η Olaparib (AZD2281) είναι μια καλά ανεκτή από το στόματος αναστολέας PARP, η οποία έχει δείξει ελπιδοφόρα δραστηριότητα στην μονοθεραπεία σε ασθενείς με BRCA1- ή BRCA2-μεταλλάξεις που έχουν διαγνωσθεί με καρκίνο του μαστού και ωοθηκών [187].

Οι Gelmon *et al.* [188] κατέδειξαν, για πρώτη φορά, δραστηριότητα της olaparib σε ασθενείς με καρκίνους υψηλού βαθμού κακοήθειας χωρίς παρουσία μεταλλάξεων στα BRCA1 ή BRCA γονίδια, υποδεικνύοντας ότι η olaparib μπορεί να αποτελεί μία υποσχόμενη θεραπευτική επιλογή για γυναίκες με αυτές τις επιθετικές μορφές καρκίνου. Οι ασθενείς με BRCA μεταλλάξεις αποτελούν τον πληθυσμό που έχει διερευνηθεί περισσότερο στις διάφορες κλινικές δοκιμές διαφορετικών αναστολέων PARP. Η θεραπεία με συνδυασμό αναστολέων PARP και χημειοθεραπεία ή στοχευμένη θεραπεία έχει δυνητικά περισσότερα πλεονεκτήματα για τη θεραπεία του TNBC. Μόνο λίγες δοκιμές Φάσης I-III έχουν αποδείξει μέχρι σήμερα την αποτελεσματικότητα των αναστολέων PARP σε ασθενείς που έχουν TNBC τόσο στην προεγχειρητική επικουρική χημειοθεραπεία όσο και στο μεταστατικό TNBC. Στο πλαίσιο της I-Spy 2 μελέτης, ο συνδυασμός των carboplatin και veliparib, προστιθέμενος σε εβδομαδιαία paclitaxel και ακολουθούμενος από doxorubicin/cyclophosphamide, οδήγησε σε διπλασιασμό του ποσοστού PCR σε ασθενείς με TNBC (από 26% σε 52%) [189]. Η συνδυασμένη αγωγή με olaparib και με αναστολείς CDK1 (RO-3306) ή pan HER αναστολέα (neratinib, afatinib) οδήγησε σε μεγαλύτερη αναστολή της ανάπτυξης του όγκου σε σύγκριση με την μονοθεραπεία με olaparib [190].

Παρόλο που καλύτερη επιλογή ασθενών είναι πιθανό να βελτιώσει το θεραπευτικό αποτέλεσμα, έχουν αναφερθεί διάφοροι μηχανισμοί αντιστάσεως για τους αναστολείς PARP για BRCA-όγκους. Η εκτενέστερη μελέτη των μηχανισμών αντίστασης για τον αναστολέα PARP μπορεί να είναι καθοριστική για την ανάπτυξη θεραπευτικής στρατηγικής που εμποδίζει την αντίσταση αυτή.

Platinum salts

Τα άλατα λευκόχρυσου (cisplatin and carboplatin) είναι επίσης πολύ σημαντικά προκαλώντας βλάβη στο DNA, ιδιαίτερα στους TNBCs. Το έντονο ενδιαφέρον για θεραπείες με βάση την πλατίνα προέρχεται από το γεγονός ότι μεγάλο ποσοστό των TNBCs ανήκουν στην υποομάδα των μοριακών BLS σύμφωνα με την ταξινόμηση από τον Perou [191].

Ένα σύνολο 28 μελετών (6 τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες μελέτες και 22 αναδρομικές ή προοπτικές μελέτες) έχουν δείξει ότι το συγκεντρωτικό ποσοστό pCR ήταν 45% στους συνολικά 1.598 ασθενείς με TNBC που υποβλήθηκαν NAC με βάση platinum salts. Στις τυχαιοποιημένες μελέτες, το ποσοστό pCR σε θεραπεία NAC με φάρμακα που περιέχουν platinum salts ήταν σημαντικά αυξημένο, σε αντίθεση με τους nonplatinum παράγοντες (risk ratio =1.45; 95% CI 1.25–1.68; P=0.0001). Σε σύγκριση με τους μη-TNBCs, οι TNBCs με θεραπεία NAC που περιλάμβανε cisplatin ή carboplatin συσχετίστηκαν με τριπλάσια αύξηση του ποσοστού των pCR [192]. Ο συνδυασμός olaparib με platinum salts αυξάνει την ελεύθερη νόσου πibίωση αλλά και την OS. Ως εκ τούτου, μονοθεραπεία με platinum salts αλλά και ο συνδυασμός με στοχευμένες θεραπείες όπως οι αναστολείς PARP θα μπορούσε να οδηγήσει στο σχεδιασμό μελλοντικών δοκιμών για καρκίνους του μαστού που σχετίζονται με BRCA1. Ο συνδυασμός gemcitabine, carboplatin και iniparib στην NAC αύξησε το ποσοστό κλινικού οφέλους, αυξάνοντας τη μέση prolonged free survival, και την μέση OS έναντι gemcitabine και carboplatin μόνο.

Η προσθήκη carboplatin στην χημειοθεραπεία με ταξάνη-ανθρακυκλίνη σε συνδυασμό με την στοχευμένη θεραπεία είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη pCR σε ασθενείς με στάδιο II-III TNBC [193].

Epidermal Growth Factor Receptor /Αποδοχέας Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα (EGFR)

Όπως αναφέρεται και πιο κάτω οι περισσότεροι TNBCs χαρακτηρίζονται από υπερέκφραση του EGFR πράγμα που σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση [194]. Αυτό οδήγησε σε μια σειρά από κλινικές μελέτες που περιέλαβαν την anti-EGFR στοχευμένη θεραπεία. Η μελέτη TBCRC001 διερεύνησε το cetuximab, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, ως anti-EGFR στοχευμένη μονοθεραπεία, αλλά και την προσθήκη του σε platinum salts. Και οι δύο θεραπείες είχαν μικρή δραστηριότητα [195].

Το gefitinib αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό αναστολέα του EGFR, μπλοκάροντας τη δράση του ενεργοποιημένου φωσφορυλιωμένου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) με φωσφορυλίωση του EGFR, με μειωμένη φωσφορυλίωση τόσο της MAPK όσο και της πρωτεϊνικής κινάσης B (AKT), και επάγοντας από τη G1 φάση στα TNBC κύτταρα. Ο τριπλός συνδυασμός gefitinib, carboplatin, και docetaxel είχε αυξημένη αποτελεσματικότητα στα TNBC κύτταρα [196]. Οι Elbaz *et al.* [197] έδειξαν, για πρώτη φορά, ότι η cannabidiol ανέστειλε σημαντικά την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού και τη μετάσταση μέσω ενός νέου μηχανισμού με αναστολή της σηματοδότησης της EGF/EGFR οδού αλλά και τροποποίηση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, υποδεικνύοντας ότι η cannabidiol αποτελεί ένα καινούργιο θεραπευτικό παράγοντα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στους πολύ επιθετικούς καρκίνους του μαστού συμπεριλαμβανομένου των TNBCs.

Src αναστολέας της τυροσινικής κινάσης

Ο υποδοχέας τυροσινικής κινάσης, Src, (ιός σαρκώματος Rous) υπερεκφράζεται στους TNBCs και έχει συσχετιστεί με την μεταστατική εξέλιξη της νόσου [198]. Το dasatinib αποτελεί έναν από του στόματος αναστολέα του Src, c-kit και platelet derived-b υποδοχέα αυξητικού παράγοντα (PDGFRb), και αναστέλλει την ανάπτυξη των basal-like και TNBC κυτταρικών γραμμών, ενώ μπορεί να έχει συνεργιστική δράση όταν συνδυάζεται με cisplatin σε τρεις dasatinib ευαίσθητες κυτταρικές γραμμές [198], [199].

Η μονοθεραπεία με dasatinib αξιολογήθηκε σε ασθενείς με μεταστατικό TNBC με προηγηθείσα χημειοθεραπεία ανθρακυκλινών και ταξάνων σε μία μελέτη φάσης I. Σε αυτή τη δοκιμή, το dasatinib, σε δόση 70 mg δύο φορές ημερησίως, οδήγησε σε έλεγχο της νόσου (σταθερή νόσο για τουλάχιστον 16 εβδομάδες) κατά ένα ποσοστό 9,3% και μέση PFS 8,3 εβδομάδες [200]. Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για τον έλεγχο της χρήσης αυτών παραγόντων στην κλινική πράξη.

Αντιαγγειογενετικοί παράγοντες

Ο TNBC αποτελεί ένα νεόπλασμα με έντονο πολλαπλασιασμό που χρειάζεται συνεχή αγγειογένεση σε όλα τα στάδια της ανάπτυξής του γι'αυτό και σχετίζεται με σημαντικά υψηλή έκφραση και ενίσχυση του VEGF-A. Η αναστολή του VEGF μπορεί να εμποδίσει την ανάπτυξη και νεοαγγείωσης του όγκου [201, 202].

Το bevacizumab αποτελεί ένα αντι-αγγειογενετικό μονοκλωνικό αντίσωμα που έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την PFS των ασθενών με αρνητικό-EGFR2 στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού όταν προστίθεται στην πρώτη γραμμή χημειοθεραπείας [203, 204].

Η προσθήκη carboplatins ή bevacizumab σε NAC βελτιώνει την pCR. Όμως, παρά τα υψηλά ποσοστά της pCR, δεν έχει δικαιολογηθεί ακόμα η προσθήκη του bevacizumab ως ρουτίνα για τα στάδια II και III των TNBCs [205]. Η προσθήκη του bevacizumab στην χημειοθεραπεία NAC με ανθρακυκλίνη και ταξάνη για τους TNBCs αυξάνει επίσης σημαντικά το ποσοστό pCR (27,9% χωρίς και 39,3% με bevacizumab) [206]. Οι μελέτες έδειξαν επίσης σημαντική βελτίωση τόσο της pCR όσο και των PFS και OS όταν προστίθεται bevacizumab σε NAC έναντι χημειοθεραπείας μόνο [205, 207]. Συμπερασματικά, ο συνδυασμός χημειοθεραπείας με θεραπεία αντί-VEGF μπορεί να αποτελέσει μια σημαντική πρώτης γραμμής θεραπευτική επιλογή.

Epothilones

Είναι παράγοντες στόχευσης μικροσωληνίσκων που αποτρέπουν την κυτταρική διαίρεση. Στις πρώτες μελέτες έχουν επιδείξει βελτιωμένη δραστηριότητα και ηπιότερες παρενέργειες από τις ταξάνες [208]. Σε μια μελέτη για NAC, η ixabepilone προκάλεσε αύξηση της PCR σε ER/PR-αρνητικούς όγκους σε σύγκριση με ER/PR-θετικούς όγκους [209]. Αυτή τη στιγμή η ixabepilone αξιολογείται επίσης σε μια μελέτη με NAC για TNBCs, σε συνδυασμό με το μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα (EGFR) cetuximab (ClinicalTrials.gov NCT01097642).

Ανοσοθεραπευτική προσέγγιση για TNBC

Πρόσφατες μελέτες έχουν προτείνει μια βελτιωμένη πρόγνωση που συνδέεται με την αύξηση των επιπέδων των λεμφοκυττάρων που διηθούν όγκο (TIL) [210]. Ο καρκίνος του μαστού έχει την ικανότητα να διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα. Ο βαθμός της ανοσολογικής απόκρισης επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας του καρκίνου και σχετίζεται με καλύτερη κλινική έκβαση. Υψηλά επίπεδα programmed death ligand 1 (PD-L1), που αποτελεί ένα ανοσολογικό σημείο ελέγχου, όπως και τα υψηλά επίπεδα TILs, ανευρίσκονται πολύ συχνά στους τριπλά αρνητικούς καρκίνους του μαστού [211]. Όπως αναφέρεται και παρακάτω η προγραμματισμένη πρωτεΐνη κυτταρικού θανάτου 1 (PD-1) αποτελεί ένα ανοσολογικό φραγμό που περιορίζει τις λειτουργίες των T-κυττάρων μέσα στους ιστούς. Η σύνδεση του PD-L 1 που βρίσκεται στην επιφάνεια των T-κυττάρων με την PD-1, προκαλεί

απενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων [212]. Η Atezolizumab (MPDL3280A), που αποτελεί ένα μονοκλωνικό αντι-PD-L 1 αντίσωμα, και είναι γενικά πολύ καλά ανεκτή, επέδειξε αποτελεσματικότητα στην θεραπεία του PD-L1 θετικού μεταστατικού TNBC [211, 213].

Επιπλέον, τα προκαταρκτικά αποτελέσματα μιας πρόσφατης μελέτης σε φάση I έδειξαν ότι η μονοθεραπεία με pembrolizumab (MK-3475), ένα μονοκλωνικό αντιPD-1, συνιστά μια αρκετά ανεκτή και αποτελεσματική επιλογή με σημαντική θεραπευτική δραστηριότητα σε μια υποομάδα με υποτροπιάζον/μεταστατικό TNBC (mTNBC) [214].

Έχουν αναφερθεί επίσης τα προκαταρκτικά αποτελέσματα ενός συνδυασμού atezolizumab με χημειοθεραπεία nab-paclitaxel σε μεταστατικό TNBC και έχει ανοίξει μια μελέτη σε φάση III σε μη θεραπεύσιμο καρκίνο mTNBC ως θεραπεία πρώτης γραμμής. Πολλαπλοί πρόσθετοι υποδοχείς του ανοσοποιητικού οδοφράγματος και οι συνδέτες τους αποτελούν κύριους στόχους για αποκλεισμό (π.χ. το κυτταροτοξικό T λεμφοκύτταρο αντιγόνο-4 (CTLA-4)). Το μονοκλωνικό αντίσωμα tremelimumab, που αναστέλλει την οδό CTLA-4, αξιολογήθηκε σε ορμονοθετικό καρκίνο του μαστού και έχει δείξει καλά αποτελέσματα [215].

Οι μελέτες GeparSixto και CALGB 40563 ίσως δείξουν πιο ξεκάθαρα ποια φάση είναι καλύτερη για την ενσωμάτωση της πλατίνης για την θεραπεία του μη προχωρημένου TNBC μέσω βιοδεκτών όπως τα TILs που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και ως θεραπευτικοί στόχοι [216, 217]. Τα υψηλά TILs, που αποτελούν ιδιαίτερα σημαντικούς παθολογικούς προγνωστικούς παράγοντες ειδικά για την NAC με ανθρακυκλίνες/ταξάνες, έχουν συσχετιστεί με βελτιωμένα ποσοστά pCR ιδιαίτερα σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με καρβοπλατίνη. Προκύπτει ότι τα ανοσοτροποποιητικά φάρμακα αυξάνουν τα ποσοστά ανταπόκρισης στη NAC [216, 217].

Τα ανοσοτροποποιητικά φάρμακα αποτέλεσαν τη βάση για την ανάπτυξη των ανοσοθεραπειών που βασίζονται στην εκτίμηση της ανοσογονικότητας του TNBC, υποδεικνύοντας ένα υποσύνολο TNBC ασθενών που μπορούν να επωφεληθούν από ανοσο-θεραπεία.

PI3K/Akt/mTOR

Μια αρχική ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος, όπως αναφέρεται αναλυτικότερα πιο κάτω, έχει δείξει ότι σε πολλούς όγκους TNBC υπήρξε συνενεργοποίηση των μονοπατιών των MAPK και PI3K/ AKT. Μια μελέτη σε φάση I έδειξε ότι η αναστολή της συνενεργοποίησης των μονοπατιών αυτών είχε εξαιρετική απόκριση σε κάποιους αλλά όχι σε όλους τους ασθενείς [218].

Στόχευση του κυτταροσκελετού, της μετανάστευσης των κυττάρων και του αγγειακού συστήματος

Μεταλλάξεις που επηρεάζουν τον κυτταρικό σκελετό και ενδεχομένως τους μεσεγχυματικούς επιθηλιακούς δείκτες μετάβασης (EMT) έχουν παρατηρηθεί σχετικά συχνά στους TNBCs [219]. Κυρίως στον claudin low subtype αλλά και στο basal-like subtype έχουν παρατηρηθεί υψηλά επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη διαδικασία EMT [220]. Ωστόσο, η μονοθεραπεία με τη χρήση τέτοιων στοχευμένων παραγόντων δεν αναμένεται να είναι ιδιαίτερα δραστική. Για την θεραπευτική προσέγγιση των TNBCs επιβάλλεται συνδυασμός με άλλους θεραπευτικούς παράγοντες. Υποομάδες των όγκων αυτών παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης δεικτών των βλαστικών κυττάρων που μπορούν να συσχετιστούν με αντίσταση στη συμβατική θεραπεία. Η στόχευση των EMT μπορεί να αποδειχθεί σημαντική για ένα υποσύνολο TNBCs.

Υποδοχέας ανδρογόνων

Όπως αναφέρεται αναλυτικότερα πιο κάτω, οι TNBC που είναι θετικοί για τον υποδοχέα ανδρογόνου (AR-θετικοί) αντιπροσωπεύουν μια διακριτή υποομάδα TNBCs με δυσμενή κλινική έκβαση. Ο αποκλεισμός του AR θεωρήθηκε ως πιθανή ενδοκρινική θεραπεία για αυτούς τους ασθενείς [221].

Εμβόλιο

Το GLV-1h153 αποτελεί ογκολυτικό αντίγραφο του ιού της ευλογιάς. Σε μια μελέτη των Gholami *et al.*, κυτταρικές σειρές των TNBCs θανατώθηκαν με αυτόν τον ιό τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* και εξήχθη το συμπέρασμα ότι το GLV-1h153 είναι ένας ελπιδοφόρος θεραπευτικός παράγοντας για την πρόληψη και θεραπεία μεταστατικών TNBCs, η οποία δικαιολογεί περαιτέρω κλινικές μελέτες σε ασθενείς.

Χημειοθεραπεία υψηλών δόσεων (HDC)

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η HDC είναι αποτελεσματική σε ασθενείς TNBC. Σε μια μελέτη των Gluz *et al.*, οι ασθενείς κατανεμήθηκαν στην τύχη σε μια ομάδα με συμβατική χημειοθεραπεία [τέσσερις κύκλους epirubicin και κυκλοφωσφαμίδης (ΕΚ) που ακολουθήθηκε από τρεις κύκλους ενδοφλέβιας CMF, χορηγούμενη κάθε 2 εβδομάδες] ή σε μια ομάδα με δύο κύκλους ΕΚ που ακολουθήθηκε από δύο κύκλους HDC. Η ομάδα υψηλής δόσης έδειξε σημαντική βελτίωση της 5-ετούς ελεύθερης συμβάντων επιβίωσης

(62 έναντι 41%, $p = 0,004$) και OS (76 έναντι 61%, $p = 0,007$) σε σύγκριση με την συμβατική δόση. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, οι νέοι ασθενείς (<50 ετών) με TNBC είχαν περισσότερο όφελος από το σχήμα HDC [186]. Έχουν επίσης δημοσιευθεί δύο μεταanalύσεις που αξιολόγησαν το ρόλο της HDC. Η πρώτη περιέλαβε 6102 ασθενείς με μέσο χρόνο παρακολούθησης 6 χρόνια και έδειξε 13% όφελος στην ελεύθερη συμβάντων επιβίωση υπέρ του HDC ($p = 0,0001$) σε σχέση με την συμβατική χημειοθεραπεία, αλλά δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στην συνολική επιβίωση [188]. Η HDC συνδεόταν συχνά με σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες. Η δεύτερη ανάλυση περιέλαβε 6210 ασθενείς και έδειξε ένα όφελος 13% στην ελεύθερη συμβάντων επιβίωση με HDC ($p = 0,001$). Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στην OS για τις 2 υποομάδες εκτός από τις ασθενείς με νόσο HER2negative, για τις οποίες υπήρχε μια μείωση 21% στον κίνδυνο θανάτου. Αυτή η μείωση ήταν μεγαλύτερη (33%) μεταξύ των ασθενών με TNBC [189]. Εν ολίγοις, η HDC παραμένει μια πειραματική προσέγγιση στην επικουρική θεραπεία του TNBC [222, 223] [224].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη επιπρόσθετων προγνωστικών δεικτών για τους τριπλά αρνητικούς καρκίνους του μαστού (TNBCs) που να μπορούν να συσχετιστούν με επιθετική συμπεριφορά σε σχέση με τον υψηλότερο βαθμό κακοήθειας, τους θετικούς λεμφαδένες, τη διήθηση λεμφαγγείων (LVI), την τοπική υποτροπή, τις μεταστάσεις, την ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS) καθώς και την συνολική επιβίωση (OS). Οι δείκτες που μελετήθηκαν είναι οι ακόλουθοι:

- | | | |
|--------------|---------------|----------------|
| - Claudin 7 | - CK17 – PTEN | - CK5/6 – CMET |
| - AR – CMYC | - P63 – CKIT | - P53 - PDL1 |
| - EGFR – ALK | - KI67 | |

2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Επιλογή υλικού

Ενενήντα επτά (97) περιπτώσεις τριπλά αρνητικών καρκίνων του μαστού συλλέχθηκαν αναδρομικά από πίνακα δεδομένων με βάση την αρνητικότητα των ER, PR and HER2. Ασθενείς στους οποίους τα ιστολογικά δείγματα απουσίαζαν ή είχαν ατελή ανοσοϊστοχημεία αποκλείστηκαν.

Το προς μελέτη υλικό περιέλαβε 84 κύβους παραφίνης 84 ασθενών με τριπλά αρνητικό διηθητικό καρκίνωμα του μαστού που επιλέγηκαν από το αρχείο του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Νοσοκομείου ΥΓΕΙΑ για το χρονικό διάστημα 2003-2011. Σε συνεργασία με την κλινική μαστού και ειδικού ογκολόγου του εν λόγω νοσοκομείου, συλλέγηκαν και αρχειοθετήθηκαν όλες οι πληροφορίες που αφορούσαν τους ασθενείς, περιλαμβανομένης της κατάστασης στην οποία βρίσκονταν κατά την τελευταία ημερομηνία παρακολούθησης ενός εκάστου. Η συλλογή των στοιχείων τερματίστηκε το 2016. Ασθενείς με μη ολοκληρωμένα στοιχεία αποκλείστηκαν με αποτέλεσμα το εκάστοτε δείγμα να διαφέρει. Η ιστολογική διαβάθμιση του νεοπλασματος έγινε σύμφωνα με τα προτεινόμενα κριτήρια της Π.Ο.Υ. (WHO 2014) και η σταδιοποίηση χρησιμοποιώντας το σύστημα TNM/AJCC του 2009. Από όλους τους κύβους παραφίνης κάθε περιστατικού αξιολογήθηκαν οι τομές αιματοξυλίνης/ηωσίνης (H/E), και επιλέγηκαν οι κατάλληλοι κύβοι παραφίνης για την δημιουργία των ιστικών μικροσυστοιχειών (Tissue MicroArrays-TMA). Η επιλογή των στοιχείων του ιστού που θα εγκλειόταν στα TMA έγινε με βάση το πλακίδιο της H/E. Εκεί σημειώθηκαν με μαρκαδόρο ή/και με ειδική μικροσκοπική σφραγίδα όλες οι νεοπλασματικές και μη εστίες (όπου αυτό ήταν εφικτό). Η επιλογή και η αξιολόγηση του υλικού, καθώς και η δημιουργία των TMA έγιναν από τον ειδικό παθολογοανατόμο με εμπειρία στην εν λόγω τεχνική. Οι τεχνικές πραγματοποιήθηκαν σε μονιμοποιημένους σε φορμόλη ιστούς, εγκλεισθέντες σε παραφίνη από τα αντίστοιχα ιστολογικά παρασκευάσματα.

2. Δημιουργία ιστικών μικροσυστοιχειών

Για την εφαρμογή των ειδικών μεθόδων, δημιουργήθηκαν 3 κύβοι παραφίνης με μικροσυστοιχίες ιστικών κυλίνδρων με την χρήση του ειδικού χειροκίνητου μηχανήματος υψηλής ακρίβειας (MTA-1, Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, U.S.A.) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι νέοι ιστικοί κύβοι περιείχαν παραφίνη υψηλής ποιότητας με πλαστικά πολυμερή (Paraplast®; McCormick, St. Louis, MO., USA). Τοποθετήθηκαν

συνολικά 236 ιστικοί κύλινδροι. Από κάθε περίπτωση ελήφθησαν 2 ιστικοί κύλινδροι (cores), διαμέτρου 1.5 mm, από κεντρική και από περιφερική, διηθητική θέση του νεοπλάσματος. Η απόσταση μεταξύ των ιστικών κυλίνδρων ήταν 2.5 mm. Στους TMA κύβους περιλήφθηκαν επίσης και ιστοί ως δείκτες αξιοπιστίας (μάρτυρες) των ειδικών τεχνικών (AIX) καθώς και δείκτες προσανατολισμού και χαρτογράφησης του περιεχομένου των TMA. Ειδικότερα, τοποθετήθηκαν ως μάρτυρες ιστικοί κύλινδροι από φυσιολογικούς ιστούς μαστού, ενδομητρίου, παχέος εντέρου και σπλήνα. Οι θέσεις των ιστικών κυλίνδρων στους 3 TMA κύβους καταγράφηκαν σε αρχείο Excel (3 φύλλα εργασίας). Το παραπάνω αρχείο χρησιμοποιήθηκε ως βάση για την χαρτογράφηση και ταξινόμηση των περιπτώσεων καθώς και για την καταγραφή των αποτελεσμάτων των ανοσοχρώσεων.

3. Ανοσοϊστοχημεία (AIX-IHC)

Διενεργήθηκε απλή ανοσοϊστοχημεία έναντι 14 αντιγόνων. Ειδικότερα μελετήθηκαν αντισώματα έναντι των αντιγόνων p53, p63, C-KIT, Ki67, cMet, claudin 7, CK 5/6, CK17, AR, PTEN, EGFR, ALK, PDL-1 και c-MYC. Η ανοσοϊστοχημική διερεύνηση εφαρμόστηκε σε τομές πάχους 3 μm , από τους τρεις TMA κύβους παραφίνης. Οι ιστικές τομές τοποθετήθηκαν σε φορτισμένα πλακίδια και μετά σε κασετίνα στους 4°C μέχρι την χρησιμοποίησή τους, η οποία έγινε σε διάστημα κάτω των 10 ημερών. Για την διασφάλιση της αναπαραγωγιμότητας των αποτελεσμάτων, οι ανοσοχρώσεις έγιναν σε διαφορετικούς κύκλους για κάθε αντίσωμα. Η αποπαραφίνωση πραγματοποιήθηκε με επώαση στους 60°C επί 1-2 ώρες και στη συνέχεια ακολούθησε εμβάπτιση σε διάλυμα Ottix Plus (Diapath, Martinengo, Italy) για 2 x 8 λεπτά, και ενυδάτωση στο διάλυμα Ottix Shaper (Diapath) για 2 x 5 λεπτά. Η περαιτέρω διαδικασία της IHC πραγματοποιήθηκε στα αυτόματα μηχανήματα χρώσης Bond MaxTM (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) και i6000 (Biogenex, San Ramon, CA), ενώ η αντιγονική ανάκτηση χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα, στα αυτόματα μηχανήματα χρώσης Bond MaxTM (Leica Microsystems). Το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος ήταν ορατό χρησιμοποιώντας τα συστήματα ανίχνευσης Bond Polymer Refine (Leica Biosystems, Newcastle, UK), EnvisionTM (Dako) και ως χρωμογόνο την 3', 3'-διαμινοβενζιδίνη (DAB). Ως αντίχρωση χρησιμοποιήθηκε η αιματοξυλίνη Mayer του συστήματος ανίχνευσης Bond Polymer Refine. Για τα τρία τελευταία αντισώματα χρησιμοποιήθηκε το αυτόματο μηχανήματα BenchMark ULTRA της Ventana και το Ventana Medical Systems ultra VIEW Detection Kit. Αναλυτικότερα, η ανοσοϊστοχημική τεχνική, η πηγή, η αραίωση και επώαση των αντισωμάτων και η εντόπιση της χρώσης για την κάθε πρωτεΐνη της μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Παρουσίαση των αντισωμάτων, εταιρειών παραγωγής, συνθηκών χρώσης των αραιώσεων και εντόπισης των ανοσοχρώσεων.

Αντίσωμα	Κλώνος/ET	AA/T PΔ	AP	E	ENT
AR (m, mAb)	AR441 (1)	ER2/HP, 20'/PBS	1:200	20'	Π
CD117(r, plAb)	A4502 (1)	ER2/HP, 20'/PBS	1:100	20'	K, K/M
CK5/6(m, mAb)	D5/16 B4 (1)	ER1/HP, 20'/PBS	1:50	20'	K
CK17 (m, mAb)	E3 (2)	ER1/HP, 20'/PBS	RTU	20'	K
Claudin7 (m, mAb)	5D10F3 (3)	ER2/HP, 20'/PBS	1:200	20'	K, K/M
EGFR (r, plAb)	31G7 (4)	ENZ1/HP, 8'/PBS	1:50	20'	M, M/K
Ki67 (m, mAb)	MIB1 (1)	ER2/HP, 15'/PBS	1:70	20'	Π
cMet (m, mAb)	8F1 (1)	ER1/HP, 20'/PBS	1:200	20'	M, M/K
PTEN (m, mAb)	6H2.1 (1)	ER2/HP, 20'/PBS	1:300	60'	K, Π, K/Π
p53 (m, mAb)	DO-7 (1)	ER1/HP, 20'/PBS	1:100	20'	Π
p63 (m, mAb)	7JUL (1)	ER2/HP, 20'/PBS	1:50	20'	Π
ALK (r, mAb)	D5F3 (6)	Ultra CC1, 92	Ready to use 14mg/ ml	16'	K
PDL-1 (r, plAb)	Ab 58812 (5)	ER1/HP, 20'/PBS	1:30	40'	M/K
C-MYC (r, mAb)	Y69 (6)	Ultra CC1, 64'	Ready to use 24mg/ ml	16'	Π

Επεξηγήσεις: AA: Αντιγονική ανάκτηση. AP: Αραιώση. E: Επώαση. ENT: Εντόπιση. ET: Εταιρεία. K: Κυτταρόπλασμα. M: Μembrάνη. Π: Πυρήνας. PΔ: Ρυθμιστικό διάλυμα. T: Χρόνος αντιγονικής ανάκτησης. ENZ: Enzyme; ER1: citric acid pH6.0.

ER2: ethylenediaminetetraacetate, pH8.8; HP: Hot plate; m: mouse; mAb: monoclonal antibody; PBS: phosphate buffered saline; pl: polyclonal. r: rabbit.

(1) Dako, Glostrup, DK; (2): Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK; (3): Thermo Fisher Scientific, Fremont CA; (4): Invitrogen, Carlsbad, CA; (5) Abcam Inc. Cambridge USA; (6) Ventana USA.

4. Αξιολόγηση των ανοσοχρώσεων

c-kit

Θεωρούμε θετικά στο c-kit τα καρκινώματα που παρουσιάζουν μεμβρανική κυρίως ή κυτταροπλασματική χρώση στο εν λόγω αντίσωμα ανεξάρτητα από την έκταση ή την ένταση της χρώσης.

N=negative

Pc=positive με κυτταροπλασματική χρώση

Pm= positive με μεμβρανική χρώση

I=lost (χάθηκε, ξεκόλλησε η τομή)

AR

Θεωρούμε αρνητικά στους υποδοχείς ανδρογόνων τα καρκινώματα που δεν παρουσιάζουν κανένα κύτταρο με πυρηνική χρώση στο εν λόγω αντίσωμα. Ασθενώς θετικά τα καρκινώματα με ποσοστό θετικών κυττάρων 1-10% και θετικά τα καρκινώματα με ποσοστό θετικών κυττάρων >10%.

N=negative

Pa=positive 1-10%

Pb= positive με ποσοστό θετικών κυττάρων >10%

I=lost (χάθηκε, ξεκόλλησε η τομή)

CK 5/6 & CK 17

Θεωρούμε θετικά στις κυτταροκερατίνες 5/6 και 17 τα καρκινώματα που παρουσιάζουν μεμβρανική χρώση στα εν λόγω αντισώματα ανεξάρτητα από την έκταση ή την ένταση της χρώσης.

N=negative

P=positive

I=lost (χάθηκε, ξεκόλλησε η τομή)

Claudin 7

Ξεχωρίζουμε τα καρκινώματα με low και high expression στη βάση ενός scoring συστήματος, όπως αυτό περιγράφεται παρακάτω:

Έκταση χρώσης		Ένταση χρώσης	
0	0%	0	χωρίς χρώση
1	<25%	1	ήπια
2	26-50%	2	μέτρια
3	>50%	3	έντονη

Έκταση X ένταση = 0-9

0 = negative LOW

1-2 = weak LOW

3-6 = moderate HIGH

9= strong HIGH

l=lost (χάθηκε, ξεκόλλησε η τομή)

PTEN

Θεωρούμε θετικά στο PTEN τα καρκινώματα που παρουσιάζουν κυτταροπλασματική χρώση στο εν λόγω αντίσωμα βάσει της έντασης της χρώσης.

N=negative

P1= weak positive με κυτταροπλασματική χρώση ίδια με το φυσιολογικό

P2= positive με κυτταροπλασματική χρώση εντονότερη από το φυσιολογικό

l=lost (χάθηκε, ξεκόλλησε η τομή) **p63**

Θεωρούμε όριο θετικότητας το 5% των χρωσμένων στον πυρήνα κυττάρων ανεξάρτητα από την ένταση της χρώσης

N=negative

P1= positive cells <5%

P2= positive cells >5%

l=lost (χάθηκε, ξεκόλλησε η τομή) **p53**

Ξεχωρίζουμε τρεις κατηγορίες θετικών καρκινωμάτων βάσει του ποσοστού της πυρηνικής χρώσης, ανεξάρτητα από την ένταση της χρώσης.

N=negative

P1= positive cells <5%

P2= positive cells 5-40%

P3= positive cells >40%

I=lost (χάθηκε, ξεκόλλησε η τομή)

ALK

Θεωρούμε θετικά στο ALK τα καρκινώματα που παρουσιάζουν κοκκιώδη κυτταροπλασματική χρώση στο εν λόγω αντίσωμα ανεξάρτητα από την έκταση ή την ένταση της χρώσης.

N=negative

P= positive

I=lost (χάθηκε, ξεκόλλησε η τομή)

PDL-1

Ξεχωρίζουμε τρεις κατηγορίες θετικών καρκινωμάτων βάσει του ποσοστού της μεμβρανικής χρώσης, ανεξάρτητα από την ένταση της χρώσης.

N=negative

P1= positive cells $\leq$ 5%

P2= positive cells 6-24%

P3= positive cells $\geq$ 25%

I=lost (χάθηκε, ξεκόλλησε η τομή)

C-MET

Θεωρούμε όριο θετικότητας το 50% των χρωσμένων κυττάρων και τα ξεχωρίζουμε σε τρεις κατηγορίες από την ένταση της χρώσης.

N=negative

P3= strong positive cells $\geq$ 50%

P2= moderate positive cells $\geq 50\%$ or strong positive cells $< 50\%$

P1= weak positive cells $\geq 50\%$ or moderate positive cells $< 50\%$

I=lost (χάθηκε, ξεκόλλησε η τομή)

Ki67

Ξεχωρίζουμε τέσσερις κατηγορίες θετικών καρκινωμάτων βάσει του ποσοστού των κυττάρων με πυρηνική χρώση, ανεξάρτητα από την ένταση της χρώσης.

N=negative

P1= positive cells $\leq 10\%$

P2= positive cells 11-30%

P3= positive cells 31-50% P4= positive cells $>50\%$

I=lost (χάθηκε, ξεκόλλησε η τομή)

EGFR

Ξεχωρίζουμε τα καρκινώματα με low και high expression στη βάση ενός scoring συστήματος, όπως αυτό περιγράφεται στο H score στη βάση του ποσοστού % της έκτασης και της έντασης της μεμβρανικής χρώσης.

N=negative

P1= low $< \text{score} 200$

P2= high $> \text{score} 200$

I=lost (χάθηκε, ξεκόλλησε η τομή)

C-MYC

Ξεχωρίζουμε δύο κατηγορίες αρνητικών και σε δύο κατηγορίες θετικών καρκινωμάτων βάσει του ποσοστού των χρωσμένων κυττάρων, ανεξάρτητα από την ένταση της χρώσης.

N1=0 ή $<1\%$

N2= positive cells 1-25%

P1= positive cells 26-50 %

P2= positive cells $\geq 51\%$

I=lost (χάθηκε, ξεκόλλησε η τομή)

A/A	AP. IPQT	cKit	AR	CK5/6	CK17	CL7	PTEN	p63	p53	ALK	PDL-1	C-MET	Ki67	EGFR	CMYC
1	131150	Pm	Pb	N	N	6	N	N	N	N	N	P2	P2	N	P2
2	133287	N	Pc	P	N	9	N	N ⁶⁷	P3	N	N	P3	P2	P2	N1
3	133534	Pc	N	P	P	0	N	N	N	N	N	N	P4	P1	P2
4	133938	Pm	N	P	N	6	N	N	P3	N	P3	P3	P2	P2	P2
5	133954	Pm	N	P	P	6	N	N	N	N	P1	N	P4	P1	P2
6	133957	N	Pc	N	N	9	P2	N	P3	N	N	P3	P4	N	N1
7	136329	N	N	N	N	3	P1	N	P3	N	N	N	P4	N	P2
8	139750	N	N	P	N	4	N	N	P2	N	N	P2	P3	P2	N1
9	139881	Pm	N	P	N	2	N	N	P3	N	N	P2	P2	P1	N2
10	139998	Pm	N	P	P	6	N	N	P3	N	N	P2	P2	P1	P2
11	140140	N	Pc	N	N	9	N	N	P2	N	N	P1	P4	N	P2
12	140729	N	N	N	N	0	N	N	P3	N	N	N	P2	N	N2
13	140785	Pm	N	P	N	9	N	N	N	N	N	N	P4	P2	P2
14	141024	Pm	N	P	P	9	N	N	P3	N	N	P2	P4	P1	P2
15	142000	N	N	N	P	9	N	P1	P3	N	P1	N	P4	P1	N2
16	143241	Pc	N	P	P	9	P1	N	P3	N	N	P2	P4	N	P2
17	144055	N	N	P	P	9	N	N	P3	N	N	P2	P2	P2	P1
18	144670	Pm	Pc	P	N	9	P1	P1	P2	N	N	P3	P1	P1	P2
19	145274	N	N	P	P	6	N	P1	N	N	N	P1	P2	P2	P1
20	146906	N	Pc	P	P	9	N	P1	P1	N	N	N	P2	P2	P2
21	146987	Pc	N	P	P	6	N	P1	P2	N	N	N	P4	P2	P2
22	147931	N	N	N	N	9	P2	N	P2	N	N	P2	P2	N	P2
23	148122	Pm	N	N	N	4	N	N	P3	N	N	P2	P1	N	N2
24	150960	Pm	N	N	N	4	N	N	P3	N	N	N	P1	N	P2
25	151284	Pm	N	P	P	4	N	N	N	N	N	N	P4	P1	N1
26	151621	N	N	N	P	2	N	P2	P3	N	N	N	P3	P1	P1
27	152070	N	N	N	N	2	N	N	N	N	N	P3	P1	N	N2
28	153462	N	N	N	N	6	N	N	N	N	N	N	P1	N	P2
29	153941	Pm	N	P	N	L	N	P1	P3	N	N	P2	P3	P1	N2
30	155002	N	N	N	P	2	N	N	P3	N	N	P3	P2	N	N2
31	155058	Pc	N	N	P	6	N	N	P2	N	N	P1	P3	P1	P2
32	155663	L	N	N	N	6	N	N	P3	N	N	P3	P1	P1	N2
33	156499	N	Pb	N	N	L	N	N	P3	N	P1	N	P4	P1	N2
34	157899	N	N	N	N	6	P2	N	P3	N	N	P1	P4	P1	P2

35	157908	Pm	N	N	P	2	P1	N	N	N	N	N	P2	N	P1
36	158022	Pc	Pb	P	N	1	N	N	P3	P1	N	P3	P2	P1	P1
37	158085	N	Pc	P	P	6	N	P2	N	N	N	P1	P4	P1	N2
38	158115	N	N	P	P	9	N	N	N	N	N	N	P4	P1	P2
39	158252	N	Pc	P	P	6	N	N	P3	N	N	P1	P2	P2	N2
40	159397	N	N	N	N	9	P2	N	P2	N	N	L	P4	N	P1
41	160180	N	N	N	N	9	N	N	N	N	N	N	P2	P2	P1
42	160875	N	N	P	N	4	N	N	N	N	N	P1	P2	P2	P1
43	160910	N	N	N	N	4	N	N	N	N	N	N	P1	P1	P1
44	161018	N	N	P	P	9	N	N	N	N	N	P3	P1	P2	P2
45	161525	P	N	N	N	6	P1	N	P3	N	N	N	P4	P1	P1
46	161741	N	N	P	P	4	N	N	N	N	N	N	P3	P2	N2
47	161950	Pc	Pc	P	P	0	P1	N	P3	N	N	N	P4	P1	N2
48	163188	Pm	N	N	N	6	N	N	N	N	N	N	P2	N	P1
49	164066	N	Pc	N	N	4	N	N	N	N	N	N	P1	P1	P2
50	164912	N	N	P	N	0	P1	N	P2	P1	P1	P1	P2	N	P2
51	166607	Pm	N	N	N	2	N	N	P1	N	P1	P3	P2	N	P1
52	167141	Pc	N	P	P	L	N	P1	N	N	N	P1	P4	N	P1
53	167604	Pm	N	P	N	4	N	N	L	N	N	N	P3	P2	P2
54	169145	N	N	N	P	9	P2	P2	P3	N	N	N	P4	N	P2
55	169178	N	Pb	P	N	4	N	N	N	N	N	P3	P1	P1	N1
56	169252	N	N	P	P	9	N	P2	N	N	N	P3	P4	P2	P2
57	169432	N	N	N	N	9	N	N	N	N	N	P1	P2	P1	N2
58	170370	Pm	N	P	P	6	N	N	N	N	N	P3	P4	P1	P2
59	170841	L	N	N	N	9	N	N	P2	N	N	P2	P1	P2	N1
60	170894	Pm	N	N	N	9	P2	P2	P3	N	N	P1	P2	P2	N2
61	171130	N	N	N	N	6	N	N	P3	N	P2	N	P4	P1	P2
62	172459	Pm	N	P	P	0	N	N	P3	N	N	P1	P4	P1	N2
63	173969	Pm	N	P	P	6	N	N	P3	N	N	P1	P3	P2	P2
64	174239	N	N	P	N	4	N	N	P3	N	N	N	P4	P1	P1
65	174444	Pm	N	N	P	9	N	N	N	N	N	N	P4	P2	P2
66	174795	N	N	N	P	9	N	N	P3	N	P2	N	P1	N	N2
67	175709	Pc	Pc	P	P	6	N	N	P3	N	N	P3	P1	P2	N2
68	176114	Pc	Pc	N	N	0	P2	P2	P3	N	N	N	P4	P1	P2
69	176931	N	N	P	P	3	N	N	P3	N	N	N	P4	N	N2
70	178317	N	N	P	P	6	P2	N	P3	N	N	P1	P3	N	N2

71	178352	Pc	N	P	P	9	P2	N	N	N	N	N	P4	P1	P2
72	178636	N	Pb	N	N	L	N	N	N	N	N	P2	P1	N	N1
73	179858	Pm	N	P	N	9	N	N	P2	N	N	N	P4	N	P2
74	181894	N	Pb	N	N	9	N	N	N	N	N	P2	P1	P2	P1
75	183948	N	Pc	N	N	6	N	N	P3	N	N	P1	P1	P1	N1
76	184078	Pm	Pc	N	N	9	N	N	L	N	N	N	L	P1	N1
77	184405	L	N	P	N	L	N	N	P2	P2	N	P3	L	N	L
78	184490	N	Pc	N	P	9	N	N	P2	N	N	N	P3	P1	P1
79	184741	N	N	N	N	9	N	N	P2	N	N	P1	P4	N	N1
80	185524	Pc	N	N	N	6	N	P1	P1	N	N	N	P4	P1	P2
81	185821	N	Pc	P	P	6	N	N	N	N	N	P3	P2	P1	N2
82	186751	Pm	N	P	P	6	N	P2	P3	N	N	N	P4	P2	P2
83	186855	Pm	N	P	P	4	N	N	P3	N	N	N	P4	P1	N2
84	186863	N	N	N	N	9	N	N	P3	N	N	N	P4	N	P2
85	187491	N	Pc	N	N	2	P2	P1	P3	N	N	P1	P3	P2	P2
86	187540	Pm	N	N	N	9	N	N	P2	N	P2	P2	P4	N	P2
87	187711	N	Pc	N	N	4	P2	N	N	N	N	P1	P2	N	P1
88	187807	N	Pb	N	N	4	N	P1	N	N	N	P2	P4	N	N2
89	188113	N	N	P	N	9	N	P1	P3	N	N	N	P2	N	N2
90	189300	N	N	P	N	3	N	N	P3	N	N	N	P4	N	N2
91	190815	N	N	L	N	4	N	N	P3	N	P1	N	L	N	N2
92	191998	N	N	N	N	2	N	N	L	N	N	P2	L	P1	N1
93	195143	N	N	N	N	L	N	N	L	N	N	P1	L	N	N2
94	196338	Pm	N	P	P	9	N	P1	P3	N	N	N	P3	P2	P1
95	196912	L	L	L	L	L	N	L	L	N	N	P3	L	L	N1
96	197169	Pm	N	P	P	9	P2	N	P3	N	P1	N	P4	P2	N2
97	197588	N	N	N	P	9	N	N	P2	N	N	N	P2	N	P1
98	199780	N	N	P	N	4	N	N	P3	N	N	N	P4	P1	P2

3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

1. Ανάλυση του δείγματος

Ενενήντα επτά (97) δείγματα TNBC που συλλέγηκαν αναδρομικά από το νοσοκομείο ΥΓΕΙΑ συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη.

2. Στατιστική μέθοδος

Για κάθε ένα από τους μοριακούς δείκτες ήταν διαθέσιμες οι εξής πληροφορίες για σκοπούς ανάλυσης:

- Claudin 7:

Οι αρχικές τιμές μεταβλητής **cl7** και η μετατροπή της σε δύο νέες μεταβλητές (**newcl7**; **new2cl7**) οι οποίες να προσφέρονται για ανάλυση έγινε ως εξής:

cl7=0 σε newcl7=0

cl7=1-9 σε newcl7=1

και κατά τον ίδιο τρόπο:

cl7= 0-2 (negative – weak low) σε new2cl7=0

cl7=3-9 (moderate – strong high) σε new2cl7=1

- PTEN:

Οι αρχικές τιμές μεταβλητής **pten** και η μετατροπή της σε μια νέα μεταβλητή (**pten2**) η οποία να προσφέρεται για ανάλυση έγινε ως εξής:

pten=N (negative) se pten2=0

pten= P1, P2 (weak positive, positive) to pten2=1

- CMET:

Οι αρχικές τιμές της μεταβλητής **cmet** και η μετατροπή της σε μια νέα μεταβλητή (**cmet2**) η οποία να προσφέρεται για ανάλυση έγινε ως εξής:

cmet=N (negative) to cmet2=0

cmet= P1, P2, P3 (weak, moderate, strong positive) to cmet2=1

- CMYC:

Οι αρχικές τιμές της μεταβλητής **cmyc** και η μετατροπή της σε μια νέα μεταβλητή (**cmyc2**) η οποία να προσφέρεται για ανάλυση έγινεν ως εξής:

cmyc= N1, N2 (<1%, 1-25%) σε cmyc2=0

cmyc= P1, P2 (26-50%, ≥51%) σε cmyc2=1

- CKIT:

Οι αρχικές τιμές μεταβλητή **ckit** και η μετατροπή της σε μια νέα μεταβλητή (**ckit2**) η οποία να προσφέρεται για ανάλυση έγινε ως εξής:

ckit= N (negative) σε kit2=0

ckit= Pc, Pm (positive) σε ckit2=1

- PDL1:

Οι αρχικές τιμές της μεταβλητής **pdl1** και η μετατροπή της σε μια νέα μεταβλητή(**newpdl1**) η οποία να προσφέρεται για ανάλυση έγινε ως εξής:

pdl1=N (negative) σε newpdl1=0

pdl1=P1, P2, P3 (positive cells ≤5%, 6-24%, ≥25%) σε newpdl1=1

- ALK:

Οι αρχικές τιμές της μεταβλητής **alk** και η μετατροπή της σε μια νέα μεταβλητή (**alk2**) η οποία να προσφέρεται για ανάλυση έγινε ως εξής:

alk=N (negative) σε alk2=0 alk=P (positive) σε alk2=1

- CK17:

Οι αρχικές τιμές της μεταβλητής **ck17** και η μετατροπή της σε νέα μεταβλητή (**newck17**) η οποία να προσφέρεται για ανάλυση έγινε ως εξής:

ck17= N (negative) σε newck17=0

ck17=P (positive) σε newck17=1

- CK5/6:

Οι αρχικές τιμές της μεταβλητής **ck56** και η μετατροπή της σε μια νέα μεταβλητή (**newck56**) η οποία να προσφέρεται για ανάλυση έγινε ως εξής:

ck56= N (negative) σε newck56=0

ck56=P (positive) σε newck56=1

- AR (androgen receptor):

Οι αρχικές τιμές της μεταβλητής **ar** και η μετατροπή της σε μια νέα μεταβλητή (**ar2**) η οποία να προσφέρεται για ανάλυση έγινε ως εξής:

ar=N (negative) σε ar2=0

ar=Pb (positive >10%) σε ar2=1

- P63:

Οι αρχικές τιμές της μεταβλητής **p63** και η μετατροπή της σε μια νέα μεταβλητή (**newp63**) η οποία να προσφέρεται για ανάλυση έγινε ως εξής:

p63= N (negative) σε newp63=0

p63=P1, P2 (positive cells <5%, >5%) σε newp63

- P53:

Οι αρχικές τιμές της μεταβλητής **pd53** και η μετατροπή της σε μια νέα μεταβλητή (**newp53**) η οποία να προσφέρεται για ανάλυση έγινε ως εξής:

p53= N (negative) to newp53=0

p53=P1, P2, P3 (positive cells <5%, 5-40%, >40% σε newp53=1

- EGFR:

Οι αρχικές τιμές της μεταβλητής **egfr** και η μετατροπή της σε μια νέα μεταβλητή (**egfr2**) η οποία να προσφέρεται για ανάλυση έγινε ως εξής:

egfr = N (negative) σε egfr2=0

egfr = P1, P2 (low<score200, high>score200) σε egfr2=1

- KI67:

Οι αρχικές τιμές της μεταβλητής **ki67** και η μετατροπή της σε μια νέα μεταβλητή (**newki67**) η οποία να προσφέρεται για ανάλυση έγινε ως εξής:

ki67= P1, P2 (positive cells ≤10%, positive cells 11-30%) σε newki67=0

ki67= P3, P4 (positive cells 31-50%, positive cells >50% σε newki67=1.

Σημειώνεται ότι για την μεταβλητή ki67 δεν υπάρχουν αρνητικές τιμές.

Η σχέση της έκφρασης των μοριακών δεικτών με τον βαθμό κακοήθειας, τον αριθμό των θετικών λεμφαδένων, την λεμφαγγειακή διήθηση, την τοπική υποτροπή και τις απομακρυσμένες μεταστάσεις εξετάστηκε με την χρήση της μεθόδου Fisher's exact test. Χρησιμοποιήθηκαν logistic regression models για αξιολόγηση της επίδρασης της έκφρασης των μοριακών δεικτών στον βαθμό κακοήθειας, τον αριθμό θετικών λεμφαδένων, την λεμφαγγειακή διήθηση, την τοπική υποτροπή και τις απομακρυσμένες μεταστάσεις. Η μέθοδος backward elimination method χρησιμοποιήθηκε για την ανεύρεση μοντέλων με στατιστικά σημαντική επίδραση, με removal criterion $p=10\%$. Cox proportional-hazards regression models, με backward elimination και $p=10\%$, χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της ελεύθερης νόσου επιβίωσης (disease free survival (DFS)) και της συνολικής επιβίωσης (overall survival (OS)).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ανάλυση συμπεριέλαβε 84 ασθενείς. Όλες οι ασθενείς ήταν γυναίκες με μέση ηλικία 49 ετών (25-79 years). Δεκαεφτά (20.2%) είχαν υποβληθεί σε μαστεκτομή και εξήντα εφτά (79.8%) σε αφαίρεση όγκου σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία. Όλοι οι ασθενείς έλαβαν χημειοθεραπεία και όλοι οι ιστολογικοί τύποι ήταν διηθητικά πορογενή καρκινώματα. Ο κάθε μοριακός δείκτης εξετάστηκε σε σχέση με τον βαθμό κακοήθειας, την θετικότητα των λεμφαδένων, την λεμφαγγειακή διήθηση την ελεύθερης νόσου επιβίωση και της συνολικής επιβίωσης.

4.1 Ανάλυση του βαθμού κακοήθειας

Η ανάλυση του βαθμού κακοήθειας έγινε χρησιμοποιώντας το **grade2** variable ως εξαρτώμενη μεταβλητή.

Οι αρχικές τιμές της μεταβλητής και η μετατροπή τους στη νέα μεταβλητή **grade2** που προφέρεται για ανάλυση έγινε ως εξής:

Βαθμός κακοήθειας (grade) =1, 2 σε grade2=0 με n=23/96 Βαθμός κακοήθειας (grade) =3 σε grade2=1 με n=73/96

Το Fisher's exact test έδειξε μια στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ του βαθμού κακοήθειας του όγκου και binding protein cl7, όπως φαίνεται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9. Συσχέτιση των μοριακών δεικτών με τον βαθμό κακοήθειας του όγκου

	Degree of malignancy (grade2) Poorly/moderately differentiated	Well differentiated	Total	Fisher's exact p-value
claudin 7 (newcl7) n (%):				
negative	4(26.7%)	1(1.6%)	5	0.004
weak low to strong high	11(73.3%)	61(98.4%)	72	
Total	15	62	77	
phosphatase - PTEN n (%):				
negative	13(76.5%)	56(83.6%)	69	0.492
weak positive to positive	4(23.5%)	11(16.4%)	15	
Total	17	67	84	

transmembrane receptor tyrosine kinases cmet n (%):				
negative	6(35.3%)	33(50%)	39	0.414
weak to strong positive	11(64.7%)	33(50%)	44	
Total	17	66	83	
protein CMYC n (%):				
positive cells (<1%, 1-25%)	8(50%)	26(38.8%)	34	0.572
positive cells (26-50%, ≥51%)	8(50%)	41(61.2%)	49	
Total	16	67	83	
tyrosine kinases receptor ckit n (%):				
negative	5(35.7%)	41(62.1%)	46	0.082
positive	9(64.3%)	25(37.9%)	34	
Total	14	66	80	
PDL1 (newpdl1) n (%):				
negative	14(82.4%)	61(91%)	75	0.378
positive	3(17.6%)	6(9%)	9	
Total	17	67	84	
tyrosine kinases receptor alk n (%):				
negative	15(88.2%)	66(98.5%)	81	0.103
positive	2(11.8%)	1(1.5%)	3	
Total	17	67	84	
cytokeratins CK17 (newck17) n (%)				
negative	9(56.3%)	36(53.7%)	45	1.000
positive	7(43.7%)	31(46.3%)	38	
Total	16	67	83	
cytokeratins CK5/6 n(%) :				
negative	5(33.3%)	30(44.8%)	35	0.566
positive	10(66.7%)	37(55.2%)	47	
Total	15	67	82	
androgene receptor AR n (%):				
negative	14(87.5%)	55(82.1%)	69	1.000
positive	2(12.5%)	12(17.9%)	14	
total	16	67	83	
protein P63 n (%):				
negative	12(75%)	54(80.6%)	66	0.731
positive	4(25%)	13(19.4%)	17	
Total	16	67	83	
protein P53 (newp53) n (%):				
negative	4(26.7%)	20(30.8%)	24	1.000
positive	11(73.3%)	45(69.2%)	56	
Total	15	65	80	

transmembrane receptor of the epidermal growth factor egfr n %):				
negative	5(31.3%)	23(34.3%)	28	1.000
low to high score	11(68.7%)	44(65.7%)	55	
Total	16	67	83	
cell proliferation index KI67 n (%):				
positive cells ≤ 30%	6(46.2%)	29(43.9%)	35	1.000
positive cells >30%	7(53.8%)	37(56.1%)	44	
Total	13	66	79	

Όπως φαίνεται στον πίνακα 10 πιο κάτω (71 παρατηρήσεις) το logistic regression model απέδωσε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ του βαθμού κακοήθειας του όγκου και της έκφρασης της cl7 (p-value=0.003) αλλά και της έκφρασης της ckit (pvalue=0.026) και της πρωτεΐνης p63 (p-value=0.047).

Πίνακας 10. Logistic regression model με backward elimination (p-value of removal = 0.10) για τον βαθμό κακοήθειας.

Logistic Regression				Number of obs = 71		
Log likelihood= -22.182275				LR chi2(3) = 20.15		
				Prob > chi2 = 0.0002		
				Pseudo R2 = 0.3123		
degree of malignancy	Odds ratio	Std. Err.	z	P> z 	[95% Conf. Interval]	
C-KIT (positive vs negative)	0.140	0.124	-2.22	0.026	0.025	0.793
CLAUDINE7 (weak low to strong high vs negative)	65.788	91.182	3.02	0.003	4.349	995.188
protein P63 (positive vs negative)	0.184	0.157	-1.99	0.047	0.035	0.977
Constant	0.616	0.761	-0.39	0.695	0.055	6.937

4.2 Ανάλυση του αριθμού των θετικών λεμφαδένων

Η ανάλυση του αριθμού θετικών λεμφαδένων έγινε με το **nodes2** variable ως εξαρτώμενη μεταβλητή.

Οι αρχικές τιμές της μεταβλητής nodes και η μετατροπή τους στη νέα μεταβλητή nodes2 που προφέρεται για ανάλυση έγινε ως εξής:

nodes=N0 (αρνητικοί λεμφαδένες) πήρε στο nodes2 τη τιμή 0 με n=55/97 nodes=N1, N2, N3 (θετικοί μεμφαδένες) πήρε στο nodes2 τη τιμή 1 με n=42/97

Το Fisher's exact test έδειξε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της μεταβλητής nodes2 και της πρωτεΐνης p53, όπως φαίνεται στον πίνακα 11 πιο κάτω.

Πίνακας 11. Συσχέτιση του αριθμού θετικών λεμφαδένων με τους μοριακούς δείκτες υπό μελέτη.

Lymph nodes status (nodes2)				
	negative	positive	Total	Fisher's exact p value
claudin 7 n (%):				
negative	3(7.1%)	2(5.7%)	5	1.000
weak low to strong high	39(92.9%)	33(94.3%)	72	
Total	42	35	77	
phosphatase - PTEN n (%):		33(86.8%)	69	0.396
negative	36(78.3%)	5(13.2%)	15	
weak positive to positive	10(21.7%)	38	84	
Total	46			
transmembrane receptor tyrosine kinases cmet n (%):				0.275
negative	19(41.3%)	20(54.1%)	39	
weak to strong positive	27(58.7%)	17(45.9%)	44	
Total	46	37	83	
protein CMYC n (%):				0.116
positive cells (<1%, 1-25%)	15(32.6%)	19(51.4%)	34	
positive cells (26-50%, ≥51%)	31(67.4%)	18(48.6%)	49	
Total	46	37	83	

tyrosine kinases receptor ckit n (%):				
negative	24(54.5%)	22(61.1%)	46	0.651
positive	20(45.5%)	14(38.9%)	34	
Total	44	36	80	
PDL1 n (%):				
negative	41(89.1%)	34(89.5%)	75	1.000
positive	5(10.9%)	4(10.5%)	9	
Total	46	38	84	
tyrosine kinases receptor alk n (%):				
negative	45(97.8%)	36(94.7%)	81	0.587
positive	1(2.2%)	2(5.3%)	3	
Total	46	38	84	
cytokeratins CK17 (n (%):				
negative	22(48.9%)	23(60.5%)	45	0.377
positive	23(51.1%)	15(39.5%)	38	
Total	45	38	83	
cytokeratins CK5/6 n (%):				
negative	19(42.2%)	16(43.2%)	35	1.000
positive	26(57.8%)	21(56.8%)	47	
Total	45	37	82	
androgene receptor AR n (%):				
negative	39(86.7%)	30(78.9%)	69	0.390
positive	6(13.3%)	8(21.1%)	14	
Total	45	38	83	
protein P63 n (%):				
negative	36(80%)	30(78.9%)	66	1.000
positive	9(20%)	8(21.1%)	17	
Total	45	38	83	
protein P53 n (%):				
negative	18(41.9%)	6(16.2%)	24	0.015
positive	25(58.1%)	31(83.8%)	56	
Total	43	37	80	
transmembrane receptor of the epidermal growth factor egfr n (%):				
negative	14(31.1%)	14(36.8%)	28	0.645
low to high score	31(68.9%)	24(63.2%)	55	
Total	45	38	83	
cell proliferation index KI67 n (%):				
positive cells ≤ 30%	18(40.9%)	17(48.6%)	35	0.649
positive cells >30%	26(59.1%)	18(51.4%)	44	
Total	44	35	79	

Όπως φαίνεται στον πίνακα 12 πιο κάτω (71 παρατηρήσεις) το logistic regression model απέδωσε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της θετικότητας των λεμφαδένων και της έκφρασης της p53 πρωτεΐνης (p-value=0.009) αλλά και της έκφρασης του cmet (p-value=0.042), του androgen receptor (p-value=0.085) και του PTEN (p-value=0.100).

Πίνακας 12. Logistic regression model with a backward elimination (p-value of removal = 0.10) for the lymph nodes status

Logistic Regression				Number of obs = 71	
Loglikelihood=-41.177546				LR chi2(3) = 14.93 Prob > chi2 = 0.0049 Pseudo R2 = 0.1534	
lymph nodes	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% conf. interval]
cmet (weak to strong positive vs negative)	0.306	0.178	-2.03	0.042	0.098 0.959
androgen receptor (positive vs negative)	3.727	2.843	1.72	0.085	0.836 16.622
proteinP53 (positive vs negative)	5.090	3.174	2.61	0.009	1.499 17.279
phosphatase - PTEN (weak positive to positive vs negative)	0.305	0.220	-1.65	0.100	0.074 1.253
Constant	0.425	0.240	-1.52	0.128	0.141 1.281

4.3 Ανάλυση της λεμφαγγειακής διήθησης (LVI)

Η ανάλυση της λεμφαγγειακής διήθησης έγινε με την χρήση του **lvi variable** ως εξαρτώμενης μεταβλητής.

Οι τιμές της μεταβλητής lvi είναι:

lvi=0 με n=85/97

lvi=1 με n=12/97

Όπως φαίνεται στον πίνακα 13 πιο κάτω το Fisher's exact test έδειξε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της μεταβλητής lvi και της claudin 7.

Πίνακας 13. Συσχέτιση των μοριακών δεικτών με το LVI

lymphovascular invasion (LVI)				
	no	yes	Total	Fisher's exact p-value
claudin 7 (newcl7) n (%):				
negative	4(5.8%)	1(12.5%)	5	0.431
weak low to strong high	65(94.2%)	7(87.5%)	72	
Total	69	8	77	
claudin 7 (new2cl7) n (%):				
negative-weak low	10(14.5%)	4(50%)	14	0.032
moderate-strong high	59(85.5%)	4(50%)	63	
Total	69	8	77	
phosphatase - PTEN n (%):				
negative	61(81.3%)	8(88.9%)	69	1.000
weak positive to positive	14(18.7%)	1(11.1%)	15	
Total	75	9	84	
transmembrane receptor tyrosine kinases cmet n (%):				
negative	36(48.6%)	3(33.3%)	39	0.490
weak to strong positive	38(51.4%)	6(66.7%)	44	
Total	74	9	83	
protein CMYC n (%):				
positive cells (<1%, 1-25%)	30(40%)	4(50%)	34	0.711
positive cells (26-50%, ≥51%)	45(60%)	4(50%)	49	
Total	75	8	83	
tyrosine kinases receptor ckit n(%):				
negative	41(56.9%)	5(62.5%)	46	1.000
positive	31(43.1%)	3(37.5%)	34	
Total	72	8	80	
PDL1 n (%):				
negative	67(89.3%)	8(88.9%)	75	1.000
positive	8(10.7%)	1(11.1%)	9	
Total	75	9	84	
tyrosine kinases receptor alk n (%):				
negative	73(97.3%)	8(88.9%)	81	0.291
positive	2(2.7%)	1(11.1%)	3	
Total	75	9	84	

cytokeratins CK17 n(%):				
negative	38(51.4%)	7(77.8%)	45	0.170
positive	36(48.6%)	2(22.2%)	38	
Total	74	9	83	
cytokeratins CK5/6 n (%):				
negative	29(39.7%)	6(66.7%)	35	0.161
positive	44(60.3)	3(33.3%)	47	
Total	73	9	82	
androgene receptor AR n (%):				
negative	63(85.1%)	6(66.7%)	69	0.173
positive	11(14.9%)	3(33.3%)	14	
Total	74	9	83	
protein P63 n (%):				
negative	58(78.4%)	8(88.7%)	66	0.678
positive	16(21.6)	1(11.1)	17	
Total	74	9	83	
protein P53 n (%):				
negative	21(29.6%)	3(33.3%)	24	1.000
positive	50(70.4%)	6(66.7%)	56	
Total	71	9	80	
transmembrane receptor of the epidermal growth factor egfr n (%):				
negative	23(31.1%)	5(55.6%)	28	0.157
low to high score	51(68.9%)	4(44.4%)	55	
Total	74	9	83	
cell proliferation index KI67 n (%):				
positive cells ≤ 30%	29(40.8%)	6(75%)	35	0.129
positive cells >30%	42(59.2%)	2(25%)	44	
Total	71	8	79	

Όπως φαίνεται στον πίνακα 14 (69 παρατηρήσεις) το logistic regression model απέδωσε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της λεμφαγγειακής διήθησης και της έκφρασης των cytokeratins ck5/6 (p-value=0.026) αλλά και του androgen receptor (pvalue=0.031).

Πίνακας 14. Logistic regression model με backward elimination (p -value of removal = 0.10) για το LVI

Logistic Regression				Number of obs = 69			
				LR chi2(3)	=	10.04	
				Prob > chi2	=	0.0066	
likelihood = -19.7357				Pseudo R2	=	0.2027	
lymphovascular LVI	Odds Ratio	invasion - Std. Err.	Z	P> z	[95%Conf. Interval]		
cytokeratins ck5/6 (positive Vs negative)		0.072	0.085	-2.22	0.026	0.007	0.732
Androgen receptor (positive Vs negative)		13.435	16.142	2.16	0.031	1.275	141.561
Constant		0.211	0.106	-3.08	0.002	0.78	0.567

4.4 Ανάλυση της τοπικής υποτροπής (LR)

Η ανάλυση για την τοπική υποτροπή έγινε με την χρήση του LR2 variable ως εξαρτώμενης μεταβλητής.

Οι τιμές της μεταβλητής lr2 είναι:

$$lr2=0 \text{ με } n=70/78$$

$$lr2=1 \text{ με } n=8/78$$

Όπως φαίνεται στον πίνακα 15 πιο κάτω το Fisher's exact test δεν έδειξε κάποια στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της τοπικής υποτροπής και κάποιου από τους μοριακούς δείκτες.

Σε ότι αφορά το logistic regression model οι 41 παρατηρήσεις που ήταν διαθέσιμες δεν αποτελούσαν ικανοποιητικό μέγεθος δείγματος για την ανάλυση.

Πίνακας 15. Συσχέτιση της τοπικής υποτροπής με τους υπό μελέτη μοριακούς δείκτες

local recurrence LR (lr2)				
	no	yes	Total	Fisher's exact pvalue
claudin 7 (newcl7) n (%):				
negative	3(5.1%)	1(16.7%)	4	0.328
weak low to strong high	56(94.9%)	5(83.3%)	61	
Total	59	6	65	
phosphatase - PTEN n (%):				
negative	49(77.8%)	8(100%)	57	0.342
weak positive to positive	14(22.2%)	0(0%)	14	
Total	63	8	71	
transmembrane receptor tyrosine kinases cmet n (%):				
negative	30(48.4%)	4(50%)	34	1.000
weak to strong positive	32(51.6%)	4(50%)	36	
Total	62	8	70	
protein CMYC n (%):				
positive cells (<1%, 1-25%)	24(38.7%)	4(50%)	28	0.705
positive cells (26-50%, ≥51%)	38(61.3%)	4(50%)	42	
Total	62	8	70	
tyrosine kinases receptor ckit n (%):				
negative	36(60%)	3(37.5%)	39	0.272
positive	24(40%)	5(62.5%)	29	
Total	60	8	68	
PDL1 n (%):				
negative	56(88.9%)	8(100%)	64	1.000
positive	7(11.1%)	0(0%)	7	
Total	63	8	71	
tyrosine kinases receptor alk n (%):				
negative	60(95.2%)	8(100%)	68	1.000
positive	3(4.8%)	0(0%)	3	
Total	63	8	71	
cytokeratins CK17 n (%):				
negative	38(60.3%)	4(50%)	42	0.708
positive	25(39.7%)	4(50%)	29	
Total	63	8	71	

cytokeratins CK5/6 n (%):				
negative	31(50%)	2(0.25%)	33	0.266
positive	31(50%)	6(0.75%)	37	
Total	62	8	70	
androgene receptor AR n (%):				
negative	56(88.9%)	5(62.5%)	61	0.078
positive	7(11.1%)	3(37.5%)	10	
Total	63	8	71	
protein P63 n (%):				
negative	53(84.1%)	6(75%)	59	0.615
positive	10(15.9%)	2(25%)	12	
Total	63	8	71	
protein P53 n (%):				
negative	16(26.7%)	5(62.5%)	21	0.096
positive	44(73.3%)	3(37.5%)	47	
Total	60	8	68	
transmembrane receptor of the epidermal growth factor egfr n (%):				
negative	24(38.1%)	2(25%)	26	0.701
low to high score	39(61.9%)	6(75%)	45	
Total	63	8	71	
cell proliferation index KI67 n (%):				
positive cells ≤ 30%	25(42.4%)	4(50%)	29	0.719
positive cells >30%	34(57.6%)	4(50%)	38	
Total	59	8	67	

4.5. Ανάλυση των απομακρυσμένων μεταστάσεων

Η ανάλυση των απομακρυσμένων μεταστάσεων έγινε με το **dismet2** variable ως εξαρτώμενη μεταβλητή.

Οι τιμές της μεταβλητής dismet2 είναι:

dismet2=0 με n=62/78

dismet2=1 με n=16/78

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 16 το Fisher's exact test δεν έδειξε κάποια στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των απομακρυσμένων μεταστάσεων και κάποιου από τους μοριακούς δείκτες που μελετήθηκαν.

Πίνακας 16. Συχέτιση των απομακρυσμένων μεταστάσεων με τους υπό μελέτη μοριακούς δείκτες

distant metastasis (dismet2)				
	no	yes	Total	Fisher's exact p-value
claudin 7 (newcl7) n (%):				
negative	4(7.8%)	0(0%)	4	0.569
weak low to strong high	47(92.2%)	14(100%)	61	
Total	51	14	65	
phosphatase - PTEN n (%):				
negative	47(83.9%)	10(66.7%)	57	0.155
weak positive to positive	9(16.1%)	5(33.3%)	14	
Total	56	15	71	
transmembrane receptor tyrosine kinases cmet n (%):				
negative	30(54.5%)	4(26.7%)	34	0.081
weak to strong positive	25(45.5%)	11(73.3%)	36	
Total	55	15	70	
protein CMYC n (%):				
positive cells (<1%, 1-25%)	20(35.7%)	8(57.1%)	28	0.222
positive cells (26-50%, ≥51%)	36(64.3%)	6(42.9%)	42	
Total	56	14	70	
tyrosine kinases receptor ckit n (%): negative	31(55.4%)	8(66.7%)	39	0.536
positive	25(44.6)	4(33.3%)	29	
Total	56	12	68	
PDL1 n (%):				
negative	51(91.1%)	13(86.7%)	64	0.634
positive	5(8.9%)	2(13.3%)	7	
Total	56	15	71	
tyrosine kinases receptor alk n (%):				
negative	54(96.4%)	14(93.3%)	68	0.515
positive	2(3.6%)	1(6.7%)	3	
Total	56	15	71	

cytokeratins CK17 n (%):				
negative	31(55.4%)	11(73.3%)	42	0.249
positive	25(44.6%)	4(26.7%)	29	
Total	56	15	71	
cytokeratins CK5/6 n (%):				
negative	25(45.5%)	8(53.3%)	33	0.771
positive	30(54.5%)	7(46.7%)	37	
Total	55	15	70	
androgene receptor AR n (%)				
negative	49(87.5)	12(80%)	61	0.431
positive	7(12.5%)	3(20%)	10	
Total	56	15	71	
protein P63 n (%)				
negative	45(80.4%)	14(93.3%)	59	0.439
positive	11(19.6)	1(6.7%)	12	
Total	56	15	71	
protein P53 n (%)				
negative	19(35.2%)	2(14.3%)	21	0.197
positive	35(64.8%)	12(85.7%)	47	
Total	54	14	68	
transmembrane receptor of the epidermal growth factor egfr n (%):				
negative	21(37.5%)	5(33.3%)	26	1.000
low to high score	35(62.5%)	10(66.7%)	45	
Total	56	15	71	
cell proliferation index KI67 n (%)				
positive cells $\leq$ 30%	20(37%)	9(69.2%)	29	0.059
positive cells >30%	34(63%)	4(30.8%)	38	
Total	54	13	67	

Μόνο 41 παρατηρήσεις ήταν διαθέσιμες για το logistic regression model οι οποίες δεν αποτελούσαν καλό μέγεθος δείγματος για ανάλυση.

4.6. Συσχέτιση μεταξύ των μοριακών δεικτών

Η συσχέτιση μεταξύ των μοριακών δεικτών εξετάστηκε με το Fisher's exact test. Στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στους Πίνακες 17-22.

- Το ckit status ήταν διαθέσιμο για 79 γυναίκες με 45 αρνητικές και 34 θετικές περιπτώσεις. Το cytokeratins (ck5/6) status ήταν διαθέσιμο για 79 γυναίκες με 33 αρνητικές και 46 θετικές περιπτώσεις. Fisher's exact test έδειξε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των δεικτών αυτών με $p\text{-value}=0.022$ (πίνακας 17).

Πίνακας 17. Fisher's exact test for association between ckit and cytokeratins ck5/6

Ckit	cytokeratins ck5/6		Total
	negative	positive	
Negative	24	21	45
Positive	9	25	34
Total	33	46	79
2-sided Fisher's exact = 0.022			

- Το ckit status ήταν διαθέσιμο για 80 γυναίκες με 46 αρνητικές και 34 θετικές περιπτώσεις και το EGFR status ήταν διαθέσιμο για 80 γυναίκες με 27 αρνητικές και 53 θετικές περιπτώσεις. Fisher's exact test έδειξε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των δεικτών αυτών με $p\text{-value}=0.055$ (πίνακας 18).

Πίνακας 18. Fisher's exact test for association between tyrosine kinases receptor ckit and transmembrane receptor of the epidermal growth factor

tyrosine kinases receptor ckit	transmembrane receptor of the epidermal growth factor EGFR		Total
	negative score	low – high	
Negative	20	26	46
Positive	7	27	34
Total	27	53	80
2-sided Fisher's exact = 0.055			

- Το AR status ήταν διαθέσιμο για 82 γυναίκες με 68 αρνητικές και 14 θετικές περιπτώσεις και το cmet status ήταν διαθέσιμο για 82 γυναίκες με 39 αρνητικές και 43 θετικές περιπτώσεις. Fisher's exact test έδειξε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των δεικτών αυτών με $p\text{-value}=0.041$ (πίνακας 19).

Πίνακας 19. Fisher's exact test for association between androgen receptor and transmembrane receptor tyrosine kinases

androgen receptor	transmembrane receptor tyrosine kinases cmet		Total
	negative	positive	
Negative	36	32	68
Positive	3	11	14
Total	39	43	82
2-sided Fisher's exact = 0.041			

- Το CK5/6 status ήταν διαθέσιμο για 82 γυναίκες με 35 αρνητικές και 47 θετικές περιπτώσεις και το EGFR status ήταν διαθέσιμο για 82 γυναίκες με 27 αρνητικές και 55 θετικές περιπτώσεις. Fisher's exact test έδειξε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των δεικτών αυτών με $p\text{-value}=0.004$ (πίνακας 20).

Πίνακας 20. Fisher's exact test for association between cytokeratins ck5/6 and transmembrane receptor of the epidermal growth factor

cytokeratins ck5/6	transmembrane receptor of the epidermal growth factor EGFR		Total
	negative	low – high score	
Negative	18	17	35
Positive	9	38	47
Total	27	55	82
2-sided Fisher's exact = 0.004			

- Το CK17 status ήταν διαθέσιμο για 79 γυναίκες με 41 αρνητικές και 38 θετικές περιπτώσεις και το Ki67 status ήταν διαθέσιμο για 79 γυναίκες με 35 περιπτώσεις με θετικά κύτταρα $\leq 30\%$ και 44 περιπτώσεις με θετικά κύτταρα $>30\%$. Fisher's exact test έδειξε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των δεικτών αυτών με $p\text{value}=0.041$ (πίνακας 21).

Πίνακας 21. Fisher's exact test for association between cytokeratins ck17 and cell proliferation index – ki67

cytokeratins ck17	cell proliferation index - ki67 positive cells		Total
	$\leq 30\%$	$>30\%$	
Negative	23	18	41
Positive	12	26	38
Total	35	44	79
2-sided Fisher's exact = 0.041			

- Το cmet status ήταν διαθέσιμο για 78 γυναίκες με 38 αρνητικές και 40 θετικές περιπτώσεις και το Ki67 status ήταν διαθέσιμο για 78 γυναίκες με 35 περιπτώσεις με θετικά κύτταρα $\leq 30\%$ και 43 περιπτώσεις με θετικά κύτταρα $>30\%$. Fisher's exact test έδειξε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των δεικτών αυτών με $p\text{value}=0.002$ (πίνακας 22).

Πίνακας 22. Fisher's exact test for association between transmembrane receptor tyrosine kinases and cell proliferation index – ki67

transmembrane receptor tyrosine kinases cmet	cell proliferation index - ki67 positive cells positive cells		Total
	$\leq 30\%$	$>30\%$	
Negative	10	28	38
Positive	25	15	40
Total	35	43	78
2-sided Fisher's exact = 0.002			

4.8 Ανάλυση επιβίωσης

4.8.1 Ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS)

Ως ελεύθερη νόσου επιβίωση ορίζεται η χρονική περίοδος μετά την πρωταρχική θεραπεία όπου ο ασθενής δεν έχει κανένα σύμπτωμα. Στην παρούσα έρευνα τα διαθέσιμα στοιχεία επέτρεπαν μόνο την αξιολόγηση της ελεύθερης νόσου επιβίωσης ως discrete variable (ναι ή όχι) κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης και μέχρι την εκάστοτε τελευταία ημερομηνία παρακολούθησης. Η DFS αναλύθηκε μεταξύ των διαφόρων ασθενών με διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των μοριακών δεικτών με την χρήση του log-rank test με στατιστικά σημαντικό επίπεδο το 5%. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 21. Σύμφωνα με το log-rank test, μόνο για το kid67 απεδείχθη στατιστικά σημαντική σχέση με το DFS ($p\text{-value}=0.0378$). Η συσχέτιση τους επιβεβαιώθηκε επίσης με το Cox regression model με backward elimination ($p\text{-value}=0.048$), πίνακας 23. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης Kaplan-Meier καμπύλες (Διαγράμματα 1-14).

Πίνακας 23. Disease free survival by biomarkers' levels

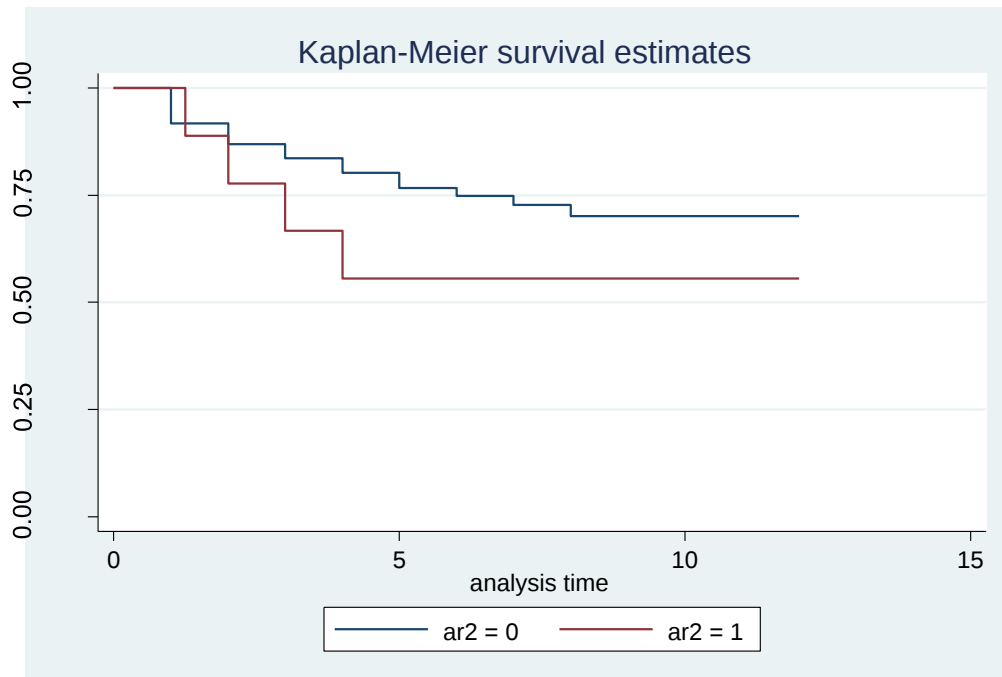
Biomarkers				
<u>Log-rank test</u>				
	Events observed	Events expected	chi -2(1)	p-v alue
tyrosine kinases receptor ckit:				
positive	8	8.32	0.02	0.8765
negative	10	9.68		
total	18	18.00		
androgen receptor:				
positive	4	2.54	0.99	0.3205
negative	17	18.46		
total	21	21.00		
cytokeratins ck5/6:				
positive	12	11.81	0.01	0.9307
negative	9	9.19		
total	21	21.00		
cytokeratins ck17:				
positive	7	9.13	0.91	0.3390
negative	14	11.87		
total	21	21.00		

claudin 7:				
moderate to strong high	15	14.73	0.03	0.8672
negative to weak low	3	3.27		
total	18	18.00		
phosphatase – PTEN:				
positive	4	3.86	0.01	0.9380
negative	17	17.14		
total	21	21.00		
protein p63:				
positive	2	3.76	1.04	0.3073
negative	19	17.24		
total	21	21.00		
protein p53:				
positive	13	13.64	0.10	0.7558
negative	7	6.36		
total	20	20.00		
tyrosine kinases receptor ALK:				
positive	1	0.94	0.00	0.9491
negative	20	20.06		
total	21	21.00		
PDL1:				
positive	2	2.15	0.01	0.9117
negative	19	18.85		
total	21	21.00		
transmembrane receptor: tyrosine kinases cmet				
positive	13	10.59	1.15	0.2838
negative	8	10.41		
total	21	21.00		
cell proliferation index - ki67:				
positive cells > 30%	7	11.36	4.32	0.0 378
positive cells ≤ 30%	12	7.64		
total	19	19.00		
transmembrane receptor of the epidermal growth factor:				
low to high score	14	13.38	0.08	0.7760
negative	7	7.62		
total	21	21.00		
protein CMYC:				
positive cells (26-50%, ≥51%)	9	12.62	2.93	0.0869
positive cells (<1%, 1-25%)	11	7.38		

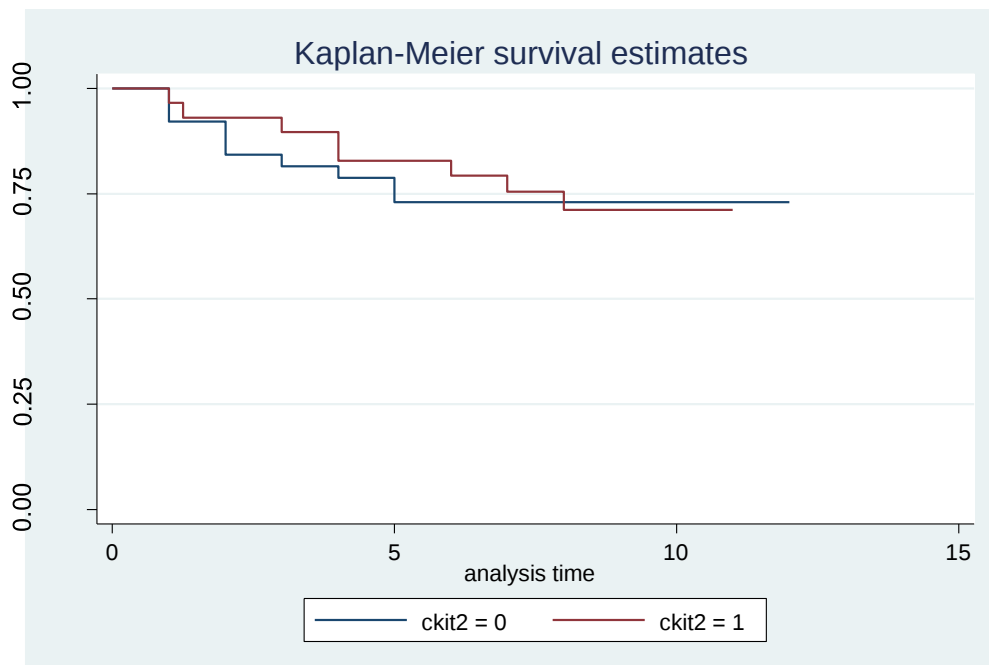
Πίνακας 24. Cox regression model with backward elimination for disease free survival data

Cox regression–Breslow methods for ties						
No. of subjects	=	66	Number of obs = 66			
No. of failures	=	19				
Time at risk	=	453.25	LRchi2(1) = 4.08			
			Prob>chi2 = 0.0434			
Log likelihood	=	-74.149511				
_t	Hazard Ratio	Std. Err.	Z	P> z 	[95% Conf. Interval]	
cell proliferation index ki67	0.390	0.186	-1.97	0.048	0.153	0.994

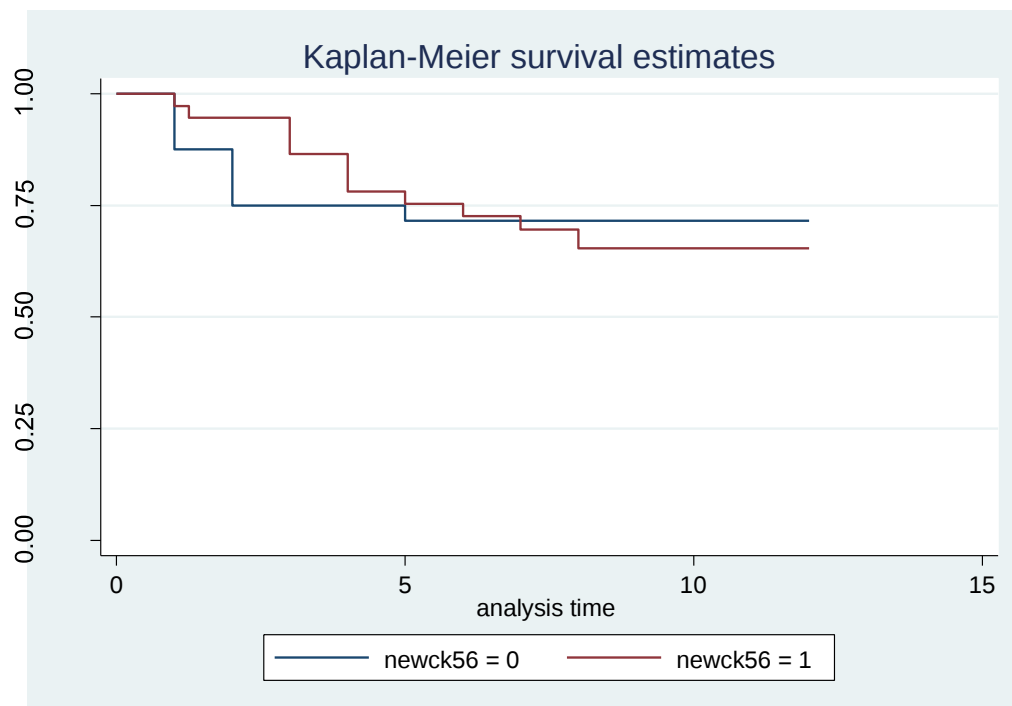
KAPLAN-MEIER GRAPHS FOR DISEASE FREE SURVIVAL



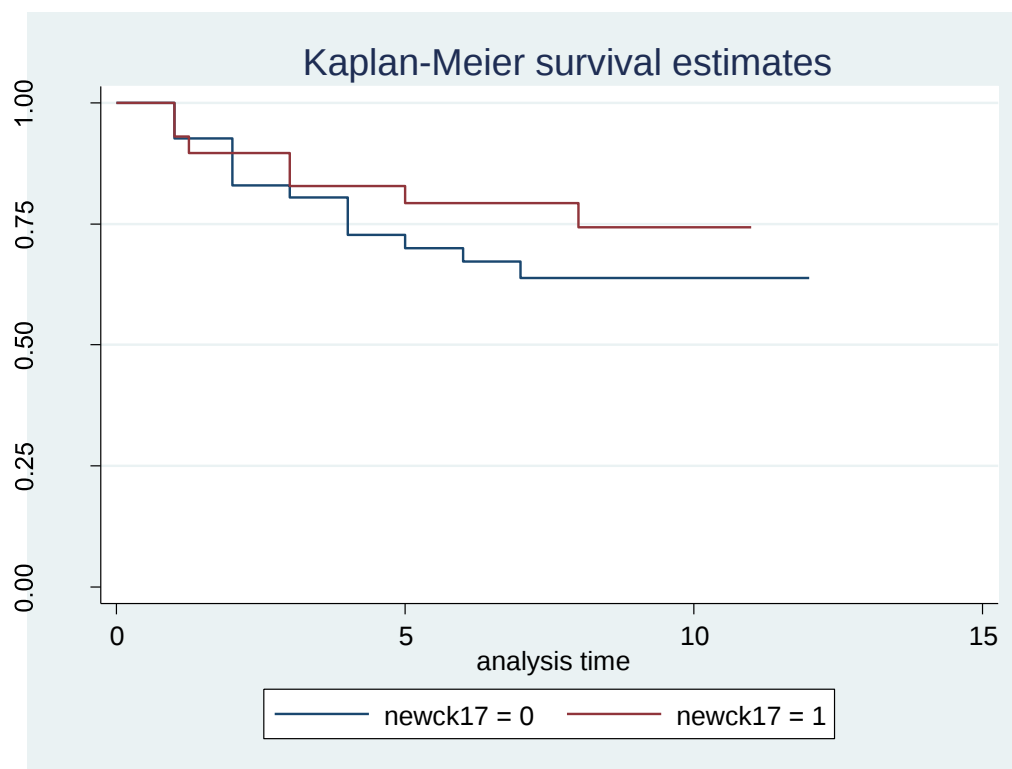
Διάγραμμα 1: Kaplan-Meier survival estimates for androgen receptor receptor



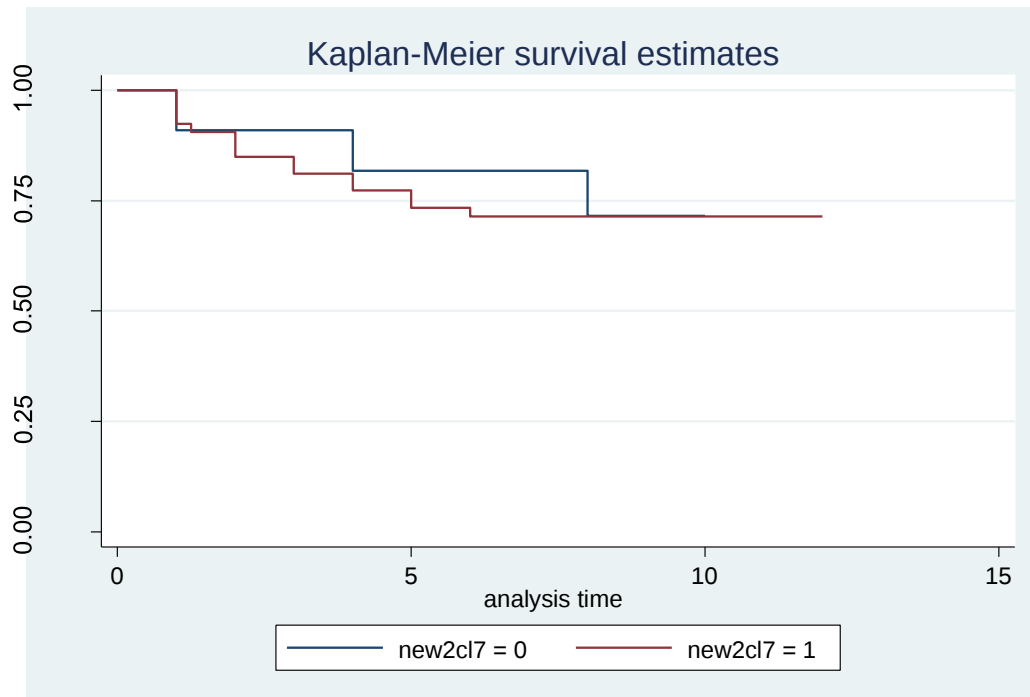
Διάγραμμα 2: Kaplan-Meier survival estimates for tyrosine kinases



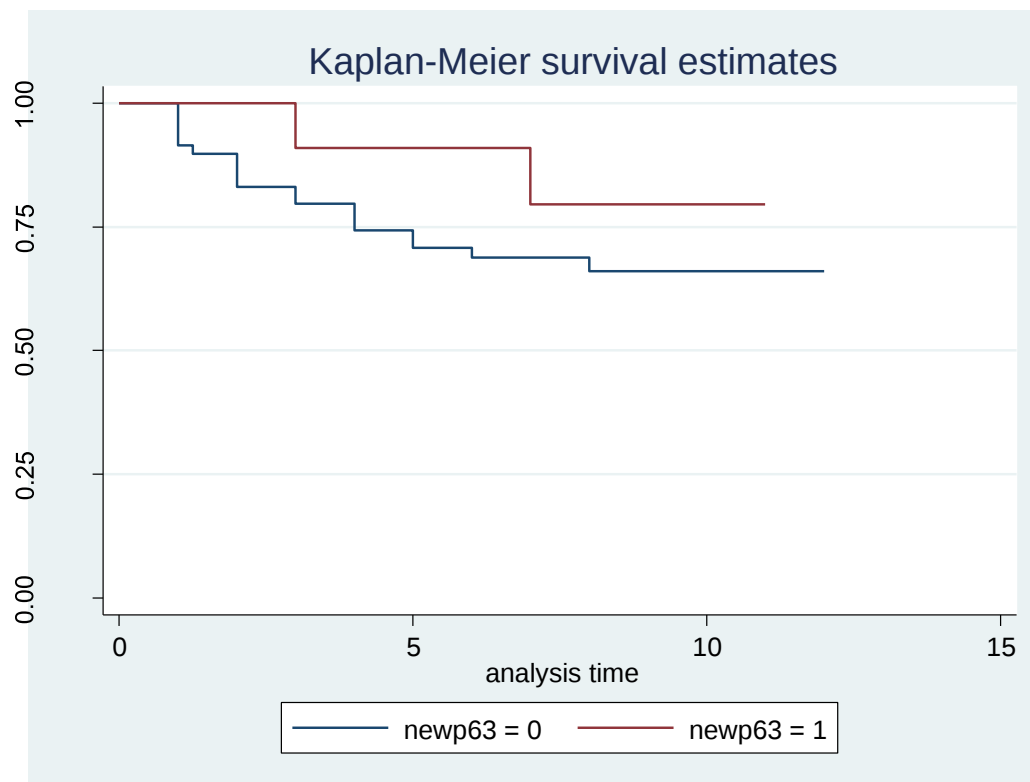
Διάγραμμα 3: Kaplan-Meier survival estimates for cytokeratin ck5/6



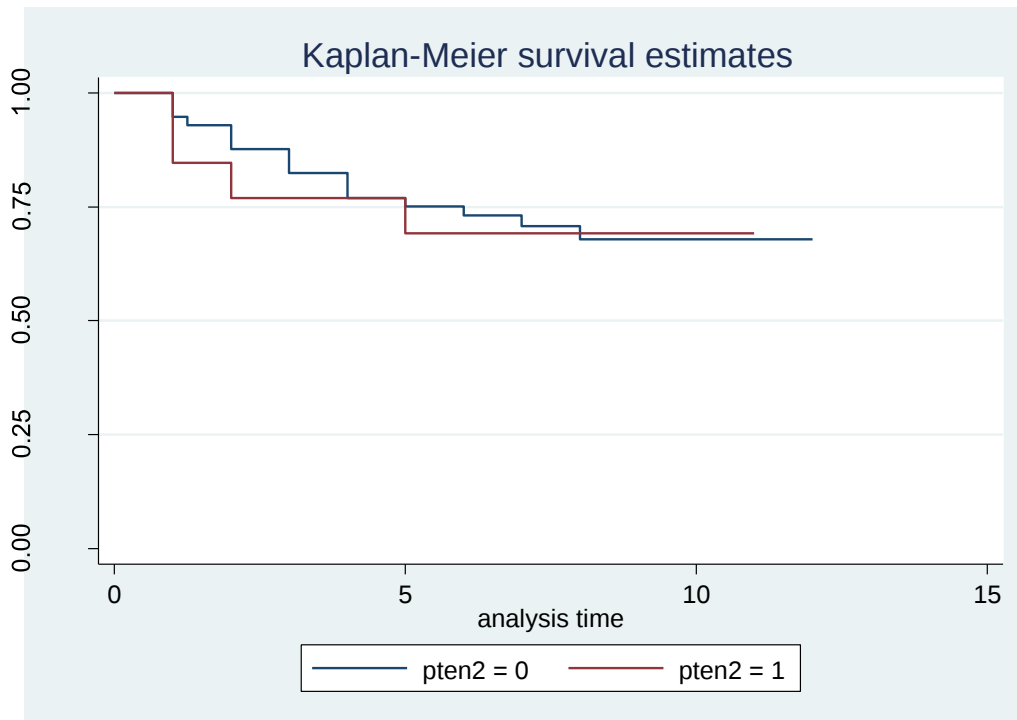
Διάγραμμα 4. Kaplan-Meier survival estimates for cytokeratin ck17



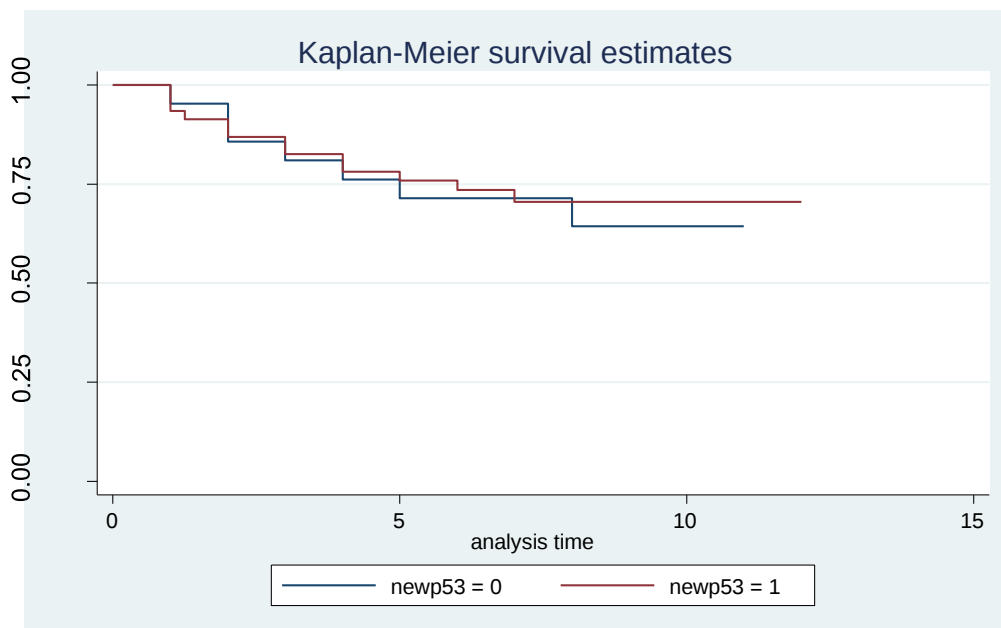
Διάγραμμα 5. Kaplan-Meier survival estimates for claudin 7



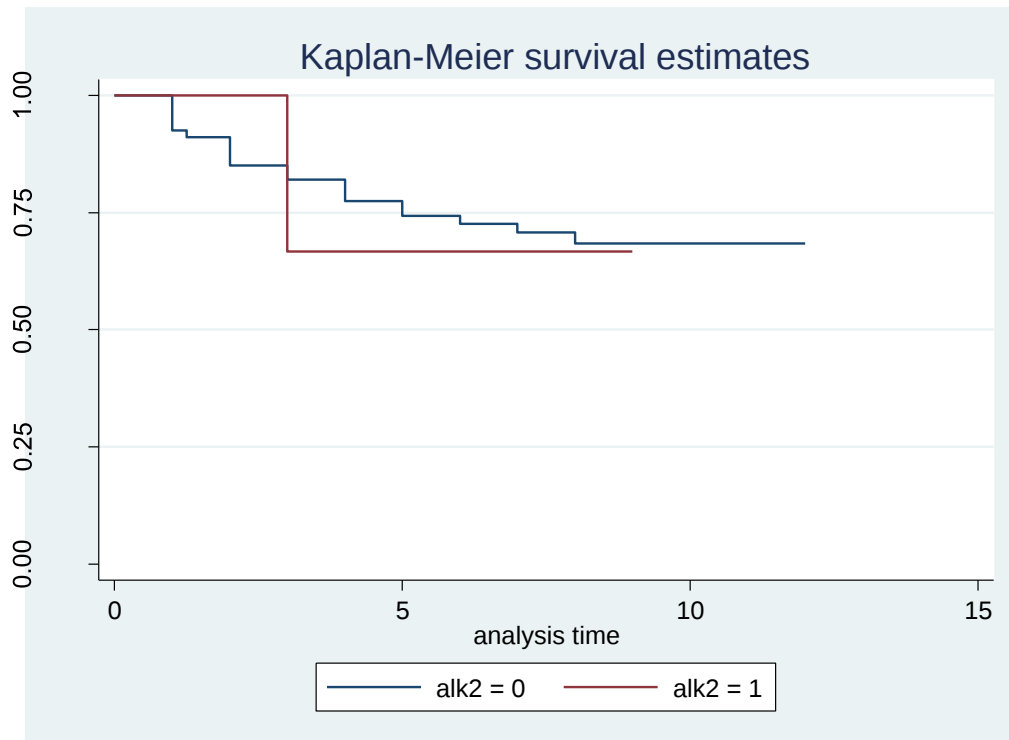
Διάγραμμα 6. Kaplan-Meier survival estimates for phosphatase - PTEN



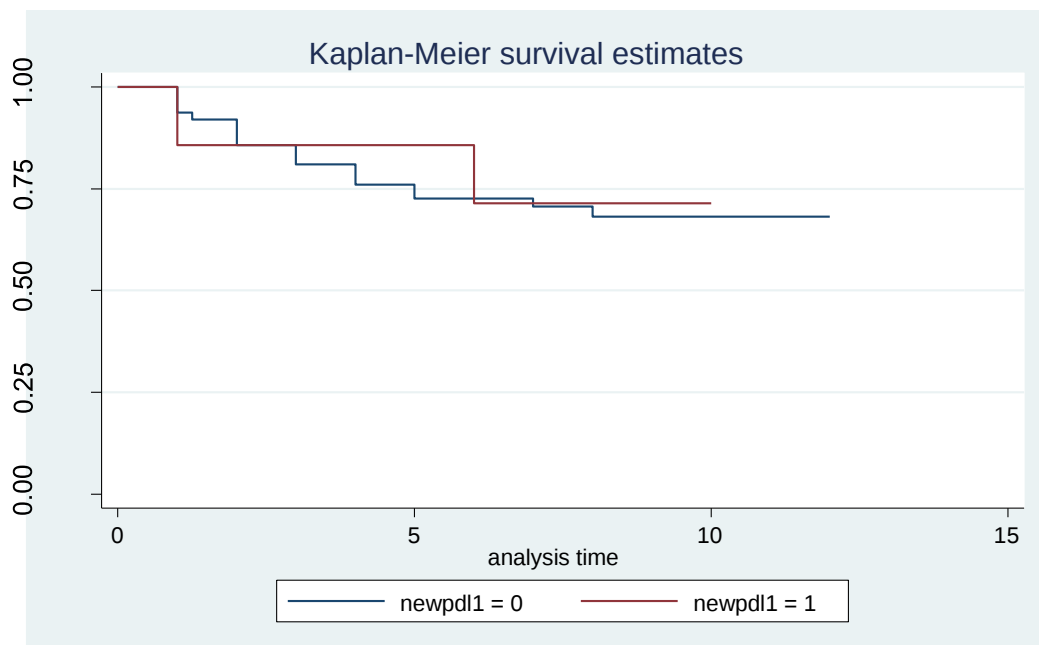
Διάγραμμα 7. Kaplan-Meier survival estimates for protein p63



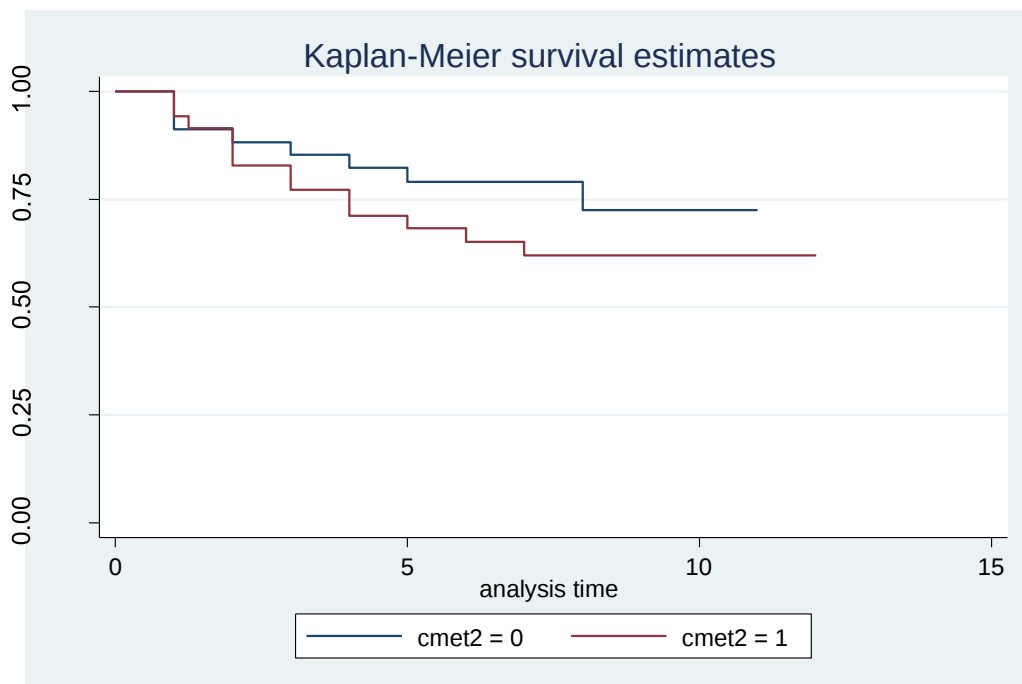
Διάγραμμα 8. Kaplan-Meier survival estimates for protein p53



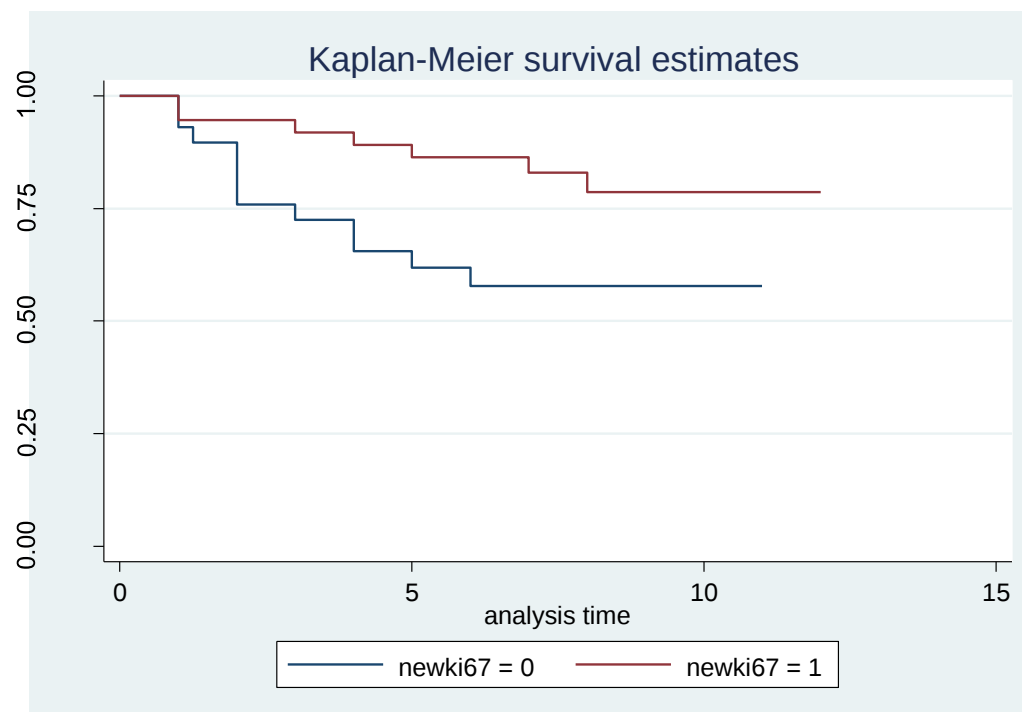
Διάγραμμα 9. Kaplan-Meier survival estimates for tyrosine kinases receptor



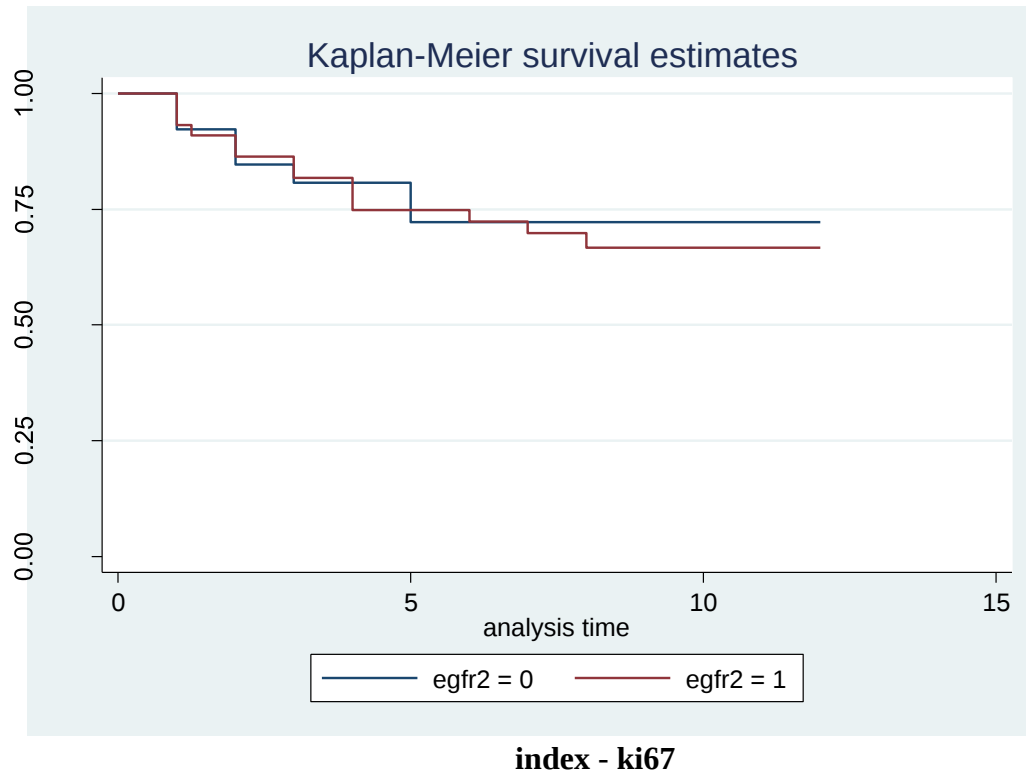
Διάγραμμα 10. Kaplan-Meier survival estimates for PDL1



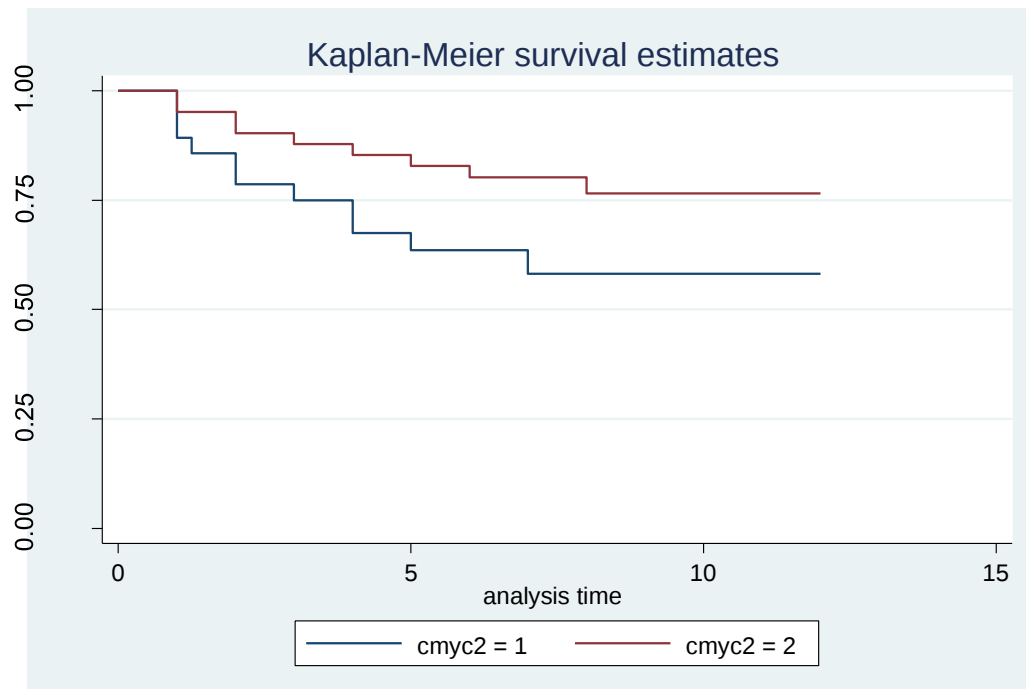
Διάγραμμα 11: Kaplan-Meier survival estimates for transmembrane receptor tyrosine kinases



Διάγραμμα 12: Kaplan-Meier survival estimates for cell proliferation



Διάγραμμα 13: Kaplan-Meier survival estimates for transmembrane receptor of the epidermal growth factor



Διάγραμμα 14: Kaplan-Meier survival estimates for protein CMYC

4.8.2 Συνολική επιβίωση (OS)

Ως συνολική επιβίωση ορίζεται η χρονική περίοδος από την μέρα της διαγνώσεως μέχρι την μέρα θανάτου από την νόσο. Στην παρούσα έρευνα τα διαθέσιμα στοιχεία επέτρεπαν μόνο την αξιολόγηση της συνολικής επιβίωσης ως discrete variable (ναι ή όχι) κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης και μέχρι την εκάστοτε τελευταία ημερομηνία παρακολούθησης. Η OS αναλύθηκε μεταξύ των διαφόρων ασθενών με διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των μοριακών δεικτών με την χρήση του log-rank test με στατιστικά σημαντικό επίπεδο το 5%. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 23. Σύμφωνα με το log-rank test, μόνο το ki67 απεδείχθη στατιστικά σημαντικό για τη συνολική επιβίωση OS (p-value=0.0186). Η σημασία του επιβεβαιώθηκε επίσης με το Cox regression model με backward elimination (p-value=0.048), πίνακας 25.

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης Kaplan-Meier καμπύλες (Διαγράμματα 15-28).

Πίνακας 25. Overall survival by biomarkers' levels

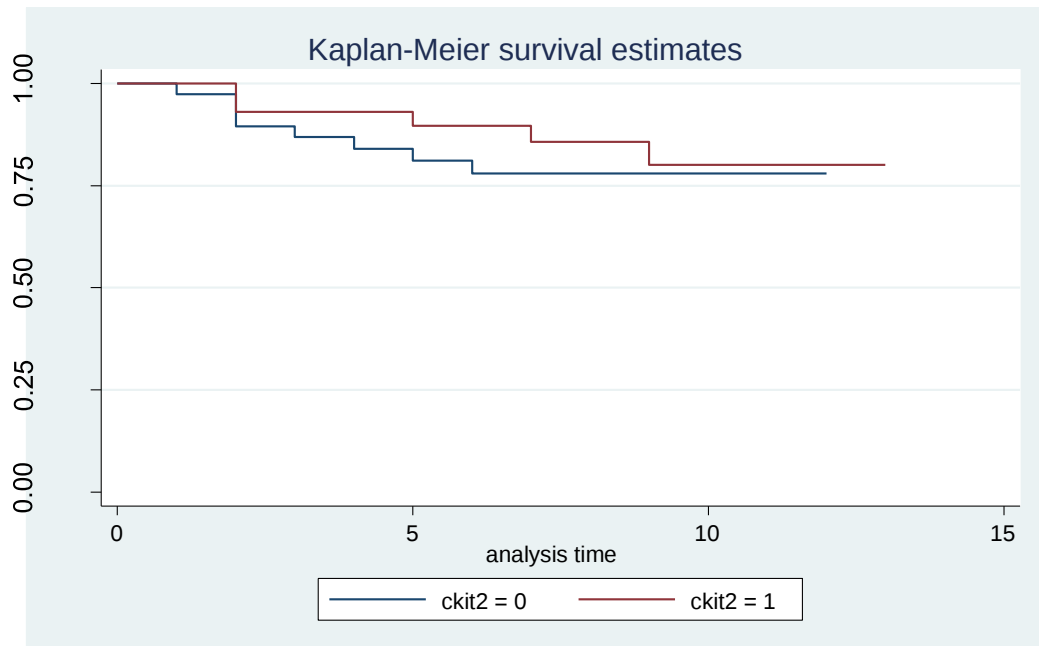
Biomarkers				
<u>Log-rank test</u>				
	Events observed	Events expected	chi -2(1)	p-value
Tyrosine kinases receptor:				
positive	5	6.06	0.36	0.5482
negative	8	6.94		
total	13	13.00		
androgen receptor:				
positive	3	2.04	0.53	0.4676
negative	13	13.96		
total	16	16.00		
cytokeratins ck5/6:				
positive	8	9.06	0.30	0.5853
negative	8	6.94		
total	16	16.00		
cytokeratins ck17:				
positive	5	6.89	0.94	0.3320
negative	11	9.11		
total	16	16.00		

claudin 7:				
moderate to strong high	12	11.47	0.14	0.7090
negative to weak low	2	2.53		
total	14	14.00		
phosphatase – PTEN:				
positive	4	2.93	0.49	0.4830
negative	12	13.07		
total	16	16.00		
protein p63:				
positive	0	2.84	3.56	0.0592
negative	16	13.16		
total	16	16.00		
protein p53:				
positive	11	10.16	0.22	0.6358
negative	4	4.84		
total	15	15.00		
tyrosine kinases eceptor:				
positive	1	0.72	0.12	0.7279
negative	15	15.28		
total	16	16.00		
PDL1:				
positive	3	1.58	1.46	0.2269
negative	13	14.42		
total	16	16.00		
transmembrane receptor tyrosine kinases:				
positive	11	8.24	1.97	0.1609
negative	5	7.76		
total	16	16.00		
cell proliferation index - ki67:				
positive cells > 30%	4	8.25	5.54	0.01 86
positive cells ≤ 30%	10	5.75		
total	14	14.00		
transmembrane receptor of the epidermal growth factor:				
low to high score	10	10.46	0.06	0.8071
negative	6	5.54		
total	16	16.00		
protein CMYC:				
positive cells (26-50%, ≥51%)	6	9.39	3.40	0.0653
positive cells (<1%, 1-25%)	9	5.61		
total	15	15.00		

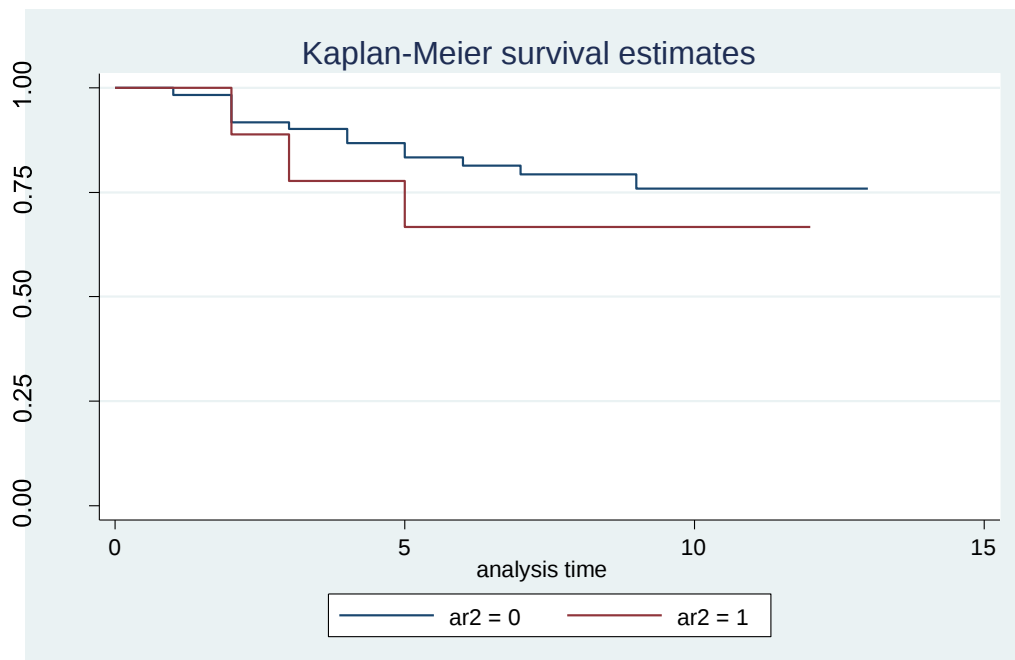
Πίνακας 26. Cox regression model with backward elimination for overall survival data

Cox regression – Breslow methods for ties						
No. of subjects	=	66	Number of obs	=	66	
No. of failures	=	19				
Time at risk	=	453.25	LRchi2(1)	=	5.30	
			Prob>chi2	=	0.0213	
Log likelihood	=	-53.679639				
_t	Hazard Ratio	Std. Err.	Z	P> z 	[95% Conf. Interval]	
cell proliferation index ki67	0.277	0.164	-2.16	0.030	0.087	0.886
Cox regression – Breslow methods for ties						
No. of subjects	=	66	Number of bs	=	66	
No. of failures	=	14				
Time at risk	=	491	LRchi2(1)	=	5.30	
			Prob>chi2	=	0.0213	
Log likelihood	=	-53.679639				
_t	Hazard Ratio	Std. Err.	Z	P> z 	[95% Conf. Interval]	
cell proliferation index ki67	0.277	0.165	-2.16	0.030	0.087	0.886

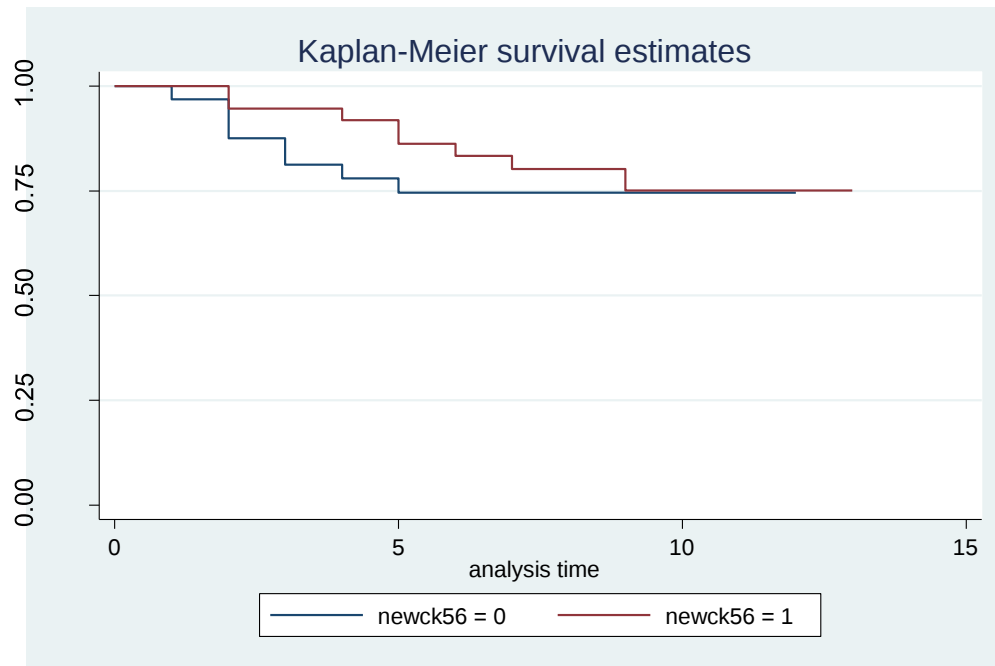
KAPLAN-MEIER GRAPHS FOR OVERALL SURVIVAL



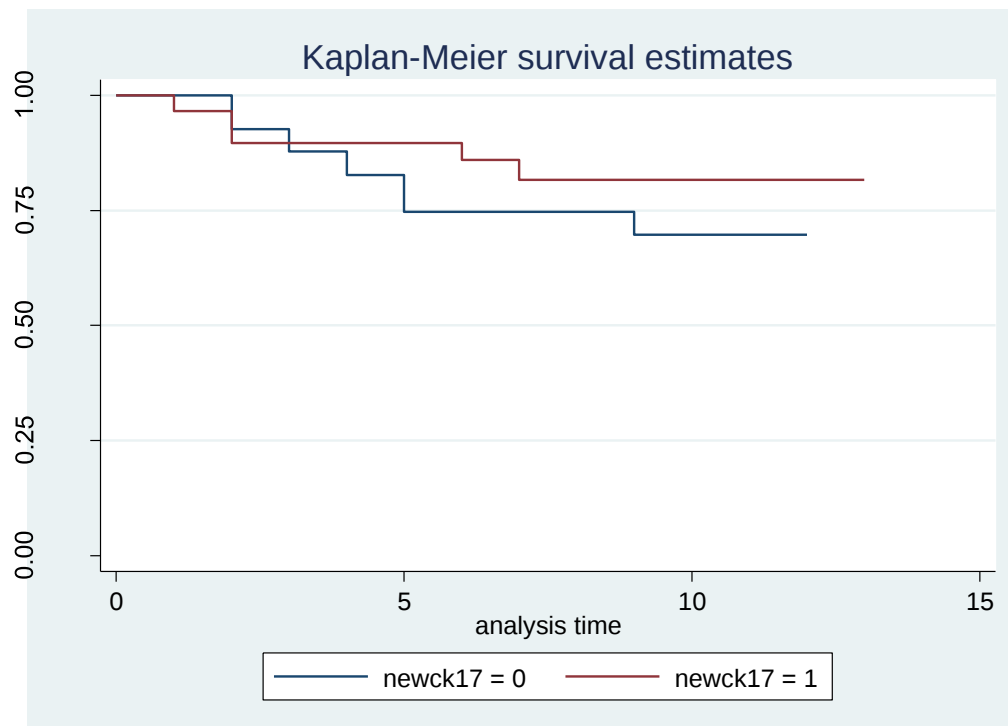
Διάγραμμα 15: Kaplan-Meier survival estimates for tyrosine kinases receptor



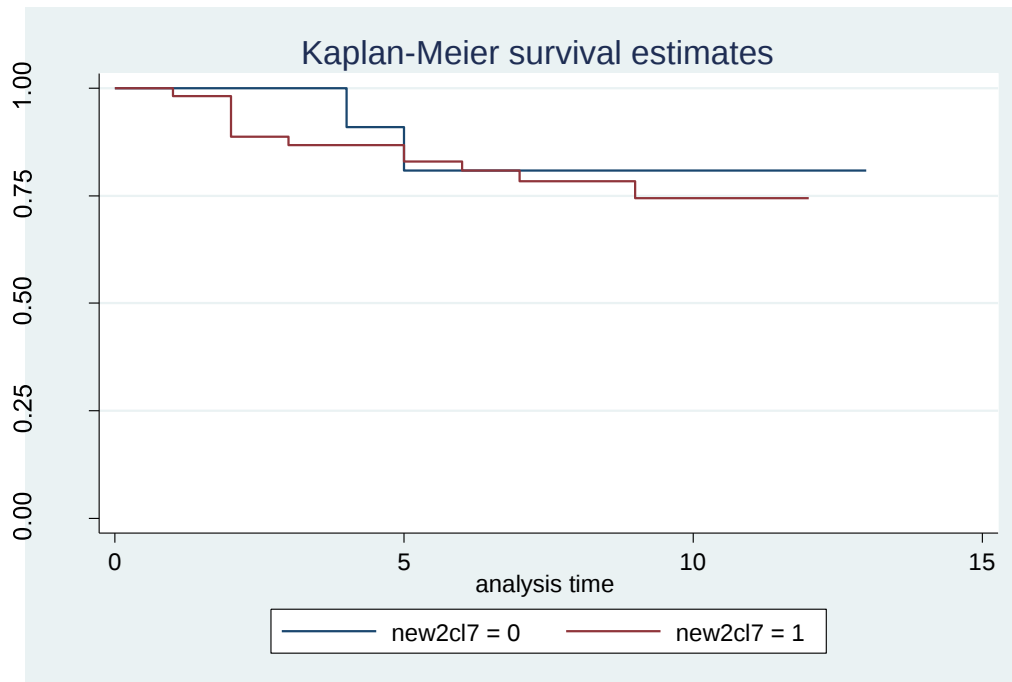
Διάγραμμα 16: Kaplan-Meier survival estimates for androgen receptor



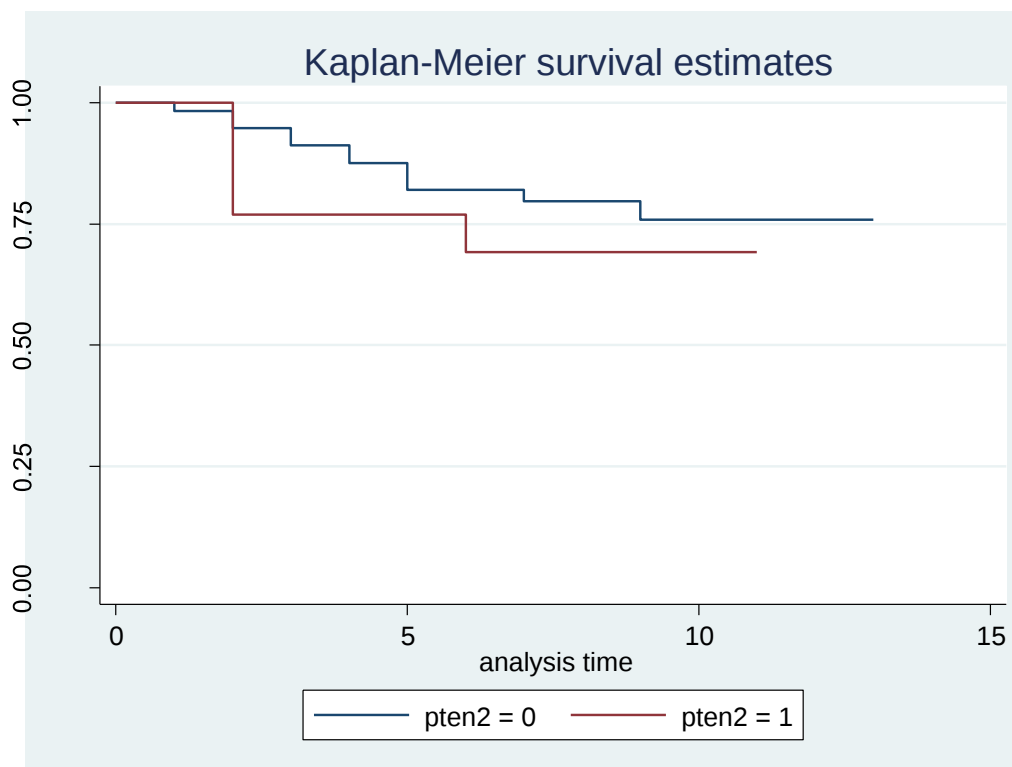
Διάγραμμα 17: Kaplan-Meier survival estimates for cytokeratins ck5/6



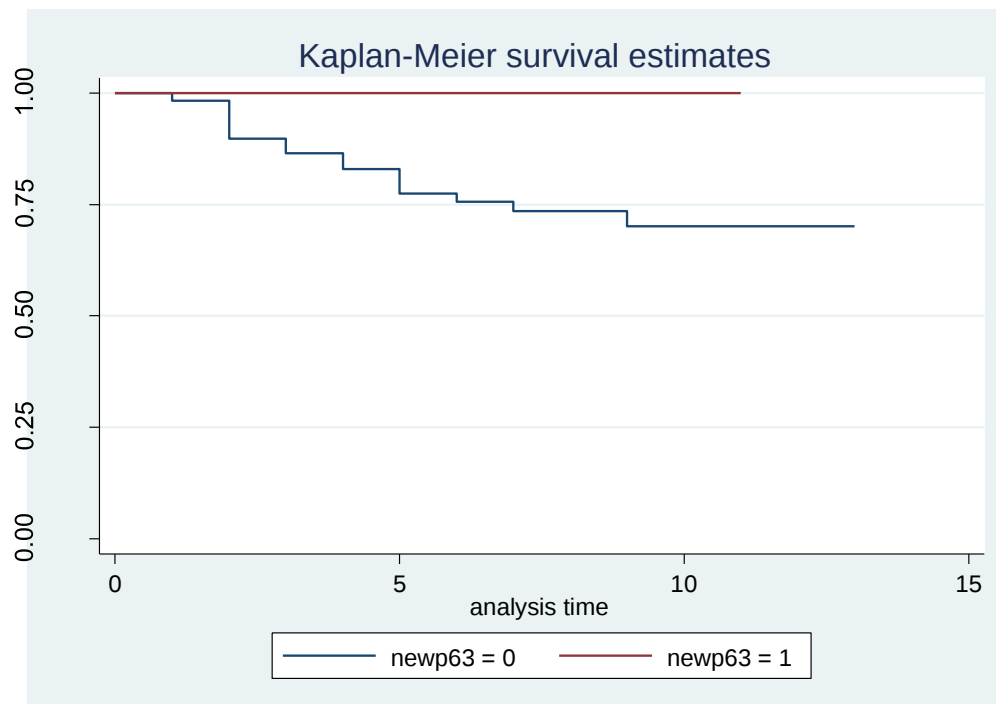
Διάγραμμα 18: Kaplan-Meier survival estimates for cytokeratins ck17



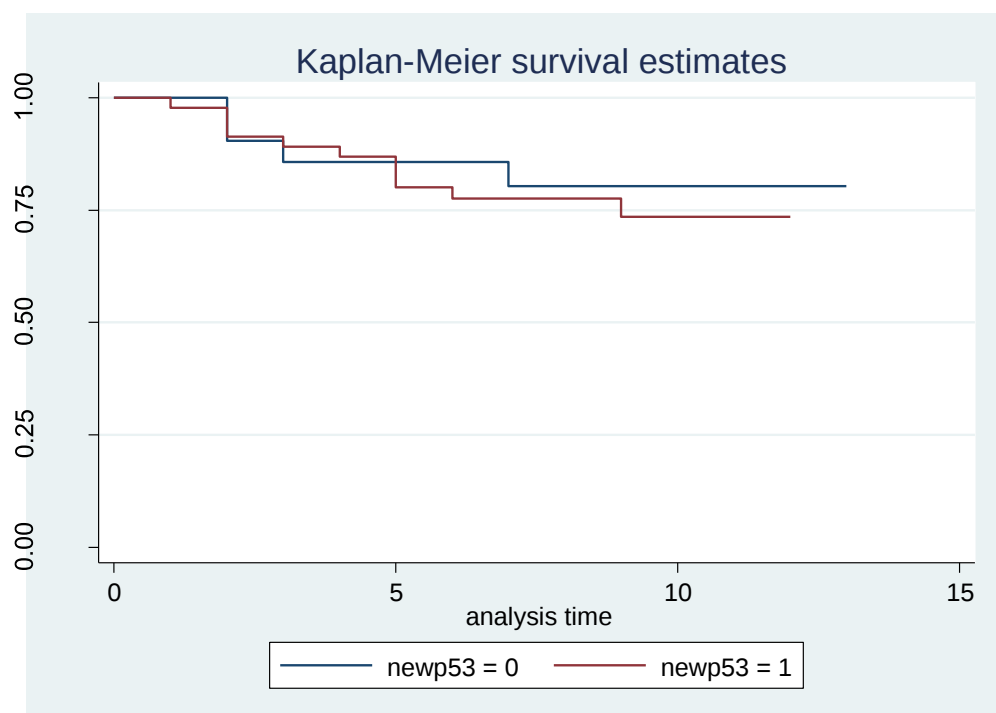
Διάγραμμα 19: Kaplan-Meier survival estimates for claudin 7



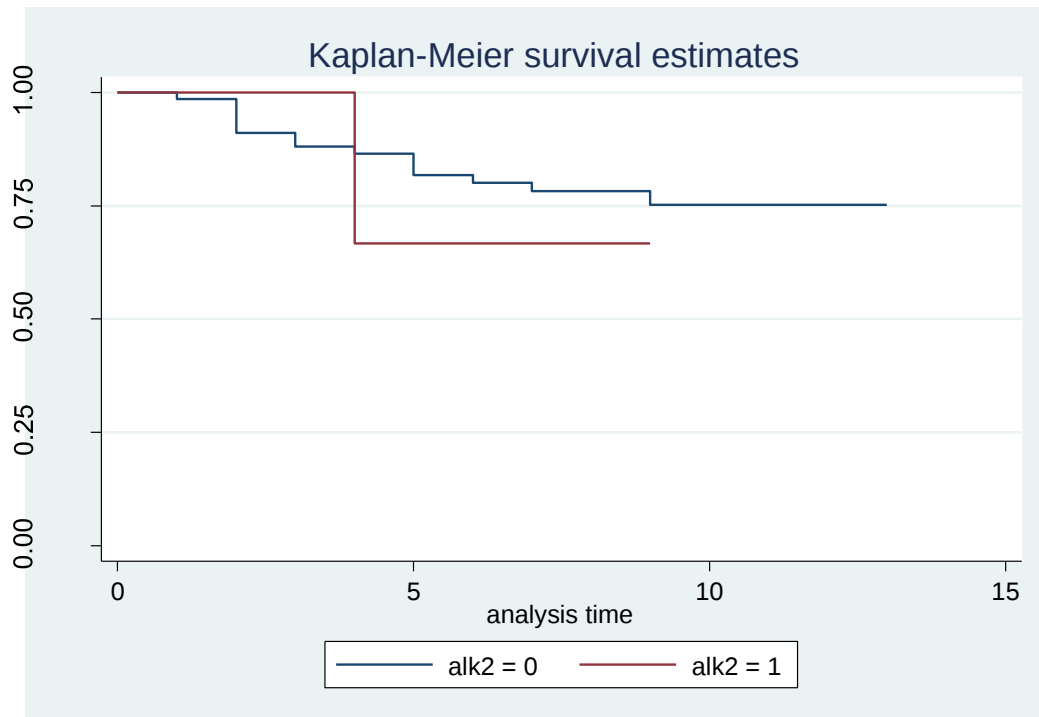
Διάγραμμα 20: Kaplan-Meier survival estimates for phosphatase - PTEN



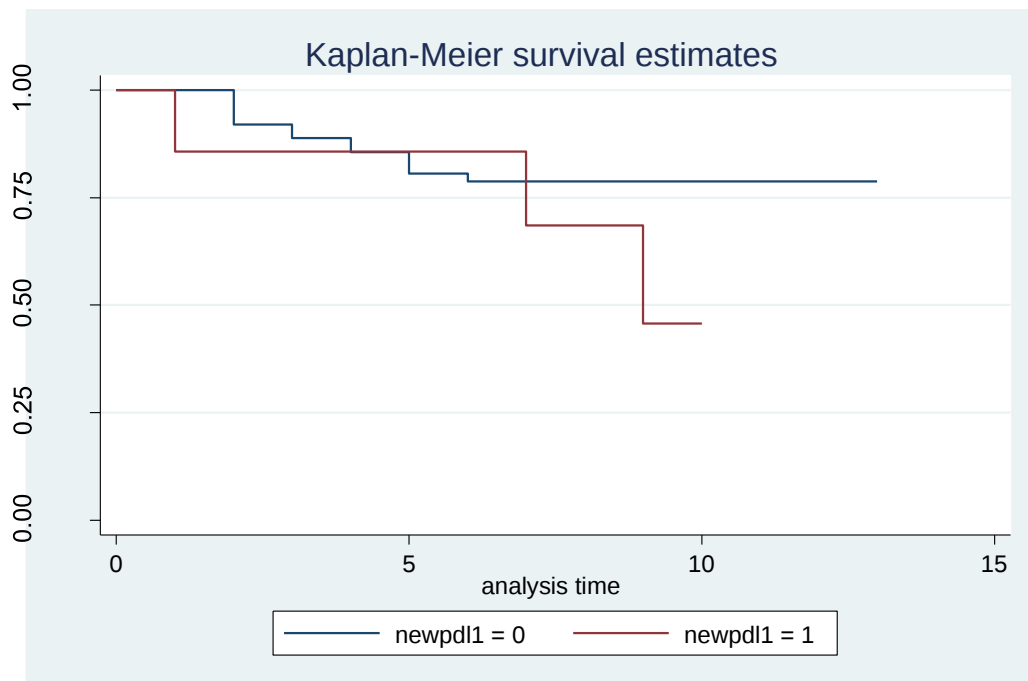
Διάγραμμα 21: Kaplan-Meier survival estimates for protein p63



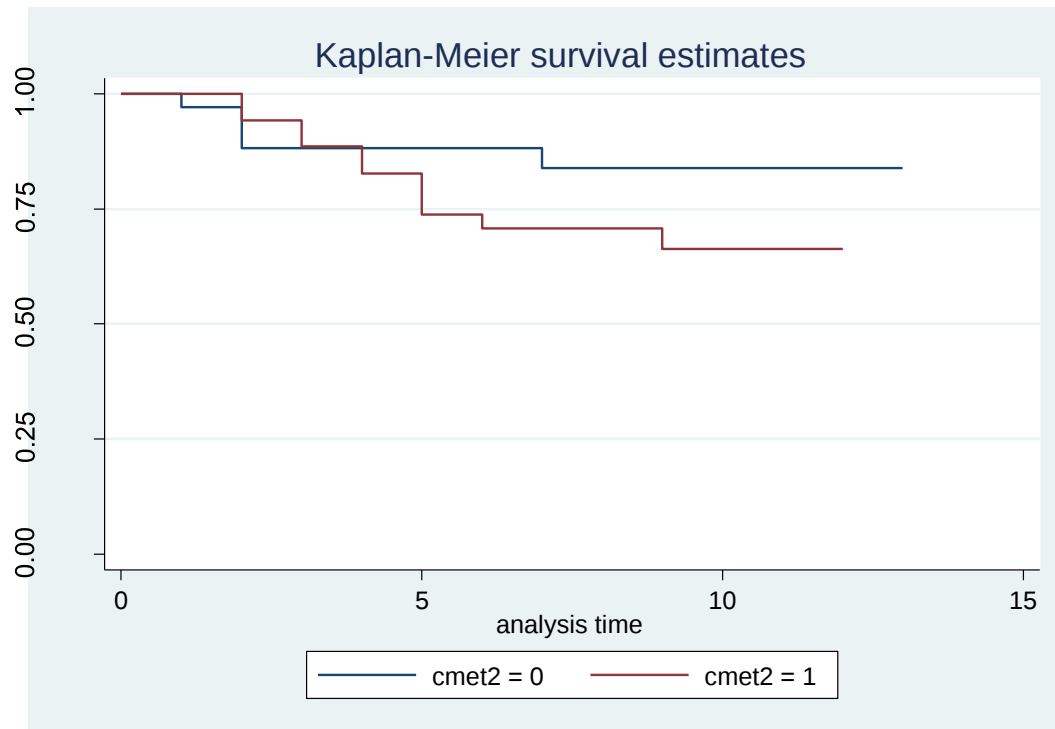
Διάγραμμα 22: Kaplan-Meier survival estimates for protein p53



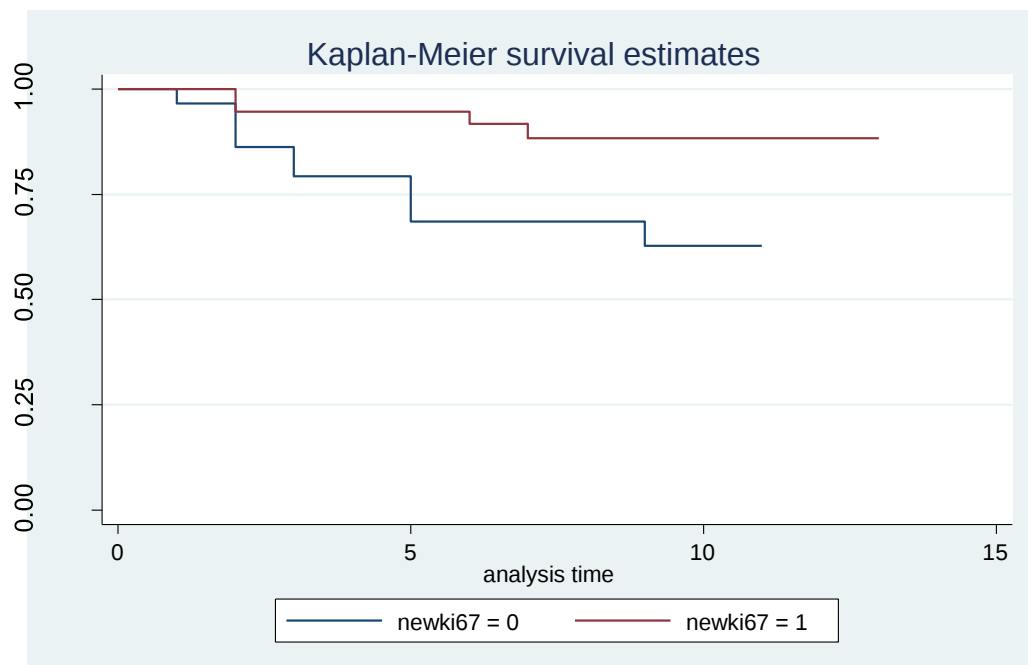
Διάγραμμα 23: Kaplan-Meier survival estimates for tyrosine kinases receptor



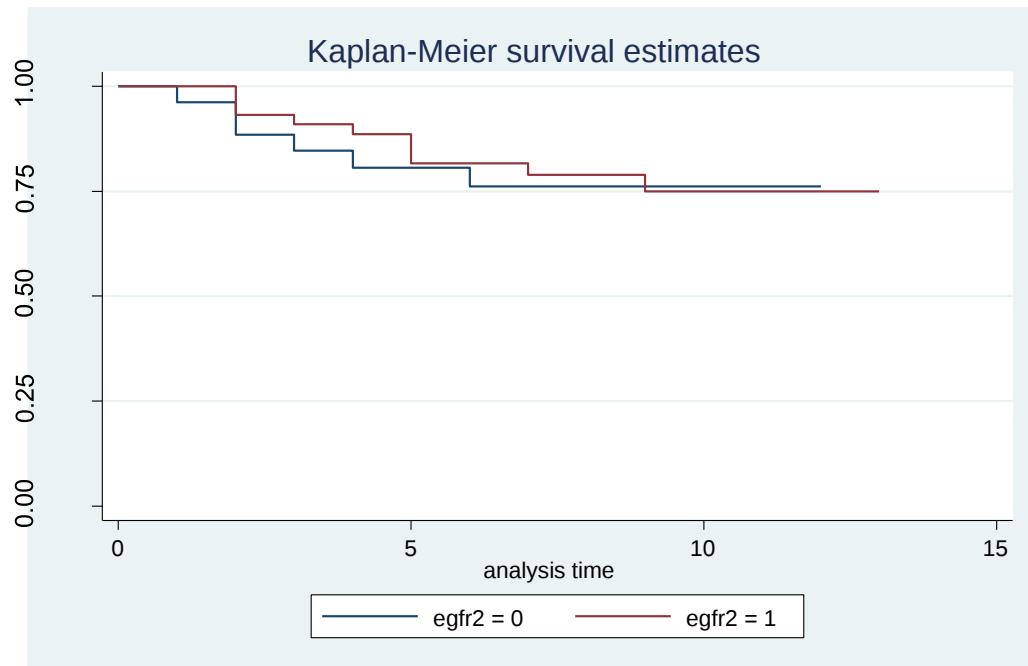
Διάγραμμα 24: Kaplan-Meier survival estimates for PDL1



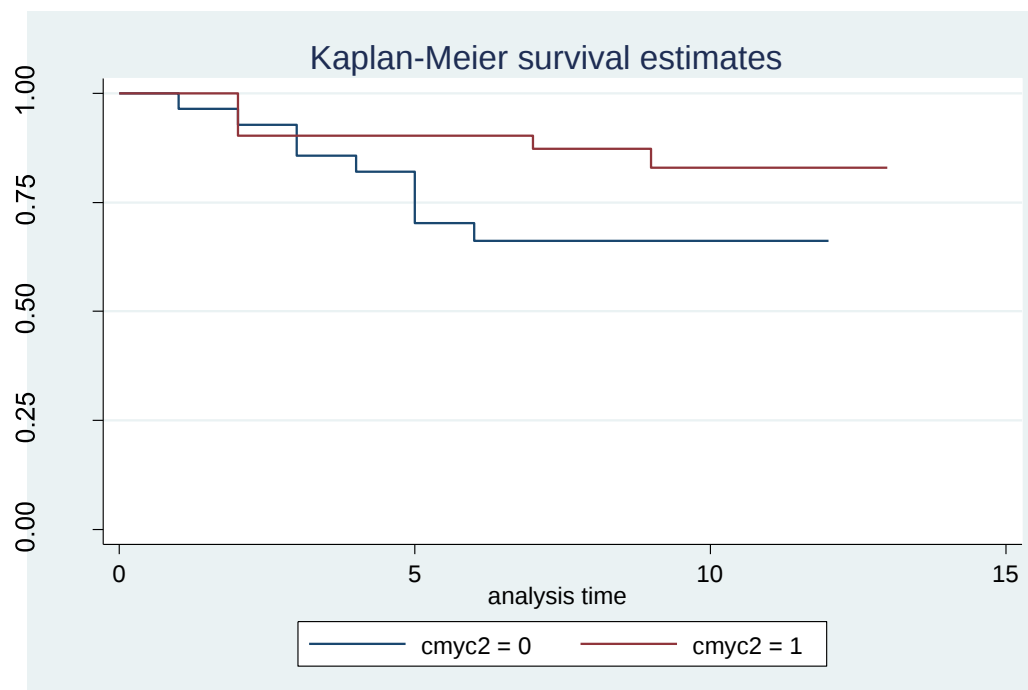
Διάγραμμα 25: Kaplan-Meier survival estimates for transmembrane receptor tyrosine kinases



Διάγραμμα 26: Kaplan-Meier survival estimates for cell proliferation index - ki67



Διάγραμμα 27: Kaplan-Meier survival estimates for transmembrane receptor of the epidermal growth factor



Διάγραμμα 28: Kaplan-Meier survival estimates for protein CMYC

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

5.1 Claudin

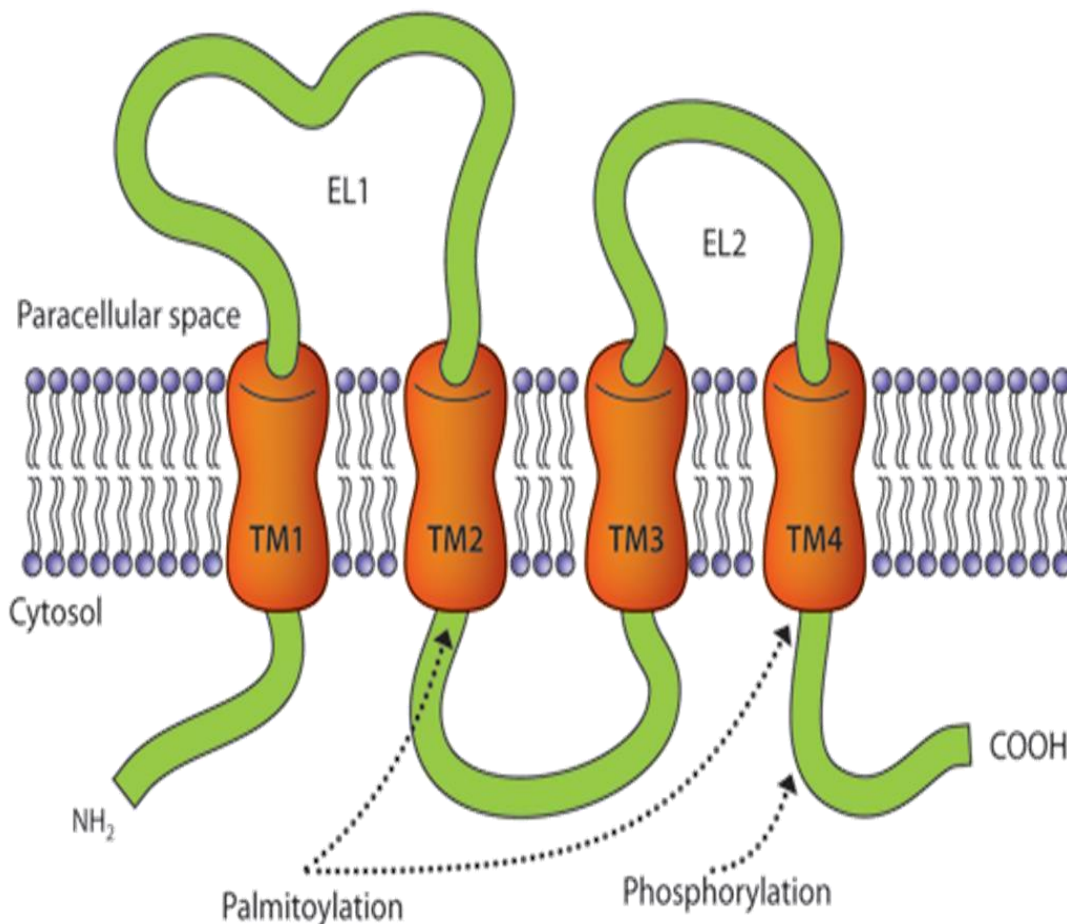
Τι είναι το claudin;

Οι σφικτοί σύνδεσμοι (TJS) αποτελούν δομές οι οποίες διαχωρίζουν διαφορετικά διαμερίσματα ιστών ενώ δρουν ως φραγμοί που ρυθμίζουν την ροή ιόντων και πρωτεϊνών μεταξύ των ιστολογικών διαμερισμάτων. Οι claudins και οι occludins αποτελούν τα κύρια δομικά μοριακά συστατικά που σχηματίζουν τους σφικτούς συνδέσμους μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων. Οι Claudins ως διαμεμβρανικές πρωτεΐνες έχουν επίσης σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής προσκόλλησης και στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση, ενώ ελέγχουν την παρακυτταρική διαπερατότητα και τη διατήρηση της πολικότητας των επιθηλιακών κυττάρων [225, 226]. Υπάρχουν 27 διαφορετικοί γνωστοί υποτύποι claudins στα θηλαστικά, που κυμαίνονται από μέγεθος 17 έως 27 kDa, και δείχνουν ιστολογική και κυτταρική ειδικότητα και επηρεάζουν τη διαπερατότητα των κυττάρων [226, 227]. Οι υποτύποι αυτοί δεν περιορίζονται όλοι στους σφικτούς συνδέσμους μεταξύ των κυττάρων. Οι Blackman *et al.* έχουν δείξει ότι η claudin-7 δεν βρίσκεται ποτέ στις σφικτές συνδέσεις των επιθηλιακών κυττάρων, του μαζικού αδένα, των βρόγχων, του νεφρικού φλοιού και του εντέρου. Αντιθέτως ανευρίσκεται σε κυτοσολικά κυστίδια κοντά στην βασοκυτταρική πλευρική μεμβράνη και πιθανώς παίζει κάποιο ρόλο στην διακίνηση τους [228].

Δομικά οι περισσότερες claudins είναι μεγέθους 20-34 kDa και αποτελούνται από τέσσερις διαμεμβρανικές έλικες με ένα αμινικό και ένα καρβοξυλικό άκρο που εκτείνονται μέσα στο κυτταρόπλασμα [226]. Επιπλέον έχουν δύο εξωκυττάριας θηλές που περιέχουν φορτισμένα αμινοξέα και έχουν βασικό ρόλο στην κυτταρική διαπερατότητα [229] (εικόνα 12). Το καρβοξυλικό άκρο είναι αυτό που διαφέρει μεταξύ των claudins και κυρίως ως προς το μέγεθος και την αλληλουχία. Αυτό περιέχει ένα PDZ-μοτίβο-πρόσδεσης που επιτρέπει την άμεση αλληλεπίδραση των claudins με τις κυτταροπλασματική TJ-πρωτεΐνες όπως τις ZO-1, ZO-2, ZO-3 και MUPP1. Επιπλέον, αυτό το άκρο αποτελεί την περιοχή με μετά-μεταφραστικές ιδιότητες όπως φωσφορυλίωση και μπορεί να επηρεάσει τον εντοπισμό και τις λειτουργίες των claudins. Όπως αναφέρεται ανωτέρω διαφορετικές claudins μπορεί να ανευρίσκονται στους

διάφορους ιστούς. Για παράδειγμα η claudin-2 ανευρίσκεται στο ήπαρ και στους νεφρούς, η claudin-4 ανευρίσκεται στον πνεύμονα και στο νεφρό, αλλά όχι στο ήπαρ. Οι περισσότεροι ιστοί εκφράζουν πολλαπλές claudins [230].

Οι claudins διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση και στην εκλεκτικότητα της παρακυτταρικής διαπερατότητας. Για παράδειγμα η claudins -2 και -15 είναι γνωστό ότι λειτουργούν ως δίαυλοι κατιόντων ενώ οι claudins -4, -7 και -10a λειτουργούν ως δίαυλοι ανιόντων [231]. Μεταλλάξεις των γονιδίων των claudins έχουν συνδεθεί με αρκετές ανθρώπινες ασθένειες. Η σκληρυντική χολαγγειίτιδα και η ιχθύωση συνδέονται με μετάλλαξη της claudin-1, ενώ η υπομαγνησαιμία έχει συνδεθεί με μεταλλάξεις των claudins -16 και -19. Απώλεια της claudin-7, όπως αναφέρεται αναλυτικά πιο κάτω, σχετίζεται με το πορογενές καρκίνωμα *in situ* του μαστού καθώς και με το διηθητικό πορογενές.



Εικόνα 12. Δομή Claudin-7

Ρόλος στην καρκινογένεση

Μειωμένη έκφραση πολλών claudins (συμπεριλαμβανομένων των claudins -1 και -7) μπορεί να οδηγήσει σε διατάραξη των TJs, με αποτέλεσμα την απώλεια της κυτταρικής πολικότητας και της ακεραιότητας των επιθηλιακών κυττάρων. Μείωση των μεσοκυττάρων συνδέσεων έχει ως αποτέλεσμα την ελεύθερη κυκλοφορία των καρκινικών κυττάρων ενώ συμβάλλουν σε μια χαμηλότερη συνοχή μεταξύ των νεοπλασματικών κυττάρων, καθιστώντας την αποκόλληση του ενός από το άλλο ευκολότερη και συμβάλλοντας έτσι στην αυξημένη διήθηση κατά την ογκογένεση και μετάσταση. Αυτός είναι πιθανόν και ο λόγος που σε περιοχές φτωχότερης διαφοροποίησης παρατηρείται αυξημένη μείωση της έκφρασης της claudin [225, 232, 233]. Ακόμα η μειωμένη κυτταρική πολικότητα αυξάνει την διακίνηση θρεπτικών συστατικών της προσφοράς τους, παράγοντας που συμβάλλει στην ραγδαία επέκταση των καρκινικών κυττάρων [234, 235]. Παρόλα αυτά σε κάποιες περιπτώσεις έχει αναφερθεί ότι και υπερέκφραση των claudins μπορεί να συσχετισθεί με κάποιους καρκίνους. Για παράδειγμα υπερέκφραση των claudin -3 και -4 έχει παρατηρηθεί στον καρκίνο των ωοθηκών καθώς επίσης και σε αρκετές άλλες κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένου του μαστού, του στομάχου, του παγκρέατος, του προστάτη και σε καρκίνους μήτρας [236-238] [239-243]. Η σχέση της έκφρασης των claudins με τον καρκίνο του μαστού είναι ακόμα αμφιλεγόμενη.

Πιο συγκεκριμένα, στα διηθητικά καρκινώματα του μαστού μια πρόσφατη μελέτη που εξέτασε την έκφραση των claudins -1, -3, -4, -7 και -8 σε 226 διηθητικούς καρκίνους του μαστού, βαθμού κακοήθειας 3, στους διάφορους μοριακούς υποτύπους, έδειξε ότι υπάρχει διαφορετική έκφραση των claudins ανάλογα με τον μοριακό υποτύπο. Για τους luminal (με θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς) οι claudins-7 και -8 είχαν υψηλή έκφραση ενώ οι claudins -1 και -4, χαμηλή. Αντιθέτως για τα Basal-like (με οιστρογονικούς υποδοχείς και HER2 αρνητικά) οι claudins -1 και -4 είχαν υψηλή έκφραση ενώ οι claudins -7 και -8 χαμηλή. Σε 30 από 226 περιπτώσεις (14%) η έκφραση και των πέντε claudins ήταν εντελώς αρνητική και η ομάδα αυτή ορίστηκε ως claudin-low υποτύπος. Η πλειοψηφία των claudin-low ήταν basal-like, (23 από 30, 77%) και αυτοί οι ασθενείς είχαν σημαντικά χειρότερη συνολική επιβίωση ελεύθερη νόσου σε σχέση με τους υπόλοιπους ασθενείς ($p = 0.0093$). Χειρότερη πρόγνωση παρατηρήθηκε στα basal-like με claudin-low σε σχέση με τα basal-like με claudin-high ($P=0.11$) [244].

Οι Soini *et al.* παρατήρησαν ισχυρή έκφραση των claudins -3 και -4 στο διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού. Ωστόσο, απέτυχαν να βρουν κάποια σύνδεση μεταξύ της έκφρασης και του βαθμού κακοήθειας του όγκου ή την κατάσταση των οιστρογονικών υποδοχέων [245]. Οι Tokes *et al.* αναφέρουν σημαντική απώλεια του mRNA της claudin-4 και της έκφραση πρωτεΐνης στην πλειονότητα διηθητικών πορογενή βαθμού κακοήθειας 1, αλλά αυξημένη έκφραση της στους βαθμούς κακοήθειας 2 και 3 [246]. Οι Lanigan *et al.* περιέγραψαν σχέση της αυξημένης έκφρασης claudin-4 με υψηλό βαθμό κακοήθειας, ER αρνητικό και χειρότερη πρόγνωση [247]. Οι Blanchard *et al.* απέδειξαν συσχέτιση των claudins 1 και 4 με τον basal-like subtype [348]. Συμπερασματικά, η ανώμαλη έκφραση των claudins, είτε πρόκειται για αύξηση είτε για μείωση, σχετίζεται με πιο επιθετικούς όγκους.

CLAUDIN 7

Η Claudin 7 απορρυθμίζεται συχνά στον καρκίνο. In vivo μελέτες έχουν δείξει ότι υπερέκφραση της στον καρκίνο του παχέος εντέρου προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και ογκογένεση [249]. Παρομοίως, υπερέκφραση της στον καρκίνο των ωοθηκών ενισχύει την κυτταρική μετανάστευση και διήθηση των καρκινικών κυττάρων [250]. Σε αντίθεση με τα πιο πάνω αποτελέσματα, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι μειωμένη έκφραση της Claudin 7 αυξάνει την μετανάστευση και διήθηση των καρκινικών κυττάρων στον καρκίνο του πνεύμονα και στο πλακώδες καρκίνωμα του οισοφάγου [232,251]. Επίσης, φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στην ανταπόκριση στην χημειοθεραπεία παρόλο που τα αποτελέσματα που υπάρχουν στην βιβλιογραφία είναι αντικρουόμενα. Οι Kim *et al.* βρήκαν ότι υψηλή έκφραση της claudin-7 σχετίζεται με μικρότερη ελεύθερης νόσου επιβίωση και μικρότερη ευαισθησία στην χημειοθεραπεία βασισμένη σε πλατίνα στους ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών γι' αυτό και αναστολή της έκφρασης της claudin-7 προκάλεσε αύξηση της ευαισθησίας των καρκινικών κυττάρων των ωοθηκών στην θεραπεία με cisplatin [252]. Αντιθέτως μία άλλη μελέτη για τον καρκίνο του πνεύμονα βρήκε ότι η claudin-7 αυξάνει την χημειοευαισθησία στην cisplatin [253].

Διάφορες μελέτες έχουν εξετάσει την κλινική σημασία του claudin-low υποτύπου. Οι Hennessy *et al.* συγκρίνοντας το μεταγραφικό προφίλ των μεταπλαστικών καρκίνων του μαστού (MBC), που αποτελούν μια επιθετική και χημειοανθεκτική υποομάδα των TNBCs, με άλλους υποτύπους του καρκίνου του μαστού συμπεριλαμβανομένων των luminal, HER2-θετικών και basal-like, έδειξαν ότι οι MBC σχετίζονται συχνότερα με τον claudin-low

υποτύπο [254]. Αυτή η μελέτη έδειξε επίσης ότι οι MBC με χαμηλά επίπεδα claudin χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα δεικτών βλαστικών κυττάρων και επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT). Οι Creighton *et al.* έδειξαν ότι στον claudin-low υποτύπο τα καρκινικά κύτταρα του μαστού χαρακτηρίζονται από CD44 (+)/CD24 (-/low) αντιγόνα κυτταρικής επιφάνειας και υπογραφή mammosphere (MS), προφίλ που υποδεικνύει υψηλό ογκογενή δυναμικό. Το προφίλ αυτό, CD44 (+)/CD24 (-/low) -MS υπογραφή, παρατηρήθηκε και μετά από χημειοθεραπεία ή ορμονοθεραπεία, στον claudin-low υποτύπο, υποδεικνύοντας ότι παραμένει στους όγκους του μαστού μετά από συμβατική θεραπεία [255].

Οι Prat *et al.* με την ανάλυση των κλινικών και μοριακών χαρακτηριστικών του claudin-low υποτύπου του καρκίνου του μαστού σε σχέση με άλλους υποτύπους έδειξαν ότι οι claudin-low όγκοι του είναι κυρίως TNBCs διηθητικά πορογενείς με φτωχή πρόγνωση και με υψηλό ποσοστό διαφοροποίησης σε μεταπλαστικά και μυελικά καρκινώματα εμπλουτισμένα με μεσεγχυματογενή και βλαστικά κύτταρα [88]. Παρόμοια αποτελέσματα βρήκαν και οι Lehmann *et al.* [139]. Οι Asiedu *et al.* έδειξαν παραγωγή βλαστικών κυττάρων (CSC) με επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) μετά από έκθεση των καρκινικών κυττάρων σε TGFβ και TNFα από καρκινικά κύτταρα μαζικού αδένου ποντικού. Αυτά τα κύτταρα έδειξαν αυξημένη *in vitro* ιδιότητα αυτοανανέωσης και *in vivo* ιδιότητα ογκογένεσης καθώς και αυξημένη αντοχή στις oxaliplatin, etoposide, and paclitaxel. Περαιτέρω ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης έδειξε ότι τα πιο πάνω περιγραφόμενα καρκινικά κύτταρα του μαστού είχαν μειωμένη έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις Claudins -3, -4 και -7 καθώς και του αυλικού δείκτη κυτοκερατίνη 18, επιβεβαιώνοντας την δημιουργία claudin-low CSC/TICs μέσω EMT. Όλες αυτές οι αλλαγές υποδεικνύουν ότι ο claudin-low υποτύπος χαρακτηρίζεται από την έκφραση δεικτών μεσεγχυματικών και βλαστικών κυττάρων και σχετίζεται με φτωχότερη πρόγνωση [256].

Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για να φανεί κατά πόσο η απώλεια έκφρασης της claudin προκαλεί την παραγωγή του μαζικών CSC/TICs μέσω EMT ή αν claudinlow κλαουδίνη αποτελεί μια δευτερεύουσα συνέπεια της διαταραχής του κυττάρου σφικτών συνδέσεων και της απώλειας της κυτταρικής πολικότητας κατά τη διάρκεια της EMT ανεξαρτήτως από τις επιδράσεις στα CSC/TICs.

Προγνωστική σημασία της Claudin-7 στον καρκίνο του μαστού

Πολλές μελέτες δείχνουν ότι η απώλεια της Claudin-7 σχετίζεται με σημαντικά φτωχότερη πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο του μαστού. Οι Kominsky *et al.* έδειξαν ότι η χαμηλή έκφραση της Claudin-7 συνδέεται με υψηλότερο βαθμό κακοήθειας στον καρκίνο του μαστού, συμπεριλαμβανομένου του *in situ* και διηθητικού πορογενούς καρκινώματος του μαστού. Έδειξαν επίσης ότι η πλειοψηφία των διηθητικών καρκίνων του μαστού με θετικούς λεμφαδένες είχε χάσει την έκφραση της, γεγονός που υποδηλώνει ρόλο της Claudin-7 στην ανάπτυξη μεταστάσεων [257]. Μελέτη της έκφρασης της Claudin-7 σε δείγματα αναρροφήσεων λεπτής βελόνας από καρκινώματα του μαστού από τους Sauer *et al.* έδειξε στατιστικά σημαντική σχέση της μειωμένης έκφρασης με υψηλότερο βαθμό κακοήθειας, θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, μετάσταση στους λεμφαδένες και απομακρυσμένες μεταστάσεις [258].

Οι Lu *et al.* έδειξαν ότι χαμηλή έκφραση των claudins -1, -3, -4, -7 και -8 συσχετιζόταν με μικρότερη ελεύθερης νόσου επιβίωση, υποδεικνύοντας ότι ο claudin-low υποτύπος μπορεί να αποτελέσει σημαντικό δείκτη υποτροπής [244].

Σε αντίθεση με τα πιο πάνω αποτελέσματα, οι Bemardi *et al.* δεν βρήκαν συσχέτιση της Claudin 7 με τους διαφορετικούς υποτύπους και υποστήριξαν ότι έκφραση της Claudin 7 στον πορογενή διηθητικό καρκίνο του μαστού σχετίζεται με μικρότερη ελεύθερη νόσου επιβίωση, γεγονός που υποδηλώνει συμβολή αυτού του δείκτη σε αυξημένη επιθετικότητα του καρκίνου του μαστού [259].

Οι Kim *et al.* βρήκαν ότι υψηλή έκφραση της claudin-7 σχετίζεται με μικρότερη ελεύθερη νόσου επιβίωση και μικρότερη ευαισθησία στην χημειοθεραπεία βασισμένη σε πλατίνα στους ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών, γι' αυτό και αναστολή της έκφρασης της claudin-7 προκάλεσε αύξηση της ευαισθησίας των καρκινικών κυττάρων των ωοθηκών στη θεραπεία με cisplatin [252].

Αντιθέτως, μια άλλη μελέτη για τον καρκίνο του πνεύμονα βρήκε ότι η claudin-7 αυξάνει την χημειοευαισθησία στην cisplatin [253].

Στην δική μας μελέτη το Fisher's exact test έδειξε στατιστικά σημαντική σχέση (p -value= 0.004) μεταξύ του βαθμού κακοήθειας και της claudin-7 (negative n=5 vs positive n=72). Ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για τον βαθμό κακοήθειας καθορίστηκαν με multivariate logistic regression model με stepwise backward

elimination of variables με $p\text{-value}=0.05$. Η έκφραση της claudin-7 φάνηκε να είναι πολύ υψηλότερη στους ασθενείς με υψηλότερο βαθμό κακοήθειας ($OR=65.8$, $95\%CI$ 4.35 - 995.19, $p\text{-value}=0.003$). Παρόλο που αυτή η παρατήρηση έρχεται σε αντίθεση με την πλειονότητα των μελετών ότι claudin low όγκοι σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση, πρόκειται για ένα εύρημα που έχει παρατηρηθεί και σε άλλες πρόσφατες μελέτες όπως οι Bernardi *et al.* που αναφέρεται πιο πάνω, οι οποίοι δεν βρήκαν κάποια σχέση μεταξύ claudin-7 και των διαφόρων υποτύπων του καρκίνου του μαστού και υποστήριξαν ότι έκφραση της claudin-7 στο διηθητικό πορογενή καρκίνο σχετιζόταν με μικρότερο DFS υποδηλώνοντας συμβολή του δείκτη αυτού στην επιθετικότητα του καρκίνου [259].

5.2 PTEN

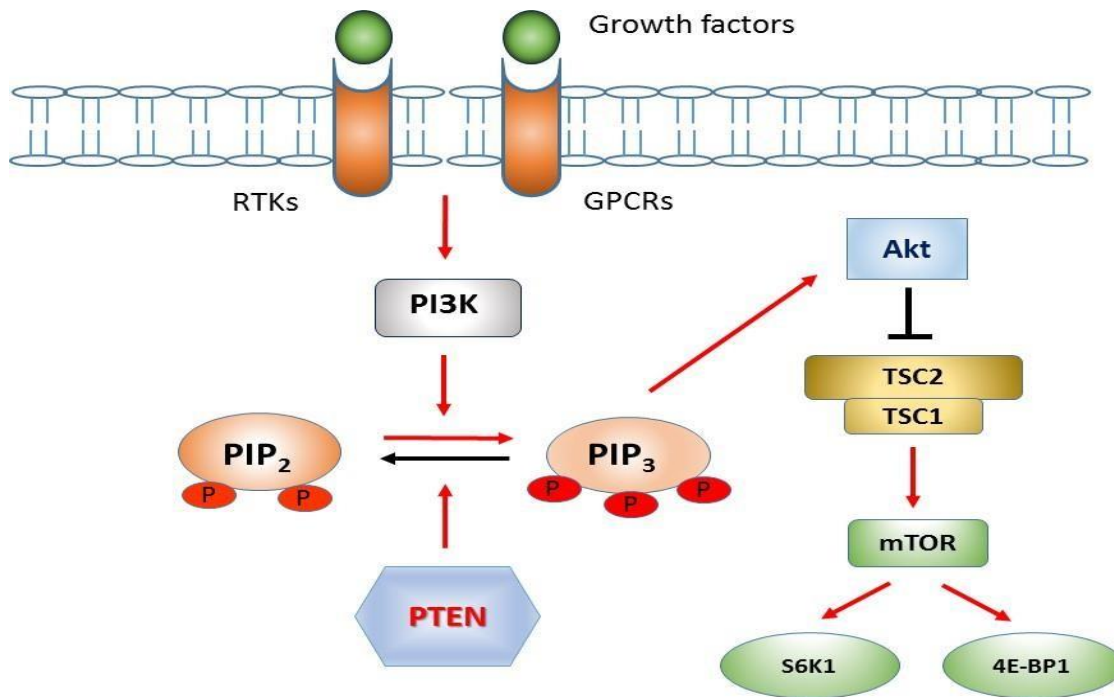
Το PTEN αποτελεί ένα 200 kb ογκοκατασταλτικό γονίδιο που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10q23 το οποίο ρυθμίζει πολλές κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης. Μεταλλάξεις του έχουν παρατηρηθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, του προστάτη και του πνεύμονα [260].

Οδός PI3K/Akt/mTOR

Η οδός PI3K/Akt/mTOR (εικόνα 13) αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης, του οποίου συχνά παρατηρείται ενεργοποίηση σε διάφορους καρκίνους [261]. Η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη αποτελεί συστατικό της ευκαρυωτικής κυτταρικής μεμβράνης. Τα PI3Ks είναι ταξινομημένα σε τρεις τάξεις, I, II ή III, ανάλογα με τη δομή της υπομονάδας και τη ρύθμιση και εκλεκτικότητα του υποστρώματος. Κάθε τάξη περιέχει διάφορες ισόμορφες, με την τάξη IA να αποτελεί την πιο μελετημένη στον καρκίνο [262].

Ενεργοποίηση του PI3K/Akt/mTOR: Αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν υποδοχείς της κινάσης τυροσίνης (RTKs) και/ή υποδοχείς που συζευγνύονται με πρωτεΐνη G (GPCRs), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κινάσης-3 φωσφατιδυλϊνοσιτόλης (PI3K) [263]. Η PIP3 δρα ως δεύτερος μεσολαβητής δεσμεύοντας και ενεργοποιώντας τις πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν την περιοχή ομολογίας pleckstrin (PH), συμπεριλαμβανομένης της

serine/threonine kinase AKT/Protein kinase B (PKB) [264]. Το ενεργοποιημένο AKT φωσφορυλιώνει το TSC2 για να διαταράξει το σύμπλεγμα TSC, το οποίο επιτρέπει στον Rheb να δεσμεύσει το ATP. Στην παρουσία του ATP, ο Rheb μετατρέπεται από την ανενεργό μορφή GDP στην ενεργό μορφή GTP που στη συνέχεια ενεργοποιεί το mTORC1 αναστέλλοντας την FKBP38 [114].



Εικόνα 13. PTEN and PI3K/Akt/mTOR pathway [265].

Η AKT είναι βασικός ρυθμιστής μιας ποικιλίας πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον έλεγχο του μηχανισμού της απόπτωσης, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό, την εισβολή, τη μετανάστευση και την επιδιόρθωση του DNA [266].

Το ενεργοποιημένο mTOR οδηγεί σε αυξημένη πρωτεϊνική σύνθεση, μέσω του παράγοντα έναρξης ευκαρυωτικής μετάφρασης eIF4E-δέσμευσης πρωτεΐνης 1 (4EBP1) και P70S6 κινάσης (S6K1) [267].

Η οδός PI3K/AKT ρυθμίζεται αρνητικά από το PTEN [268-270].

Ρόλος του PTEN

Το PTEN λειτουργεί τόσο ως πρωτεϊνική φωσφατάση διπλής ειδικότητας όσο και ως ινοσιτόλη φωσφολιπιδικής φωσφατάσης ρυθμίζοντας μια ποικιλία κυτταρικών οδών σηματοδότησης. Μέσω της ειδικότητας του ως λιπιδικής φωσφατάσης, το PTEN αναστέλλει την οδό Akt/mTOR, ενώ μπορεί να αποφωσφορυλιώσει τον λιπαρό δεύτερο μεσολαβητή PIP3 και να μετατρέψει το βιολογικά ενεργό λιπιδικό PIP3 σε PIP2 [271, 272]. Το PTEN είναι η μόνη γνωστή λιπιδική φωσφατάση που καταστέλλει την οδό PI3K/Akt και η έλλειψη της αρνητικής ρυθμιστικής του δράσης έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της οδού PI3K μέσω της φωσφορυλίωσης του AKT [273].

Το PTEN αναστέλλει επίσης την κυτταρική μετανάστευση και τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου με αποφωσφορυλίωση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων σερίνης/θρεονίνης και τυροσίνης. Μία παραλλαγή του με μια 576-αμινομάδα, που ονομάζεται PTEN-Long, έχει εκκριτική λειτουργία και έχει ταυτοποιηθεί να εκκρίνεται από τα κύτταρα και να εισέρχεται σε άλλα κύτταρα. Το PTEN-Long έχει επίσης δράση λιπιδικής φωσφατάσης, ασκώντας την αντικαρκινική του δράση με παρακρινικό μηχανισμό. Το PTEN μπορεί επίσης να εκκρίνεται με τη μορφή εξωσωμάτων και να μεταφέρεται σε άλλα κύτταρα, εκεί το εκκρινόμενο PTEN εσωτερικεύεται από τα κύτταρα-δέκτες με προκύπτουσα λειτουργική δραστηριότητα [274, 275].

Απώλεια PTEN

Η απώλεια PTEN συμβαίνει σε πολλούς καρκίνους, συμπεριλαμβανομένων καρκίνων του μαστού, του ενδομητρίου, του προστάτη και του θυρεοειδούς, μέσω γενετικών όσο και μη γενετικών μηχανισμών, όπως μεταλλάξεις, διαγραφές, επιγενετική σίγαση, μεταγραφική ρύθμιση, καθώς και πρωτεϊνική αστάθεια. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του AKT/mTOR μονοπατιού που οδηγεί σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αναστολή της απόπτωσης [276]. Η πρωταρχική αιτία απενεργοποίησης της λειτουργίας του PTEN είναι η μετάλλαξη γονιδίων. Η απενεργοποίηση του PTEN έχει βασικό ρόλο στην ογκογένεση καθώς συσχετίζεται με πρόοδο της νόσου και κακή πρόγνωση [277-279].

ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ

Γενετικές μεταλλάξεις: Οι γενετικές μεταλλάξεις προκαλούν τα σύνδρομα PTEN αμαρτώματος (PHTS), συμπεριλαμβανομένου του συνδρόμου Cowden (CS), του συνδρόμου Bannayan-Riley-Ruvalcaba (BRRS) και του συνδρόμου τύπου Proteus [280]. Ασθενείς με διαταραχές αυτισμού και μακροκεφαλία φέρουν την γενετική μετάλλαξη του γονιδίου PTEN.

Σωματικές μεταλλάξεις: Σε αντίθεση με τις γενετικές μεταλλάξεις, οι σωματικές μεταλλάξεις του PTEN, έχουν ανευρεθεί σε ποικιλία ανθρωπίνων καρκινωμάτων. Για παράδειγμα, 62% (150 από 242) των ασθενών με καρκίνο του ενδομητρίου έχουν μεταλλάξεις PTEN [προέλευση στοιχείων: Cancer Genome Atlas (TCGA)]. Υψηλά ποσοστά έχουν επίσης ανευρεθεί στον καρκίνο του προστάτη και του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Απώλεια της ετεροζυγίας (LOH): Η LOH του γονιδίου PTEN αποτελεί ακόμα ένα γενετικό μηχανισμό που παρατηρείται με πολύ μεγάλη συχνότητα σε σποραδικούς όγκους, γεγονός που υποδηλώνει ότι το PTEN έχει ογκοκατασταλτική λειτουργία. Μάλιστα οι Alimonti *et al.* έδειξαν ότι ακόμη και μια μικρή μείωση του PTEN μπορεί να διαταράξει τη βιολογία των ιστών του μαζικού αδένα στα ποντίκια, καθώς επίσης και το προφίλ έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων [281].

ΜΗ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ

Οι μη γενετικές μεταβολές του PTEN έχουν επίσης ογκογονικές επιπτώσεις. Η μεθυλίωση του γονιδίου PTEN περιγράφεται συχνά στα γλοιώματα παιδικής ηλικίας και επηρεάζει την κλινική τους έκβαση [229]. Από την άλλη οι Majchrzak-Celińska *et al.* βρήκαν ότι ο προαγωγέας του γονιδίου PTEN μεθυλιώνεται λιγότερο συχνά στα 95 γλοιώματα που μελετήθηκαν τα οποία είχαν διαφορετικό βαθμό κακοήθειας [282]. Αυτή η διαφορά μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές μοριακές εκτροπές που εμπλέκονται στην καρκινογένεση στα παιδιά και στους ενήλικες ασθενείς με όγκους του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Το miRNA-135b καταστέλλει την έκφραση της ειδικής πεπτιδάσης 13 ουβικιτίνης (USP13) μειώνοντας έτσι την σταθερότητα του PTEN στα καρκινικά κύτταρα του ανθρώπινου παχέος εντέρου (CRC) [283]. Επιπλέον το miRNA-21, που ρυθμίζει την ανθρώπινη αντίστροφη μεταγραφάση τελομεράσης (hTERT), ελέγχει την κυτταρική ανάπτυξη των CRC μέσω της PTEN/ERK1/2 σηματοδοτικής οδού [284].

Απώλεια του PTEN στον καρκίνο του μαστού

Στον καρκίνο του μαστού (KM) η απώλεια του PTEN μπορεί να συμβεί με πολλαπλούς μηχανισμούς. Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω οι μεταλλάξεις του γονιδίου PTEN παρατηρούνται συχνά στον καρκίνο του ενδομητρίου και στο γλοιοβλάστωμα. Όμως στον καρκίνο του μαστού παρατηρείται μόνο στο 5% των περιπτώσεων και οι περισσότερες προκαλούν αποσταθεροποίηση της πρωτεΐνης [275, 285, 286]. Ο κυριότερος μηχανισμός απενεργοποίησης του PTEN στον καρκίνο του μαστού αποτελεί η διαγραφή του γονιδίου του [287]. Απώλεια του PTEN μπορεί επίσης συμβεί λόγω μειωμένης μεταγραφής του από μεθυλίωση του προαγωγού του ή από την έκφραση miRNA, αλλά και από απώλεια των πρωτεϊνών σταθεροποίησης, όπως η πρωτεΐνη Rak η οποία με την φωσφορυλίωση του PTEN το προστατεύει από αποικοδόμηση που μπορεί να προκληθεί από διαμεσολάβηση της ubiquitin [288-290]. Η μείωση των επιπέδων πρωτεΐνης PTEN στον καρκίνο του μαστού μπορεί να παρατηρηθεί με την χρήση ανοσοϊστοχημείας (IHC). Μελέτες έδειξαν μείωση της έκφρασης ή απώλειας του PTEN σε ποσοστό μέχρι και 33% στους όγκους του μαστού και άμεση σχέση αυτής της μείωσης/απώλειας με την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού. Άλλες μελέτες έχουν αναφέρει μείωση του PTEN σε 15-48% των ασθενών. [18, 40, 66, 71, 72]. Η πραγματική συσχέτιση της απώλειας του PTEN με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά αλλά και την πρόγνωση παραμένει ασαφής. Ωστόσο, σε μερικές μελέτες η απώλεια του PTEN συσχετίστηκε με υψηλό βαθμό κακοήθειας, αυξημένο μέγεθος όγκου και αρνητικούς ορμονικούς υποδοχείς.

Απώλεια του PTEN στους TNBCs

Απώλειες του PTEN έχουν παρατηρηθεί στο 37-74% των TNBCs [201, 291, 292] και έχουν συσχετιστεί με την ενεργοποίηση της AKT [293]. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι υπάρχει μια λογική στην αξιολόγηση των αναστολέων mTOR σε ασθενείς με TNBC, καθώς δεν υπάρχει εναλλακτική στοχευμένη θεραπεία. Σε μια μελέτη του Inanc *et al.* όπου η έκφραση PTEN αξιολογήθηκε με ανοσοϊστοχημεία (IHC) σε 99 TNBCs, απώλεια του PTEN παρατηρήθηκε στο 44,3% μεταξύ όλων των όγκων. Στο 34,6% των όγκων που εξέφραζαν και CK5/6 συσχετίστηκε με βραχύτερη επιβίωση, αυξημένη υποτροπή και μεγαλύτερο κίνδυνο θνησιμότητας. Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της απώλειας του PTEN και άλλων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών παρά μόνο υψηλότερο ποσοστό απώλειας στους ασθενείς με λεμφοαγγειακή διήθηση [294]. Σε μια άλλη μελέτη των Stefansson *et al.*, όπου η ανάλυση έκφρασης του PTEN έγινε με TMAs με IHC, η απώλεια του PTEN και η έκφραση

του CK5/6 βρέθηκαν να είναι 37% και 66% αντίστοιχα. Αυτό αντιστοιχούσε στο 25% των ασθενών με οικογενή μετάλλαξη BRCA1 και στο 39% εκείνων με σποραδική μεθυλίωση του BRCA1, υποδηλώνοντας ότι τα ποσοστά της απώλειας PTEN μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με τις γενετικές διαφορές [292, 295]. Σε μια άλλη μελέτη με TNBCs, η απώλεια του PTEN ανιχνεύθηκε στο 63% και συσχετίστηκε με μειωμένο ελεύθερο νόσου χρόνο επιβίωσης αλλά δεν είχε καμιά επίδραση στη συνολική επιβίωση. Η απώλεια του PTEN δεν συσχετίστηκε με άλλα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά [296]. Οι Dean *et al.* διερεύνησαν την απώλεια του PTEN σε blogs παραφίνης σε 101 TNBCs. Απώλεια του PTEN παρατηρήθηκε σχεδόν το μισό των TNBCs (48,3%) και συχετιζόταν με νεαρή ηλικία διάγνωσης [297].

Σε μια μελέτη με ασθενείς με καρκίνο του μαστού με θετικό HER-2 από τους Razis *et al.*, αποδείχτηκε ότι η απώλεια του PTEN συσχετιζόταν με μειωμένο χρόνο ελεύθερης νόσου επιβίωσης αλλά και με μειωμένη συνολική επιβίωση, υποδηλώνοντας ότι η απώλεια του PTEN μπορεί να προκαλεί ανθεκτικότητα στην δράση του Herceptin [298]. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και από τους Berns *et al.*, όπου η χαμηλή έκφραση του PTEN συσχετίστηκε και πάλι με αντίσταση στο Herceptin [299]. Σε μια άλλη μελέτη, με αμφοτερόπλευρους καρκίνους του μαστού, η απώλεια PTEN συσχετίστηκε με μετάσταση στους μασχαλιαίους λεμφαδένες, έκφραση HER-2 3 +, ER (-) και απομακρυσμένες μεταστάσεις, αλλά δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική σχέση με τον βαθμό κακοήθειας και το μέγεθος του όγκου. Η απώλεια του PTEN βρέθηκε να είναι πολυτιμότερη από τους κλασικούς προγνωστικούς παράγοντες [300].

Η έκφραση του PTEN εξετάστηκε επίσης με ανοσοϊστοχημεία σε δείγματα καρκίνου του μαστού από πρωτοπαθείς και μεταστατικούς όγκους του ίδιου ασθενούς. Απώλεια του PTEN παρατηρήθηκε σε 14 πρωτοπαθείς όγκους (30%) και σε 13 μεταστατικούς (25%) [301].

Συμπερασματικά, υπάρχει υψηλή συχνότητα απώλειας του PTEN στο TNBC όπου και αποτελεί σημαντικό προγνωστικό παράγοντα. Μπορεί να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην παθογένεση αυτών των όγκων και στην κακή πρόγνωση των ασθενών. Επιβάλλεται να αναπτυχθούν στοχευμένες θεραπείες για την αναστολή του mTOR σε ασθενείς με TNBC που παρουσιάζουν απώλεια PTEN. Αρκετές μελέτες αναφέρουν επίσης ότι η ενεργοποίηση του mTOR θα μπορούσε να οδηγήσει σε αντοχή στη σισπλατίνη, ένα φαινόμενο αναστρέψιμο από το everolimus (mTOR αναστολέας). Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι στοχευμένη θεραπεία με αναστολείς mTOR και συνδυασμός του με σισπλατίνη σε ασθενείς με TNBC και απώλεια του PTEN μπορεί να έχει καλά αποτελέσματα.

Στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση της απώλειας του PTEN με το βαθμό κακοήθειας, τη λεμφαγγειακή διήθηση και τους θετικούς λεμφαδένες. Όπως αναφέρεται και ανωτέρω η απώλεια του PTEN συμβαίνει με πολλαπλούς μηχανισμούς στον καρκίνο του μαστού. Αυτοί οι πολλαπλοί μηχανισμοί ενδεχομένως ευθύνονται για την ετερογένεια των αποτελεσμάτων που περιγράφονται στις διάφορες μελέτες για την απώλεια του.

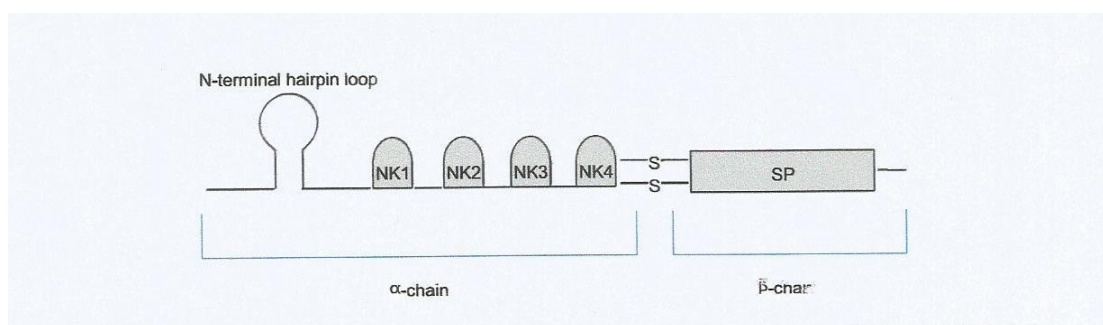
5.3 C-MET

Τι είναι C-Met:

Το cMet αποτελεί έναν υποδοχέα κινάσης τυροσίνης. Αρχικά ανακαλύφθηκε το 1991 ως ο υποδοχέας αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων (HGT) στη συνέχεια όμως η κακή ρύθμιση της σηματοδότησης του c-Met ταυτοποιήθηκε σε μια ποικιλία κακοήθων και προκακοήθων βλαβών, συμπεριλαμβανομένων των καρκινωμάτων του μαστού [302-305].

Δομή και λειτουργία

Το c-Met μεταφράζεται αρχικά ως ένα 150 kDa πολυπεπίδιο που γλυκοζυλιώνεται σε μία πρόδρομη πρωτεΐνη 170-kDa. Μετά από περαιτέρω γλυκοζυλίωση, η πρόδρομη πρωτεΐνη διασπάται σε μια 50-kDa α-αλυσίδα (εξωκυττάρια) και μια 140kDa β-αλυσίδα. Οι αλυσίδες αυτές συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς [306]. Ένας από τους πιο συχνούς τρόπους ενεργοποίησης του c-Met αποτελεί η σύνδεση του με τον αυξητικό παράγοντα των ηπατοκυττάρων (HGF). Όπως και το c-Met, ο ώριμος HGF περιέχει μια α- και μια β-αλυσίδα που δεσμεύονται από ένα δισουλφιδικό δεσμό [302] [307] (εικόνα 14).

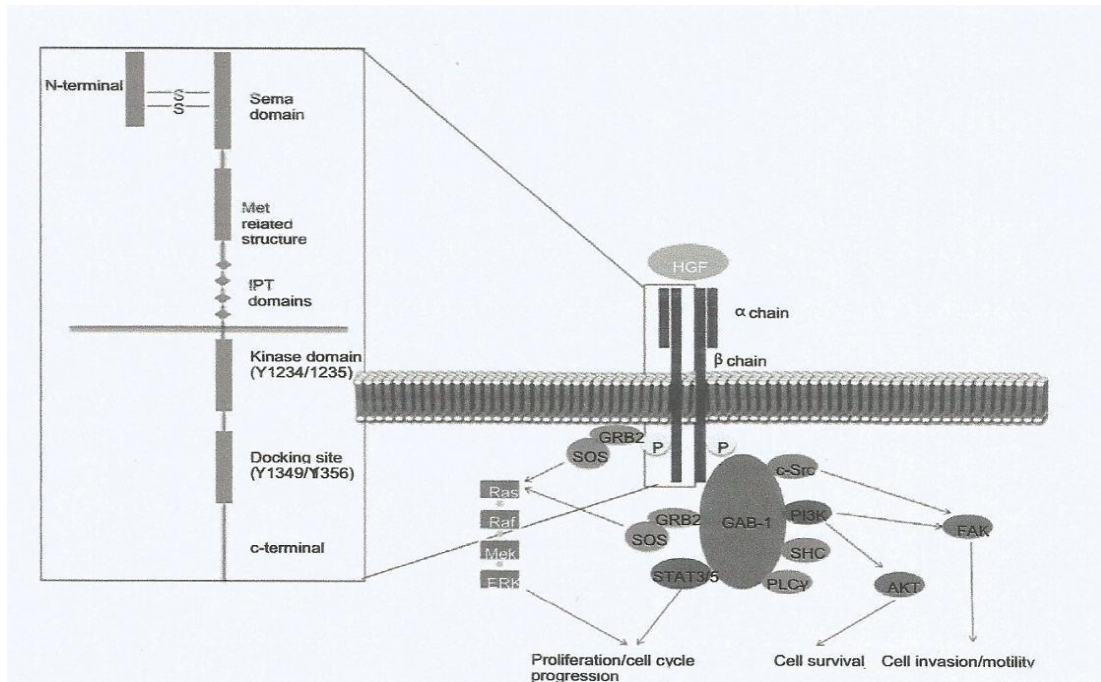


Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση της δομής της HGF πρωτεΐνης με την αλυσίδα (N-terminal hairpin loop) και τέσσερα kringle domains συνδεδεμένα με δισουλφιδικούς δεσμούς με την β-αλυσίδα (serine protease domain) [308].

Η σύνδεση του HGF στο c-Met επάγει τον διμερισμό του υποδοχέα και την φωσφορυλίωση των υπολειμμάτων τυροσίνης στις θέσεις Y1234 και Y1235, εντός της περιοχής της κινάσης τυροσίνης [309]. Περαιτέρω ενεργοποίηση των θέσεων Y1349 και Y1356 έχει ως αποτέλεσμα την στρατολόγηση των πρωτεϊνών, πράγμα που οδηγεί σε ενεργοποίηση και σηματοδότηση του [310-312].

Η σηματοδότηση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε επιθηλιακή - μεσεγχυματική μετατροπή, αγγειογένεση, αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ενίσχυση της μετανάστευσης των κυττάρων. Παρόλα αυτά οι επιδράσεις της σηματοδότησης φαίνονται να εξαρτώνται από τον τύπο του κυττάρου.

Στην εικόνα 15 πιο κάτω φαίνεται σχηματικά η δομή του υποδοχέα c-MET (αριστερή πλευρά) που δείχνει την εξωκυτταρική N-τερματική α -αλυσίδα συνδεδεμένη στην β -αλυσίδα μέσω δισουλφιδικών δεσμών. Η β -αλυσίδα αποτελείται από ένα sema domain (μία περιοχή homology to the semaphorins), τη σχετιζόμενη με το MET δομή και τέσσερις εξωκυτταρικούς τομείς IPT. Ενδοκυττάρια στην β -αλυσίδα είναι η περιοχή κινάσης και η πολυλειτουργική θέση πρόσδεσης. Η δεξιά πλευρά του σχήματος δείχνει τις ενδοκυτταρικές καθοδικές οδούς που ενεργοποιούνται από το c-MET, οι οποίες ενισχύονται από τη σύνδεση των δευτερογενών μορίων GRB-2/SOS, STAT3/5, c-Src, PI3K και PLC-g με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ERK1/2 και AKT και αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την επιβίωση των κυττάρων, την εισβολή και την κινητικότητα (IPT: Μεταγραφή ανοσοσφαιρίνης-πλεξίνης).



Εικόνα 15. (βλέπε κείμενο) [308]

Ρόλος του HGF και c-Met στην ανάπτυξη του μαστού

Η c-Met/HGF οδός μπορεί να έχει μια διαφορετική επίδραση στους διάφορους τύπους κυττάρων που συνθέτουν το μαστικό επιθήλιο. Οι Niranja *et al.* έδειξαν αύξηση κατά πέντε έως εννέα φορές του ρυθμού ανάπτυξης των αυλικών κυττάρων με την επίδραση του HGF σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Στα μυοεπιθηλιακά κύτταρα δεν είχε καμία επίδραση στην ανάπτυξη τους, αλλά προκαλούσε αύξηση των διακλαδώσεων τους [313].

Έκφραση του c-Met στον καρκίνο του μαστού

Στον ΚΜ έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον τέσσερις διαφορετικοί μηχανισμοί που μπορεί να οδηγήσουν σε μη φυσιολογική c-Met σηματοδότηση [314].

1. Γονιδιακή μετάλλαξη

Η μετάλλαξη του γονιδίου c-Met στον καρκίνο του μαστού δεν είναι συχνή. Λίγες μελέτες έχουν αξιολογήσει τη συχνότητα των μεταλλάξεων του MET στον πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού. Οι Bieche *et al.*, σε μια μικρή μελέτη με έντεκα ασθενείς με καρκίνο του μαστού, δεν εντόπισαν καμιά μετάλλαξη στην περιοχή κινάσης τυροσίνης [315]. Αντιθέτως, οι

μεταλλάξεις στην περιοχή του προαγωγέα του HGF είναι πολύ πιο συχνές και έχουν ταυτοποιηθεί στο 15% των Ευρωπαίων ασθενών του μαστού και σε πάνω από το 50% των Αφροαμερικανών ασθενών με καρκίνο του μαστού [316].

2. Γονιδιακή ενίσχυση του MET

Η γονιδιακή ενίσχυση του MET, είναι πολύ συχνή στους γαστρικούς καρκίνους, στα NSCLCs, στους καρκίνους οισοφάγου και του παχέος εντέρου [317]. Στα καρκινώματα NSCLCs η γονιδιακή ενίσχυση του c-Met έχει μελετηθεί πολύ εκτεταμένα. Η ενίσχυση του c-Met συσχετίστηκε με κακή πρόγνωση και επίκτητη αντίσταση στη θεραπεία με αντι-EGFR αναστολείς κινάσης τυροσίνης (TKI) [318, 319].

Στον διηθητικό καρκίνο του μαστού η γονιδιακή ενίσχυση του γονιδίου MET δεν είναι συχνή. Οι Carracedo *et al.* σε μία μελέτη με 155 ασθενείς δεν βρήκαν ενίσχυση MET σε κανένα ασθενή [320]. Οι Gonzalez-Angulo *et al.* σε μια μελέτη 971 ασθενών βρήκαν γονιδιακή ενίσχυση του γονιδίου MET μόνο σε 82 ασθενείς. Αυτή η ενίσχυση σχετίστηκε με χαμηλότερα ποσοστά DFS στην μονοπαραγοντική ανάλυση και υπήρχε μια θετική συσχέτιση μεταξύ του MET και των TNBCs [321].

3. Αυτοκρινής/Παρακρινής ενεργοποίηση του c-Met.

Το HGF και το c-Met συχνά συνεκφράζονται στο διηθητικό καρκίνο του μαστού. Η αυξημένη ενεργοποίηση του c-Met μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή του συνδέτη του, του HGF. Μηχανισμούς με τους οποίους το HGF μπορεί να ενεργοποιήσει το c-Met αποτελούν η παρακρινή ενεργοποίηση, όταν ο HGF παράγεται από στρωματικά κύτταρα όγκου όπως ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα και κύτταρα λείου μυός, καθώς και η αυτοκρινής ενεργοποίηση μετά από παραγωγή του HGF εντός των καρκινικών κυττάρων [311].

Η υψηλότερη συνέκφραση των HGF/c-Met βρίσκεται συχνά στα διηθητικά όρια των όγκων [322][323]. Αυτή η συνέκφραση σχετίζεται με υψηλότερο βαθμό κακοήθειας, αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μειωμένη επιβίωση σε σύγκριση με καρκίνους όπου δεν παρατηρείται αυτή η συνέκφραση [323].

Υψηλά επίπεδα της matriptase, η οποία αποτελεί ενεργοποιητή του HGF, σχετίζεται με υψηλά επίπεδα έκφρασης c-Met και HGF στο διηθητικό καρκίνο του μαστού. Τα επίπεδα αυτά έχουν συσχετιστεί με μειωμένη 30-ετή επιβίωση σε μονοπαραγοντική ανάλυση [324].

Λίγες μελέτες έχουν διερευνήσει την προγνωστική σημασία της φωσφορυλίωσης του c-Met για την μελέτη του ρόλου της ανεξάρτητης ενεργοποίησης του c-Met από τον συνδετή του στο διηθητικό καρκίνο του μαστού. Δυστυχώς, η ανίχνευση του φωσφορυλιωμένου c-Met σε ανθρώπινα μονιμοποιημένα με φορμαλίνη και εγκλεισμένα σε παραφίνη ιστολογικά δείγματα είναι προβληματική λόγω της κακής σταθερότητας των phosphoepitopes και της περιορισμένης ευαισθησίας και ειδικότητας των φωσφο-ειδικών αντισωμάτων [325-328].

Οι Hochgräfe *et al.* διαπίστωσαν σε μία μελέτη με 107 ασθενείς με πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού υψηλότερη έκφραση του φωσφορυλιωμένου c-Met στους TNBCs [328].

Οι Raghav *et al.* βρήκαν υψηλότερα ποσοστά υποτροπής σε ασθενείς των οποίων οι όγκοι είχαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του φωσφορυλιωμένου c-Met, αν και δεν βρήκαν καμιά διαφορά μεταξύ της έκφρασης του φωσφορυλιωμένου c-Met στους διαφορετικούς μοριακούς υποτύπους [329].

4. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης C-MET.

Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης c-Met εκτιμάται με ανοσοϊστοχημεία (IHC)/ανοσοφθορισμό. Σήμερα είναι γενικά παραδεκτό και ότι αποτελεί κακό προγνωστικό παράγοντα στον διηθητικό καρκίνο του μαστού. Διαφορετικές μέθοδοι βαθμολόγησης και σημεία αποκοπής, τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης, η επιλογή του αντισώματος για τον προσδιορισμό IHC και η περιοχή του υποδοχέα που στοχεύεται από το αντίσωμα αποτελούν μεταβλητές που μπορεί να επηρεάσουν την αναλογία των c-Met θετικών περιπτώσεων (15 έως 63%) [304, 324, 330-333].

Οι Pozner-Moulis *et al.* μελέτησαν με έξι διαφορετικά εμπορικά αντισώματα τις ίδιες μικροσυστοιχίες ιστών και παρατήρησαν ότι υπήρχαν διαφορετικά αποτελέσματα για το ίδιο αντίσωμα [334]. Επιπλέον, όταν διαφορετικές παρτίδες του ίδιου μονοκλωνικού αντισώματος εφαρμόστηκαν στον ίδιο όγκο, παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές στο πρότυπο χρώσης. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι πολλά αντισώματα c-Met μπορεί να μην παρέχουν αξιόλογη εκτίμηση της έκφρασης c-Met [334]. Πολλές μελέτες έχουν επίσης σχολιάσει τη σημασία της επιλογής αντισωμάτων c-Met που στοχεύουν την ενδοκυττάρια

περιοχή του, καθώς η έκφραση αυτού του τμήματος του υποδοχέα φαίνεται να έχει μεγαλύτερη προγνωστική σημασία σε σχέση με αυτές που στοχεύουν την εξωκυττάρια περιοχή [324, 334].

Προκύπτει ότι υπάρχει ανάγκη να αναπτυχθεί τυποποιημένη μέθοδος αξιολόγησης της έκφρασης του c-Met.

Οι περισσότερες μελέτες δεν βρήκαν συσχετισμό μεταξύ της έκφρασης του c-Met και των καθιερωμένων προγνωστικών παραγόντων όπως η ηλικία κατά την παρουσίαση, το μέγεθος του όγκου και η κατάσταση των λεμφαδένων [304, 322, 330] [331,335].

Μια μεγάλη πρόσφατη μελέτη που κάλυψε 924 ασθενείς καρκίνου του μαστού έδειξε θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του c-Met, της αύξησης του μεγέθους του όγκου και των θετικών λεμφαδένων. Οι όγκοι που υπερέκφραζαν το c-Met συσχετίστηκαν με χειρότερη επιβίωση αλλά όχι στην πολυπαραγοντική ανάλυση [333]. Όσον αφορά τον βαθμό κακοήθειας του όγκου, δεν προκύπτει συναίνεση μεταξύ των αποτελεσμάτων, με μερικές μελέτες να μη βρίσκουν συσχετισμό [304, 322, 336] ενώ άλλες μελέτες βρίσκουν αυξημένη έκφραση c-Met σε όγκους με υψηλό βαθμό κακοήθειας [330, 331] και μια άλλη βρίσκει υψηλότερη έκφραση του σε όγκους με βαθμό κακοήθειας 1 σε σχέση με τον βαθμό κακοήθειας 3 [335].

Στην μελέτη αυτή δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση της έκφρασης της πρωτεΐνης του c-Met με τον βαθμό κακοήθειας, LVI, και την θετικότητα των λεμφαδένων. Παρόλα αυτά το Fisher's exact test έδειξε την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής σχέσης μεταξύ του c-Met και του androgen receptor (p-value=0.041) καθώς επίσης και με το ki67 (p-value=0.002). Η σημασία αυτής της συσχέτισης δεν έχει μελετηθεί.

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, διαφορετικές μέθοδοι βαθμολόγησης και σημεία αποκοπής, τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης, η επιλογή του εμπορικού αντισώματος για τον προσδιορισμό IHC καθώς και η περιοχή του υποδοχέα που στοχεύεται από το αντίσωμα έχουν ενδεχομένως συμβάλει στην ποικιλία των αποτελεσμάτων που περιγράφονται στην βιβλιογραφία.

5.4 C-MYC

Το B αποτελεί ένα ογκογονίδιο, που κωδικοποιεί μια πολυλειτουργική πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη που συμβάλλει στην ανάπτυξη του κυτταρικού κύκλου και στον πολλαπλασιασμό καθώς και στον μηχανισμό της απόπτωσης και στον μετασχηματισμό των κυττάρων. Η πρωτεΐνη MYC, που έχει ρυθμιστικό ρόλο για περισσότερα από 1500 γονίδια, αποτελεί μια basic helix-loop-helix zipper (bHLHZ) motif που περιέχει ένα παράγοντα μεταγραφής του οποίου η δραστηριότητα ρυθμίζεται από την άμεση σύνδεση του με μια άλλη πρωτεΐνη bHLHZ, την MAX [337-344].

Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης MYC μπορεί να οδηγήσει στην μεταγραφική ενεργοποίηση ή καταστολή συγκεκριμένων γονιδίων [345]. Η δράση αυτή της MYC ρυθμίζεται με ακρίβεια από τη δραστηριότητα των πολλαπλών MAX πρωτεϊνών (όπως MAD, MGA, MXD4 και MNT) [346, 347]. Η γονιδιακή θέση 8q24, που βρίσκεται το ογκογονίδιο c-MYC, αποτελεί την πιο συχνά ενισχυμένη περιοχή στον καρκίνο του μαστού και στους διάφορους υποτύπους του [348]. Σε διάφορες μελέτες [349] έχει ανιχνευθεί σε 1-94% των ασθενών και σχετίζεται περισσότερο με τον basal-like καρκίνο αλλά ο ρόλος του στους TNBC δεν έχει καθοριστεί ακριβώς. Οι Allen *et al.* σε μία μεταανάλυση όπου μελετήθηκε η γονιδιακή του έκφραση από πέντε μεγάλες microarrays databases, σε σχέση με το ER status, αυξημένη έκφραση του παρατηρήθηκε στον υποτύπο basal-like [349]. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε άλλες μελέτες όπου και πάλι υπήρχε αυξημένη έκφραση του c-MYC η οποία συνδεόταν με τον basal-like υποτύπο [351, 352].

Οι Bouchalova *et al.* μελέτησαν την έκφραση της πρωτεΐνης c-MYC με ανοσοϊστοχημεία ε 187 ασθενείς με TNBC. Αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης cMYC βρέθηκε στην πλειοψηφία των TNBCs και συσχετιζόταν με χειρότερη επιβίωση [353].

Οι Horiuchi *et al.* μελέτησαν την βιολογία των TNBCs και προσδιόρισαν αυξημένη έκφραση του c-MYC καθώς επίσης και διαταραχή στην έκφραση πολλαπλών MAX πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την έκφραση της πρωτεΐνης MYC. Αυτή η διαταραχή μπορεί να συμβάλει στην αυξημένη έκφραση της MYC και στην χειρότερη έκβαση. Επίσης για πρώτη φορά οι ρευνητές αυτοί έδειξαν ότι η αυξημένη έκφραση της MYC μπορεί να επηρεάσει την απόκριση του όγκου στη προεγχειρητική χημειοθεραπεία πράγμα που συσχετίστηκε με φτωχή αντίκριση και μειωμένη ελεύθερη νόσου επιβίωση [354].

Η χειρότερη επιβίωση των ασθενών που έχουν όγκους με αυξημένη έκφραση MYC, υπαγορεύει την ανεύρεση στοχευμένης θεραπείας γι αυτούς τους ασθενείς.

Στην δική μας μελέτη δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση της έκφρασης της πρωτεΐνης του c-MYC με τον βαθμό κακοήθειας, LVI, και την θετικότητα των λεμφαδένων αλλά ούτε και με τους άλλους μοριακούς δείκτες.

5.5 C-KIT

C-kit είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας κινάσης τυροσίνης που εντοπίζεται στην επιφάνεια των αρχέγονων βλαστικών αιμοποιητικών κυττάρων αλλά και σε άλλα κύτταρα. Εναλλακτικά ονομάζεται υποδοχέας βλαστικών κυττάρων (SCFR) ή CD117. Το γονίδιο του βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4q12, περιέχει 21 εξώνια και έχει μήκος 89 kb. Το c-kit περιέχει 976 αμινοξέα και έχει βάρος 145 kDa, ενώ αποτελείται από 3 μέρη: το εξωκυττάριο με πέντε Ig-δακτύλιους, ένα εξαιρετικά υδρόφοβο διαμεμβρανικό μέρος (που περιέχει 23 αμινοξέα) και ένα ενδοκυττάριο μέρος με την λειτουργία της κινάσης τυροσίνης. Αυτός ο υποδοχέας παρουσιάζεται και εκφράζεται στα βλαστικά αιμοποιητικά κύτταρα, μαστοκύτταρα, και μελανοκύτταρα [355].

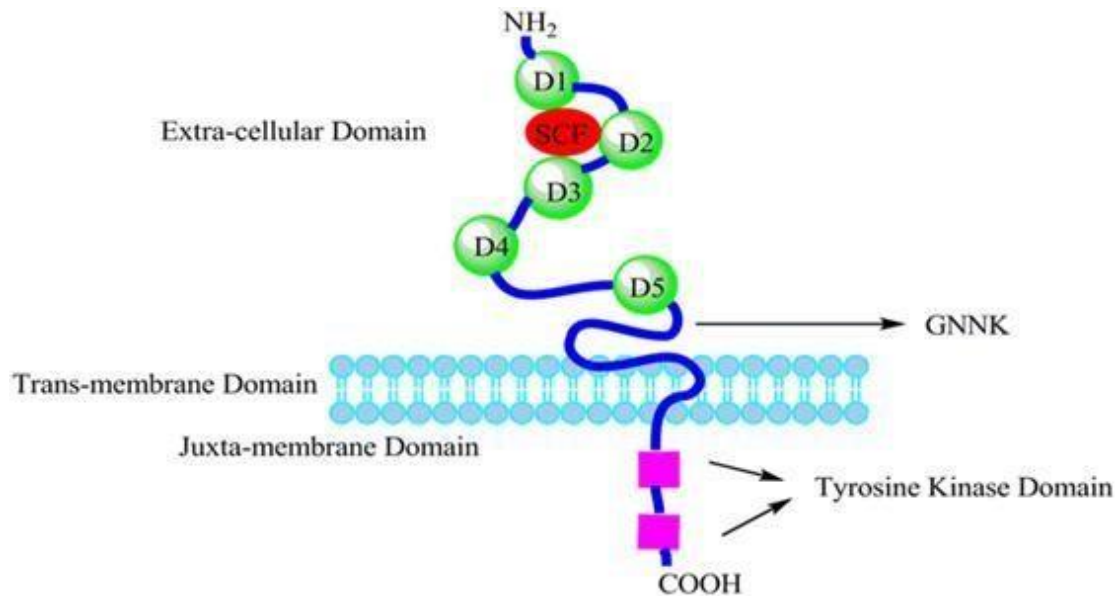
Λειτουργία

Σύνδεση του c-kit με τον παράγοντα βλαστικών κυττάρων (SCF) διεγείρει σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως κυτταρική επιβίωση, πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση, προσκόλληση και χημειοταξία ενώ επάγει την απόπτωση και αυξάνει την διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων [201]. Η σύνδεση του c-kit με τον SCF προκαλεί διμερισμό του υποδοχέα πράγμα που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης (εικόνα 16).

Ο ρόλος του c-kit στον καρκίνο του μαστού

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως το c-kit αποτελεί έναν υποδοχέα κινάσης τυροσίνης που είναι απαραίτητος για την κυτταρική διαίρεση (π.χ. των αιμοποιητικών κυττάρων) με μειωμένη ή αυξημένη έκφραση σε ορισμένες κακοήθειες [356]. Η αύξηση της έκφρασης του c-kit παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των στρωματικών όγκων του γαστρεντερικού [357]. Χαμηλή έκφραση του c-kit παίζει επίσης ρόλο στην εξέλιξη κάποιων όγκων (π.χ. μελάνωμα) ενώ μπορεί να έχει αυτοκρινή καθώς και παρακρινή δράση [358]. Αν και η δραστηριότητα της μεταλλαγμένης c-kit κινάσης δεν είναι πλήρως κατανοητή, φαίνεται ότι οι καρκίνοι μαστού, θυρεοειδούς και ωοθηκών σχετίζονται με απώλεια της

έκφρασης του c-kit [359]. Στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού η σημασία της έκφρασης του c-kit είναι αμφιλεγόμενη και το ποσοστό θετικότητας του c-kit κυμαίνεται από 1 έως 82%, πράγμα που πιθανόν να οφείλεται στις διαφορετικές μεθόδους



Εικόνα 16: Δομή του c-kit

προσδιορισμού της έκφρασης του c-kit. Τέσσερις μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση του c-kit σε φυσιολογικό ιστό του μαστού είναι 100% [360]. Σε μια άλλη μελέτη που εξέτασε την έκφρασή του c-kit σε καλοήθεις όγκους, αυτή ήταν χαμηλότερη από ότι στον φυσιολογικό ιστό του μαστού και ακόμη χαμηλότερη στον καρκίνο του μαστού [361]. Οι Ulivi *et al.* ανέλυσαν την έκφραση των c-kit και SCF σε επιθήλια από φυσιολογικό μαστικό αδένά αλλά και από α Β και διηθητικό καρκίνο του μαστού. Με τη χρήση της ανοσοϊστοχημείας και *in situ* υβριδισμό, η πρωτεΐνη και η έκφραση του mRNA, τόσο του c-kit αλλά και του SCF, ήταν υψηλές στο φυσιολογικό μαστικό αδένά, σημαντικά χαμηλότερες σε *in situ* καρκίνο και σχεδόν μη ανιχνεύσιμες σε διηθητικό καρκίνο του μαστού. Αυτά τα αποτελέσματα εισηγούνται ότι τα C-kit/SCF παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της φυσιολογικής ανάπτυξης του μαστικού επιθηλίου και ότι η διαδικασία κακοήθους μετασχηματισμού συνοδεύεται από προοδευτική απώλεια τους [362]. Οι Talaiezhadeh *et al.* αξιολόγησαν με IHC την έκφραση του c-kit σε 60 δείγματα καρκίνου του μαστού και σε 60 δείγματα φυσιολογικού μαστικού και βρήκαν ότι η έκφραση του σ' όλα τα δείγματα με καρκίνο του μαστού ήταν αρνητική ενώ στα δείγματα με φυσιολογικό μαστικό αδένά ήταν θετική στο 22% [363].

Η σχέση της έκφρασης του c-kit με την πρόγνωση είναι επίσης αμφιλεγόμενη. Οι Tsuitsui *et al.* βρήκαν ότι η απώλεια της έκφρασης c-kit συνδεόταν με λεμφαδενικές μεταστάσεις και χειρότερη πρόγνωση καθώς επίσης και με πιο προχωρημένο στάδιο του καρκίνου του μαστού [364]. Οι Nielsen *et al.* διαπίστωσαν έκφραση του c-kit στο 30% των basal-like καρκίνων του μαστού η οποία όμως δεν επηρέαζε την πρόγνωση [146]. Οι Simon *et al.* δεν βρήκαν καμιά διαφορά στην πρόγνωση μεταξύ των καρκίνων του μαστού που ήταν c-kit θετικοί και αυτούς που ήταν c-kit αρνητικοί. Αναφέρουν επίσης ότι η έκφραση του c-kit δεν παρατηρείται συχνά στον καρκίνο του μαστού και μάλιστα οι c-kit θετικοί καρκίνοι μπορεί να μην έχουν πραγματική αύξηση της έκφρασης του c-kit αφού το c-kit εκφράζεται επίσης στο φυσιολογικό επιθήλιο του μαστού [365].

Εντελώς αντίθετα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν από τους Diallo *et al.* που υποστήριξαν ότι η έκφραση του c-kit αποτελεί ένα ανεξάρτητο κακής πρόγνωσης παράγοντα στους καρκίνους υψηλού κινδύνου [366].

Έκφραση του c-kit στους τριπλά αρνητικούς καρκίνους

Σε αντίθεση με προηγούμενα ευρήματα, νέες μελέτες έχουν δείξει υπερέκφραση του c-kit σε κάποιους από τους TNBCs [128, 367]. Σε μία μελέτη από τους Kim *et al.*, το c-kit εκφραζόταν στο 19.3% του basal-like υποτύπου των TNBCs [102]. Οι Zhu *et al.* μελέτησαν την έκφραση της πρωτεΐνης c-kit και τις μεταλλάξεις του γονιδίου c-kit στους TNBCs. 41.7% είχαν έκφραση του c-kit αλλά μόνο 1/171 ασθενείς είχαν μετάλλαξη γονιδίου c-kit. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το 40% των θετικών για c-kit TNBCs μπορεί να έχουν κάποιο όφελος από αναστολείς κινάσης της τυροσίνης [368]. Οι Kashiwagi *et al.* ανέφεραν έκφραση της c-kit σε 111 (16.6%) από 667 καρκίνους του μαστού και η συχνότητα θετικής έκφρασης ήταν πιο συχνή σε ασθενείς με BLBC και θεωρήθηκε ως ένας ανεξάρτητος παράγοντας κακής πρόγνωσης [369]. Οι Daron *et al.* βρήκαν ότι το c-kit εκφραζόταν στο 6% των TNBCs στο Βιετναμέζικο πληθυσμό και στο 19% των περιπτώσεων στις ΗΠΑ, γεγονός που υποδηλώνει ότι η χρήση των αναστολέων της κινάσης τυροσίνης θα πρέπει να περιορίζεται σε μικρή ομάδα ασθενών [370]. Οι Kanapathy, Pillai *et al.* ανέφεραν έκφραση του c-kit στο 89% των TNBCs και αυτό συσχετίστηκε με EGFR και CK5/6 έκφραση καθώς και υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67 [371]. Οι Jansson *et al.* έδειξαν έκφραση της τάξεως του 49% στους TNBCs vs 10% στους μη TNBCs [372].

Στην μελέτη αυτή το Fisher's exact test έδειξε στατιστικά σημαντική σχέση (p value=0.022) του c-kit, το οποίο ήταν θετικό για 34 ασθενείς και αρνητικό για 45 ασθενείς, με τις cytokeratins ck5/6. Στατιστικά σημαντική σχέση παρατηρήθηκε επίσης μεταξύ του ckit και του EGFR (p -value=0.045)

Multivariate logistic regression model with stepwise backward elimination of variables με p -value=0.05 έδειξε ότι η έκφραση του c-kit ήταν χαμηλότερη σε ασθενείς με υψηλότερο βαθμό κακοήθειας (OR=0.14, 95%=CI 0.025 – 0.793, p value =0.026).

Όπως αναφέρεται και πιο πάνω η σημασία της έκφρασης του c-kit στον καρκίνο του μαστού είναι αμφιλεγόμενη αφού το ποσοστό θετικότητας του c-kit κυμαίνεται από 1 έως 82% στις διάφορες μελέτες πράγμα που πιθανόν οφείλεται στις διαφορετικές μεθόδους προσδιορισμού της έκφρασης του c-kit.

Θεραπεία

Βάσει των μελετών που έδειξαν υψηλότερη έκφραση του c-kit στους TNBCs αυτή η υποομάδα των ασθενών ίσως θα μπορούσε να ωφεληθεί από στοχευμένη θεραπεία με αναστολείς της κινάσης τυροσίνης όπως το imatinib και το dasatinib.

Ειδικότερα:

Imatinib: αποτελεί ένα μοριακό παράγοντα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την στόχευση του c-kit. Παλαιότερες μελέτες έχουν όμως δείξει ότι η απόκριση στη θεραπεία με imatinib έχει μια στενότερη σχέση με την μεταλλακτική ενεργοποίηση του γονιδίου c-kit και όχι με την έκφραση της πρωτεΐνης c-kit [373-375]. Μια άλλη κλινική δοκιμή έδειξε επίσης ότι η imatinib, ως μονοθεραπεία, δεν είχε καμιά κλινική αποτελεσματικότητα στους μεταστατικούς καρκίνους του μαστού [376].

Dasatinib: αποτελεί ένα ακόμα πιθανό μοριακό παράγοντα που στοχεύει τους c-kit θετικούς TNBCs, αλλά η ακριβής επίδραση του χρειάζεται περαιτέρω έρευνα και κλινικές δοκιμές.

5.6 PDL-1

Τα τελευταία χρόνια οι στοχευμένες θεραπείες κατά του οιστρογονικού υποδοχέα ή κατά των ογκογόνων πρωτεϊνών (erbB2, EGFR, VEGF, και μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR) έχουν οδηγήσει σε σημαντική θεραπευτική πρόοδο. Δυστυχώς στις περισσότερες περιπτώσεις αναδύονται ανθεκτικοί κλώνοι λόγω της μεγάλης ικανότητας προσαρμογής και μετάλλαξης

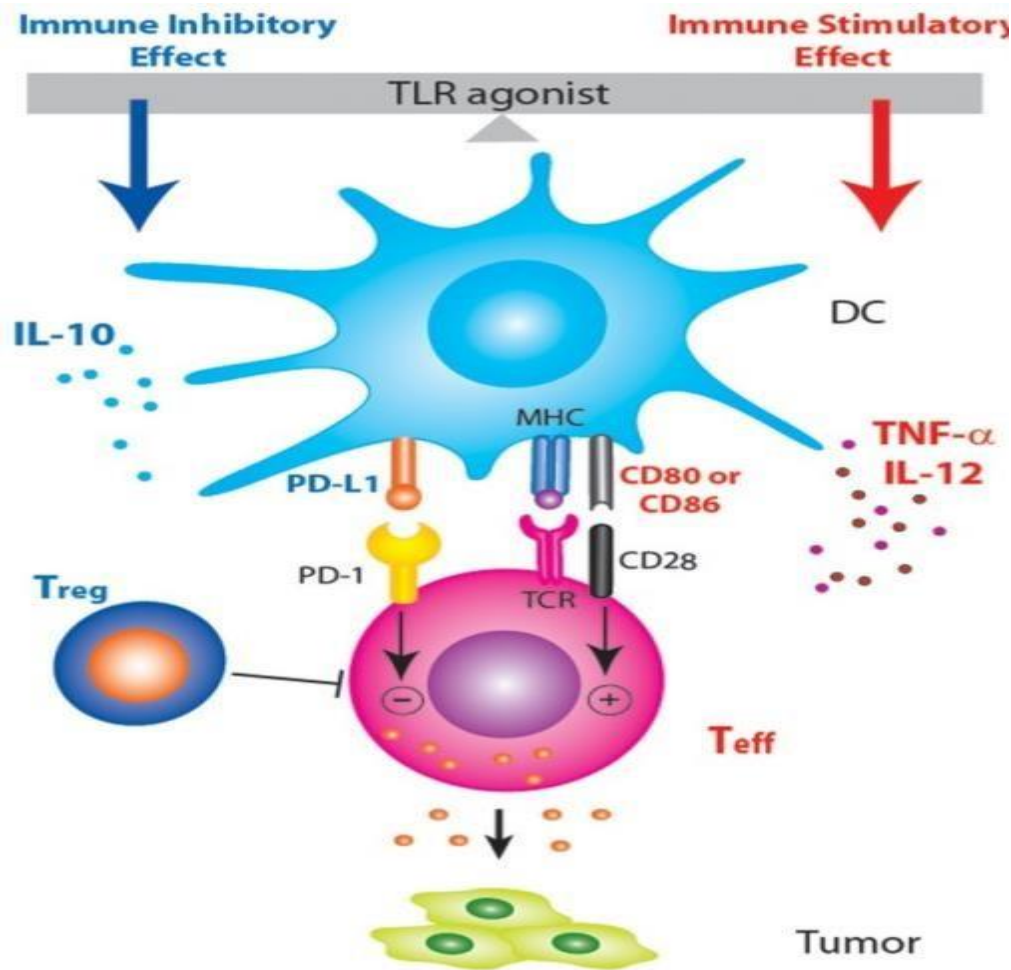
των καρκινικών κυττάρων, πράγμα που καθιστά προσωρινή την απόκριση του όγκου. Θεωρητικά, αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με την ανοσοθεραπεία του καρκίνου λόγω της προσαρμοστικότητας της ανοσολογικής απόκρισης. Δυστυχώς, ο καρκίνος του μαστού είναι λιγότερο νοσογόνος σε σχέση με το μελάνωμα και τον νεφρικό καρκίνο και τα αποτελέσματα της ανοσοθεραπείας (ιντερλευκίνη 2, ιντερφερόνες, και εμβόλια) ήταν μάλλον απογοητευτικά [377]. Μόνο την τελευταία δεκαετία έχει αναφερθεί μια ευνοϊκή πρόγνωση, σε σχέση με την παρουσία των ογκο-διηθητικών λεμφοκυττάρων (TILs) και της ανοσολογικής απόκρισης, κυρίως για ER-αρνητικούς όγκους, με υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού [378-380] [381, 382]. Η ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης αποτελεί ένα πολύπλοκο φαινόμενο που βασίζεται στην ενεργοποίηση και αναστολή διαφόρων μονοπατιών. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την δυνατότητα διατήρησης ενός ανοσοκατασταλτικού μικροπεριβάλλοντος που ευνοεί την εξέλιξη του όγκου.

Τι είναι το PDL-1;

Ο σύνδεσμος -1 προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, PDL-1, περιγράφει την σύνδεση μεταξύ υποδοχέα προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου -1 και του συνδέτη (PD1) η οποία αποτελεί μια σημαντική οδό αναστολής. Το PDL-1 αποτελεί μια 40kDa διαμεμβρανική πρωτεΐνη (PD-L1 or CD274, B7-H1) που κωδικοποιείται από το γονίδιο CD274 στο χρωμόσωμα εννέα. Η κωδικοποίηση αυτή ρυθμίζεται από την ιντερφερόνη 1 (IRF1) και τον Signal Transducer Activation of Transcription 1 (STAT1) εντός του υποκινητή [383]. Το PD-L1 εκφράζεται σε ποικίλους φυσιολογικούς ιστούς περιλαμβανομένων των φυσικών φονικών κυττάρων (natural killer cells), των μακροφάγων, μυελοειδών δενδριτικών κυττάρων, Β λεμφοκυττάρων, επιθηλιακών κυττάρων και αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά και στην επιφάνεια πολλών καρκινικών κυττάρων [384].

Ρόλος στον καρκίνο

Ο φυσιολογικός ρόλος του PDL1 (εικόνα 17) έγκειται στη δέσμευση των υποδοχέων προγραμματισμού θανάτου-1 (PD-1) που εκφράζονται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων κυτταροτοξικών Τ κυττάρων. Αυτή η σύνδεση προκαλεί αναστολή της παραγωγής IL-2 και της μετανάστευσης των Τ-κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό μέσω μειωμένης φωσφορύλιωσης της ZAP70 και PKC [385]. Αυτή η καταστολή των Τ-κυττάρων παρέχει ένα σημαντικό ρυθμιστικό έλεγχο στην ανοσολογική απόκριση [386].



Εικόνα 17. Ρόλος του PDL-1

Πρόσφατα έχει επισημανθεί ότι η έκφραση του PDL-1 σε καρκινικούς όγκους διαφορετικής προέλευσης μπορεί να παρεμβαίνει στην καρκινική ανοσία καταστέλλοντας το ανοσοποιητικό σύστημα από το να καταστρέψει τα καρκινικά κύτταρα. Η έκφρασή του έχει μελετηθεί σε διαφορετικές μορφές καρκίνου, όπως νεφρών, πνευμόνων, παγκρέατος, οισοφάγου, ωοθηκών, παχέος εντέρου, κεφαλής και τραχήλου, καθώς και σε πλακώδη καρκινώματα, μελανώματα και γλοιώματα με ενδείξεις χαρακτηριστικές σε διάφορες μελέτες [387, 388] [389-397].

Λίγες μελέτες έχουν διερευνήσει το ρόλο της έκφρασης του PD-L 1 στον καρκίνο του μαστού, όπου τόσο ο βαθμός έκφρασης όσο και η προγνωστική του αξία ποικίλουν.

Οι Gheben *et al.* μελέτησαν την έκφραση της πρωτεΐνης PD-L 1 με ανοσοϊστοχημεία (IHC) σε δείγματα καρκίνου του μαστού και διαπίστωσαν ότι σχετιζόταν με κακής πρόγνωσης χαρακτηριστικά όπως υψηλότερο βαθμό κακοήθειας, αρνητικούς ορμονικούς υποδοχείς,

αυξημένη διήθηση με ρυθμιστικά κύτταρα T και επίσης υψηλότερη έκφραση του Ki67 [398, 399]. Σε μια μελέτη από τους Quin *et al.*, τομές όγκων από 870 ασθενείς με καρκίνο του μαστού εγκλεισμένοι σε παραφίνη βάφτηκαν με PD-L 1 αντίσωμα. Η έκφραση του PD-L 1 παρατηρήθηκε σε ποσοστό μεγαλύτερο του 20% με υψηλότερο ποσοστό έκφρασης στους ασθενείς με TNBC της τάξεως του 55,9% σε σύγκριση με άλλους τύπους. Η θετική έκφραση του PD-L 1 συσχετιζόταν με στατιστικά σημαντική χειρότερη επιβίωση σε σχέση με εκείνους με PD-L 1 αρνητική έκφραση ανεξάρτητα από τον τύπο του καρκίνου του μαστού [400]. Μια άλλη μελέτη με 105 TNBC καρκίνους του μαστού αποκάλυψε ότι στο 19% (20/105) των TNBCs υπήρχε έκφραση PD-L 1, και ότι αυτή η έκφραση ήταν μεγαλύτερη από ότι σε μη-TNBCs [401]. Οι Ali *et al.* έδειξαν έκφραση του PD-L 1 στο 19% των ασθενών με basal-like όγκους οι οποίοι, όπως έχει συζητηθεί και πιο πάνω, αποτελούν τον κύριο υποτύπο των TNBCs. Η έκφραση αυτή συνδεόταν με βελτιωμένη επιβίωση [402]. Οι Muenst *et al.* μελέτησαν την έκφραση του PD-L1 σε 650 καρκίνους του μαστού με τη χρήση TMA. Παρατηρήθηκε έκφραση του σε 152 (23,4%) από τα 650 δείγματα και συνδέθηκε με την ηλικία, το μέγεθος του όγκου, AJCC ταξινόμηση πρωτογενούς όγκου, βαθμό του όγκου, την κατάσταση των λεμφαδένων, απουσία έκφρασης ER, υψηλή έκφραση Ki-67 και μικρότερη συνολική επιβίωση [403]. Στους Soliman *et al.* χρωματίστηκαν με τη χρήση TMA 61 διηθητικοί καρκίνοι του μαστού για έκφραση PD-L 1 και αναλύθηκαν. Η έκφραση PD-L 1 ήταν υψηλότερη στον υποτύπο basal-like σε σύγκριση με το luminal. Αυτή η υψηλή έκφραση του PD-L 1 στα basal like συσχετιζόταν με υπερέκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην διήθηση, αυξημένο πολλαπλασιασμό και χημειοαντίσταση σε σύγκριση με τα basal που είχαν χαμηλή έκφραση του PD-L1. Η ανάλυση τους έδειξε επίσης υψηλή έκφραση του PD-L1 στις περιπτώσεις με θετικούς λεμφαδένες σε σχέση με τις περιπτώσεις με αρνητικούς λεμφαδένες, υποδηλώνοντας ότι η στόχευση του PDL-1 μπορεί να προκαλέσει εξόντωση των επιθετικών καρκινικών κυττάρων του μαστού από το ανοσοποιητικό σύστημα. [404].

Οι Guo *et al.* χρησιμοποίησαν IHC και *in situ* υβριδισμό για την ανίχνευση της πρωτεΐνης PD-L1 και την έκφραση του mRNA σε όγκους από 183 ασθενείς με TNBC. Έκφραση PD-L1 παρατηρήθηκε στο 13.7% (25/183) των όγκων TNBC (4,9% από κύτταρα του ανοσοποιητικού και 8,7% από τα καρκινικά κύτταρα). Η PDL-1 έκφραση συσχετίστηκε με υψηλότερο βαθμό κακοήθειας του όγκου, αλλά δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση με την εμμηνοπαυσιακή κατάσταση, την λεμφαδενική μετάσταση, τον ιστολογικό υποτύπο ούτε με

το μέγεθος του όγκου [405]. Οι Sabatier *et al.* ανέλυσαν αναδρομικά την έκφραση του PD-L1 mRNA σε 45 κυτταρικές γραμμές καρκίνου του μαστού. Η έκφραση PD-L1 ήταν υψηλότερη στους basal-like όγκους (38%) και συσχετιζόταν με χειρότερης πρόγνωσης παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά όπως μεγαλύτερο μέγεθος του όγκου, υψηλό βαθμό κακοήθειας, υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού και αυξημένη ανοσολογική απόκριση κυτταροτοξικών T-κυττάρων καθώς και με μεγαλύτερη συνολική επιβίωση και καλύτερη απόκριση στη χημειοθεραπεία, υποδηλώνοντας ότι η ενεργοποίηση των αδρανών λεμφοκυττάρων που διηθούν τον όγκο από PDL1 αναστολές θα μπορούσε να αποτελέσει υποσχόμενη μέθοδο αντιμετώπισης των καρκίνων του μαστού με υψηλή έκφραση PD-L1 [406]. Οι Schalper *et al.* μελέτησαν επίσης την έκφραση PDL1 mRNA σε 636 δείγματα καρκίνου του μαστού. Θετική έκφραση του PD-L 1 mRNA βρέθηκε στο 60% των όγκων του μαστού [407].

Οι Bertucci *et al.* ανέλυσαν έκφραση PD-L1 mRNA σε 306 δείγματα καρκίνου του μαστού. Η έκφραση του PD-L1 ήταν υψηλότερη σε φλεγμονώδεις καρκίνους του μαστού και συνδεόταν με επιθετικούς υποτύπους με αρνητικούς ορμονικούς υποδοχείς καρκίνους, basal-like, εμπλουτισμένους με ErbB2 και ενδείξεις απόκρισης των κυτταροτοξικών T- λεμφοκυττάρων κατά των όγκων, αλλά και με καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία [408]. Αυτή η φαινομενικά αντιφατική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης ενός ανοσοκατασταλτικού μορίου PD-L1 και της βελτιωμένης θεραπευτικής απόκρισης, μπορεί να επιλυθεί αν η έκφραση του PD-L1 θεωρηθεί ως δείκτης μιας ισχυρής αντικαρκινικής ανοσοαπόκρισης μεταξύ των ασθενών που έλαβαν θεραπεία με ανοσογόνο χημειοθεραπεία. Σε αυτούς τους ασθενείς, η αναστολή PD-L1 θα μπορούσε να προστατεύσει τα ενεργοποιημένα T-κύτταρα ή να επανενεργοποιήσει τα αδρανοποιημένα T-κύτταρα και να βελτιώσει την θεραπευτική ανταπόκριση, ιδίως όταν συνδέεται με ανοσογόνο χημειοθεραπεία.

Η διαφορετική επιφανειακή έκφραση του PD-L1 μεταξύ των κυτταρικών σειρών οφείλεται μάλλον στην διαφορετική συνολική έκφραση του PD-L1. Τα αποτελέσματα από την μελέτη των κυτταρικών σειρών υποδηλώνουν επίσης διαφορές μεταξύ των διαφόρων μορφών καρκίνου του μαστού οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένη έκφραση του PD-L 1 από τα κύτταρα του όγκου ανεξαρτήτως από το μικροπεριβάλλον του. Ένας τέτοιος μηχανισμός που θα μπορούσε να εξηγήσει την διαφορετική έκφραση του PD-L1 αποτελεί ο συνδυασμός υψηλών επιπέδων γονιδιακής έκφρασης STAT1/ χαμηλών επιπέδων IRFBP2.

Θα πρέπει όμως να καταστεί σαφές ότι πολλαπλές οδοί, εκτός από JAK/STAT που ενεργοποιείται από B, μπορεί να επηρεάσουν την έκφραση PD-L 1 στα καρκινικά κύτταρα, όπως διάφορες οδοί πολλαπλασιασμού - MEK/ERK και PI3K/AKT - οι οποίες μπορούν επίσης να αυξήσουν την έκφραση του PD-L1 [111]. Η ετερογένεια της έκφρασης του PD-L1 στον όγκο μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητική έκφραση του PD-L1 όταν ανιχνεύεται με ανοσοϊστοχημεία, εάν η δειγματοληψία έγινε από περιοχή του όγκου που μπορεί να είχε προσωρινά χαμηλότερο επίπεδο έκφρασης PD-L 1. Είναι σαφές ότι μόνο με την χρήση της ανοσοϊστοχημείας δεν μπορούν να διακριθούν όλοι οι όγκοι που μπορεί να επωφεληθούν από την αντι-PDL1 θεραπεία. Η χρήση επιπλέον μεθόδων ανίχνευσης του PD-L1 σε έναν όγκο θα βοηθήσει στην καλύτερη επιλογή ασθενών για θεραπεία με PD-1/PD-L1 αντισώματα

Μελέτες ανάλυση της έκφρασης του mRNA PD-L1 (ISH) [405, 406] δείχνουν ότι σχετίζεται με μεγαλύτερη ελεύθερη υποτροπής επιβίωση ενώ η έκφραση της πρωτεΐνης με IHC έχει συσχετιστεί με χειρότερη συνολική επιβίωση [400, 401, 403].

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε έκφραση του PD-L1 στο 10.4% των ασθενών ενώ 69 από τους 77 ασθενείς (89.6%) δεν είχαν PD-L1 έκφραση. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σχέση του PD-L1 με το βαθμό κακοήθειας, την λεμφαγγειακή διήθηση και τον αριθμό των θετικών λεμφαδένων.

Η ασυμφωνία αυτή στα αποτελέσματα των διάφορων μελετών πιθανό να οφείλεται στην απουσία τυποποίησης της μεθόδου IHC για την ανίχνευση του PD-L1. Αρκετά αντισώματα είναι διαθέσιμα αλλά στερούνται ειδικότητας [409, 410]. Πρόσφατες μελέτες που χρησιμοποίησαν επικυρωμένα αντισώματα για την ανίχνευση του PD-L1 με IHC σε διάφορους καρκίνους έδειξαν ότι η έκφραση PD-L1 είχε θετική προγνωστική επίδραση [390, 411, 412], σε αντίθεση με ό, τι είχε προηγουμένως προταθεί.

Θεραπεία

Τα πρώτα δεδομένα από τις κλινικές μελέτες με αντι-PD1/PD-L1 μονοκλωνικά αντισώματα σε TNBC έχουν δείξει ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Προκαταρκτικά αποτελέσματα από κλινικές δοκιμές του pembrolizumab (ένα μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-PD1) σε ασθενείς με TNBC (n = 27) που είχαν λάβει όλες τις διαθέσιμες θεραπείες ανέφερε συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης 18,5%, μεταξύ των οποίων ένα περιστατικό με πλήρη ανταπόκριση (3,7%) [413].

Η κλινική δοκιμή με MPDL3280A (ένα μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-PD-L1) σε μεταστατικούς TNBCs (n = 9 αξιολογήσιμοι) που εκφράζουν το PD-L1 ανέφερε ποσοστό ανταπόκρισης 33,3% στη θεραπεία, με έναν ασθενή να έχει πλήρη ανταπόκριση, ενισχύοντας την υπόθεση ότι το PD-L1 εκφράζεται κυρίως σε TNBC.

Κλινικές δοκιμές με άντι-PD1 ή άντι-PD-L1 φάρμακα με σκοπό την επαναφορά αντι-καρκινικής ανοσίας έχουν δείξει πολύ ελπιδοφόρα αποτελέσματα [213, 414, 415] και οι μελέτες φάσης III βρίσκονται σε εξέλιξη.

Αυτές οι παρατηρήσεις υποστηρίζουν την αξιολόγηση του PD-1/PD-L1 ως στοχευμένης θεραπείας στον καρκίνο του μαστού.

5.7 ALK

Η κινάση του αναπλαστικού λεμφώματος (ALK) αποτελεί έναν υποδοχέα τυροσίνης, μέλος της οικογένειας υποδοχέων ινσουλίνης. Φυσιολογικά εκφράζεται επιλεκτικά στα κύτταρα του νευρικού συστήματος [286, 287]. Ανεξέλεγκτη δραστηριότητα της ALK μπορεί να προκύψει από σημειακές μεταλλάξεις, χρωμοσωμιακές μετατοπίσεις, ή άλλους τύπους αναδιατάξεων που εμπλέκονται στην παθογένεση διαφόρων κακοηθειών στον άνθρωπο. Η αναδιάταξη και μετάλλαξη της ALK εμπλέκεται στην παθογένεση αναπλαστικού λεμφώματος, νευροβλαστώματος και μυοϊνοβλαστικού όγκου. Ένας αυξημένος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου της (CNG) καθώς και ενίσχυση έχουν αναφερθεί σε μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (NSCLC), καρκίνο του παχέος εντέρου, καρκίνωμα νεφρικών κυττάρων (RCC), ραβδομυοσάρκωμα, και στο νευροβλάστωμα [288-292].

ALK στον καρκίνο του μαστού

Σημαντικά αυξημένος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου της ALK (CNG) καθώς και ενίσχυση έχουν αναφερθεί σε κυτταρικές σειρές και όγκους διηθητικού καρκίνου του μαστού [293, 294]. Η ταυτοποίηση των γενετικών ανωμαλιών της δεν είναι η ίδια σε όλους τους όγκους μαστού σε αντίθεση με άλλους τύπους όγκων.

Πρόσφατα, ένα νέο γονίδιο σύντηξης που σχετίζεται με την ALK και η echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4) ανακαλύφθηκαν στο μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (NSCLC) [295, 296]. Οι Fukuyoshi *et al.* απέτυχαν να

ανιχνεύσουν τις μελετημένες μεταγραφές σύντηξης EML4-ALK σε 90 περιστατικά καρκίνου του μαστού με τη χρήση PCR [297]. Οι Lin *et al.* ανίχνευσαν την EML4-ALK μεταγραφή σύντηξης στο 2,4% των καρκινωμάτων του μαστού [298]. Σε αυτές τις δύο μελέτες το γονιδιακό προφίλ των καρκίνων του μαστού δεν αναφέρεται. Οι Grob *et al.* δεν βρήκε καμιά αναδιάταξη του γονιδίου ALK σε 65 δείγματα TNBC [299]. Οι Perez-Pinera *et al.* κατέδειξαν την έκφραση του ALK σε διάφορους ιστολογικούς υποτύπους του ανθρώπινου καρκίνου του μαστού [300]. Οι Lehmann *et al.* προσδιόρισαν την οδό ALK ως ένα σημαντικό μονοπάτι σηματοδότησης που ανευρίσκεται συχνότερα στις κυτταρικές γραμμές των TNBCs με χαρακτηριστικά μεσεγχυματικών κυττάρων και μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων, υποδηλώνοντας ότι οι EML4-ALK ανωμαλίες είναι πιθανόν σπάνιες γενικά στους καρκίνους του μαστού, με την έκφραση όμως του γονιδίου ALK και την ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης της ALK να είναι όμως πιο συχνή σε TNBCs[36].

Οι Robertson *et al.* έδειξαν αυξημένο αριθμό αντιγράφων ALK, χαμηλού επιπέδου γονιδιακή ενίσχυση και/ή ενεργοποίηση του μονοπατιού ALK σε προ-κλινικά μοντέλα TNBC, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ALK μπορεί να αποτελεί έναν πιθανό στόχο θεραπείας σε ασθενείς TNBC [294]. Οι Kim *et al.* βρήκαν ότι η αυξημένη παρουσία του γονιδίου ALK καθώς και η αύξηση του αριθμού αντιγράφων της ALK σχετίζονται με φτωχότερη επιβίωση στον διηθητικό καρκίνο του μαστού. Σε αυτή τη μελέτη, η αναλογία όγκων με θετική έκφραση της ALK ήταν υψηλότερη στους TNBCs (47,1%) από ότι ήταν στους μη TNBCs (26,3%), υποδηλώνοντας ότι η έκφραση της ALK είναι πιο συχνή σε TNBCs [301].

Στην παρούσα μελέτη μόνο 2 ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού ήταν θετικές για ALK ενώ 75 από τις 77 γυναίκες ήταν αρνητικές.

Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για τη διερεύνηση του ρόλου της ALK στην παθογένεση του καρκίνου του μαστού

Θεραπεία

Οι Robertson *et al.* σε μια προκλινική μελέτη έδειξε ότι τα καρκινικά κύτταρα που απομονώθηκαν από ασθενείς IBC θετικά σε ALK ήταν εξαιρετικά ευαίσθητα στην επίδραση του crizotinib και ανθεκτικά σε paclitaxel υποδηλώνοντας ότι η ALK μπορεί να αποτελεί

έναν πιθανό στόχο σε ασθενείς IBC [294] [187]. Κλινικές μελέτες εξετάζουν τη χρήση των εκλεκτικών αναστολέων της ALK σε ασθενείς με προχωρημένους συμπαγείς όγκους θετικούς σε αλλαγές του γονιδίου της ALK. Τα αποτελέσματα από αυτές τις πρώιμες κλινικές δοκιμές θα μπορούσαν να βοηθήσουν ώστε οι μελλοντικές μελέτες να επικεντρωθούν στην πιθανή επίδραση των αναστολέων ALK στον καρκίνο του μαστού.

5.8 Cytokeratines 5/6 και 5.9 Cytokeratines 17

Τι είναι οι cytokeratines 5/6 και 17;

Οι Cytokeratin 5/6 και 17 αποτελούν σημαντικούς δείκτες για την ταυτοποίηση των basal-like καρκίνων και σχετίζονται με κακή πρόγνωση των TNBCs [86, 87, 416, 417]. Στο φυσιολογικό μαζικό αδένιο οι CKs 7, 8, 18 και 19 εκφράζονται στα αυλικά κύτταρα και οι CKs 5, 14 και 17 στα μυοεπιθηλιακά κύτταρα [418]. Οι basal-like, που αποτελούν την πλειονότητα των TNBCs, ταυτοποιούνται από την ανίχνευση της έκφρασης του EGFR και των CK5/6 με ανοσοϊστοχημεία [97, 143, 417, 419, 420].

Οι Korsching *et al.* σε μια μελέτη με 166 καρκίνους του μαστού διαπίστωσαν ότι η θετική έκφραση των CK5/6 σχετιζόταν με αρνητικούς ER, PR υποδοχείς, αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και έκφραση του p53 και του EGFR [154]. Οι Van de Rijn *et al.* έδειξαν ότι η CK5/6 και CK17 θετικότητα ήταν προγνωστικά σημαντική στους ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες [417]. Αντιθέτως οι Nielsen *et al.* τόνισαν την προγνωστική σημασία της έκφρασης των CK5/6 στους ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες και ότι αποτελούσε ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη από το μέγεθος του όγκου, τον βαθμό κακοήθειας και το ER, HER-2 status [146]. Παρομοίως, σε μια μελέτη με microarray 1944 καρκίνων του μαστού, οι CK 5/6 θετικοί όγκοι σχετίζονταν με χειρότερη πρόγνωση ενώ το CK5/6 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης για το DFS ανεξαρτήτως από το λεμφαδενικό status, το βαθμό κακοήθειας και το μέγεθος όγκου [421]. Σε μια μελέτη από τους Inanc *et al.*, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ CK5/6 και του αριθμού των θετικών λεμφαδένων, ενώ ο κίνδυνος υποτροπής και θνησιμότητας ήταν υψηλότερος για όγκους που εξέφραζαν CK5/6. Παρομοίως, το DFS και το OS ήταν μικρότερα σε όγκους που εξέφραζαν CK5/6 υποδηλώνοντας ότι η έκφραση της CK5/6, αποτελεί ένα σημαντικό προγνωστικό δείκτη [294]. Οι Sutton *et al.* έδειξαν ότι οι basal-like TNBCs που είχαν θετικούς λεμφαδένες και απομακρυσμένες μεταστάσεις είχαν

σημαντικά υψηλότερη έκφραση του EGFR και CK5/6 σε σύγκριση με εκείνους χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις και πρότειναν ότι EGFR και CK5/6 θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό των ασθενών υψηλού κινδύνου για μεταστατική νόσο [422].

Οι Rao *et al.* παρατήρησαν ότι το 74% των TNBCs είχαν θετική έκφραση του EGFR ή/και των CK5/6 και παρουσίαζαν χειρότερη πρόγνωση. Ο έλεγχος των CK5/6 και EGFR είναι σημαντικός για την ταυτοποίηση των basal-like TNBCs αλλά και για τον καθορισμό της πρόγνωσης και θεραπείας των TNBCs [423]. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν από τους Foulkes *et al.*, όπου TNBCs με θετική έκφραση CK5/6 είχαν χειρότερη πρόγνωση από τους TNBCs που ήταν αρνητικοί [424].

Στην μελέτη αυτή 47 από τις 82 ασθενείς (57.3%) ήταν cytokeratins5/6-θετικές ενώ 35 (42,7%) ήταν αρνητικές. Το Fisher's exact test έδειξε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των cytokeratins5/6 και του EGFR με p-value= 0.004. Multivariate logistic regression model with stepwise backward elimination of variables with a p-value =0.05 έδειξε ότι η έκφραση των cytokeratins5/6 ήταν χαμηλότερη στους ασθενείς με λεμφαγγειακή διήθηση (OR=0.072, 95%=CI 0.007 – 0.732, p-value =0.026).

Η cytokeratin17 ήταν διαθέσιμη σε 79 ασθενείς με 41 αρνητικές και 38 θετικές περιπτώσεις. Το Fisher's exact test έδειξε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ CK17 και Ki67 με p-value=0.041.

Αυτά τα αποτελέσματα δεν συνάδουν με εκείνα πολλών άλλων μελετών στην βιβλιογραφία. Όμως τα ποσοστά έκφρασης των CK5/6 κυμαίνονται ευρέως στη βιβλιογραφία (από 24 έως 72%) πράγμα που αντανακλά τη χρησιμοποίηση διαφορετικών συστημάτων βαθμολόγησης σε μελέτες με IHC για CK5/6, CK17 καθώς και το γεγονός ότι δεν υπάρχει ακριβής τιμή cutoff [425].

5.10 Androgen receptor (AR)

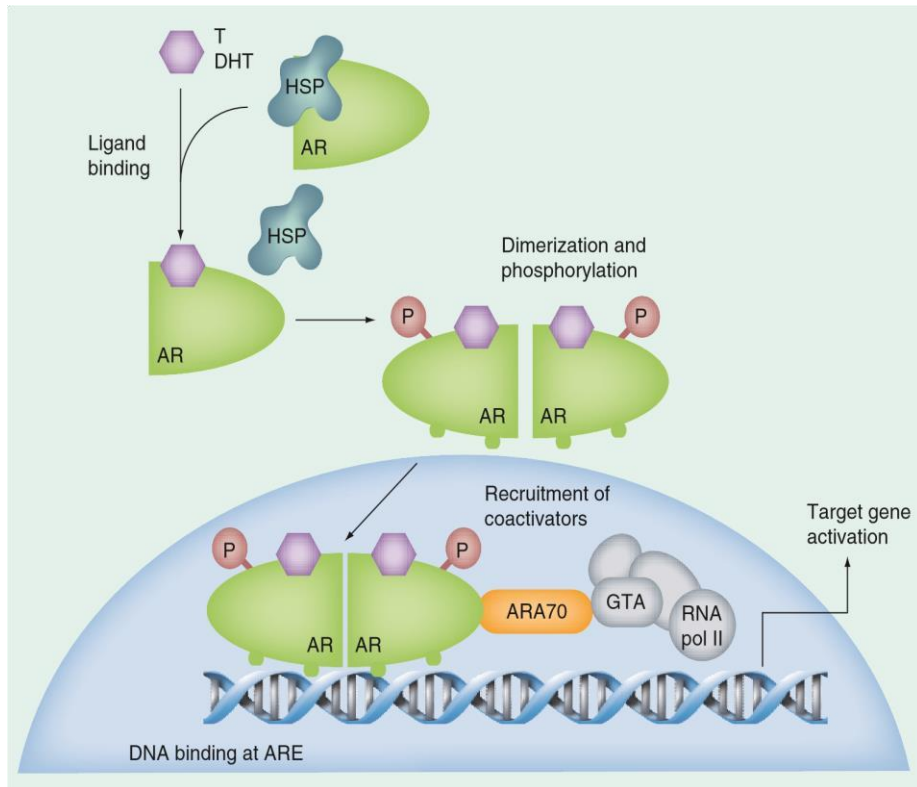
Τι είναι ο androgen receptor;

Τα ανδρογόνα είναι στεροειδείς ορμόνες υπεύθυνες για την ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηριστικών και του αναπαραγωγικού συστήματος στους άρρενες ενώ έχουν βασικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη. Ο AR αποτελεί μέλος των στεροειδικών ορμονικών υποδοχέων που περιλαμβάνουν και τους υποδοχείς οιστρογόνων και

προγεστερόνης [426]. Στις γυναίκες, 50% των ανδρογόνων παράγονται από τις ωοθήκες και τα επινεφρίδια και εκκρίνονται σε υψηλότερα επίπεδα από ό,τι τα οιστρογόνα. Το υπόλοιπο 50% συντίθεται από τα επινεφριδιακά ανδρογόνα σε άλλα μέρη του σώματος (π.χ. στο λιπώδη ιστό). Το ένζυμο αρωματάση μεταβολίζει την τεστοστερόνη σε E2 και την ανδροστενοδιόνη σε οιστρόνη, η οποία μπορεί επίσης να μετατραπεί σε E2 από την 17β-υδροξυστεροειδή αφυδρογονάσης [427]. Στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, τα κύρια ανδρογόνα που κυκλοφορούν είναι τα DHEAS, DHEA, η ανδροστενεδιόνη, τεστοστερόνη και διυδροτεστοστερόνη. Το AR έχει υψηλότερη συγγένεια με την τεστοστερόνη (T) και την διυδροτεστοστερόνη (DHT).

Το γονίδιο του AR βρίσκεται στο χρωμόσωμα Xq11-12 και κωδικοποιεί ένα 110 kDa κυτταροπλασματικό πολυπεπτίδιο το οποίο έχει τέσσερις διακριτές λειτουργικές περιοχές [428]. Αυτές περιλαμβάνουν τη ρυθμιστική περιοχή στην αμίνο-τερματική θέση (AF-1 θέση), την περιοχή δέσμησης DNA που αποτελείται από δύο δακτύλιους ψευδαργύρου, την περιοχή με σήμα πυρηνικού εντοπισμού και την C-terminal ligandbinding domain (AF-2 site). Όταν ο AR είναι ανενεργός, είναι συνδεδεμένος στις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (π.χ. heat shock proteins 90, 70, 56 and 23) που τον σταθεροποιούν.

Κυκλοφορούντα ανδρογόνα, όπως η τεστοστερόνη και διυδροτεστοστερόνη δεσμεύονται στο C-terminal ligand-binding domain, εκτοπίζοντας τις δεσμευμένες heat shock proteins. Η δέσμευση των ανδρογόνων στο AR οδηγεί στο διμερισμό του και στην φωσφορυλίωση της κινάσης τυροσίνης, η οποία με τη σειρά της προκαλεί την μετατόπιση του AR συμπλέγματος στον πυρήνα. Η περιοχή δέσμησης του DNA του AR συνδέεται με στοιχεία απόκρισης ανδρογόνων τόσο στον προαγωγέα όσο και στον γονιδιακό ενισχυτή δημιουργώντας ένα ενεργό σύμπλεγμα μεταγραφής κατά την πρόσληψη των ρυθμιστικών πρωτεϊνών.



Εικόνα 18. Μηχανισμοί δράσης του androgen receptor. Τα ανδρογόνα συνδέονται στον AR εκτοπίζοντας τις δεσμευμένες heat shock proteins (HSPs), προκαλώντας διμερισμό του και φωσφορυλίωση του υποδοχέα. Το σύμπλεγμα αυτό μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου ο AR συνδέεται με το ARE, οδηγώντας στην στοχευμένη μεταγραφή γονιδίων. AR: Androgen receptor; ARE: Androgen response element; DHT: Dihydrotestosterone; GTA: General transcription apparatus; HSP: Heat shock protein; P: Phosphate; Pol II: Polymerase II; T: Testosterone (Li, 2009 #482).

Το AR έχει βασικό πόλο στην γονιδιακή ενίσχυση άλλα αλληλεπιδρά και με πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος στο κυτταρόπλασμα, όπως η Src και Akt, οι οποίες έχουν βασικούς ρόλους στην κυτταρική επιβίωση, στον πολλαπλασιασμό, στην εισβολή και στην αγγειογένεση [Friedlander, #483].

AR στον φυσιολογικό μαζικό αδένα

Κατά τη γέννηση, ο μαζικός αδένας αποτελείται από ένα υποτυπώδες πορογενές σύστημα που συνεχίζει να αυξάνεται σε αναλογία με το σώμα μέχρι την εφηβεία, όπου παρατηρείται σημαντική ανάπτυξη. Κατά την περίοδο αυτή ο οιστρογονικός υποδοχέας (**ERa**) αποτελεί τον υποδοχέα-κλειδί που ρυθμίζει την ανάπτυξη και μορφοποίηση των πόρων [421]. Μελέτες ανοσοϊστοχημείας έδειξαν ότι σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες μόνο το 10% των

επιθηλιακών κυττάρων των κυψελίδων του μαστού και των μεσολόβιων πόρων χρωματίζονται θετικά για τους ERα υποδοχείς γεγονός που σημαίνει ότι, ως απόκριση στα οιστρογόνα, τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν παρακρινείς παράγοντες που διεγείρουν τα γύρω ER-αρνητικά κύτταρα να αναπτύσσονται και να πολλαπλασιάζονται. Αντίθετα, ένα μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων αυτών (20%) χρωματίζονται θετικά για AR [430].

Ο AR διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της φυσιολογικής ανάπτυξης του στήθους εξισορροπώντας τον οιστρογονικά επαγόμενο κυτταρικό πολλαπλασιασμό [431] [432]. Για παράδειγμα, αναστολή του AR στα ποντίκια προκαλεί μείωση της πορογενούς διακλάδωσης του αριθμού λοβίων και κυψελίδων [431]. Σε μία άλλη μελέτη, οι Peters *et al.* έδειξαν ότι η διέγερση της οδού AR με την χορήγηση της 5α-διωδροτεστοστερόνης ή του αντιανδρογόνου flutamide σε θήλεα ποντίκια οδήγησε σε διατάραξη της ανάπτυξης/μορφολογίας του μαζικού αδένος κατά την μέση εφηβική ηλικία [433]. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε πιθήκους με ωοθηκεκτομή όπου η αγωγή με τεστοστερόνη ανέστειλε τον επαγόμενο από οιστρογόνα πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών μαζικών κυττάρων [432]. Όλα αυτά υποδεικνύουν ότι η δραστηριότητα του AR εξισορροπεί τον επαγόμενο από τα οιστρογόνα κυτταρικό πολλαπλασιασμό, συμβάλλοντας στη σωστή ανάπτυξη του μαζικού αδένος [431].

Ρόλος του AR στην καρκινογένεση

Ο AR αποτελεί τον πιο συχνά εκφραζόμενο ορμονικό υποδοχέα, σε ποσοστό μέχρι και 90%, στον *in situ* διηθητικό και μεταστατικό καρκίνο του μαστού και σε μικρότερο ποσοστό 6,6-75% στους TNBC [434, 435]. Οι Moinfar *et al.* παρατήρησαν 88% έκφραση του AR σε διηθητικό καρκίνο του μαστού βαθμού κακοήθειας 1, σε σχέση με 47% σε καρκίνο του μαστού με βαθμό κακοήθειας 3 καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι ο AR αποτελεί τον πιο συχνά εκφραζόμενο δείκτη ακόμη και στους καρκίνους του μαστού υψηλού βαθμούς κακοήθειας [436]. Παρά το γεγονός ότι η αναφερόμενη συχνότητα έκφρασης του AR στα καρκινικά κύτταρα του μαστού διαφέρει σημαντικά μεταξύ των μελετών, πιθανώς λόγω των μεθοδολογικών διαφορών στην ανάλυση, έχει προταθεί ότι η AR έκφραση, ειδικά σε TNBCs, έχει προγνωστική σημασία. Οι Farmer *et al.* πρότειναν την ανακατάταξη του BC σε τρεις μεγάλες υποκατηγορίες με βάση την κατάσταση του AR: αυλικού τύπου (ERα+, AR+), βασικού τύπου (ERα-, AR-) και αποκρινή μοριακού τύπου (ERα-, AR+) [437].

Ο ρόλος του AR φαίνεται να είναι διαφορετικός στα διάφορα στάδια και στους διαφορετικούς υποτύπους του καρκίνου του μαστού. Η πλειοψηφία των *in vitro* μελετών έχουν δείξει ότι η έκφραση του AR είναι ανασταλτική για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του καρκίνου του μαστού [432, 438-441]. Ωστόσο, ορισμένες μελέτες ανέφεραν αντικρουόμενα αποτελέσματα όπου τα ανδρογόνα επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [442-444]. Τα αντιφατικά αποτελέσματα μεταξύ αυτών των μελετών μπορεί να οφείλονται στις διαφορετικές μεθοδολογίες εκτίμησης της κυτταρικής ανάπτυξης, στις διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας κυττάρων, στους διαφορετικούς τύπους ανδρογόνων (π.χ. διυδροτεστοστερόνη, τεστοστερόνη) και στο χρόνο διέγερσης (stimulation). Υποδεικνύουν ταυτόχρονα ότι ο ρόλος του AR στην καρκινογένεση του μαστού εξαρτάται, σε κάποιο βαθμό, από το οιστρογονικό περιβάλλον [442, 445, 446]. Επίσης η πολλαπλασιαστική ιδιότητα του όγκου στον καρκίνο του μαστού μπορεί να εξαρτάται από τον μοριακό υποτύπο και πιο συγκεκριμένα από την παρουσία ή την απουσία οιστρογονικών υποδοχέων [447].

AR στους TNBCs

Όπως αναφέρεται ανωτέρω στους TNBCs η έκφραση του AR είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με άλλους υποτύπους του καρκίνου του μαστού. Το ποσοστό έκφρασης του AR στα καρκινικά κύτταρα του μαστού στους TNBCs ποικίλλει σημαντικά. (0-54%) [139, 194, 427, 435, 448-450]. Ακόμα και στις περιπτώσεις μελετών που χρησιμοποιούν κοινό 10% cut off point για τον καθορισμό AR θετικότητας, αυτή η ανομοιογένεια παραμένει. Πιθανοί παράγοντες που την προκαλούν είναι ο υποτύπος της νόσου, η εξέλιξη της νόσου, η ομάδα μελέτης, καθώς και προβλήματα όπως η προετοιμασία των ιστών, των μεθόδων ανάκτησης αντιγόνου, διαφορετικές παραλλαγές αντισωμάτων και χρώσης. Η έκφραση του AR σε ασθενείς με TNBC επηρεάζεται επίσης από τον ιστολογικό τύπο, με θετικότητα στο πορογενές διηθητικό καρκίνο 0-39% σε σχέση με 12,5% στο λοβιακό διηθητικό καρκίνο του μαστού. Οι Hanley *et al.* διερεύνησαν την έκφραση του AR σε διαφορετικά στάδια κλινικής εξέλιξης του TNBC και παρατήρησαν ότι, στις περιπτώσεις TNBC υψηλού βαθμού κακοήθειας, η έλλειψη AR στα καρκινικά κύτταρα διευκόλυνε τη μετάβαση από *in situ* σε διηθητικό καρκίνο, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στους TNBCs χαμηλής κακοήθειας [451, 452].

Οι περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες που ανέλυσαν τη σχέση μεταξύ έκφρασης AR και διαφόρων κλινικο-παθολογικών χαρακτηριστικών παρατήρησαν ότι η έκφραση του AR ήταν αντιστρόφως ανάλογη σε σχέση με υψηλότερο κλινικό στάδιο, μιτωτικό σκορ και βαθμό κακοήθειας, γεγονός που υποδηλώνει ότι η AR θετικότητα στους TNBCs θα μπορούσε να συσχετιστεί με λιγότερο επιθετικούς όγκους [436, 450, 453-457] [449, 458].

Οι Gasparini *et al.* εξέτασαν την έκφραση του AR σε 678 καρκίνους του μαστού από τους οποίους 396 ήταν TNBCs [594]. Η έκφραση του AR ήταν θετική μόνο στο 24,8% των περιπτώσεων TNBCs σε σύγκριση με 81,6% σε μη TNBCs. Η AR θετικότητα σε TNBCs συσχετίστηκε με καλύτερη συνολική επιβίωση των ασθενών ($p = 0,032$) στους basal-like TNBCs. Παρόμοια ευρήματα αναφέρονται και από τους Mrklic *et al.* οι οποίοι παρατήρησαν μια αντιστροφή συσχέτιση μεταξύ του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67 και AR (33,7% έναντι 7,2%, $p = 0,014$). Οι Millis *et al.* στην μεγαλύτερη μέχρι τώρα μελέτη της έκφρασης AR με 6341 καρκίνους του μαστού (2111 TNBCs και 4230 μη TNBCs) έδειξαν ότι η υψηλότερη έκφραση του AR στους TNBCs συνδεόταν με χαμηλότερα επίπεδα Ki67. Τούτο έχει παρατηρηθεί σε πολλές άλλες μελέτες γεγονός που υποδηλώνει ότι ο AR μπορεί να καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό [453, 458, 459]. Σε μια μελέτη με 81 TNBCs οι Pistelli *et al.* βρήκαν ότι το AR ήταν θετικό στο 18,8% των περιπτώσεων και η έκφραση AR ήταν και πάλι αντιστρόφως ανάλογη με το υψηλότερο Ki67 ($p < 0,0001$) αλλά και την λεμφο-αγγειακή διήθηση ($p = 0.01$) [460].

Προγνωστική αξία του AR

Η προγνωστική αξία του AR σε TNBCs είναι ακόμα ασαφής. Οι μελέτες των Rakha *et al.* [194] και Sutton *et al.* [459] έδειξαν ότι η απουσία έκφρασης AR συνδεόταν με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής, απομακρυσμένες μεταστάσεις και θετικούς λεμφαδένες, υποδηλώνοντας ότι η έκφραση του AR στους TNBCs σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση. Οι Luo *et al.* βρήκαν επίσης ότι η έκφραση του AR συνδεόταν με υψηλότερη 5ετή ελεύθερη νόσου επιβίωση καθώς και συνολική επιβίωση [461].

Άλλες μελέτες όπως εκείνη των Park *et al.*, οι οποίοι αξιολόγησαν την επίδραση της έκφρασης του AR σε tissue microarray σειρά με 931 διηθητικούς καρκίνους του μαστού από τους οποίους οι 176 ήταν TNBCs, δεν διαπίστωσαν κάποια επίδραση της έκφρασης αυτής στην υποομάδα των TNBCs [448].

Σε αντίθεση με τα προαναφερθέντα αποτελέσματα, οι Hu *et al.* που ανέλυσαν την AR έκφραση σε 211 TNBCs διαπίστωσαν ότι οι ασθενείς με AR θετικούς όγκους είχαν αυξημένο ποσοστό θνησιμότητας - της τάξεως του 83% - σε σχέση με τους ARαρνητικούς όγκους [449].

Αυτά τα αντικρουόμενα αποτελέσματα ενδεχομένως οφείλονται σε διαφορές μεταξύ των αντισωμάτων, στα συστήματα βαθμολόγησης που χρησιμοποιήθηκαν για να καθοριστεί η AR θετικότητα καθώς και στην πολυπλοκότητα αυτής της οδού. Οι McNamara *et al.* ανέλυσαν την έκφραση του AR σε συνδυασμό με την 5ααναγωγή 1 (5αR1) που αποτελεί ένζυμο σύνθεσης ανδρογόνων και της 17βυδροξυστεροειδούς αφυδρογονάσης τύπου 5 (17βHSD5). Μόνο στην περίπτωση διπλής θετικότητας, ενζύμου και AR, υπήρχε καλύτερο αποτέλεσμα καταστολής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων [495].

Σε αντίθεση με τα πιο πάνω αποτελέσματα, στην παρούσα μελέτη το multivariate logistic regression model with stepwise backward elimination of variables και p-value=0.05, που εφαρμόστηκε, έδειξε ότι η έκφραση του androgen receptor ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με λεμφαγγειακή διήθηση (OR=13.44 95%=CI 1.28 – 141.56, p-value =0.031). Επίσης στα Kaplan-Meier διαγράμματα για disease-free και overall survival analysis σε σχέση με την έκφραση του androgen receptor, οι ασθενείς με αρνητική έκφραση του androgen receptor είχαν καλύτερη επιβίωση παρόλο που το log-rank test για αυτή τη σύγκριση δεν έδειξε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ AR και επιβίωσης.

AR ως θεραπευτικός παράγοντας

Η θεραπευτική προσέγγιση μπορεί να περιλαμβάνει την αναστολή της σύνθεσης των ανδρογόνων με τη χρήση μη-ανδρογόνων ορμονών που δεσμεύουν τον AR. Ο AR, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, έχει δύο ενδογενείς συνδέτες, την τεστοστερόνη και την διυδροτεστοστερόνη (DHT). Στον μαζικό αδένα, η τεστοστερόνη μετατρέπεται με την δράση της 5α-ρεδουκτάσης (5-Red) σε DHT και από την δράση της αρωματάσης σε οιστραδιόλη. Η δραστηριότητα της 5-Red είναι τέσσερις έως οκτώ φορές υψηλότερη στα καρκινικά κύτταρα από ότι στα φυσιολογικά κύτταρα του μαστού, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της DHT να είναι τρεις φορές υψηλότερη στον μαζικό ιστό σε σχέση με το πλάσμα. Η θεραπεία με έναν αναστολέα αρωματάσης αυξάνει τη συγκέντρωση τεστοστερόνης εντός του όγκου και της DHT στον καρκίνο του μαστού. Τα αποτελέσματα

αυτά υποδηλώνουν ότι οι υψηλές εντός του όγκου συγκεντρώσεις των μετατρεπτικών ενζύμων των ανδρογόνων διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για στοχευμένη θεραπεία. Αναστολή της τοπικά υπερεκφραζόμενης 17-υδροξυστεροειδούς αφυδρογονάσης τύπου 5 (17-HSD5) και 5-Red ενδεχομένως παρέχει θεραπευτικές επιλογές για τους ασθενείς με AR-θετικούς και ER αρνητικούς KM. Όμως, οι αναστολές είναι ακόμη σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης.

Τα TNBC καρκινώματα που εκφράζουν AR ορίζονται κλινικά ως «μοριακά αποκρινή» [437]. Αυτός ο υποτύπος έχει μελετηθεί εκτεταμένα *in vitro*, σε κυτταρικές σειρές και κυρίως με τη χρήση της γραμμής MDA-MB-453. Η αυξημένη σηματοδότηση των ανδρογόνων έχει παρατηρηθεί και σε άλλες επίσης κυτταρικές γραμμές TNBC (π.χ. GSE-10890 και E-TABM-157) και έχει αποδειχθεί ότι η στόχευση του AR μπορεί να γίνει με siRNA, με την χρήση του αντιανδρογόνου bicalutamide (AR antagonist) [139, 456].

Τα αρχικά αποτελέσματα μιας τρέχουσας πολυκεντρικής μελέτης Phase II (NCT00468715) σκοπός της οποίας είναι να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της καθημερινής χορήγησης bicalutamide σε ασθενείς με AR +, ER-/PR- τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο του μαστού με καθορισμό του κλινικού οφέλους (CBR) (σταθερή ασθένεια/μερική ανταπόκριση/πλήρη ανταπόκριση για > 6 μήνες), ήταν πολύ ενθαρρυντικά με CBR 19% και ελάχιστη τοξικότητα [462]. Η bicalutamide αποτελεί ένα από του στόματος μη στεροειδές αντιανδρογόνο που έχει εγκριθεί από το FDA των ΗΠΑ σε συνδυασμό με ένα ορμονικό ανάλογο της ωχρινότροπου ορμόνης για τη θεραπεία του προχωρημένου καρκίνου του προστάτη. Άλλα αντιανδρογόνα παρόμοια με την bicalutamide είναι η flutamide και η nilutamide. Αυτά τα αντιανδρογόνα έχουν υψηλή ανταγωνιστικότητα με το AR, αλλά στερούνται επιλεκτικότητας ιστού. Ένα ιδανικός εκλεκτικός αναστολέας των υποδοχέων των ανδρογόνων (SARM) πρέπει να έχει υψηλή ανταγωνιστικότητα με τον AR αλλά και εκλεκτικότητα ιστού για να περιορίζεται ο αριθμός των παρενεργειών που προκαλεί. Οι SARMs που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια είναι στο στάδιο της έρευνας με επιδιωκόμενη χρήση, ως επί τον πλείστον, στον καρκίνο του προστάτη, αλλά θα μπορούσαν κάλλιστα να χρησιμοποιηθούν σε νέες θεραπείες για AR θετικούς TNBCs.

Σε μια άλλη τρέχουσα πολυκεντρική single-arm phase II μελέτη σε γυναίκες με μεταστατικό ή ανεγχείρητο, τοπικά προχωρημένο και AR-θετικό TNBC (μοριακοί apocrine όγκοι), αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα της abiraterone acetate (AA) με prednisone. Αρχικά

αποτελέσματα έχουν δείξει, σε μια περίοδο 6 μηνών, CBR 20,0% με ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης (ORR) 6,7% (95% CI 0,8% -22,1%) και μεση επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (PFS) 2,8 μηνών. Κόπωση, υπέρταση, υποκαλσιαιμία και ναυτία ήταν οι πιο συχνές σχετιζόμενες με το φάρμακο ανεπιθύμητες ενέργειες. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η AA με prednisone, μπορεί να είναι επωφελής για ορισμένους ασθενείς με μοριακούς apocrine όγκους.

Οι Robles *et al.* έδειξαν ότι ο συνδυασμός της rapamycin, ενός αναστολέα mTOR, με ένα αντιανδρογόνο, την enzalutamide, είχε αθροιστικά αποτελέσματα και ισχυρή αντικαρκινική δράση στις MDA-MB-453 κυτταρικές σειρές, υποδηλώνοντας ότι αυτός ο συνδυασμός μπορεί να είναι μια αποτελεσματικός για την αντιμετώπιση των θετικών στον AR TNBCs [463].

Οι Caiazza *et al.* αξιολόγησαν την δράση του AR αναστολέα δεύτερης γενεάς enzalutamide σε 11 κυτταρικές σειρές TNBC. Η δράση του enzalutamide ήταν παρόμοια στους TNBCs και μη-TNBCs αλλά ήταν εξαρτώμενη από την παρουσία και τη θετικότητα του AR. Το enzalutamide προκαλούσε μείωση της κυτταρικής ανάπτυξης στα AR-θετικά κύτταρα. Επιπλέον, ανέστειλε την κυτταρική μετανάστευση και διήθηση με έναν AR-εξαρτώμενο τρόπο. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η στόχευση του AR με φάρμακα όπως η enzalutamide μπορεί να αποτελεί μια εναλλακτική στρατηγική θεραπεία για ασθενείς με AR-θετικούς καρκίνους του μαστού [464].

Συμπερασματικά το AR, όπως και το ER, ενδεχομένως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην γένεση του καρκίνου του μαστού και συνεπώς θα μπορούσε να αξιοποιηθεί ως μια νέα, αρκετά ανεκτή θεραπευτική επιλογή. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία για τα άτομα με TNBC για τους οποίους η κυτταροτοξική χημειοθεραπεία παραμένει η μοναδική επιλογή θεραπείας και μπορεί να είναι αναποτελεσματική. Επί του παρόντος οι AR-στοχευμένες θεραπείες είναι στο στάδιο των κλινικών ερευνών. Τα αποτελέσματα προκλινικών και κλινικών μελετών με bicalutamide, abiraterone acetate και enzalutamide είναι ενθαρρυντικά αλλά χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Μπορούμε όμως να προσβλέπουμε σε μια εποχή όπου με την ανταγωνιστική δράση κατά του AR θα μειώνεται ο κίνδυνος υποτροπής των AR-θετικών TNBCs κατά τον ίδιο τρόπο που μειώνεται η πιθανότητα υποτροπής για τους ER θετικούς καρκίνους με ER ανταγωνιστές.

5.11 P63

Τι είναι P63;

Το P63 αποτελεί ένα μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας γονιδίων του p53. Εκφράζεται στη βασική στοιβάδα του επιθηλίου και παίζει βασικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην ακεραιότητα όλων των κυβοειδών επιθηλίων συμπεριλαμβανομένου και του μαστού. Έχει εκτιμηθεί ότι ελέγχει την έκφραση περίπου 5800 ανθρώπινων γονιδίων. Η έκφραση P63 αποτελεί καθοριστικό χαρακτηριστικό του basal-like type-2 υποτύπου των TNBCs. Το γονίδιο TP63 μπορεί να μεταγραφεί από δύο προαγωγούς, δίνοντας γένεση σε δύο διαφορετικές Ντερματικές ισόμορφες: μια μακρύτερη ισόμορφη που περιέχει το N-terminal transactivation domain (ονομαζόμενη TAp63) και την N-terminally-truncated isoform, που δεν διαθέτει αυτή την περιοχή transactivation (ονομαζόμενη ΔN-p63). Επιπλέον, η κάθε μορφή μπορεί να υποστεί επιπρόσθετες αλλαγές δημιουργώντας διαφορετικές παραλλαγές, α, β, γ, δ. Σύμφωνα με ανοσοϊστοχημικές μελέτες, ο ΔNp63 αποτελεί την κυρίαρχη ισόμορφη στους περισσότερους φυσιολογικούς ιστούς ενηλίκων σε αντίθεση με το TAp63 που εκφράζεται κυρίως σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους όπως τα Β-λεμφοκύτταρα [465-468].

Φυσιολογικός ρόλος:

Η ισόμορφη ΔNp63 διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση των πλασματοκυττάρων/προγεννητικών κυττάρων των ενηλίκων, στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην απόκριση βλάβης του DNA, στην κυτταρική επιβίωση, στην προσκόλληση και στη μετανάστευση των κυττάρων [469-471], ενώ το TAp63 ρυθμίζει την τελική διαφοροποίηση. Σε φυσιολογικό ιστό του μαστού η έκφραση ΔNp63 περιορίζεται στη βασική στοιβάδα και στα επιθηλιακά κύτταρα. [466, 472, 473]. Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη το p63 είναι απαραίτητο για τη μορφοποίηση του μαστικού αδένα [474]. Στους ενήλικες, το ΔNp63 είναι σημαντικό για τη διατήρηση των χαρακτηριστικών των επιθηλιακών κυττάρων της βασικής στοιβάδας του μαστού [475] και για τον σωστό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των αυλικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της γαλουχίας [476].

Ρόλος στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού:

Στον καρκίνο του μαστού το ΔNp63 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό σε ένα υποσύνολο των τριπλών αρνητικών όγκων με μεταπλαστικά και basal-like χαρακτηριστικά [477]. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν τον πολύπλοκο ρόλο του p63 στον καρκίνο του μαστού με μερικές μελέτες να δείχνουν ότι το ΔNp63 μπορεί να προκαλέσει basal-like καρκίνο του μαστού στα ποντίκια μέσω της Wnt σηματοδότησης, γεγονός που υποδηλώνει ογκογονικό ρόλο για το ΔNp63. Σε αντίθεση με τα πιο πάνω δεδομένα άλλες μελέτες εισηγούνται ογκοκατασταλτική δράση για το ΔNp63, αφού έχει βρεθεί να εργάζεται συνεργικά με το γονίδιο BRCA1 και στη διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας και αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [478, 479]. Το ΔN6p3α έχει πολύ ισχυρότερη επίδραση στην γονιδιακή έκφραση από ότι το TAp63α.

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, το p63 αποτελεί ένα καθοριστικό χαρακτηριστικό έκφρασης για τον basal-like type-2 υποτύπο των TNBCs. Ο Orzol *et al.* χρησιμοποίησε τις HCC1806 κυτταρικές γραμμές καρκίνου του μαστού ως πρότυπο για να διερευνήσει το ρόλο του p63 σε αυτόν τον συγκεκριμένο υποτύπο, και παρατήρησε υψηλή έκφραση της ΔNp63 ισόμορφης παρόμοια με τα φυσιολογικά βασικά κύτταρα ποντικών και ανθρώπων. Ο πολλαπλασιασμός τους και η διατήρηση του basal-like φαινοτύπου βασίζεται στην έκφραση του p63. Αντιθέτως, απώλεια του p63 σχετιζόταν με μείωση του πολλαπλασιασμού. Βρήκαν επίσης ότι το ΔNp63 έχει πολλαπλούς ρόλους όσον αφορά τις συμφύσεις μεταξύ των κυττάρων αφού διαπίστωσαν ότι ενισχύει την προσκόλληση σε μια επιφάνεια καλλιέργειας κυττάρων αλλά αυξάνει επίσης ή μειώνει την έκφραση των γονιδίων που ρυθμίζουν τις συμφύσεις μεταξύ των κυττάρων, υποδηλώνοντας ότι οι συνέπειες του χειρισμού των επιπέδων p63 διαμορφώνονται σε συνάρτηση με το είδος των κυττάρων που εξετάζονται, τον βαθμό εξάρτησης τους από το p63 καθώς και το διαφορετικό γενετικό τους υπόβαθρο. Όλα αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν έναν ογκογόνο ρόλο για το ΔNp63 στο basal-like type-2 καρκίνο του μαστού[471].

Μια μελέτη από τους Boldrup *et al.* έδειξε ότι η CD44, μια γλυκοπρωτεΐνη κυτταρικής επιφάνειας που ρυθμίζει την κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση και συνδέεται με τον φαινότυπο βλαστικών κυττάρων σε διαφορετικούς τύπους όγκων, περιλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού, αποτελούσε άμεσο μεταγραφικό στόχο για το ΔNp63 [480].

Οι Cheung *et al.* έχουν δείξει ότι η διήθηση των όγκων του μαστού ρυθμίζεται από έναν υποπληθυσμό κυττάρων που ορίζονται από την έκφραση βασικών επιθηλιακών γονιδίων και περιλαμβάνουν την κυτοκερατίνη 14 (K14) και p63 [481]. Αν και μόνο μια μειοψηφία

κυττάρων εντός των όγκων του μαστού εκφράζει βασικά επιθηλιακά γονίδια, στόχευση είτε της K14 είτε του p63 ήταν επαρκής για να αναστείλει την διήθηση σε οργανοειδείς με πρωτοπαθείς όγκους. Σε αντίθεση με τη συχνά αναφερθείσα σημασία του ΔNr63 για τη διατήρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η επαγωγή του ΔNr63 σε κυτταρικές σειρές MDA-MB-468 είχε ως συνέπεια την απώλεια των κυτταρικών συμφύσεων, την τελική απόσπαση των κυττάρων, μειωμένο πολλαπλασιασμό, διακοπή του κυτταρικού κύκλου, αποκόλληση των κυττάρων που προκάλεσε την μειωμένη βιωσιμότητα τους 3 ημέρες μετά την επαγωγή. Παρόμοιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε σε καρκίνο σε SCID ποντίκια, όπου η επαγωγή του ΔNr63 σχετίστηκε με μειωμένο μέγεθος όγκου [482]. Όλα αυτά υπογραμμίζουν τον πολύπλοκο ρόλο του p63 στη ρύθμιση των καρκινικών κυττάρων.

Έχει επίσης αναφερθεί ότι το ΔNr63 προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου και προκαλεί θετική ρύθμιση των γονιδίων GADD45 και CDKN1A [483]. Παρόμοια αποτελέσματα για τις επιδράσεις του ΔNr63 στον πολλαπλασιασμό και την προσκόλληση των κυττάρων παρατηρήθηκαν σε μία άλλη basal-A (επιθηλιακή) TNBC κυτταρική σειρά τύπου BT-20. Είναι ενδιαφέρον ότι αυτά τα αποτελέσματα δεν παρατηρήθηκαν στη basal-B (μεσεγχυματικού) τύπου TNBC σειρά BT-549, υποδηλώνοντας ότι οι επιδράσεις του ΔNr63 είναι ειδικές ανάλογα με τον κυτταρικό φαινότυπο [484, 485]

Στην μελέτη αυτή, the multivariate logistic regression model απέδωσε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ του βαθμού κακοήθειας του όγκου και της έκφρασης της p63 πρωτεΐνης. Η p63 ήταν χαμηλότερη στους ασθενείς με υψηλότερο βαθμό κακοήθειας (OR=0.18, 95% CI= 0.035 – 0.978, p-value =0.047).

5.12 TP53

20-35% όλων των καρκίνων του μαστού έχουν TP53 μετάλλαξη, στους δε TNBCs είναι παρούσα σχεδόν σε όλους [139, 485].

Τι είναι το P53 και ποιος ο ρόλος του;

Το P53 είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί μια 53000 πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη. Ογκογονικά σήματα στρες, προκαλούν ενεργοποίηση της μεταγραφής άγριου τύπου (wt) p53, που έχει την ικανότητα να συντονίσει μια πολύπλοκη κυτταρική αντίδραση που οδηγεί σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου, επιδιόρθωση του DNA καθώς

και απόπτωση των κυττάρων, άμεσα με τη μεταγραφή στόχων όπως το p21 ή έμμεσα με την μεταγραφή στόχων όπως η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη PTEN, ή μέσω ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, συμπεριλαμβανομένων των εξαρτώμενων από κυκλίνη κινασών 1 και 2 (CDKs), ασκώντας αρνητική ρύθμιση καθώς και πρωτεΐνες επιδιόρθωσης βλαβών του DNA όπως οι PAKP-1 και BRCA-1 [434, 486-489].

Μετάλλαξη

Μετάλλαξη του p53 (mtp53) οδηγεί σε απώλεια των ανωτέρω περιγραφέντων wt-p53 ογκοκατασταλτικών λειτουργιών που αναφέρθηκαν πιο πάνω και έχει συχνά αντίθετα αποτελέσματα όπως ενεργοποίηση των CDK 1 και 2 πράγμα που αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση με αποτέλεσμα την αυξημένη επιθετικότητα και ικανότητα μετάστασης του όγκου. Επίσης προκαλεί καταστολή των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών όπως p63 και p73 που αποτελούν τα άλλα 2 μέλη της οικογένειας του P53. Οι μεταλλάξεις του P53 ανευρίσκονται σχεδόν σε όλες τις κυτταρικές σειρές του TNBC [139, 485]. Σε αντίθεση με το wtp53 το μεταλλαγμένο p53 συσσωρεύεται στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων και μπορεί να ανιχνευθεί με ανοσοϊστοχημεία. Hot-spot μεταλλάξεις του p53 DNA προκαλούν συχνά έκφραση μιας μεταλλαγμένης πρωτεΐνης p53 προικισμένης με νέες λειτουργίες που δεν υπάρχουν στο wtp53 και σχετίζεται με κακή πρόγνωση στους ανθρώπινους όγκους και ανάπτυξη επιθετικών όγκων σε μοντέλα ποντικού. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις του p53 στους basal-like καρκίνους του μαστού (πάνω από 90%) είναι μεταλλάξεις όπου ένα αμινοξύ υποκαθίσταται από ένα άλλο. Οι περισσότερες από αυτές τις αλλαγές βρίσκονται στα "hotspot" codons, όπου, ως γνωστόν, το p53 μεταλλάσσεται και σε πολλούς άλλους καρκίνους (R248Q, R248W, R175H, R273H, R273C και G245S) [265].

Οι Olivier *et al.* σε μια μελέτη με 1794 ασθενείς με καρκίνο του μαστού συνέκριναν την επιβίωση σε όγκους με mtp53 σε σχέση με wtp53. Η μέση επιβίωση για καρκίνο του μαστού σε στάδιο II με θετικούς λεμφαδένες ήταν 40% για όγκους mtp53 σε σύγκριση με 85% για εκείνους με wtp53. Πιο συγκεκριμένα, οι ασθενείς με όγκους του μαστού και hotspot μετάλλαξη του p53 στο R248W είχαν 20 φορές χαμηλότερη επιβίωση σε σχέση με τους wtp53 όγκους [490]. Απώλεια του γονιδίου p53 στα βλαστικά κύτταρα μαζικού αδένου ποντικού με διαγραφή του BRCA1 οδηγεί σε κακοήγη αδενοκυστικό καρκίνωμα, που δεν αποτελεί έναν τυπικό καρκίνο του μαστού. Μεταλλάξεις του BRCA-1 παρατηρούνται κυρίως στους basal-like καρκίνους του μαστού και δεν παρατηρείται πλήρης απώλεια του p53 αλλά μετάλλαξη του αποκτώντας πρόσθετες ογκογόνες λειτουργίες.

Οι Muller *et al.* έδειξαν ότι η έκφραση του mtp53 αυξάνει την διήθηση και την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων του μαστού [265]. Hot-spot μετάλλαξη του p53 στο R175H σε ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη basal-like μεταστατικών καρκινωμάτων του μαστού (στο 60%), σε σύγκριση με ποντίκια που έχουν απώλεια του p53 τα οποία δεν αναπτύσσουν ποτέ καρκινώματα. Μια άλλη hot-spot μετάλλαξη του p53 στο R273H (που παρατηρείται συχνά στους basal-like καρκίνους του μαστού) προκαλεί επίσης αύξηση των μεταστάσεων στα ποντίκια, κάτι που πάλι δεν παρατηρείται στα νεογνά ποντίκια με απώλεια του wt p53. Οι Han *et al.* έδειξαν ότι η έκφραση Ki67 του p53 ήταν υψηλότερη στους TNBCs και ότι αυτή η υψηλότερη έκφραση μπορεί να παίζει ρόλο στη χειρότερη πρόγνωση των TNBCs [491]. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι όγκοι του μαστού με μεταλλαγμένο p53 είναι γενικά TNBC και σχετίζονται με μειωμένη επιβίωση, αλλά ο μηχανισμός που μπορεί να συνεπάγεται αυτή τη συσχέτιση είναι γενικά ασαφής [492, 493].

Οι Anda *et al.* σε μια μελέτη όπου αξιολογήθηκε με ανοσοϊστοχημεία η συνδυασμένη έκφραση του CK5/6, AR και p53, διαπίστωσαν ότι η ομάδα των ασθενών με αρνητικό CK5/6 και AR έκφραση, αλλά θετική έκφραση του p53 είχε τη χειρότερη DFS και OS στους TNBCs [494]. Οι Coradini *et al.* βρήκαν ότι με βάση την έκφραση του p53, οι TNBCs θα μπορούσαν να υποδιαιρεθούν σε δύο ομάδες, στους ασθενείς με θετικό p53 που χαρακτηρίζονται από μικρότερη DFS και OS σε σχέση με τους ασθενείς με p53 αρνητικό [495].

Στην μελέτη αυτή, multivariate logistic regression analysis με stepwise backward elimination of variables και p-value =0.05, έδειξε ότι η έκφραση της p53 πρωτεΐνης ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες. (OR=3.84 95%=CI 1.22 – 12.07, p-value =0.021).

Στοχευμένη θεραπεία για το p53

Λίγοι όγκοι διατηρούν το wt p53, γι' αυτό και διερευνάται μια σειρά προσεγγίσεων για τη στόχευση του p53. Δεδομένου ότι η απώλεια του λειτουργικού p53 διαταράσσει τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, μια προσέγγιση αποτελεί η επιλεκτική στόχευση των καρκινικών κυττάρων που στερούνται p53 σε φάσεις του κυτταρικού κύκλου που είναι p53-εξαρτώμενες. Έρευνες έχουν δείξει ότι η αναστολή της WEE1 κινάσης αποτρέπει την S φάση του κυτταρικού κύκλου. Ως εκ τούτου, χημειοθεραπεία σε συνδυασμό με την αναστολή της WEE1 κινάσης ή αναστολή των WEE1 και CHK1 μπορούν να προκαλέσουν

εκλεκτική μιτωτική καταστροφή και απόπτωση των κυττάρων που βρίσκονται στην S φάση του κυτταρικού κύκλου και στερούνται λειτουργικό p53 [496]. Οι WEE1 αναστολείς επί του παρόντος αξιολογούνται σε κλινικές μελέτες φάσης I με ή χωρίς πλατίνα ή gemcitabine και έχει φανεί ότι είναι καλά ανεκτές με ισχυρή εκλεκτική δεσμευτική ικανότητα [497]. Δεδομένου ότι η μεγάλη πλειοψηφία των όγκων με mtp53 έχουν hot-spot μεταλλάξεις, οι έρευνες επικεντρώθηκαν σε στόχευση αυτών των μεταλλάξεων, εκλεκτικοί αναστολείς των οποίων βρίσκονται υπό ανάπτυξη.

Τόσο η εκλεκτική στόχευση των p53 μεταλλάξεων όσο και η αποκατάσταση της λειτουργίας του wtp53 αλλά και η εκλεκτική στόχευση του κυτταρικού κύκλου έχουν τη δυνατότητα να έχουν πολύ μεγάλη κλινική επίδραση αφού η μετάλλαξη του TP53 αποτελεί την πιο συχνή ανωμαλία που παρατηρείται στους TNBCs.

PI3K/AKT/ mTOR αναστολείς

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω το wtp53 ενεργοποιεί το PTEN το οποίο αποτελεί κύριο αρνητικό ρυθμιστή της οδού PI3K, γι αυτό και η μετάλλαξη στο p53, μπορεί να αυξήσει την δραστηριότητα της οδού του PI3K η οποία είναι σημαντική στην ανάπτυξη των κυττάρων και την επιβίωση.

Επιπλέον, το mtp53 αναστέλλει την εποπτική δραστηριότητα του TA-p73 η οποία προσφέρει προστασία από ογκογόνους παράγοντες άγχους. Επίσης το TA-p73 ρυθμίζεται αρνητικά από το mTOR, γι αυτό και η αναστολή mTOR με everolimus αυξάνει τα επίπεδα του TA-p73 στα καρκινικά κύτταρα κυτταρικών σειρών [498]. Οι Leong *et al.* έδειξαν συν-έκφραση TA-p73 και DNp63 εντός ενός υποσυνόλου TNBCs, η πλειοψηφία των οποίων είχε μεταλλαγμένο p53. Αναστολή του TA-p73 είχε επίσης ως αποτέλεσμα την αποτυχία της cisplatin να επάγει την απόπτωση, αφού το TA-p73 αποτελεί στοιχείο ζωτικής σημασίας για την προώθηση της απόπτωσης μετά από τη χορήγηση cisplatin σε κυτταρικές σειρές TNBC [499].

Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι ο συνδυασμός ενός m-TOR αναστολέα με ένα παράγοντα που προκαλεί βλάβη στο DNA, όπως η cisplatin, μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα του TA-p73 που επάγουν την απόπτωση, ειδικότερα στους TNBCs με mtp53. Αποτελεσματική συνέργεια της cisplatin με τον m-TOR αναστολέα παρατηρείται όμως μόνο στους TNBCs και στις luminal κυτταρικές σειρές.

Chk1 αναστολείς

Το wt-p53 ρυθμίζει το G1/M σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και η Chk1 ρυθμίζει το G2/M. Σε κύτταρα με μεταλλαγμένο p53 και συνακόλουθη απώλεια ελέγχου στο G1/S, προκαλείται αυξημένη εξάρτηση από το σημείο ελέγχου G2/M. Χημειοθεραπεία που προκαλεί βλάβη στο DNA σε συνδυασμό με την αναστολή της Chk1 στα p53 δυσλειτουργικά κύτταρα οδηγεί σε αποτυχία και των δύο σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, οδηγώντας σε ανεξέλεγκτη εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, παρά την υπερβολική βλάβη στο DNA, μιτωτική καταστροφή και απόπτωση. Αυτό έχει παρατηρηθεί σε πολλές κυτταρικές σειρές καρκινικών κυττάρων συμπεριλαμβανομένων και κυττάρων του μαστού [500-502]. Οι Ma *et al.* έδειξαν ότι ο συνδυασμός irinotecan με έναν αναστολέα Chk1 προκάλεσε αύξηση της απόπτωσης στις κυτταρικές γραμμές με mtp53 αλλά όχι στις κυτταρικές σειρές με WT-p53, ενώ προκάλεσε αναστολή της ανάπτυξης του όγκου και παρατεταμένη επιβίωση στα ποντίκια με όγκους mt-p53. Επιπλέον, το knockdown του p53 σε μοντέλα WT-p53 αύξησε σημαντικά την ευαισθησία του όγκου στον συνδυασμό irinotecan με έναν αναστολέα Chk1, τονίζοντας τη σημασία της ανεπάρκειας p53 για την αποτελεσματικότητα του συνδυασμού [500]. Οι Verlinden *et al.* έδειξαν σε 103 όγκους του μαστού υψηλότερη έκφραση του γονιδίου Chk1 στους TNBCs σε σύγκριση με άλλους όγκους βαθμού κακοήθειας 3 [503]. Σε μια κλινική δοκιμή φάσης I της UCN-01 με συνδυασμό του αναστολέα Chk1 και irinotecan σε προχωρημένες κακοήθειες, ένας ασθενής με ER + και WT-p53 του καρκίνου του μαστού δεν είχε καμιά ανταπόκριση στην θεραπεία, αλλά δύο ασθενείς με TNBC και mtp53 είχαν μερική ανταπόκριση ενώ δύο ασθενείς TNBC (και άγνωστης κατάστασης p53) είχαν σταθερή νόσο. Νεότεροι αναστολείς Chk1 με αυξημένη ειδικότητα Chk1 πάνω σε UCN-01, συμπεριλαμβανομένης και της AZD7762, σε συνδυασμό με παράγοντες που προκαλούν βλάβη του DNA, υπόσχονται μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε αρκετές καρκινικές κυτταρικές σειρές, συμπεριλαμβανομένου του στήθους [504].

Hsp90 αναστολείς

Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90 (Hsp90) ρυθμίζει και σταθεροποιεί έναν αριθμό ρυθμιστικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των p53, PI3K, AKT και EGFR. Η Hsp90 εμπλέκεται στη ρύθμιση του wt-p53 αλλά και του mt-p53 και η υψηλή συσσώρευση της mt-p53 πρωτεΐνης στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να προάγεται άμεσα από μοριακές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης και της Hsp90 [505-508].

Αναστολή της Hsp90 από geldanamycin αυξάνει την υποβάθμιση mt-p53 [506].

Παρά το γεγονός ότι οι TNBCs παρουσιάζουν αντίσταση στους Hsp90 αναστολείς πρώτης γενεάς όπως η geldanamycin, σε μελέτες με κυτταρικές σειρές καρκινικών κυττάρων έχουν δείξει μεγαλύτερη ευαισθησία σε νεότερους παράγοντες όπως οι PF4942847, PU-H71 και ganetespib. Τα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών πρώιμης φάσης για την καλύτερη αξιολόγηση της χρησιμότητας της αναστολής της Hsp90 στους TNBC αναμένονται [509].

HDAC αναστολείς

Οι histone deacetylases (HDACs) είναι υπεύθυνες για την τροποποίηση της ακετυλίωσης των ιστονών ρυθμίζοντας έτσι πολλές κυτταρικές λειτουργίες όπως την επιδιόρθωση του DNA, την κυτταρική διαίρεση και απόπτωση [510, 511]. Οι HDACs είναι σημαντικές για την λειτουργία του wt-p53, παρόλα αυτά ο ρόλος τους στη δράση του mt-p53 είναι αβέβαιος. Οι αναστολείς των HDACs αποτελούν ως εκ τούτου δυνητικούς αντικαρκινικούς παράγοντες. Αναμένονται τα αποτελέσματα μιας τυχαιοποιημένης μελέτης σε φάση 2 με atezolizumab και etinostat σε ασθενείς με TNBC προκειμένου να διευκρινισθεί καλύτερα η χρησιμότητα των αναστολέων HDAC.

CDK αναστολείς

Οι κινάσες που εξαρτώνται από την κυκλίνη (cyclin dependent kinases, CDKS) αποτελούν μια μικρή οικογένεια πρωτεϊνών οι οποίες παίζουν ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την μεταγραφή, και την επεξεργασία του mRNA. Η ανώμαλη ενεργοποίηση τους παρατηρείται συχνά σε διάφορες κακοήθειες [512]. Το wt-p53 ασκεί αρνητική δράση επί των CDK1 και 2 ενώ το mt-p53 προκαλεί αντιστρόφως υπερέκφραση τους [111]. Βρίσκεται υπό εξέλιξη μια κλινική δοκιμή σε φάση I/Ib για την αξιολόγηση ενός μοριακού CDK αναστολέα, του dinaciclib (MK-7965), σε μεταστατικό TNBC και τα αποτελέσματα αναμένονται.

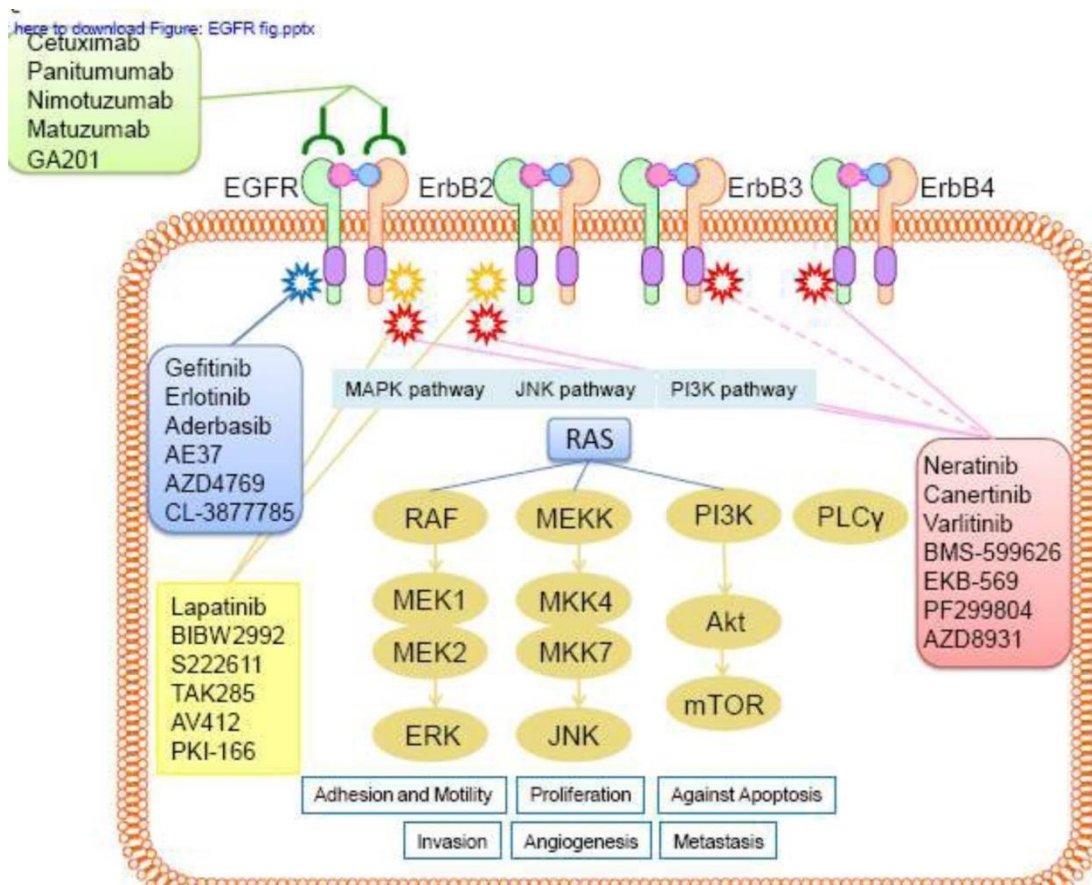
5.13 EGFR

Δομή EGFR και οδός σηματοδότησης

Ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) είναι επίσης γνωστός ως ErbB1 και HER1 και αποτελεί έναν από τους πιο γνωστούς καρκινικούς μοριακούς στόχους. Αποτελεί έναν υποδοχέα κινάσης τυροσίνης (TKr) και ανήκει στην οικογένεια HER η οποία διαθέτει άλλα τρία μέλη - Erb-B2/HER2, Erb-B3/HER3, και Erb-B4/HER4 - όλα υποδοχείς TKr [513, 514]. Το γονίδιο του EGFR βρίσκεται στο 7p11.2-p12 χρωμόσωμα και κωδικοποιεί μια and 170 kd γλυκοπρωτεΐνη [515]. Αποτελείται από τα ακόλουθα μέρη: α) ένα εξωκυττάριο μέρος (ECD) που ελέγχει την έναρξη μεταγωγής σήματος και αποτρέπει την συνεχή ενεργοποίηση του TKr και το οποίο αποτελείται από 4 μέρη: 2 πλούσια σε λευκίνη, L1 και L2, που μεσολαβούν στην σύνδεση του με τον συνδετήρα και 2 πλούσια σε κυστεΐνη, CR1 και CR2, που διευκολύνουν διμερισμό του υποδοχέα, β) μια διαμεμβρανική περιοχή (TMD) και μία ενδοκυττάρια περιοχή η οποία περιλαμβάνει ένα παραμεμβρανικό μέρος (JMD) και συμμετέχει στη ρύθμιση των διαφόρων λειτουργιών του EGFR συμπεριλαμβανομένου του ελέγχου της δραστηριότητας TKr, ενώ μπορεί να αλληλεπιδράσει με δευτερογενείς αγγελιοφόρους όπως η καλμοδουλίνη, γ) μια περιοχή κινάσης τυροσίνης (TKD) που αποτελείται από μια θέση ενεργοποίησης, απαραίτητη για τον διμερισμό και τη λειτουργική ενεργοποίηση του υποδοχέα και την επαγωγή της οδού σηματοδότησης του EGFR, και δ) μια ρυθμιστική περιοχή (RD) η οποία αποτελείται από μια θέση ενεργοποίησης και ένα C-terminal άκρο του οποίου η διαφωσφορυλίωση δημιουργεί επιπλέον θέσεις σύνδεσης για επιπλέον μόρια σηματοδότησης. Μεταλλαξιγένεση και διαγραφή των TKD και RD προκαλούν σημαντική μείωση στη δραστηριότητα της κινάσης και αποτελούν τη βάση της θεραπείας με μικρά μόρια αναστολείς κινάσης τυροσίνης. Ένωση του υποδοχέα με τον συνδετήρα προκαλεί μια διαμορφωτική αλλαγή στον υποδοχέα που επιτρέπει τον ομο- και έτερο-διμερισμό με άλλα ενεργοποιημένα μέλη της οικογένειας HER [516, 517]. Ειδικοί συνδετήρες για τον EGFR αποτελούν ο EGF, ο transforming growth Factor-α (TGF-α), και η amphiregulin. Άλλοι συνδετήρες δείχνουν διπλή ειδικότητα για τον EGFR αλλά και τον Erb-B4, όπως οι betacellulin, heparin-binding EGF (HBEGF) και epiregulin [515]. Η φωσφορυλίωση αρκετών υποστρωμάτων από την περιοχή TK οδηγεί στην ενεργοποίηση κύριων αυξητικών οδών σηματοδότησης - RAS/MAPK, PI(3)/Akt, PLC -PKC, και Jak/STAT - και οδηγεί σε μια πληθώρα βιολογικών λειτουργιών [518, 519], (εικόνα 18).

Απορρύθμιση του EGFR στον καρκίνο του μαστού

Απορρύθμιση του EGFR έχει περιγραφεί σε πολυάριθμους ανθρώπινους καρκίνους συμπεριλαμβανομένων του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC), του καρκίνου του παχέος εντέρου, του γλοιώματος και του καρκίνου του μαστού [515]. Όσον αφορά στον καρκίνο του μαστού, ο EGFR υπερκεράζεται πιο συχνά στον TNBC και στον φλεγμονώδη καρκίνο (IBC), 2 μορφές ιδιαίτερα επιθετικές [194, 520, 521]. Ανώμαλη ενεργοποίηση του EGFR σε κυτταρικό επίπεδο επάγει τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του όγκου καθώς και την πρόσφυση, την κινητικότητα και την επιβίωση τους ενώ προωθείται η διήθηση και η αβιογένεση [522]. Κύριοι μηχανισμοί απορρύθμισης του EGFR περιλαμβάνουν την υπερέκφραση των συνδετήρων του (TGF-α ή amphiregulin), αυτοκρινή ή παρακρινική δράση όπου οι συνδέτες EGFR εκκρίνονται από περιβάλλοντα στρωματικά κύτταρα όπως μακροφάγα, ανώμαλο ετεροδιμερισμό και διασταύρωση με άλλους υποδοχείς ErbB ή με άλλους υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας, μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, υποδοχείς κυτοκινών και διαύλους ιόντων, μειωμένα επίπεδα φωσφατάσης που αναστέλλει τη δραστηριότητα της TK καθώς και ενεργές μεταλλάξεις που οδηγούν σε συνεχή ενεργοποίηση του [523-525]. Ο μηχανισμός απορρύθμισης του EGFR πιθανόν να είναι διαφορετικός μεταξύ των όγκων διαφόρων οργάνων, ενώ υπάρχουν ενδείξεις για σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μελών της οικογένειας του EGFR και άλλων κινασών τυροσίνης, όπως οι c-MET και IGF-1 R, και είναι πιθανό ότι αυτά τα εναλλακτικά μονοπάτια σηματοδότησης συνδέονται με την αντίσταση που παρατηρείται στις στοχευμένες θεραπείες του EGFR [526].



Εικόνα 18. Οι EGFR αναστολείς και οι οδοί σηματοδότησης: Ενεργοποίηση του EGFR οδηγεί σε ομοδιμερισμό/ετεροδιμερισμό και φωσφορυλίωση συγκεκριμένων κινασών τυροσίνης. Το κύριο μονοπάτι που ενεργοποιείται από τους EGFR υποδοχείς οδηγεί στην ενεργοποίηση κυρίων αυξητικών οδών, Ras-Raf-MAPK, JNK, PI3 κινάσες, και την PLCγ και έχει ως αποτέλεσμα πληθώρα βιολογικών λειτουργιών. Σε κυτταρικό επίπεδο οι σύνδεσμοι όχι μόνο επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά και τις συμφύσεις στην κινητικότητα και προστατεύουν κατά την απόπτωση. Σε φυσιολογικό επίπεδο οι σύνδεσμοι προωθούν την διήθηση και την αγγειογένεση [518, 519].

Στους TNBC

Υπερέκφραση του EGFR στον καρκίνο του μαστού έχει αναφερθεί μεταξύ 16-36% στις διάφορες πληθυσμιακές ομάδες [524]. Στους TNBCs, υπερέκφραση του EGFR παρατηρείται σε υψηλό ποσοστό (έχουν αναφερθεί ποσοστά πάνω από 50%) και συνδέεται με αρνητικές επιπτώσεις [123, 527]. Η ενίσχυση του EGFR γονιδίου είναι σπάνια στους καρκίνους του μαστού, γύρω στο 6% των περιπτώσεων με εύρος από 0,8% -14% [524, 528, 529]. Στους TNBCs, ωστόσο, έχει παρατηρηθεί γονιδιακή ενίσχυση στο 25% των μεταπλαστικών περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού [528, 530, 531].

Οι ενεργές μεταλλάξεις αποτελούν ένα άλλο μηχανισμό υπερέκφρασης του EGFR. Οι Weber *et al.* έδειξαν ότι οι μεταλλάξεις του EGFR παρατηρούνται σε σημαντικά υψηλότερη συχνότητα στους κληρονομικούς καρκίνους του μαστού σε σχέση με τους σποραδικούς ($P = 0.0079$), και ότι η πλειονότητα των μεταλλάξεων αυτών ανευρίσκονταν στην περιοχή κινάσης της τυροσίνης στο εξόνιο 20 [531]. Ο Van der Groep έδειξε ότι ο φαινότυπος ER-/Her2+ EGFR+ ήταν πιο συχνός κατά τρόπο στατιστικά σημαντικό σε φορείς μετάλλαξης BRCA1 [532]. Αυτό επιβεβαιώθηκε σε μια μεγαλύτερη μελέτη για τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού [533]. Ο TNBC είναι επίσης συχνότερος μεταξύ των ασθενών με κληρονομικό καρκίνο του μαστού από ό, τι μεταξύ των ασθενών με σποραδικό καρκίνο του μαστού [533, 534].

Ένα καινούργιο σηματοδοτικό μονοπάτι του EGFR, που σχετίζεται με τον καρκίνο του μαστού, περιλαμβάνει τον πυρηνικό EGFR. Ο ενεργοποιημένος EGFR μεταφέρεται στο πυρηνόπλασμα [535]. Ο πυρηνικός EGFR μπορεί να δράσει ως παράγοντας μεταγραφής και αυτό υποστηρίζεται από την εύρεση μιας θετικής συσχέτισης μεταξύ του πυρηνικού EGFR, όχι όμως και του μη-πυρηνικού, με την κυκλίνη D1 και έκφραση του Ki67 και μιας αρνητικής συσχέτισης με τη συνολική ελεύθερη νόσου επιβίωση σε μία ομάδα από 130 ασθενείς με καρκίνο του μαστού [535, 536]. Ο πυρηνικός EGFR μπορεί στο μέλλον να χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη.

Η ενεργοποίηση του EGFR μπορεί επίσης να συμβεί μέσω ετερόλογων συστημάτων υποδοχέα όπως ο υποδοχέας σύζευξης της G-πρωτεΐνης (GPCRs) [536-538]. Η GPCRs μπορεί να ενεργοποιήσει τον EGFR μέσω δύο διαφορετικών μηχανισμών. Πρώτον, μέσω Src η οποία φωσφορυλιώνει την ενδοκυττάρια περιοχή TK του EGF και, δεύτερον, μέσω της απελευθέρωσης του membrane-anchored ligand (protease-dependent autocrine loop) [536]. Έχει αποδειχθεί ότι με τη χρήση μικρών παρεμβαλλόμενων RNAs ή μικρών μοριακών αναστολέων, αυτοί οι συνδέτες του EGFR μπορούν να δεσμευτούν και να καταστούν μη διαθέσιμοι, με αποτέλεσμα τη μειωμένη ενεργοποίηση του EGFR και την καταστολή των κακοήθων χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων [537, 538]. Ο μηχανισμός αυτός αποτελεί έναν εντελώς καινούργιο τρόπο στόχευσης του EGFR στον καρκίνο του μαστού, γεγονός που υποδηλώνει ότι η διακοπή της οδού EGFR με έναν αναστολέα πρωτεάσης, σε συνδυασμό με υφιστάμενους αναστολείς αντι-EGFR, μπορεί να αποδειχθεί μια αποτελεσματική θεραπεία για όγκους που εξαρτώνται από την έκφραση των συνδετών του EGFR. Έχουν προταθεί αρκετοί μηχανισμοί που έχουν ως αποτέλεσμα την

αυξημένη έκφραση του EGFR σε μεταγραφικό επίπεδο (υψηλό επίπεδο mRNA του EGFR) στα καρκινικά κύτταρα του μαστού,. Σε αυτό μπορεί να οφείλεται και η διαφορετική ανταπόκριση στους αναστολείς EGFR στην εξέλιξη του όγκου στους διάφορους καρκίνους του μαστού [539-541].

Ρόλος του EGFR στον καρκίνο του μαστού

Η υπερέκφραση του EGFR στον καρκίνο του μαστού σχετίζεται με μεγάλο μέγεθος όγκου, χαμηλή διαφοροποίηση και χειρότερη κλινική έκβαση [282, 513]. Αλλαγές στην έκφραση του παρατηρούνται συνήθως σε μεταστατική φάση της νόσου. Ο EGFR προάγει μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και διήθηση αλλά παίζει επίσης ρόλο στην επιθηλιακή μεσεγχυματική μετάβαση (EMT). Η EMT αποτελεί την διαδικασία όπου τα κύτταρα αλλάζουν μορφολογικά από πολωμένο επιθηλιακό φαινότυπο σε μεσεγχυματικό ινοβλαστοειδή φαινότυπο σε μια ποικιλία επιθηλιακών κυτταρικών γραμμών γεγονός που διαδραματίζει βασικό ρόλο στη μετανάστευση και διήθηση των καρκινικών κυττάρων του μαστού [542, 543] [544, 545].

Σε *in vitro* επιθηλιακές κυτταρικές σειρές η EMT μπορεί να προκληθεί από αυξητικούς παράγοντες όπως ο EGFR, παράγοντες ανάπτυξης των ηπατοκυττάρων, παράγοντες ανάπτυξης, cMet, ERK και AKT [544]. Όλα αυτά υποδηλώνουν ότι ο EGFR μπορεί να αποτελεί το κλειδί που μπορεί να συμβάλει στην αναστολή της μετάστασης των όγκων.

Ο ρόλος του EGFR ως προγνωστικού παράγοντα στον καρκίνο του μαστού

Δεν έχει ξεκαθαριστεί κατά πόσον ο EGFR αποτελεί πραγματικά προγνωστικό παράγοντα. Οι Bae *et al.* σε μια μεγάλη μεταανάλυση 40 μελετών με 5232 ασθενείς παρατήρησαν θετική συσχέτιση της έκφρασης του EGFR με το βαθμό κακοήθειας όγκου. Όσον αφορά την βραχυπρόθεσμη επιβίωση (1-4 έτη), μόνο 5 από 9 μελέτες έδειξαν στατιστικά σημαντική προγνωστική αξία και 3 από 5 μελέτες έδειξαν επίδραση του EGFR στην μακροπρόθεσμη επιβίωση [546]. Σε μια μελέτη από τους Torregrosa *et al.* με 825 καρκίνους του μαστού, η έκφραση EGFR συνδέθηκε με μείωση της ελεύθερης νόσου επιβίωσης και της συνολικής επιβίωσης [547]. Μερικές μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση της έκφρασης του EGFR με κακή πρόγνωση [516, 548, 549], ενώ άλλες μελέτες έδειξαν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση [550]. Σε μια άλλη μελέτη από τους Buchholz *et al.*, δεν βρέθηκε σχέση της έκφρασης EGFR με το κλινικό στάδιο, HER2, πυρηνική ατυπία, ορμονική

κατάσταση και δείκτη πολλαπλασιασμού αλλά ο EGFR-θετικός φαινότυπος ήταν προγνωστικός δείκτης θετικών λεμφαδένων μετά από θεραπεία με ανθρακυκλίνες καθώς και φτωχότερης επιβίωσης [551].

Στους TNBCs και στους basal-like καρκίνους ο ρόλος του EGFR ως προγνωστικού παράγοντα είναι πιο ξεκάθαρος. Στη μελέτη των Cheang *et al.* με 3744 καρκίνους του μαστού, ο EGFR και η CK5/6 συσχετίστηκαν με κακή πρόγνωση στον τριπλά αρνητικό φαινότυπο [552]. Σε μελέτη των Tan *et al.* με 245 ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία με ανθρακυκλίνες, η χημειοθεραπεία σχετίστηκε σε μονοπαραγοντική EGFR ανάλυση με μικρότερη ελεύθερης νόσου επιβίωση και η συσχέτιση αυτή ήταν πιο ψηλή σε ασθενείς με TNBC και στους basal-like καρκίνους του μαστού [144]. Συσχέτιση υψηλής έκφραση του EGFR (και του c-Kit) με υψηλό βαθμό κακοήθειας, υψηλή πυρηνική ατυπία, υψηλό μιτωτικό αριθμό και TNBC/basal-like φαινότυπο βρέθηκε σε μια μελέτη 65 όγκων του μαστού γυναικών της Αφρικής [367]. Σε μια μετα-ανάλυση των Zhang *et al.* η έκφραση του EGFR ήταν υψηλότερη σε TNBCs σε σύγκριση με μη-TNBCs [163]. Η ενίσχυση του γονιδίου EGFR έχει επίσης αναφερθεί ότι συνδέεται με χειρότερη ελεύθερη νόσου επιβίωση [553].

Στον καρκίνο του μαστού, το επίπεδο έκφρασης του EGFR και/ή η παρουσία μετάλλαξης του γονιδίου του χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για την κατανομή των ασθενών σε συγκεκριμένες θεραπείες. Ωστόσο, παραμένει να αποδειχθεί κατά πόσον ο EGFR αποτελεί πραγματικά προγνωστικό δείκτη. Η αβεβαιότητα στην καθιέρωση του EGFR ως προγνωστικού δείκτη στον καρκίνο του μαστού οφείλεται κυρίως στις διάφορες μεθόδους ανίχνευσης του. Ο EGFR μπορεί να αξιολογηθεί με καθορισμό των επιπέδων του DNA, του RNA ή της πρωτεΐνης του υποδοχέα ή με εκτίμηση της ενεργοποίησης του υποδοχέα. Η IHC αποτελεί την πιο κοινή μέθοδο ανίχνευσης του EGFR ο οποίος, στον φυσιολογικό μαζικό ιστό, ανιχνεύεται από λίγο έως καθόλου σε αντίθεση με τον καρκινικό μαζικό ιστό όπου ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων χρωματίζονται θετικά για το EGFR [554].

Στην μελέτη αυτή, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ του EGFR, από τη μια και του βαθμού κακοήθειας, της λεμφαγγειακής διήθησης και του αριθμού των θετικών λεμφαδένων από την άλλη. Στατιστικά σημαντική σχέση σύμφωνα με το Fisher's exact test διεπιστώθη μόνο μεταξύ EGFR και C-kit (pvalue=0.045) καθώς και μεταξύ CK5/6 και EGFR (p-value= 0.004). Τούτο συνάδει με την γενική διαπίστωση ότι η χρήση του EGFR ως προγνωστικού παράγοντα στον καρκίνο του μαστού είναι ακόμη αβέβαιη γεγονός που εβδεχομένως οφείλεται *inter alia* στις διαφορετικές μεθόδους ανίχνευσης του.

EGFR στοχευμένες θεραπείες

Εκκινώντας από την υψηλή έκφραση του EGFR στους TNBCs, πολυάριθμες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στον προσδιορισμό πιθανών θεραπευτικών παραγόντων. Παρά τα ενθαρρυντικά προκλινικά αποτελέσματα, οι κλινικές δοκιμές με μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) και TK αναστολείς που στοχεύουν τον EGFR απέδωσαν μόνο μέτρια κλινικά αποτελέσματα. Σημειώνεται ότι τα mAbs στοχεύουν το εξωκυττάριο μέρος ενώ οι TKIs το ενδοκυττάριο μέρος του υποδοχέα.

Cetuximab

Κλινικές δοκιμές με cetuximab, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει τον EGFR, απέδωσαν κάπως περιορισμένο όφελος. Σε μια τυχαιοποιημένη μελέτη σε φάση II αξιολογήθηκε ο συνδυασμός carboplatin και cetuximab σε ασθενείς που είχαν λάβει θεραπεία και τώρα είχαν προχωρημένο TNBC. Οι ασθενείς (n = 120) κατανεμήθηκαν στην τύχη είτε σε cetuximab μόνο, είτε σε cetuximab με την προσθήκη carboplatin κατά την εξέλιξη της νόσου, είτε σε συνδυασμό cetuximab και carboplatin από την αρχή της θεραπείας. Το συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης στο cetuximab ως μονοθεραπεία ήταν 6%, στο συνδυασμό με carboplatin κατά την εξέλιξη της νόσου ήταν 16% και στον συνδυασμό με την carboplatin από την αρχή της θεραπείας 17%. Συνολικά όμως η συνδυασμένη θεραπεία με carboplatin/cetuximab συνδέθηκε με μια μικρή μέση επιβίωση χωρίς εξέλιξη νόσου 2,1 μηνών και μέση συνολική επιβίωση 10,4 μηνών. Σε αυτή τη μελέτη οι συγγραφείς ερεύνησαν τη γονιδιακή έκφραση του EGFR χρησιμοποιώντας DNA microarrays γονιδιακής έκφρασης και διαπίστωσαν ότι το cetuximab μπλοκάρει την έκφραση της οδού EGFR μόνο σε μικρό ποσοστό των ασθενών, γεγονός που δείχνει ότι στους περισσότερους ασθενείς είχαν δραστηριοποιηθεί εναλλακτικοί μηχανισμοί ενεργοποίησης της οδού [195].

Οι Baselga *et al.* σε μια άλλη τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή φάσης II αξιολόγησαν τον συνδυασμό cisplatin και cetuximab σε ασθενείς με προηγούμενη θεραπεία και προχωρημένη νόσο TNBC. Οι ασθενείς (n = 173) κατανεμήθηκαν στην τύχη είτε σε cisplatin μόνο είτε σε συνδυασμό cisplatin και cetuximab. Το συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης και η μέση ελεύθερη εξέλιξης επιβίωση με θεραπεία συνδυασμού ήταν διπλάσια σε σύγκριση με τη μονοθεραπεία μόνο με σισπλατίνη [555]. Η μελέτη των Baselga *et al.* αποτελεί την πρώτη κλινική δοκιμή που έδειξε ότι η αντι-EGFR θεραπεία μπορεί να προσφέρει σημαντικό κλινικό όφελος για τους ασθενείς με TNBC.

Σε μια άλλη κλινική δοκιμή φάσης II σε ασθενείς με προχωρημένο HER2 αρνητικό καρκίνο του μαστού ($n = 150$), οι ασθενείς κατανεμήθηκαν στην τύχη σε irinotecan και carboplatin, σε συνδυασμό με cetuximab (ICE) ή χωρίς cetuximab (IC). Η προσθήκη του cetuximab βελτίωσε το συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης μόνο στους ασθενείς με TNBC. Σε αυτή την υποομάδα, τα συνολικά ποσοστά ανταπόκρισης ήταν 38% για τους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με irinotecan και carboplatin και 49% για τους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με irinotecan, carboplatin και cetuximab.

Αναφορά 60 από το ρόλο του EGFR στον καρκίνο του μαστού.

Οι Nabholz *et al.* σε μια πολυκεντρική πιλοτική μελέτη φάσης II χορήγησαν cetuximab ως προεγχειρητική χημειοθεραπεία σε συνδυασμό με docetaxel σε ασθενείς με χειρουργήσιμο TNBC και στάδιο II-III. Στη συνέχεια, όλοι οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση. Ο συνδυασμός του cetuximab με docetaxel είχε μέτριο αποτέλεσμα αλλά αποδεκτή τοξικότητα ως προεγχειρητική χημειοθεραπεία στους χειρουργήσιμους TNBCs [556].

Σε μια άλλη μελέτη φάσης II από τους Crozier *et al.* ο συνδυασμός των irinotecan και cetuximab έδειξε ελπιδοφόρα αποτελέσματα για τον μεταστατικό TNBC, όπου το ποσοστό ανταπόκρισης ήταν 18% έναντι 0% σε μη-TNBC [557].

Panitumumab

Το panitumumab αποτελεί ένα άλλο μονοκλωνικό αντίσωμα που έχει ερευνηθεί σε μια κλινική δοκιμή φάσης II η οποία σχεδιάστηκε για να αξιολογήσει την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια του panitumumab σε συνδυασμό με gemcitabine και carboplatin, ως πρώτη και δεύτερη γραμμή θεραπείας για τον μεταστατικό TNBC. Τα αποτελέσματα αυτής της δοκιμής δεν απέδωσαν κάποιο όφελος από τον συνδυασμό αυτό [558]. Σε μία άλλη μελέτη φάσης II η χρήση στην προεγχειρητική θεραπεία του panitumumab σε συνδυασμό με 5-fluorouracil, epirubicin και cyclophosphamide, ακολουθούμενη από docetaxel, είχε αποδεκτό συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης και αποδεκτή τοξικότητα [559].

Gefitinib and erlotinib

Οι gefitinib και erlotinib αποτελούν μικρούς μοριακούς αναστολείς TKI. Οι Corkery *et al.* έδειξαν ότι ο συνδυασμός χημειοθεραπείας και gefitinib είχε μεγαλύτερη επίδραση στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων των TNBCs από ότι η χρήση μονοθεραπείας είτε είτε επρόκειτο μόνο για χημειοθεραπεία είτε μόνο για gefitinib [196]. Διάφορες άλλες κλινικές δοκιμές φάσης II με gefitinib ως μονοθεραπεία στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού απέτυχαν όμως να δείξουν κλινικό όφελος [560-562]. Μελέτες με erlotinib είχαν επίσης απογοητευτικά αποτελέσματα στον καρκίνο του μαστού. Μία κλινική δοκιμή φάσης II με μονοθεραπεία με erlotinib στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού έδειξε ελάχιστο κλινικό όφελος [563]. Περιορισμένη δραστηριότητα έδειξε και ο συνδυασμός της erlotinib με bevacizumab σε μια άλλη κλινική δοκιμή φάσης II [564]. Πολύ καλά αποτελέσματα απέδωσε αντίθετα ο συνδυασμός της erlotinib με capecitabine και docetaxel όπου το συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης στον μεταστατικό καρκίνο του μαστού ήταν 67% [565].

Συμπερασματικά προκύπτει ότι αν και ο EGFR εμπλέκεται αναμφίβολα στην αιτιολογία και εξέλιξη του καρκίνου του μαστού, τα αποτελέσματα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία είναι εν πολλοίς αντικρουόμενα και τα πρότυπα έκφρασης αυτών των γονιδιακών προϊόντων χρειάζονται να διαλευκανθούν περαιτέρω.

5.14 Ki67

Τι είναι το Ki67;

Το Ki67 θεωρείται ένας από τους πιο σημαντικούς δείκτες για την εκτίμηση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων [566]. Το Ki67, γνωστό και ως MK167, αποτελεί ένα αντίγονο που ανιχνεύεται στον πυρήνα των κυττάρων που βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού. Εκφράζεται σε όλες τις φάσεις διαίρεσης των κυττάρων G1, S, G2 και μίτωση, αλλά όχι στη φάση G0 (φάση ηρεμίας). Σημαντική αύξηση της έκφρασης Ki67 παρατηρείται κατά το δεύτερο μισό του κυτταρικού κύκλου. Στην μιτωτική ανάφαση, έχει αναφερθεί ταχεία αποδόμηση του Ki67 και απώλεια των επιτόπων [170, 567]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ανοσοποιητική έκφραση του Ki67 συνδέεται στενά με τον κυτταρικό κύκλο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης [170, 568].

Σημασία στον καρκίνο του μαστού

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι το αντίγονο Ki67 και ο στεροειδής υποδοχέας του εκφράζεται σε διάφορα είδη κυττάρων καθώς και στο φυσιολογικό επιθήλιο του ανθρώπινου μαστού, αλλά σε πολύ μικρότερο ποσοστό (<3%). Η έκφρασή του σε στα καρκινικά κύτταρα είναι σημαντικά υψηλότερη, ιδιαίτερα στα ER-αρνητικά κύτταρα [569]. Στο St Gallen του 2011, η ομάδα εμπειρογνομόνων διαπίστωσε ότι το Ki67 είναι πολύ σημαντικό για τη διάκριση μεταξύ των “luminal A” και “luminal B” υποτύπων, με cutoff value 14% [570]. Η έκφραση του Ki67 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και την πρόβλεψη ανάπτυξης μεταστατικής νόσου καθώς και τοπικής υποτροπής σε μια ποικιλία κακοήθων όγκων [571]. Στον καρκίνο του μαστού υψηλό Ki67 σχετίζεται με κακή πρόγνωση. Σε διάφορες μελέτες η υψηλή έκφραση Ki67 βρέθηκε να σχετίζεται με προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, μεγαλύτερο μέγεθος του όγκου, λεμφαγγειακή διήθηση, θετικούς λεμφαδένες, ER αρνητικότητα καθώς και HER2 θετικότητα [572, 573].

Οι De Azambuja *et al.* σε μια μεταανάλυση, όπου εξέτασαν την DFS από 29 μελέτες ανέφεραν ότι υψηλά επίπεδα Ki67 σχετίζονταν με κακή πρόγνωση ανεξαρτήτως από την κατάσταση των λεμφαδένων και από το κατά πόσον οι ασθενείς υποβάλλονταν ή όχι σε θεραπεία [568]. Εντούτοις, ένας μεγάλος αριθμός μελετών και μετααναλύσεων αναφέρονται στη σημασία του Ki67 ως ανεξάρτητου προγνωστικού δείκτη [574-576]. Οι Colleoni *et al.* διαπίστωσαν ότι υψηλή έκφραση του Ki67 στον καρκίνο του μαστού σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα υποτροπής ακόμα και σε μικρού μεγέθους όγκους με αρνητικούς λεμφαδένες [577].

Παρόμοια αποτελέσματα περιγράφονται από τους Pathmanathan *et al.*, όπου η έκφραση του Ki67 μελετήθηκε σε μία ομάδα περιστατικών καρκίνων του μαστού με αρνητικούς λεμφαδένες, που δεν έλαβαν επικουρική συστηματική θεραπεία με 15 χρόνια παρακολούθησης. Αφού ανέλυσαν πολλαπλά κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά, οι μελετητές αυτοί ανέφεραν ότι ο δείκτης Ki67 αποδείχτηκε ο πιο ισχυρός ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας επιβίωσης [578]. Οι Cuzick *et al.* υπέδειξαν επίσης ότι η έκφραση του Ki67 έχει καθοριστικό ρόλο της στην πρόγνωση των ER-θετικών καρκίνων του μαστού και εισηγήθηκαν έναν αλγόριθμο που βασίζεται σε ημιποσοτικούς συντελεστές της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των ER και PR, του HER2 status, του Ki67 score και του «IHC-4 score», ο οποίος έχει παρόμοια προγνωστική αξία όπως το 21-gene Recurrence

Score για τους ER-θετικούς καρκίνους του μαστού [579]. Οι Aleskandarany *et al.* σε μία μεγάλη μελέτη 1550 καρκίνων του μαστού έδειξαν επίσης ότι ο δείκτης Ki67 αποτελούσε τον ισχυρότερο προγνωστικό δείκτη για την DFS και την OS χωρίς την μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση στους όγκους με βαθμό κακοήθειας 2 [580].

Παρά το γεγονός ότι το Ki67 αποτελεί έναν καθιερωμένο προγνωστικό δείκτη για τους ER-θετικούς καρκίνους του μαστού, η εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω της έκφρασης του Ki67 δεν συνιστάται ακόμη ως ρουτίνα στην παθολογοανατομική αξιολόγηση από τις υφιστάμενες κατευθυντήριες γραμμές της Αμερικανικής Εταιρείας Κλινικής Ογκολογίας (ASCO) και της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Ογκολογίας (ESMO). Αυτό οφείλεται πιθανώς στο γεγονός ότι δεν έχει ακόμη καθιερωθεί πώς οι μετρήσεις του Ki67 θα πρέπει να επηρεάζουν τις κλινικές αποφάσεις και επειδή μόνο λίγα στοιχεία υπάρχουν για να υποστηρίξουν τον προγνωστικό του ρόλο του στους ER-αρνητικούς καρκίνους του μαστού.

Το Ki67 χρησιμοποιείται κυρίως για να προβλέψει το όφελος από τη χημειοθεραπεία στους “luminal A” και “luminal B” υποτύπους καρκίνου του μαστού που έλαβαν μια σειρά από NAC σχήματα, συμπεριλαμβανομένων των πρωτοκόλλων με βάση την ανθρακυκλίνη ή/και την ταξάνη. Η έκφραση του Ki67 αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την pCR, την πλήρη κλινική ανταπόκριση, την OS, την DFS καθώς και της τοπική υποτροπή locoregional recurrence [571, 581, 582].

Αυξημένα επίπεδα του Ki67 μετά από NAC Ki67 υποδηλώνουν κακή πρόγνωση [170, 567].

Σημασία στους TNBCs

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, οι TNBCs συνδέονται γενικά με επιθετικό φαινότυπο και κακή πρόγνωση. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιοι υποπληθυσμοί των TNBCs των οποίων η πρόγνωση παραμένει καλή. Οι Keam *et al.* πρότειναν ότι η έκφραση του Ki67 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την περαιτέρω κατάταξη των TNBCs σε δύο υποτύπους που παρουσιάζουν διαφορετική απόκριση στην θεραπεία και πρόγνωση, αλλά μόνο το 26,7% των ασθενών με TNBCs έδειξαν χαμηλότερη έκφραση Ki67 [583].

Σε ασθενείς με TNBC η υψηλή έκφραση του Ki67 σχετίζεται με αυξημένο μέγεθος όγκου, υψηλότερο βαθμό κακοήθειας ενώ ακόμα υψηλότερα επίπεδα (> 35% χρώση) συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο θανάτου. Υψηλά επίπεδα Ki67 έχουν παρατηρηθεί κυρίως στο

διηθητικό πορογενές TNBC σε σύγκριση με άλλους ιστολογικούς τύπους. (80% σε TNBC έναντι 10% -30% σε άλλα είδη) [584]. Οι Li *et al.* διερεύνησαν την έκφραση του Ki67 στους TNBCs και διαπίστωσαν ότι σχετιζόταν με αυξημένο μέγεθος του όγκου και λεμφαδενικές μεταστάσεις, όμως κανένας συσχετισμός δεν παρατηρήθηκε με την ηλικία και το κλινικό στάδιο υποδηλώνοντας ότι το Ki67 μπορεί να αποτελεί έναν δείκτη κακής πρόγνωσης σε ασθενείς με TNBC [585]. Οι Niikura *et al.* αντιθέτως δεν βρήκαν καθόλου συσχετισμό του Ki67 με την επιβίωση στην ER-αρνητική ομάδα 716 ασθενών [586].

Σε αντίθεση με την καθιέρωση της προγνωστική αξίας της έκφρασης του Ki67 σε ασθενείς με HR-θετικούς όγκους [587, 589], μόνο λίγα στοιχεία υποστηρίζουν τη χρήση του Ki67 για τον καθορισμό καλής πρόγνωσης στους ER-αρνητικούς καρκίνους του μαστού μετά από NAC και ως προγνωστικού δείκτη για την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας γενικά. Οι Sueta *et al.* αναφέρουν ότι το Ki67 δεν είχε προβλεπτική αξία για το PCR σε HER2 θετικούς και τριπλά αρνητικούς υποτύπους που έλαβαν NAC [587]. Παρομοίως, οι Jones *et al.* ανέφεραν επίσης ότι το Ki67 δεν είχε καμιά προβλεπτική αξία για το PCR στους τριπλά αρνητικούς υποτύπους, αλλά παρατήρησαν μεγαλύτερη ευαισθησία στην χημειοθεραπεία σε αυτούς τους όγκους [590]. Ωστόσο, μια κλινική δοκιμή με 552 ασθενείς με καρκίνο του μαστού έδειξε ότι το Ki67 αποτελούσε ανεξάρτητο προβλεπτικό δείκτη ανταπόκρισης μετά από NAC τόσο στην ομάδα των luminal όγκων όσο και στην ομάδα των τριπλά αρνητικών όγκων [581].

Οι Tan *et al.* εξέτασαν την έκφραση του Ki67 ως προβλεπτικό δείκτη για την PCR μετά από NAC με ανθρακυκλίνες ή/και ταξάνες σε συνολικά 183 ασθενείς και ERαρνητικούς, συμπεριλαμβανομένων και 61 TNBCs. Η έκφραση του Ki67 αποτελούσε προβλεπτικό δείκτη για την PCR, ενώ υψηλότερη έκφραση του Ki67 συσχετίστηκε με HER2 θετικό, αυξημένο μέγεθος του όγκου, θετικούς λεμφαδένες, λεμφαγγειακή διήθηση και υψηλό βαθμό κακοήθειας όγκου. Επίσης, υψηλή έκφραση Ki67 στους υπολειπόμενους όγκους συσχετίστηκε με φτωχή DFS, αλλά όχι με την OS [591].

Οι Hao *et al.* σε μια μελέτη με 571 ασθενείς έδειξαν ότι χαμηλό Ki67 είχε χειρότερη πρόγνωση σε TNBC ασθενείς που διαγνώστηκαν σε ηλικία νεότερη των 50 ετών [592].

Οι Abubakar *et al.*, σε μια από τις μεγαλύτερες μελέτες ίχε συμπεριλάβει 8088 ασθενείς, δεν βρήκαν ισχυρή συσχέτιση μεταξύ πρόγνωσης και υψηλής, μέτριας ή χαμηλής έκφρασης του Ki67 και αυτό ίσχυε και για τους TNBCs (1.70; CI = 1.02–2.84); P = 0.04) [593].

Στην μελέτη αυτή η ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS) και η ολική επιβίωση (OS) μεταξύ των διαφόρων ομάδων ασθενών με διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των μοριακών δεικτών εξετάστηκαν με την χρήση του log-rank test και επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5%. Σύμφωνα με το log-rank test, μόνο το Ki67 είχε στατιστικά σημαντική σχέση με το DFS (p-value=0.0378) και το OS (p-value=0.0186). Η σημασία αυτού του δείκτη επιβεβαιώθηκε και με το Cox regression model με backward elimination τόσο στην περίπτωση του DFS (HR=0.39; 95% CI = 0.153 – 0.994; p-value =0.048) όσο και για το OS (HR=0.277, 95% CI = 0.087 – 0.886; p-value =0.03).

Πρόσθετα, το Fisher's exact test έδειξε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ του Ki67 και της ck17 (p-value=0.041).

Παρά το γεγονός ότι οι διαπιστώσεις αυτές κρίνονται πολύ σημαντικές, τα αντικρουόμενα εν πολλοίς ευρήματα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία υποδεικνύουν ότι απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την αξιολόγηση της εκτίμησης της έκφρασης του Ki67 στους TNBCs.

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (TNBC) αντιπροσωπεύει το 10-15% των καρκίνων του μαστού και ορίζεται ανοσοϊστοχημικά από την έλλειψη έκφρασης των ER, PR και HER2. Χαρακτηρίζεται από υψηλότερη θνησιμότητα σε σχέση με τους άλλους υποτύπους λόγω της επιθετικής κλινικής συμπεριφοράς του, της κακής πρόγνωσης του και της έλλειψης στοχευμένων θεραπειών.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση προγνωστικών δεικτών για τους TNBCs - p53, p63, C-KIT, Ki67, cMet, claudin 7, CK 5/6, CK17, AR, PTEN, EGFR, ALK, PDL-1 και c-MYC - σε σχέση με τον υψηλότερο βαθμό κακοήθειας, θετικούς λεμφαδένες, την λεμφαγγειακή διήθηση (LVI), τοπική υποτροπή, μεταστάσεις, την ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS) καθώς και την συνολική επιβίωση (OS).

Υλικό-Μέθοδοι: Διενεργήθηκε απλή ανοσοϊστοχημεία έναντι των 14 αντιγόνων σε 84 ασθενείς με τριπλά αρνητικό διηθητικό καρκίνωμα του μαστού. Επιλέγηκαν κατάλληλοι κύβοι παραφίνης για την δημιουργία ιστικών μικροσυστοιχιών (Tissue MicroArrays-TMA). Η ανοσοϊστοχημική διερεύνηση εφαρμόστηκε σε τομές πάχους 3 μm , από τους τρεις TMA κύβους παραφίνης.

Αποτελέσματα: Μονοπαραγοντική ανάλυση με το Fisher's exact test έδειξε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ του βαθμού κακοήθειας του όγκου και της CLAUDIN 7 (p-value=0.004), των θετικών λεμφαδένων και της πρωτεΐνης p53 (pvalue=0.015), της λεμφαγγειακής διήθησης και της CLAUDIN 7 (p-value=0.032), καθώς και μεταξύ των μοριακών δεικτών ckit και των ck5/6 (p-value=0.022), ckit και EGFR (p-value=0.055), AR και cMet (p-value=0.041), CK5/6 και EGFR (pvalue=0.004), CK17 και Ki67 (p-value=0.041), Ki67 και cMet (p-value=0.002).

Η σημασία αυτής της συσχέτισης μεταξύ των δεικτών δεν έχει διερευνηθεί.

Πολυπαραγοντική ανάλυση με logistic regression model with stepwise backward elimination of variables with a p-value=0.05 για τον βαθμό κακοήθειας έδειξε:

Υψηλότερη έκφραση της cl7 (OR=65.8, 95%CI=4.35-995.19, p-value=0.003), χαμηλότερη έκφραση της ckit (OR=0.14, 95%CI=0.025-0.793, p-value=0.026) αλλά και της πρωτεΐνης p63 (OR=0.18 95%CI=0.035-0.978, p-value=0.047) σχετίζονταν με υψηλότερο βαθμό

κακοήθειας του όγκου. Παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση του AR (OR=13.44, 95%CI=1.28-141.56, p-value=0.031) και χαμηλότερη έκφραση των CK5/6 OR=0.072, 95%CI=0.007-0.732, (p-value=0.026) σε ασθενείς με θετική LVI.

Σύμφωνα με το A-rank B, μόνο το Ki67 απεδείχθη στατιστικά σημαντικό για την OS (p-value=0.0186) και για την DFS (p-value=0.0378).

Συμπέρασμα: Υψηλή έκφραση της claudin-7 και χαμηλή έκφραση της c-kit και της πρωτεΐνης p63 σχετίζονταν με υψηλότερο βαθμό κακοήθειας του όγκου. Υψηλότερη έκφραση του AR, και χαμηλότερη έκφραση των CK5/6 φαίνεται να σχετίζονται με θετικό LVI. Αυτά τα ευρήματα εισηγούνται ότι αυτοί οι μοριακοί δείκτες μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί δείκτες για τους TNBCς.

7. SUMMARY

Triple Negative Breast Cancer (TNBC) represents 10-15% of the breast cancer subtypes and immunohistochemically it is characterized by the lack of expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2). It is responsible for a disproportionate share of mortality owing to its aggressive clinical behavior, poor prognosis and lack of targeted therapies.

Background/Aim: To explore the relationship between p53, p63, c-kit, Ki67, cMet, claudin7, CK5/6, CK17, AR, PTEN, EGFR, ALK, PDL-1 and c-MYC expression with clinicopathological features of triple- negative breast cancer and evaluate their prognostic value.

Materials and Methods: Immunohistochemistry was performed in 84 triple-negative breast cancer samples versus the 14 antigens in 3µm thickness sections from the three paraffin-embedded TMA cubes.

Results: Univariate statistical analysis, with Fisher's exact test showed a statistically significant relationship between claudin-7 and tumour grade ($p=0.004$) between claudin-7 and lymphovascular invasion, between protein p53 and positive lymph nodes ($p=0.015$) and also a statistically significant relationship between the markers ckit and ck5/6 ($p\text{-value}=0.022$), ckit and EGFR ($p\text{-value}=0.055$), AR and cmet ($p\text{value}=0.041$), CK5/6 and EGFR ($p\text{-value}=0.004$), CK17 and Ki67 ($p\text{-value}=0.041$), Ki67 and cmet ($p\text{-value}=0.002$).

Multivariate statistical analysis with logistic regression model with stepwise backward elimination of variables with a $p\text{-value}=0.05$ showed high expression of claudin7 ($OR=65.8$, $95\%CI=4.35\text{-}995.19$, $p\text{-value}=0.003$) and low expression of c-kit ($OR=0.14$, $95\%CI=0.025\text{-}0.793$, $p\text{value}=0.026$) and protein p63 ($OR=0.18$ $95\%CI=0.035\text{-}0.978$, $p\text{-value}=0.047$) to be associated with higher tumor grade. Higher AR expression ($OR=13.44$, $95\%CI=1.28\text{-}141.56$, $p\text{-value}=0.031$) and lower expression of CK5/6 CK5/6 cytokeratins was found in patients with positive lymphovascular invasion (LVI) ($OR=0.072$, $95\%CI=0.007\text{-}0.732$, $p\text{-value}=0.026$). Only the cell proliferation index (Ki67) has been proven to be statistically significant for disease-free survival ($p\text{-value}=0.0378$), and overall survival

(p-value=0.0186). **Conclusion:** High expression of claudin-7 and low expression of c-kit and protein p63 are associated with higher tumor grade. AR and CK5/6 expression seem to be important in LVI.

These findings suggest that these biomarkers may be useful as prognostic or predictive markers in TNBC.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kaufmann M. Atlas of Breast surgery. Springer; 2006.
2. Rasooly A, Jacobson J. Development of biosensors for cancer clinical testing. *Biosens Bioelectron.* 2006 Apr 15;21(10):1851-8.
3. Jefford CE, Irminger-Finger I. Mechanisms of chromosome instability in cancers. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006 Jul;59(1):1-14.
4. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002 Jun;3(6):415-28.
5. Youlten DR, Cramb SM, Dunn NA, Muller JM, Pyke CM, Baade PD. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol.* Jun;36(3):237-48.
6. Hortobagyi GN, de la Garza Salazar J, Pritchard K, Amadori D, Haidinger R, Hudis CA, et al. The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. *Clin Breast Cancer.* 2005 Dec;6(5):391-401.
7. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009 Jul-Aug;59(4):225-49.
8. Brinton LA, Sherman ME, Carreon JD, Anderson WF. Recent trends in breast cancer among younger women in the United States. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Nov 19;100(22):1643-8.
9. Anderson WF, Rosenberg PS, Menashe I, Mitani A, Pfeiffer RM. Age-related crossover in breast cancer incidence rates between black and white ethnic groups. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Dec 17;100(24):1804-14.
10. Xue F, Michels KB. Intrauterine factors and risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis of current evidence. *Lancet Oncol.* 2007 Dec;8(12):1088-100.
11. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev.* 1993;15(1):36-47.
12. Lacey JV, Jr., Kreimer AR, Buys SS, Marcus PM, Chang SC, Leitzmann MF, et al. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC Cancer.* 2009 Mar 17;9:84.
13. White E. Projected changes in breast cancer incidence due to the trend toward delayed childbearing. *Am J Public Health.* 1987 Apr;77(4):495-7.
14. Thiebaut AC, Kipnis V, Chang SC, Subar AF, Thompson FE, Rosenberg PS, et al. Dietary fat and postmenopausal invasive breast cancer in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study cohort. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Mar 21;99(6):451-62.

15. Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, van den Brandt PA, Folsom AR, Goldbohm RA, et al. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA*. 1998 Feb 18;279(7):535-40.
16. Hamajima N, Hirose K, Tajima K, Rohan T, Calle EE, Heath CW, Jr., et al. Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer*. 2002 Nov 18;87(11):1234-45.
17. Reynolds P, Hurley S, Goldberg DE, Anton-Culver H, Bernstein L, Deapen D, et al. Active smoking, household passive smoking, and breast cancer: evidence from the California Teachers Study. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Jan 7;96(1):29-37.
18. Cook MG, Rohan TE. Benign breast disease: the relationship between its histological features and risk factors for breast cancer. *Pathology*. 1991 Oct;23(4):286-90.
19. Hartmann LC, Ghosh K. Benign breast disease: emerging findings in a diverse population. *Breast J*. 2007 Mar-Apr;13(2):113-4.
20. Byrne C, Schairer C, Wolfe J, Parekh N, Salane M, Brinton LA, et al. Mammographic features and breast cancer risk: effects with time, age, and menopause status. *J Natl Cancer Inst*. 1995 Nov 1;87(21):1622-9.
21. Key T, Appleby P, Barnes I, Reeves G. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst*. 2002 Apr 17;94(8):606-16.
22. Hankinson SE, Willett WC, Michaud DS, Manson JE, Colditz GA, Longcope C, et al. Plasma prolactin levels and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Apr 7;91(7):629-34.
23. Schernhammer ES, Holly JM, Pollak MN, Hankinson SE. Circulating levels of insulin-like growth factors, their binding proteins, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Mar;14(3):699-704.
24. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002 Jul 17;288(3):321-33.
25. Verkooijen HM, Bouchardy C, Vinh-Hung V, Rapiti E, Hartman M. The incidence of breast cancer and changes in the use of hormone replacement therapy: a review of the evidence. *Maturitas*. 2009 Oct 20;64(2):80-5.
26. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Sep 16;90(18):1371-88.

27. Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, Cronin WM, Cecchini RS, Atkins JN, et al. Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial. *JAMA*. 2006 Jun 21;295(23):2727-41.
28. Wickerham DL, Costantino JP, Vogel VG, Cronin WM, Cecchini RS, Ford LG, et al. The use of tamoxifen and raloxifene for the prevention of breast cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2009;181:113-9.
29. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG, et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature*. 2007 Jun 28;447(7148):1087-93.
30. He C, Kraft P, Chen C, Buring JE, Pare G, Hankinson SE, et al. Genome-wide association studies identify loci associated with age at menarche and age at natural menopause. *Nat Genet*. 2009 Jun;41(6):724-8.
31. Ambrosone CB. The promise and limitations of genome-wide association studies to elucidate the causes of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2007;9(6):114.
32. Glass AG, Lacey JV, Jr., Carreon JD, Hoover RN. Breast cancer incidence, 1980-2006: combined roles of menopausal hormone therapy, screening mammography, and estrogen receptor status. *J Natl Cancer Inst*. 2007 Aug 1;99(15):1152-61.
33. Smigal C, Jemal A, Ward E, Cokkinides V, Smith R, Howe HL, et al. Trends in breast cancer by race and ethnicity: update 2006. *CA Cancer J Clin*. 2006 MayJun;56(3):168-83.
34. Zheng T, Holford TR, Chen Y, Jones BA, Flannery J, Boyle P. Time trend of female breast carcinoma in situ by race and histology in Connecticut, USA. *Eur J Cancer*. 1997 Jan;33(1):96-100.
35. Ehemann CR, Shaw KM, Ryerson AB, Miller JW, Ajani UA, White MC. The changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas: United States, 1999-2004. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Jun;18(6):1763-9.
36. Tice JA, Cummings SR, Ziv E, Kerlikowske K. Mammographic breast density and the Gail model for breast cancer risk prediction in a screening population. *Breast Cancer Res Treat*. 2005 Nov;94(2):115-22.
37. Santen RJ, Boyd NF, Chlebowski RT, Cummings S, Cuzick J, Dowsett M, et al. Critical assessment of new risk factors for breast cancer: considerations for development of an improved risk prediction model. *Endocr Relat Cancer*. 2007 Jun;14(2):169-87.
38. Rosenberg LU, Einarsson K, Friman EI, Wedren S, Dickman PW, Hall P, et al. Risk factors for hormone receptor-defined breast cancer in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Dec;15(12):2482-8.

39. Althuis MD, Fergenbaum JH, Garcia-Closas M, Brinton LA, Madigan MP, Sherman ME. Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 Oct;13(10):1558-68.
40. Deandrea S, Talamini R, Foschi R, Montella M, Dal Maso L, Falcini F, et al. Alcohol and breast cancer risk defined by estrogen and progesterone receptor status: a case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 Aug;17(8):2025-8.
41. Reeves GK, Beral V, Green J, Gathani T, Bull D. Hormonal therapy for menopause and breast-cancer risk by histological type: a cohort study and metaanalysis. *Lancet Oncol.* 2006 Nov;7(11):910-8.
42. Couto E, Banks E, Reeves G, Pirie K, Beral V. Family history and breast cancer tumour characteristics in screened women. *Int J Cancer.* 2008 Dec 15;123(12):2950-4.
43. Fisher ER, Gregorio RM, Fisher B, Redmond C, Vellios F, Sommers SC. The pathology of invasive breast cancer. A syllabus derived from findings of the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol no. 4). *Cancer.* 1975 Jul;36(1):1-85.
44. Rosen PP. The pathological classification of human mammary carcinoma: past, present and future. *Ann Clin Lab Sci.* 1979 Mar-Apr;9(2):144-56.
45. Dixon JM, Anderson TJ, Page DL, Lee D, Duffy SW, Stewart HJ. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: an evaluation of the incidence and consequence of bilateral disease. *Br J Surg.* 1983 Sep;70(9):513-6.
46. Frost AR, Terahata S, Yeh IT, Siegel RS, Overmoyer B, Silverberg SG. The significance of signet ring cells in infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med.* 1995 Jan;119(1):64-8.
47. Porter PL, Garcia R, Moe R, Corwin DJ, Gown AM. C-erbB-2 oncogene protein in situ and invasive lobular breast neoplasia. *Cancer.* 1991 Jul 15;68(2):331-4.
48. Borst MJ, Ingold JA. Metastatic patterns of invasive lobular versus invasive ductal carcinoma of the breast. *Surgery.* 1993 Oct;114(4):637-41; discussion 41-2.
49. Marucci G, Betts CM, Golouh R, Peterse JL, Foschini MP, Eusebi V. Toker cells are probably precursors of Paget cell carcinoma: a morphological and ultrastructural description. *Virchows Arch.* 2002 Aug;441(2):117-23.
50. Manavi M, Hudelist G, Schatten C, Battistutti WB, Pischinger KI, Czerwenka KF. Characteristics of clear cells and Toker cells in the epidermis of underlying nipple duct adenoma. *Anticancer Res.* 2002 Nov-Dec;22(6B):3691-700.
51. Rajakariar R, Walker RA. Pathological and biological features of mammographically detected invasive breast carcinomas. *Br J Cancer.* 1995 Jan;71(1):150-4.
52. McBoyle MF, Razek HA, Carter JL, Helmer SD. Tubular carcinoma of the breast: an institutional review. *Am Surg.* 1997 Jul;63(7):639-44; discussion 44-5.
53. Elson BC, Helvie MA, Frank TS, Wilson TE, Adler DD. Tubular carcinoma of the breast: mode of presentation, mammographic appearance, and frequency of nodal metastases. *AJR Am J Roentgenol.* 1993 Dec;161(6):1173-6.

54. Diab SG, Clark GM, Osborne CK, Libby A, Allred DC, Elledge RM. Tumor characteristics and clinical outcome of tubular and mucinous breast carcinomas. *J Clin Oncol*. 1999 May;17(5):1442-8.
55. Winchester DJ, Sahin AA, Tucker SL, Singletary SE. Tubular carcinoma of the breast. Predicting axillary nodal metastases and recurrence. *Ann Surg*. 1996 Mar;223(3):342-7.
56. Stutz JA, Evans AJ, Pinder S, Ellis IO, Yeoman LJ, Wilson AR, et al. The radiological appearances of invasive cribriform carcinoma of the breast. Nottingham Breast Team. *Clin Radiol*. 1994 Oct;49(10):693-5.
57. Page DL, Dixon JM, Anderson TJ, Lee D, Stewart HJ. Invasive cribriform carcinoma of the breast. *Histopathology*. 1983 Jul;7(4):525-36.
58. Venable JG, Schwartz AM, Silverberg SG. Infiltrating cribriform carcinoma of the breast: a distinctive clinicopathologic entity. *Hum Pathol*. 1990 Mar;21(3):3338.
59. Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1992 Jun;20(6):479-89.
60. Fisher ER, Anderson S, Redmond C, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project protocol B-06. 10-year pathologic and clinical prognostic discriminants. *Cancer*. 1993 Apr 15;71(8):2507-14.
61. Avisar E, Khan MA, Axelrod D, Oza K. Pure mucinous carcinoma of the breast: a clinicopathologic correlation study. *Ann Surg Oncol*. 1998 JulAug;5(5):447-51.
62. Wilson TE, Helvie MA, Oberman HA, Joynt LK. Pure and mixed mucinous carcinoma of the breast: pathologic basis for differences in mammographic appearance. *AJR Am J Roentgenol*. 1995 Aug;165(2):285-9.
63. Eisinger F, Jacquemier J, Charpin C, Stoppa-Lyonnet D, Bressac-de Paillerets B, Peyrat JP, et al. Mutations at BRCA1: the medullary breast carcinoma revisited. *Cancer Res*. 1998 Apr 15;58(8):1588-92.
64. Pedersen L, Zedeler K, Holck S, Schiødt T, Mouridsen HT. Medullary carcinoma of the breast. Prevalence and prognostic importance of classical risk factors in breast cancer. *Eur J Cancer*. 1995 Dec;31A(13-14):2289-95.
65. Somerville JE, Clarke LA, Biggart JD. c-erbB-2 overexpression and histological type of in situ and invasive breast carcinoma. *J Clin Pathol*. 1992 Jan;45(1):16-20.
66. Fisher C, Edmonds CJ. Papillary carcinoma of the thyroid in two brothers after chest fluoroscopy in childhood. *Br Med J*. 1980 Dec 13;281(6255):1600-1.
67. Chhieng C, Cranor M, Lesser ME, Rosen PP. Metaplastic carcinoma of the breast with osteocartilaginous heterologous elements. *Am J Surg Pathol*. 1998 Feb;22(2):188-94.
68. Ro JY, Silva EG, Gallager HS. Adenoid cystic carcinoma of the breast. *Hum Pathol*. 1987 Dec;18(12):1276-81.

69. Sommer S, Fuqua SA. Estrogen receptor and breast cancer. *Semin Cancer Biol.* 2001 Oct;11(5):339-52.
70. Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal.* 2008;6:e003.
71. Park WC, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators (SERMS) and their roles in breast cancer prevention. *Trends Mol Med.* 2002 Feb;8(2):82-8.
72. Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol.* 2005 Apr;19(4):833-42.
73. Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KC, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology.* 2003 Oct;144(10):4562-74.
74. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science.* 1995 Dec 1;270(5241):1491-4.
75. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev.* 1999 Jun;20(3):321-44.
76. Ferguson AT, Lapidus RG, Baylin SB, Davidson NE. Demethylation of the estrogen receptor gene in estrogen receptor-negative breast cancer cells can reactivate estrogen receptor gene expression. *Cancer Res.* 1995 Jun 1;55(11):2279-83.
77. Lapidus RG, Ferguson AT, Ottaviano YL, Parl FF, Smith HS, Weitzman SA, et al. Methylation of estrogen and progesterone receptor gene 5' CpG islands correlates with lack of estrogen and progesterone receptor gene expression in breast tumors. *Clin Cancer Res.* 1996 May;2(5):805-10.
78. Graham JD, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev.* 1997 Aug;18(4):502-19.
79. Keshamouni VG, Mattingly RR, Reddy KB. Mechanism of 17-beta-estradiol-induced Erk1/2 activation in breast cancer cells. A role for HER2 AND PKC-delta. *J Biol Chem.* 2002 Jun 21;277(25):22558-65.
80. Olayioye MA. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res.* 2001;3(6):385-9.
81. Rusnak DW, Affleck K, Cockerill SG, Stubberfield C, Harris R, Page M, et al. The characterization of novel, dual ErbB-2/EGFR, tyrosine kinase inhibitors: potential therapy for cancer. *Cancer Res.* 2001 Oct 1;61(19):7196-203.
82. Liu Y, el-Ashry D, Chen D, Ding IY, Kern FG. MCF-7 breast cancer cells overexpressing transfected c-erbB-2 have an in vitro growth advantage in estrogen-depleted conditions and reduced estrogen-dependence and tamoxifen-sensitivity in vivo. *Breast Cancer Res Treat.* 1995 May;34(2):97-117.

83. Coles C, Condie A, Chetty U, Steel CM, Evans HJ, Prosser J. p53 mutations in breast cancer. *Cancer Res.* 1992 Oct 1;52(19):5291-8.
84. Tan M, Yao J, Yu D. Overexpression of the c-erbB-2 gene enhanced intrinsic metastasis potential in human breast cancer cells without increasing their transformation abilities. *Cancer Res.* 1997 Mar 15;57(6):1199-205.
85. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol.* Jun 1;28(16):2784-95.
86. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000 Aug 17;406(6797):747-52.
87. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 11;98(19):10869-74.
88. 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.* 12(5):R68.
89. Quinn JE, Kennedy RD, Mullan PB, Gilmore PM, Carty M, Johnston PG, et al. BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2003 Oct 1;63(19):6221-8.
90. Thompson D, Easton DF. Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Sep 18;94(18):1358-65.
91. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Begin LR, Goffin JR, Wong N, et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Oct 1;95(19):1482-5.
92. Gusterson BA, Ross DT, Heath VJ, Stein T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2005;7(4):143-8.
93. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a populationbased study from the California cancer Registry. *Cancer.* 2007 May 1;109(9):1721-8.
94. Bertolo C, Guerrero D, Vicente F, Cordoba A, Esteller M, Ropero S, et al. Differences and molecular immunohistochemical parameters in the subtypes of infiltrating ductal breast cancer. *Am J Clin Pathol.* 2008 Sep;130(3):414-24.
95. Ihemelandu CU, Leffall LD, Jr., Dewitty RL, Naab TJ, Mezghebe HM, Makambi KH, et al. Molecular breast cancer subtypes in premenopausal and postmenopausal African-American women: age-specific prevalence and survival. *J Surg Res.* 2007 Nov;143(1):109-18.

96. Kwan ML, Kushi LH, Weltzien E, Maring B, Kutner SE, Fulton RS, et al. Epidemiology of breast cancer subtypes in two prospective cohort studies of breast cancer survivors. *Breast Cancer Res.* 2009;11(3):R31.
97. Thike AA, Cheok PY, Jara-Lazaro AR, Tan B, Tan P, Tan PH. Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. *Mod Pathol.* Jan;23(1):123-33.
98. Lund MJ, Trivers KF, Porter PL, Coates RJ, Leyland-Jones B, Brawley OW, et al. Race and triple negative threats to breast cancer survival: a population-based study in Atlanta, GA. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Jan;113(2):357-70.
99. Lara-Medina F, Perez-Sanchez V, Saavedra-Perez D, Blake-Cerda M, Arce C, Motola-Kuba D, et al. Triple-negative breast cancer in Hispanic patients: high prevalence, poor prognosis, and association with menopausal status, body mass index, and parity. *Cancer.* Aug 15;117(16):3658-69.
100. Stead LA, Lash TL, Sobieraj JE, Chi DD, Westrup JL, Charlot M, et al. Triple-negative breast cancers are increased in black women regardless of age or body mass index. *Breast Cancer Res.* 2009;11(2):R18.
101. Kurebayashi J, Moriya T, Ishida T, Hirakawa H, Kurosumi M, Akiyama F, et al. The prevalence of intrinsic subtypes and prognosis in breast cancer patients of different races. *Breast.* 2007 Dec;16 Suppl 2:S72-7.
102. Kim MJ, Ro JY, Ahn SH, Kim HH, Kim SB, Gong G. Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes. *Hum Pathol.* 2006 Sep;37(9):1217-26.
103. Tian XS, Cong MH, Zhou WH, Zhu J, Chen YZ, Liu Q. Clinicopathologic and prognostic characteristics of triple-negative breast cancer. *Onkologie.* 2008 Nov;31(11):610-4.
104. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* 2006 Jun 7;295(21):2492-502.
105. Shinde SS, Forman MR, Kuerer HM, Yan K, Peintinger F, Hunt KK, et al. Higher parity and shorter breastfeeding duration: association with triple-negative phenotype of breast cancer. *Cancer.* Nov 1;116(21):4933-43.
106. Dolle JM, Daling JR, White E, Brinton LA, Doody DR, Porter PL, et al. Risk factors for triple-negative breast cancer in women under the age of 45 years. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Apr;18(4):1157-66.
107. Millikan RC, Newman B, Tse CK, Moorman PG, Conway K, Dressler LG, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 May;109(1):123-39.

108. Ademuyiwa FO, Groman A, O'Connor T, Ambrosone C, Watroba N, Edge SB. Impact of body mass index on clinical outcomes in triple-negative breast cancer. *Cancer*. Sep 15;117(18):4132-40.
109. Vona-Davis L, Rose DP, Hazard H, Howard-McNatt M, Adkins F, Partin J, et al. Triple-negative breast cancer and obesity in a rural Appalachian population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 Dec;17(12):3319-24.
110. Dunn BK, Agurs-Collins T, Browne D, Lubet R, Johnson KA. Health disparities in breast cancer: biology meets socioeconomic status. *Breast Cancer Res Treat*. Jun;121(2):281-92.
111. Ray M, Polite BN. Triple-negative breast cancers: a view from 10,000 feet. *Cancer J*. Jan-Feb;16(1):17-22.
112. Morris GJ, Naidu S, Topham AK, Guiles F, Xu Y, McCue P, et al. Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer*. 2007 Aug 15;110(4):876-84.
113. 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.
114. Bai X, Ma D, Liu A, Shen X, Wang QJ, Liu Y, et al. Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. *Science*. 2007 Nov 9;318(5852):97780.
115. Dogan BE, Turnbull LW. Imaging of triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*. Aug;23 Suppl 6:vi23-9.
116. Collett K, Stefansson IM, Eide J, Braaten A, Wang H, Eide GE, et al. A basal epithelial phenotype is more frequent in interval breast cancers compared with screen detected tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 May;14(5):1108-12.
117. Schmadeka R, Harmon BE, Singh M. Triple-negative breast carcinoma: current and emerging concepts. *Am J Clin Pathol*. Apr;141(4):462-77.
118. Kim MY, Choi N. Mammographic and ultrasonographic features of triplenegative breast cancer: a comparison with other breast cancer subtypes. *Acta Radiol*. Oct;54(8):889-94.
119. Sung JS, Jochelson MS, Brennan S, Joo S, Wen YH, Moskowitz C, et al. MR imaging features of triple-negative breast cancers. *Breast J*. Nov-Dec;19(6):643-9.
120. Carkaci S, Santiago L, Adrada BE, Whitman GJ. Screening for breast cancer with sonography. *Semin Roentgenol*. Oct;46(4):285-91.
121. Krizmanich-Conniff KM, Paramagul C, Patterson SK, Helvie MA, Roubidoux MA, Myles JD, et al. Triple receptor-negative breast cancer: imaging and clinical characteristics. *AJR Am J Roentgenol*. Aug;199(2):458-64.

122. Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, Weigelt B, Peterse H, Bartelink H, et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triplenegative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res.* 2007;9(5):R65.
123. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol.* 2006 Feb;19(2):264-71.
124. Rakha EA, Putti TC, Abd El-Rehim DM, Paish C, Green AR, Powe DG, et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *J Pathol.* 2006 Mar;208(4):495-506.
125. Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS, Sofronis A, Gillett CE, Lakhani SR, et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology.* 2006 Jul;49(1):22-34.
126. Tsuda H, Takarabe T, Hasegawa T, Murata T, Hirohashi S. Myoepithelial differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas with large central acellular zones. *Hum Pathol.* 1999 Oct;30(10):1134-9.
127. Schouten JA, Hulscher ME, Kullberg BJ, Cox A, Gyssens IC, van der Meer JW, et al. Understanding variation in quality of antibiotic use for community-acquired pneumonia: effect of patient, professional and hospital factors. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Sep;56(3):575-82.
128. Lerma E, Peiro G, Ramon T, Fernandez S, Martinez D, Pons C, et al. Immunohistochemical heterogeneity of breast carcinomas negative for estrogen receptors, progesterone receptors and Her2/neu (basal-like breast carcinomas). *Mod Pathol.* 2007 Nov;20(11):1200-7.
129. Dabbs DJ, Chivukula M, Carter G, Bhargava R. Basal phenotype of ductal carcinoma in situ: recognition and immunohistologic profile. *Mod Pathol.* 2006 Nov;19(11):1506-11.
130. DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, Madden SF, et al. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov.* Jun;1(1):54-67.
131. Medrek C, Ponten F, Jirstrom K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer.* Jul 23;12:306.
132. Reis-Filho JS, Milanezi F, Carvalho S, Simpson PT, Steele D, Savage K, et al. Metaplastic breast carcinomas exhibit EGFR, but not HER2, gene amplification and overexpression: immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization analysis. *Breast Cancer Res.* 2005;7(6):R1028-35.
133. Bae SY, Lee SK, Koo MY, Hur SM, Choi MY, Cho DH, et al. The prognoses of metaplastic breast cancer patients compared to those of triple-negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* Apr;126(2):471-8.

134. Martinez SR, Beal SH, Canter RJ, Chen SL, Khatri VP, Bold RJ. Medullary carcinoma of the breast: a population-based perspective. *Med Oncol.* Sep;28(3):73844.
135. Ridolfi RL, Rosen PP, Port A, Kinne D, Mike V. Medullary carcinoma of the breast: a clinicopathologic study with 10 year follow-up. *Cancer.* 1977 Oct;40(4):1365-85.
136. Reyes C, Jorda M, Gomez-Fernandez C. Salivary gland-like tumors of the breast express basal-type immunohistochemical markers. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* Jul;21(4):283-6.
137. Foschini MP, Krausz T. Salivary gland-type tumors of the breast: a spectrum of benign and malignant tumors including "triple negative carcinomas" of low malignant potential. *Semin Diagn Pathol.* Feb;27(1):77-90.
138. Azoulay S, Lae M, Freneaux P, Merle S, Al Ghuzlan A, Chnecker C, et al. KIT is highly expressed in adenoid cystic carcinoma of the breast, a basal-like carcinoma associated with a favorable outcome. *Mod Pathol.* 2005 Dec;18(12):162331.
139. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* Jul;121(7):2750-67.
140. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SA, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* Apr 1;21(7):1688-98.
141. Jezequel P, Loussouarn D, Guerin-Charbonnel C, Campion L, Vanier A, Gouraud W, et al. Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response. *Breast Cancer Res.* Mar 20;17:43.
142. Rakha EA, Tan DS, Foulkes WD, Ellis IO, Tutt A, Nielsen TO, et al. Are triple-negative tumours and basal-like breast cancer synonymous? *Breast Cancer Res.* 2007;9(6):404; author reply 5.
143. Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, Habashi HO, Green AR, Powe DG, et al. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res.* 2009 Apr 1;15(7):2302-10.
144. Tan DS, Marchio C, Jones RL, Savage K, Smith IE, Dowsett M, et al. Triple negative breast cancer: molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Sep;111(1):27-44.
145. Banerjee S, Sengupta K, Dhar K, Mehta S, D'Amore PA, Dhar G, et al. Breast cancer cells secreted platelet-derived growth factor-induced motility of vascular smooth muscle cells is mediated through neuropilin-1. *Mol Carcinog.* 2006 Nov;45(11):871-80.
146. 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 Aug 15;10(16):5367-74.
147. Yehiely F, Moyano JV, Evans JR, Nielsen TO, Cryns VL. Deconstructing the molecular portrait of basal-like breast cancer. *Trends Mol Med.* 2006 Nov;12(11):537-44.

148. Biganzoli E, Coradini D, Ambrogio F, Garibaldi JM, Lisboa P, Soria D, et al. p53 status identifies two subgroups of triple-negative breast cancers with distinct biological features. *Jpn J Clin Oncol*. Feb;41(2):172-9.
149. Foulkes WD, Brunet JS, Stefansson IM, Straume O, Chappuis PO, Begin LR, et al. The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53+/glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Cancer Res*. 2004 Feb 1;64(3):830-5.
150. Palacios J, Honrado E, Osorio A, Cazorla A, Sarrio D, Barroso A, et al. Phenotypic characterization of BRCA1 and BRCA2 tumors based in a tissue microarray study with 37 immunohistochemical markers. *Breast Cancer Res Treat*. 2005 Mar;90(1):5-14.
151. Stefansson OA, Jonasson JG, Johannsson OT, Olafsdottir K, Steinarsdottir M, Valgeirsdottir S, et al. Genomic profiling of breast tumours in relation to BRCA abnormalities and phenotypes. *Breast Cancer Res*. 2009;11(4):R47.
152. Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, Pusztai L, Nitz U, Harbeck N. Triplenegative breast cancer--current status and future directions. *Ann Oncol*. 2009 Dec;20(12):1913-27.
153. McCabe N, Turner NC, Lord CJ, Kluzek K, Bialkowska A, Swift S, et al. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res*. 2006 Aug 15;66(16):8109-15.
154. Korsching E, Packeisen J, Agelopoulos K, Eisenacher M, Voss R, Isola J, et al. Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Lab Invest*. 2002 Nov;82(11):1525-33.
155. Turner NC, Reis-Filho JS. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene*. 2006 Sep 25;25(43):5846-53.
156. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer*. 2004 Oct;4(10):814-9.
157. Baldwin RL, Nemeth E, Tran H, Shvartsman H, Cass I, Narod S, et al. BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: a population-based study. *Cancer Res*. 2000 Oct 1;60(19):5329-33.
158. Collins LC, Martyniak A, Kandel MJ, Stadler ZK, Masciari S, Miron A, et al. Basal cytokeratin and epidermal growth factor receptor expression are not predictive of BRCA1 mutation status in women with triple-negative breast cancers. *Am J Surg Pathol*. 2009 Jul;33(7):1093-7.
159. 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 Dec 20;24(36):5652-7.
160. Lowery AJ, Kell MR, Glynn RW, Kerin MJ, Sweeney KJ. Locoregional recurrence after breast cancer surgery: a systematic review by receptor phenotype. *Breast Cancer Res Treat*. Jun;133(3):831-41.

161. Abdulkarim BS, Cuartero J, Hanson J, Deschenes J, Lesniak D, Sabri S. Increased risk of locoregional recurrence for women with T1-2N0 triple-negative breast cancer treated with modified radical mastectomy without adjuvant radiation therapy compared with breast-conserving therapy. *J Clin Oncol*. Jul 20;29(21):2852-8.
162. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA*. Feb 9;305(6):569-75.
163. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med*. 2002 Oct 17;347(16):1233-41.
164. Nguyen PL, Taghian AG, Katz MS, Niemierko A, Abi Raad RF, Boon WL, et al. Breast cancer subtype approximated by estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2 is associated with local and distant recurrence after breast-conserving therapy. *J Clin Oncol*. 2008 May 10;26(14):2373-8.
165. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*. Apr 1;28(10):1684-91.
166. Gabos Z, Thoms J, Ghosh S, Hanson J, Deschenes J, Sabri S, et al. The association between biological subtype and locoregional recurrence in newly diagnosed breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. Nov;124(1):187-94.
167. Kyndi M, Sorensen FB, Knudsen H, Overgaard M, Nielsen HM, Overgaard J. Estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and response to postmastectomy radiotherapy in high-risk breast cancer: the Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol*. 2008 Mar 20;26(9):1419-26.
168. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triplenegative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Mar 10;26(8):1275-81.
169. Straver ME, Glas AM, Hannemann J, Wesseling J, van de Vijver MJ, Rutgers EJ, et al. The 70-gene signature as a response predictor for neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. Feb;119(3):551-8.
170. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol*. Feb;11(2):174-83.
171. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res*. 2007 Apr 15;13(8):2329-34.
172. Berry DA, Cirincione C, Henderson IC, Citron ML, Budman DR, Goldstein LJ, et al. Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. *JAMA*. 2006 Apr 12;295(14):1658-67.

173. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A, et al. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol*. 2008 Feb 10;26(5):778-85.
174. Huober J, von Minckwitz G, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, et al. Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res Treat*. Nov;124(1):133-40.
175. Di Leo A, Desmedt C, Bartlett JM, Piette F, Ejlertsen B, Pritchard KI, et al. HER2 and TOP2A as predictive markers for anthracycline-containing chemotherapy regimens as adjuvant treatment of breast cancer: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. Nov;12(12):1134-42.
176. Rocca A, Bravaccini S, Scarpi E, Mangia A, Petroni S, Puccetti M, et al. Benefit from anthracyclines in relation to biological profiles in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. Apr;144(2):307-18.
177. De Laurentiis M, Cancelli G, D'Agostino D, Giuliano M, Giordano A, Montagna E, et al. Taxane-based combinations as adjuvant chemotherapy of early breast cancer: a meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol*. 2008 Jan 1;26(1):44-53.
178. Jiang Y, Yin W, Zhou L, Yan T, Zhou Q, Du Y, et al. First efficacy results of capecitabine with anthracycline- and taxane-based adjuvant therapy in high-risk early breast cancer: a meta-analysis. *PLoS One*. 7(3):e32474.
179. Perez EA, Patel T, Moreno-Aspitia A. Efficacy of ixabepilone in ER/PR/HER2-negative (triple-negative) breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. Jun;121(2):261-71.
180. Gronwald J et al. Neoadjuvant therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 2009;;27. abstract 502.
181. Byrski T, Gronwald J, Huzarski T, Grzybowska E, Budryk M, Stawicka M, et al. Response to neo-adjuvant chemotherapy in women with BRCA1-positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*. 2008 Mar;108(2):289-96.
182. Domagala P, Hybiak J, Rys J, Byrski T, Cybulski C, Lubinski J. Pathological complete response after cisplatin neoadjuvant therapy is associated with the downregulation of DNA repair genes in BRCA1-associated triple-negative breast cancers. *Oncotarget*. Oct 18;7(42):68662-73.
183. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. Jul 10;28(20):3271-7.
184. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):366-74.
185. Metzger-Filho O, Tutt A, de Azambuja E, Saini KS, Viale G, Loi S, et al. Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. May 20;30(15):1879-87.

186. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*. 2005 Apr 14;434(7035):917-21.
187. Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet*. Jul 24;376(9737):235-44.
188. Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay H, Swenerton K, Robidoux A, Tonkin K, et al. Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *Lancet Oncol*. Sep;12(9):852-61.
189. Rugo HS, Olopade OI, DeMichele A, Yau C, van 't Veer LJ, Buxton MB, et al. Adaptive Randomization of Veliparib-Carboplatin Treatment in Breast Cancer. *N Engl J Med*. Jul 7;375(1):23-34.
190. Pierce A, McGowan PM, Cotter M, Mullooly M, O'Donovan N, Rani S, et al. Comparative antiproliferative effects of iniparib and olaparib on a panel of triplenegative and non-triple-negative breast cancer cell lines. *Cancer Biol Ther*. Jun;14(6):537-45.
191. Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*. 15 Suppl 5:39-48.
192. Petrelli F, Coinu A, Borgonovo K, Cabiddu M, Ghilardi M, Lonati V, et al. The value of platinum agents as neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. Apr;144(2):223-32.
193. von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, Salat C, Denkert C, Rezai M, et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol*. Jun;15(7):747-56.
194. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*. 2007 Jan 1;109(1):25-32.
195. Carey LA, Rugo HS, Marcom PK, Mayer EL, Esteva FJ, Ma CX, et al. TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. Jul 20;30(21):2615-23.
196. Corkery B, Crown J, Clynes M, O'Donovan N. Epidermal growth factor receptor as a potential therapeutic target in triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*. 2009 May;20(5):862-7.
197. Elbaz M, Nasser MW, Ravi J, Wani NA, Ahirwar DK, Zhao H, et al. Modulation of the tumor microenvironment and inhibition of EGF/EGFR pathway: novel anti-tumor mechanisms of Cannabidiol in breast cancer. *Mol Oncol*. Apr;9(4):906-19.

198. Finn RS, Dering J, Ginther C, Wilson CA, Glaspy P, Tchekmedyian N, et al. Dasatinib, an orally active small molecule inhibitor of both the src and abl kinases, selectively inhibits growth of basal-type/"triple-negative" breast cancer cell lines growing in vitro. *Breast Cancer Res Treat.* 2007 Nov;105(3):319-26.
199. Tryfonopoulos D, Walsh S, Collins DM, Flanagan L, Quinn C, Corkery B, et al. Src: a potential target for the treatment of triple-negative breast cancer. *Ann Oncol.* Oct;22(10):2234-40.
200. Fornier MN, Morris PG, Abbruzzi A, D'Andrea G, Gilewski T, Bromberg J, et al. A phase I study of dasatinib and weekly paclitaxel for metastatic breast cancer. *Ann Oncol.* Dec;22(12):2575-81.
201. Andre F, Job B, Dessen P, Tordai A, Michiels S, Liedtke C, et al. Molecular characterization of breast cancer with high-resolution oligonucleotide comparative genomic hybridization array. *Clin Cancer Res.* 2009 Jan 15;15(2):441-51.
202. Linderholm BK, Hellborg H, Johansson U, Elmberger G, Skoog L, Lehtio J, et al. Significantly higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and shorter survival times for patients with primary operable triple-negative breast cancer. *Ann Oncol.* 2009 Oct;20(10):1639-46.
203. Miles DW, Chan A, Dirix LY, Cortes J, Pivot X, Tomczak P, et al. Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* Jul 10;28(20):3239-47.
204. Robert NJ, Dieras V, Glaspy J, Brufsky AM, Bondarenko I, Lipatov ON, et al. RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* Apr 1;29(10):1252-60.
205. Makhoul I, Klimberg VS, Korourian S, Henry-Tillman RS, Siegel ER, Westbrook KC, et al. Combined neoadjuvant chemotherapy with bevacizumab improves pathologic complete response in patients with hormone receptor negative operable or locally advanced breast cancer. *Am J Clin Oncol.* Feb;38(1):74-9.
206. Gerber B, Loibl S, Eidtmann H, Rezai M, Fasching PA, Tesch H, et al. Neoadjuvant bevacizumab and anthracycline-taxane-based chemotherapy in 678 triple-negative primary breast cancers; results from the geparquinto study (GBG 44). *Ann Oncol.* Dec;24(12):2978-84.
207. Brufsky A, Valero V, Tiangco B, Dakhil S, Brize A, Rugo HS, et al. Secondline bevacizumab-containing therapy in patients with triple-negative breast cancer: subgroup analysis of the RIBBON-2 trial. *Breast Cancer Res Treat.* Jun;133(3):1067-75.

208. Rivera E, Lee J, Davies A. Clinical development of ixabepilone and other epothilones in patients with advanced solid tumors. *Oncologist*. 2008 Dec;13(12):1207-23.
209. Baselga J, Zambetti M, Llombart-Cussac A, Manikhas G, Kubista E, Steger GG, et al. Phase II genomics study of ixabepilone as neoadjuvant treatment for breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Feb 1;27(4):526-34.
210. Disis ML, Stanton SE. Triple-negative breast cancer: immune modulation as the new treatment paradigm. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. e25-30.
211. Wimberly H, Brown JR, Schalper K, Haack H, Silver MR, Nixon C, et al. PDL1 Expression Correlates with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancer Immunol Res*. Apr;3(4):32632.
212. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. Mar 22;12(4):252-64.
213. Powles T, Eder JP, Fine GD, Braithel FS, Loriot Y, Cruz C, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*. Nov 27;515(7528):558-62.
214. Barrett MT, Anderson KS, Lenkiewicz E, Andreozzi M, Cunliffe HE, Klassen CL, et al. Genomic amplification of 9p24.1 targeting JAK2, PD-L1, and PD-L2 is enriched in high-risk triple negative breast cancer. *Oncotarget*. Sep 22;6(28):2648393.
215. Cimino-Mathews A, Foote JB, Emens LA. Immune targeting in breast cancer. *Oncology (Williston Park)*. May;29(5):375-85.
216. Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC, Sinn BV, Gade S, Kronenwett R, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triplenegative primary breast cancers. *J Clin Oncol*. Mar 20;33(9):983-91.
217. Tung NM, Winer EP. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to platinum in triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. Mar 20;33(9):969-71.
218. Shrivastava S, Jeengar MK, Reddy VS, Reddy GB, Naidu VG. Anticancer effect of celastrol on human triple negative breast cancer: possible involvement of oxidative stress, mitochondrial dysfunction, apoptosis and PI3K/Akt pathways. *Exp Mol Pathol*. Jun;98(3):313-27.
219. Jeong H, Ryu YJ, An J, Lee Y, Kim A. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer correlates with high histological grade and triple-negative phenotype. *Histopathology*. May;60(6B):E87-95.
220. Dutta B, Pusztai L, Qi Y, Andre F, Lazar V, Bianchini G, et al. A networkbased, integrative study to identify core biological pathways that drive breast cancer clinical subtypes. *Br J Cancer*. Mar 13;106(6):1107-16.
221. Choi JE, Kang SH, Lee SJ, Bae YK. Androgen receptor expression predicts decreased survival in early stage triple-negative breast cancer. *Ann Surg Oncol*. Jan;22(1):82-9.

222. Gluz O, Nitz UA, Harbeck N, Ting E, Kates R, Herr A, et al. Triple-negative high-risk breast cancer derives particular benefit from dose intensification of adjuvant chemotherapy: results of WSG AM-01 trial. *Ann Oncol.* 2008 May;19(5):861-70.
223. Nieto Y, Shpall EJ. High-dose chemotherapy for high-risk primary and metastatic breast cancer: is another look warranted? *Curr Opin Oncol.* 2009 Mar;21(2):150-7.
224. Berry DA, Ueno NT, Johnson MM, Lei X, Caputo J, Rodenhuis S, et al. Highdose chemotherapy with autologous stem-cell support as adjuvant therapy in breast cancer: overview of 15 randomized trials. *J Clin Oncol.* Aug 20;29(24):3214-23.
225. Morin PJ. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res.* 2005 Nov 1;65(21):9603-6.
226. Lal-Nag M, Morin PJ. The claudins. *Genome Biol.* 2009;10(8):235.
227. Tsukita S, Furuse M. Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Curr Opin Cell Biol.* 2002 Oct;14(5):531-6.
228. Blackman B, Russell T, Nordeen SK, Medina D, Neville MC. Claudin 7 expression and localization in the normal murine mammary gland and murine mammary tumors. *Breast Cancer Res.* 2005;7(2):R248-55.
229. Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Mar;1778(3):631-45.
230. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Apr;2(4):285-93.
231. Tsukita S, Yamazaki Y, Katsuno T, Tamura A. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene.* 2008 Nov 24;27(55):6930-8.
232. Lioni M, Brafford P, Andl C, Rustgi A, El-Deiry W, Herlyn M, et al. Dysregulation of claudin-7 leads to loss of E-cadherin expression and the increased invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells. *Am J Pathol.* 2007 Feb;170(2):709-21.
233. Singh AB, Sharma A, Dhawan P. Claudin family of proteins and cancer: an overview. *J Oncol.* 2010;541957.
234. Hoevel T, Macek R, Swisshelm K, Kubbies M. Reexpression of the TJ protein CLDN1 induces apoptosis in breast tumor spheroids. *Int J Cancer.* 2004 Jan 20;108(3):374-83.
235. Mullin JM. Potential interplay between luminal growth factors and increased tight junction permeability in epithelial carcinogenesis. *J Exp Zool.* 1997 Dec 1;279(5):484-9.
236. Hough CD, Sherman-Baust CA, Pizer ES, Montz FJ, Im DD, Rosenshein NB, et al. Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2000 Nov 15;60(22):6281-7.
237. Rangel LB, Agarwal R, D'Souza T, Pizer ES, Alo PL, Lancaster WD, et al. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clin Cancer Res.* 2003 Jul;9(7):2567-75.

238. Heinzelmann-Schwarz VA, Gardiner-Garden M, Henshall SM, Scurry J, Scolyer RA, Davies MJ, et al. Overexpression of the cell adhesion molecules DDR1, Claudin 3, and Ep-CAM in metaplastic ovarian epithelium and ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2004 Jul 1;10(13):4427-36.
239. Lu KH, Patterson AP, Wang L, Marquez RT, Atkinson EN, Baggerly KA, et al. Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis. *Clin Cancer Res.* 2004 May 15;10(10):3291-300.
240. Santin AD, Zhan F, Bellone S, Palmieri M, Cane S, Bignotti E, et al. Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *Int J Cancer.* 2004 Oct 20;112(1):14-25.
241. Zhu Y, Brannstrom M, Janson PO, Sundfeldt K. Differences in expression patterns of the tight junction proteins, claudin 1, 3, 4 and 5, in human ovarian surface epithelium as compared to epithelia in inclusion cysts and epithelial ovarian tumours. *Int J Cancer.* 2006 Apr 15;118(8):1884-91.
242. Hibbs K, Skubitz KM, Pambuccian SE, Casey RC, Burleson KM, Oegema TR, Jr., et al. Differential gene expression in ovarian carcinoma: identification of potential biomarkers. *Am J Pathol.* 2004 Aug;165(2):397-414.
243. Shang X, Lin X, Alvarez E, Manorek G, Howell SB. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 control tumor growth and metastases. *Neoplasia.* Oct;14(10):974-85.
244. Lu S, Singh K, Mangray S, Tavares R, Noble L, Resnick MB, et al. Claudin expression in high-grade invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with the molecular subtype. *Mod Pathol.* Apr;26(4):485-95.
245. Soini Y. Claudins 2, 3, 4, and 5 in Paget's disease and breast carcinoma. *Hum Pathol.* 2004 Dec;35(12):1531-6.
246. Tokes AM, Kulka J, Paku S, Szik A, Paska C, Novak PK, et al. Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res.* 2005;7(2):R296-305.
247. Lanigan F, McKiernan E, Brennan DJ, Hegarty S, Millikan RC, McBryan J, et al. Increased claudin-4 expression is associated with poor prognosis and high tumour grade in breast cancer. *Int J Cancer.* 2009 May 1;124(9):2088-97.
248. Blanchard AA, Skliris GP, Watson PH, Murphy LC, Penner C, Tomes L, et al. Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. *Virchows Arch.* 2009 Jun;454(6):647-56.
249. Darido C, Buchert M, Pannequin J, Bastide P, Zalzal H, Mantamadiotis T, et al. Defective claudin-7 regulation by Tcf-4 and Sox-9 disrupts the polarity and increases the tumorigenicity of colorectal cancer cells. *Cancer Res.* 2008 Jun 1;68(11):4258-68.

250. Nubel T, Preobraschenski J, Tuncay H, Weiss T, Kuhn S, Ladwein M, et al. Claudin-7 regulates EpCAM-mediated functions in tumor progression. *Mol Cancer Res.* 2009 Mar;7(3):285-99.
251. Lu Z, Ding L, Hong H, Hoggard J, Lu Q, Chen YH. Claudin-7 inhibits human lung cancer cell migration and invasion through ERK/MAPK signaling pathway. *Exp Cell Res.* Aug 1;317(13):1935-46.
252. Kim CJ, Lee JW, Choi JJ, Choi HY, Park YA, Jeon HK, et al. High claudin-7 expression is associated with a poor response to platinum-based chemotherapy in epithelial ovarian carcinoma. *Eur J Cancer.* Apr;47(6):918-25.
253. Hoggard J, Fan J, Lu Z, Lu Q, Sutton L, Chen YH. Claudin-7 increases chemosensitivity to cisplatin through the upregulation of caspase pathway in human NCI-H522 lung cancer cells. *Cancer Sci.* May;104(5):611-8.
254. Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Gilcrease MZ, Krishnamurthy S, Lee JS, et al. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res.* 2009 May 15;69(10):4116-24.
255. Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A, et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 18;106(33):13820-5.
256. Asiedu MK, Ingle JN, Behrens MD, Radisky DC, Knutson KL. TGFbeta/TNF(alpha)-mediated epithelial-mesenchymal transition generates breast cancer stem cells with a claudin-low phenotype. *Cancer Res.* Jul 1;71(13):4707-19.
257. Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, et al. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene.* 2003 Apr 3;22(13):2021-33.
258. Sauer T, Pedersen MK, Ebeltoft K, Naess O. Reduced expression of Claudin-7 in fine needle aspirates from breast carcinomas correlate with grading and metastatic disease. *Cytopathology.* 2005 Aug;16(4):193-8.
259. Bernardi MA, Logullo AF, Pasini FS, Nonogaki S, Blumke C, Soares FA, et al. Prognostic significance of CD24 and claudin-7 immunoexpression in ductal invasive breast cancer. *Oncol Rep.* Jan;27(1):28-38.
260. Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell.* 2008 May 2;133(3):403-14.
261. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:127-50.
262. Samuels Y, Ericson K. Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr Opin Oncol.* 2006 Jan;18(1):77-82.
263. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 2002 May 31;296(5573):1655-7.

264. Georgescu MM. PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes Cancer*. Dec;1(12):1170-7.
265. Xi Y, Chen Y. Oncogenic and Therapeutic Targeting of PTEN Loss in Bone Malignancies. *J Cell Biochem*. Sep;116(9):1837-47.
266. Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell*. 2003 Oct;4(4):257-62.
267. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*. 2006 Aug;7(8):60619.
268. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Dec;4(12):988-1004.
269. Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:615-75.
270. Tokunaga E, Oki E, Egashira A, Sadanaga N, Morita M, Kakeji Y, et al. Deregulation of the Akt pathway in human cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008 Feb;8(1):27-36.
271. Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell*. 2000 Feb 18;100(4):387-90.
272. Tamura M, Gu J, Tran H, Yamada KM. PTEN gene and integrin signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Nov 3;91(21):1820-8.
273. Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008 May;8(3):187-98.
274. Hopkins BD, Fine B, Steinbach N, Dendy M, Rapp Z, Shaw J, et al. A secreted PTEN phosphatase that enters cells to alter signaling and survival. *Science*. Jul 26;341(6144):399-402.
275. Putz U, Howitt J, Doan A, Goh CP, Low LH, Silke J, et al. The tumor suppressor PTEN is exported in exosomes and has phosphatase activity in recipient cells. *Sci Signal*. Sep 25;5(243):ra70.
276. Ali IU, Schriml LM, Dean M. Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Nov 17;91(22):1922-32.
277. Bose S, Crane A, Hibshoosh H, Mansukhani M, Sandweis L, Parsons R. Reduced expression of PTEN correlates with breast cancer progression. *Hum Pathol*. 2002 Apr;33(4):405-9.
278. Depowski PL, Rosenthal SI, Ross JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Mod Pathol*. 2001 Jul;14(7):672-6.

279. Rubin MA, Gerstein A, Reid K, Bostwick DG, Cheng L, Parsons R, et al. 10q23.3 loss of heterozygosity is higher in lymph node-positive (pT2-3,N+) versus lymph node-negative (pT2-3,N0) prostate cancer. *Hum Pathol.* 2000 Apr;31(4):504-8.
280. Orloff MS, Eng C. Genetic and phenotypic heterogeneity in the PTEN hamartoma tumour syndrome. *Oncogene.* 2008 Sep 18;27(41):5387-97.
281. Alimonti A, Carracedo A, Clohessy JG, Trotman LC, Nardella C, Egia A, et al. Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. *Nat Genet.* May;42(5):454-8.
282. Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Mar 1;58(3):903-13.
283. Xiang S, Fang J, Wang S, Deng B, Zhu L. MicroRNA135b regulates the stability of PTEN and promotes glycolysis by targeting USP13 in human colorectal cancers. *Oncol Rep.* Mar;33(3):1342-8.
284. Yang Y, Yang JJ, Tao H, Jin WS. MicroRNA-21 controls hTERT via PTEN in human colorectal cancer cell proliferation. *J Physiol Biochem.* Mar;71(1):59-68.
285. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 1997 Mar 28;275(5308):1943-7.
286. Maehama T, Taylor GS, Dixon JE. PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:247-79.
287. Bose S, Wang SI, Terry MB, Hibshoosh H, Parsons R. Allelic loss of chromosome 10q23 is associated with tumor progression in breast carcinomas. *Oncogene.* 1998 Jul 9;17(1):123-7.
288. Garcia JM, Silva J, Pena C, Garcia V, Rodriguez R, Cruz MA, et al. Promoter methylation of the PTEN gene is a common molecular change in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004 Oct;41(2):117-24.
289. Huang TH, Wu F, Loeb GB, Hsu R, Heidersbach A, Brincat A, et al. Upregulation of miR-21 by HER2/neu signaling promotes cell invasion. *J Biol Chem.* 2009 Jul 3;284(27):18515-24.
290. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology.* 2007 Aug;133(2):647-58.
291. Martin V, Botta F, Zanellato E, Molinari F, Crippa S, Mazzucchelli L, et al. Molecular characterization of EGFR and EGFR-downstream pathways in triple negative breast carcinomas with basal like features. *Histol Histopathol.* Jun;27(6):785-92.
292. Stefansson OA, Jonasson JG, Olafsdottir K, Hilmarsdottir H, Olafsdottir G, Esteller M, et al. CpG island hypermethylation of BRCA1 and loss of pRb as cooccurring events in basal/triple-negative breast cancer. *Epigenetics.* May;6(5):63849.

293. Marty B, Maire V, Gravier E, Rigai G, Vincent-Salomon A, Kappler M, et al. Frequent PTEN genomic alterations and activated phosphatidylinositol 3-kinase pathway in basal-like breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2008;10(6):R101.
294. Inanc M, Ozkan M, Karaca H, Berk V, Bozkurt O, Duran AO, et al. Cytokeratin 5/6, c-Met expressions, and PTEN loss prognostic indicators in triplenegative breast cancer. *Med Oncol.* Jan;31(1):801.
295. Tsutsui S, Inoue H, Yasuda K, Suzuki K, Higashi H, Era S, et al. Reduced expression of PTEN protein and its prognostic implications in invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncology.* 2005;68(4-6):398-404.
296. Daemen A, Wolf DM, Korkola JE, Griffith OL, Frankum JR, Brough R, et al. Cross-platform pathway-based analysis identifies markers of response to the PARP inhibitor olaparib. *Breast Cancer Res Treat.* Sep;135(2):505-17.
297. Dean SJ, Perks CM, Holly JM, Bhoo-Pathy N, Looi LM, Mohammed NA, et al. Loss of PTEN expression is associated with IGFBP2 expression, younger age, and late stage in triple-negative breast cancer. *Am J Clin Pathol.* Mar;141(3):323-33.
298. Razis E, Bobos M, Kotoula V, Eleftheraki AG, Kalofonos HP, Pavlakis K, et al. Evaluation of the association of PIK3CA mutations and PTEN loss with efficacy of trastuzumab therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* Jul;128(2):447-56.
299. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell.* 2007 Oct;12(4):395-402.
300. Piekarski JH, Biernat W. Clinical significance of CK5/6 and PTEN protein expression in patients with bilateral breast carcinoma. *Histopathology.* 2006 Sep;49(3):248-55.
301. Gonzalez-Angulo AM, Ferrer-Lozano J, Stemke-Hale K, Sahin A, Liu S, Barrera JA, et al. PI3K pathway mutations and PTEN levels in primary and metastatic breast cancer. *Mol Cancer Ther.* Jun;10(6):1093-101.
302. Nakamura T, Kitazawa T, Ichihara A. Partial purification and characterization of masking protein for beta-type transforming growth factor from rat platelets. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986 Nov 26;141(1):176-84.
303. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, et al. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met protooncogene product. *Science.* 1991 Feb 15;251(4995):802-4.
304. Lengyel E, Prechtel D, Resau JH, Gauger K, Welk A, Lindemann K, et al. CMet overexpression in node-positive breast cancer identifies patients with poor clinical outcome independent of Her2/neu. *Int J Cancer.* 2005 Feb 10;113(4):678-82.
305. Kim CH, Kim J, Kahng H, Choi EC. Change of E-cadherin by hepatocyte growth factor and effects on the prognosis of hypopharyngeal carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2007 May;14(5):1565-74.

306. Maulik G, Shrikhande A, Kijima T, Ma PC, Morrison PT, Salgia R. Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002 Feb;13(1):41-59.
307. Tolbert WD, Daugherty-Holtrop J, Gherardi E, Vande Woude G, Xu HE. Structural basis for agonism and antagonism of hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 27;107(30):13264-9.
308. Gaule PB, Crown J, O'Donovan N, Duffy MJ. cMET in triple-negative breast cancer: is it a therapeutic target for this subset of breast cancer patients? *Expert Opin Ther Targets.* Sep;18(9):999-1009.
309. Naldini L, Weidner KM, Vigna E, Gaudino G, Bardelli A, Ponzetto C, et al. Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J.* 1991 Oct;10(10):2867-78.
310. Graveel CR, DeGroot JD, Su Y, Koeman J, Dykema K, Leung S, et al. Met induces diverse mammary carcinomas in mice and is associated with human basal breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 4;106(31):12909-14.
311. Graveel CR, Tolbert D, Vande Woude GF. MET: a critical player in tumorigenesis and therapeutic target. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Jul 1;5(7).
312. Cecchi F, Rabe DC, Bottaro DP. Targeting the HGF/Met signalling pathway in cancer. *Eur J Cancer.* May;46(7):1260-70.
313. Niranjana B, Buluwela L, Yant J, Perusinghe N, Atherton A, Phippard D, et al. HGF/SF: a potent cytokine for mammary growth, morphogenesis and development. *Development.* 1995 Sep;121(9):2897-908.
314. Sierra JR, Tsao MS. c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. *Ther Adv Med Oncol.* Nov;3(1 Suppl):S21-35.
315. Bieche I, Champeme MH, Lidereau R. Infrequent mutations of the MET gene in sporadic breast tumours. *Int J Cancer.* 1999 Sep 9;82(6):908-10.
316. Ma J, DeFrances MC, Zou C, Johnson C, Ferrell R, Zarnegar R. Somatic mutation and functional polymorphism of a novel regulatory element in the HGF gene promoter causes its aberrant expression in human breast cancer. *J Clin Invest.* 2009 Mar;119(3):478-91.
317. Koeppen H, Rost S, Yauch RL. Developing biomarkers to predict benefit from HGF/MET pathway inhibitors. *J Pathol.* Jan;232(2):210-8.
318. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science.* 2007 May 18;316(5827):1039-43.
319. Toschi L, Cappuzzo F. Clinical implications of MET gene copy number in lung cancer. *Future Oncol.* Feb;6(2):239-47.

320. Carracedo A, Egervari K, Salido M, Rojo F, Corominas JM, Arumi M, et al. FISH and immunohistochemical status of the hepatocyte growth factor receptor (cMet) in 184 invasive breast tumors. *Breast Cancer Res.* 2009;11(2):402.
321. Gonzalez-Angulo AM, Chen H, Karuturi MS, Chavez-MacGregor M, Tsavachidis S, Meric-Bernstam F, et al. Frequency of mesenchymal-epithelial transition factor gene (MET) and the catalytic subunit of phosphoinositide-3-kinase (PIK3CA) copy number elevation and correlation with outcome in patients with early stage breast cancer. *Cancer.* Jan 1;119(1):7-15.
322. Jin L, Fuchs A, Schnitt SJ, Yao Y, Joseph A, Lamszus K, et al. Expression of scatter factor and c-met receptor in benign and malignant breast tissue. *Cancer.* 1997 Feb 15;79(4):749-60.
323. Edakuni G, Sasatomi E, Satoh T, Tokunaga O, Miyazaki K. Expression of the hepatocyte growth factor/c-Met pathway is increased at the cancer front in breast carcinoma. *Pathol Int.* 2001 Mar;51(3):172-8.
324. Kang JY, Dolled-Filhart M, Ocal IT, Singh B, Lin CY, Dickson RB, et al. Tissue microarray analysis of hepatocyte growth factor/Met pathway components reveals a role for Met, matriptase, and hepatocyte growth factor activator inhibitor 1 in the progression of node-negative breast cancer. *Cancer Res.* 2003 Mar 1;63(5):1101-5.
325. *-Baker AF, Dragovich T, Ihle NT, Williams R, Fenoglio-Preiser C, Powis G. Stability of phosphoprotein as a biological marker of tumor signaling. *Clin Cancer Res.* 2005 Jun 15;11(12):4338-40.
326. Dua R, Zhang J, Parry G, Penuel E. Detection of hepatocyte growth factor (HGF) ligand-c-MET receptor activation in formalin-fixed paraffin embedded specimens by a novel proximity assay. *PLoS One.* Jan 21;6(1):e15932.
327. Jarvius M, Paulsson J, Weibrecht I, Leuchowius KJ, Andersson AC, Wahlby C, et al. In situ detection of phosphorylated platelet-derived growth factor receptor beta using a generalized proximity ligation method. *Mol Cell Proteomics.* 2007 Sep;6(9):1500-9.
328. Blokzijl A, Friedman M, Ponten F, Landegren U. Profiling protein expression and interactions: proximity ligation as a tool for personalized medicine. *J Intern Med.* Sep;268(3):232-45.
329. Raghav KP, Wang W, Liu S, Chavez-MacGregor M, Meng X, Hortobagyi GN, et al. cMET and phospho-cMET protein levels in breast cancers and survival outcomes. *Clin Cancer Res.* Apr 15;18(8):2269-77.
330. Camp RL, Rimm EB, Rimm DL. Met expression is associated with poor outcome in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma. *Cancer.* 1999 Dec 1;86(11):2259-65.
331. Zagouri F, Bago-Horvath Z, Rossler F, Brandstetter A, Bartsch R, Papadimitriou CA, et al. High MET expression is an adverse prognostic factor in patients with triple-negative breast cancer. *Br J Cancer.* Mar 19;108(5):1100-5.
332. Ho-Yen CM,

- Green AR, Rakha EA, Brentnall AR, Ellis IO, Kermorgant S, et al. C-Met in invasive breast cancer: is there a relationship with the basal-like subtype? *Cancer*. Jan 15;120(2):163-71.
333. Kim YJ, Choi JS, Seo J, Song JY, Lee SE, Kwon MJ, et al. MET is a potential target for use in combination therapy with EGFR inhibition in triple-negative/basal-like breast cancer. *Int J Cancer*. May 15;134(10):2424-36.
 334. Pozner-Moulis S, Cregger M, Camp RL, Rimm DL. Antibody validation by quantitative analysis of protein expression using expression of Met in breast cancer as a model. *Lab Invest*. 2007 Mar;87(3):251-60.
 335. Nakopoulou L, Gakiopoulou H, Keramopoulos A, Giannopoulou I, Athanassiadou P, Mavrommatis J, et al. c-met tyrosine kinase receptor expression is associated with abnormal beta-catenin expression and favourable prognostic factors in invasive breast carcinoma. *Histopathology*. 2000 Apr;36(4):313-25.
 336. Chen BH, Xie Q, Liu KD. [Influence of the inhibitor of c-Met on the growth and motility of hepatocellular carcinoma cells]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2003 Aug;11(8):487-9.
 337. Nass SJ, Dickson RB. Defining a role for c-Myc in breast tumorigenesis. *Breast Cancer Res Treat*. 1997 May;44(1):1-22.
 338. Bidwell GL, 3rd, Raucher D. Enhancing the antiproliferative effect of topoisomerase II inhibitors using a polypeptide inhibitor of c-Myc. *Biochem Pharmacol*. 2006 Jan 12;71(3):248-56.
 339. Christoph F, Schmidt B, Schmitz-Drager BJ, Schulz WA. Over-expression and amplification of the c-myc gene in human urothelial carcinoma. *Int J Cancer*. 1999 Apr 20;84(2):169-73.
 340. Cohen DE, Prochownik EV. A functional hierarchy for c-Myc target genes? Lessons from MT-MC1. *Cell Cycle*. 2006 Feb;5(4):392-3.
 341. Dang CV, Resar LM, Emison E, Kim S, Li Q, Prescott JE, et al. Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp Cell Res*. 1999 Nov 25;253(1):63-77.
 342. Lee CM, Reddy EP. The v-myc oncogene. *Oncogene*. 1999 May 13;18(19):2997-3003.
 343. Prendergast GC. Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene*. 1999 May 13;18(19):2967-87.
 344. Schmidt EV. The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene*. 1999 May 13;18(19):2988-96.
 345. Eilers M, Eisenman RN. Myc's broad reach. *Genes Dev*. 2008 Oct 15;22(20):2755-66.
 346. Grandori C, Cowley SM, James LP, Eisenman RN. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000;16:653-99.

347. Cowling VH, Cole MD. Mechanism of transcriptional activation by the Myc oncoproteins. *Semin Cancer Biol.* 2006 Aug;16(4):242-52.
348. Jain AN, Chin K, Borresen-Dale AL, Erikstein BK, Eynstein Lonning P, Kaaresen R, et al. Quantitative analysis of chromosomal CGH in human breast tumors associates copy number abnormalities with p53 status and patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jul 3;98(14):7952-7.
349. Bouchalova K, Cizkova M, Cwiertka K, Trojanec R, Hajduch M. Triple negative breast cancer--current status and prospective targeted treatment based on HER1 (EGFR), TOP2A and C-MYC gene assessment. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2009 Mar;153(1):13-7.
350. Alles MC, Gardiner-Garden M, Nott DJ, Wang Y, Foekens JA, Sutherland RL, et al. Meta-analysis and gene set enrichment relative to er status reveal elevated activity of MYC and E2F in the "basal" breast cancer subgroup. *PLoS One.* 2009;4(3):e4710.
351. Chandriani S, Frengen E, Cowling VH, Pendergrass SA, Perou CM, Whitfield ML, et al. A core MYC gene expression signature is prominent in basal-like breast cancer but only partially overlaps the core serum response. *PLoS One.* 2009;4(8):e6693.
352. Gatz ML, Lucas JE, Barry WT, Kim JW, Wang Q, Crawford MD, et al. A pathway-based classification of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 13;107(15):6994-9.
353. Bouchalova K, Svoboda M, Kharashvili G, Vrbkova J, Bouchal J, Trojanec R, et al. BCL2 is an independent predictor of outcome in basal-like triple-negative breast cancers treated with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Tumour Biol.* Jun;36(6):4243-52.
354. Horiuchi D, Kusdra L, Huskey NE, Chandriani S, Lenburg ME, GonzalezAngulo AM, et al. MYC pathway activation in triple-negative breast cancer is synthetic lethal with CDK inhibition. *J Exp Med.* Apr 9;209(4):679-96.
355. Takahashi H, Saitoh K, Kishi H, Parsons PG. Immunohistochemical localisation of stem cell factor (SCF) with comparison of its receptor c-Kit protooncogene product (c-KIT) in melanocytic tumours. *Virchows Arch.* 1995;427(3):283-8.
356. Linnekin D. Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999 Oct;31(10):1053-74.
357. Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, et al. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol.* 2002 May;33(5):459-65.
358. Nishida K, Tsukamoto T, Uchida K, Takahashi T, Ueda R. Introduction of the c-kit gene leads to growth suppression of a breast cancer cell line, MCF-7. *Anticancer Res.* 1996 Nov-Dec;16(6B):3397-402.

359. Reed J, Ouban A, Schickor FK, Muraca P, Yeatman T, Coppola D. Immunohistochemical staining for c-Kit (CD117) is a rare event in human colorectal carcinoma. *Clin Colorectal Cancer*. 2002 Aug;2(2):119-22.
360. Yared MA, Middleton LP, Meric F, Cristofanilli M, Sahin AA. Expression of c-kit proto-oncogene product in breast tissue. *Breast J*. 2004 Jul-Aug;10(4):323-7.
361. Tsuura Y, Suzuki T, Honma K, Sano M. Expression of c-kit protein in proliferative lesions of human breast: sexual difference and close association with phosphotyrosine status. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2002 May;128(5):239-46.
362. Ulivi P, Zoli W, Medri L, Amadori D, Saragoni L, Barbanti F, et al. c-kit and SCF expression in normal and tumor breast tissue. *Breast Cancer Res Treat*. 2004 Jan;83(1):33-42.
363. Talaiezadeh A, Jazayeri SN, Nateghi J. Expression of c-kit protein in cancer vs. normal breast tissue. *Contemp Oncol (Pozn)*.16(4):306-9.
364. Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Takeuchi H, Nishizaki T, Higashi H, et al. A loss of c-kit expression is associated with an advanced stage and poor prognosis in breast cancer. *Br J Cancer*. 2006 Jun 19;94(12):1874-8.
365. Simon R, Panussis S, Maurer R, Spichtin H, Glatz K, Tapia C, et al. KIT (CD117)-positive breast cancers are infrequent and lack KIT gene mutations. *Clin Cancer Res*. 2004 Jan 1;10(1 Pt 1):178-83.
366. Diallo R, Ting E, Gluz O, Herr A, Schutt G, Geddert H, et al. C-kit expression in high-risk breast cancer subgroup treated with high-dose or conventional dose-dense chemotherapy. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 2006;90:177-85.
367. Nalwoga H, Arnes JB, Wabinga H, Akslen LA. Expression of EGFR and c-kit is associated with the basal-like phenotype in breast carcinomas of African women. *APMIS*. 2008 Jun;116(6):515-25.
368. Zhu Y, Wang Y, Guan B, Rao Q, Wang J, Ma H, et al. C-kit and PDGFRA gene mutations in triple negative breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*.7(7):4280-5.
369. Kashiwagi S, Yashiro M, Takashima T, Aomatsu N, Kawajiri H, Ogawa Y, et al. c-Kit expression as a prognostic molecular marker in patients with basal-like breast cancer. *Br J Surg*. Mar;100(4):490-6.
370. Williams DJ, Cohen C, To TV, Page AJ, Lawson D, Sussman ZM, et al. Triple-negative breast carcinoma in women from Vietnam and the United States: characterization of differential marker expression by tissue microarray. *Hum Pathol*. 2009 Aug;40(8):1176-81.
371. Kanapathy Pillai SK, Tay A, Nair S, Leong CO. Triple-negative breast cancer is associated with EGFR, CK5/6 and c-KIT expression in Malaysian women. *BMC Clin Pathol*.12:18.

372. Jansson S, Bendahl PO, Grabau DA, Falck AK, Ferno M, Aaltonen K, et al. The three receptor tyrosine kinases c-KIT, VEGFR2 and PDGFRalpha, closely spaced at 4q12, show increased protein expression in triple-negative breast cancer. *PLoS One*.9(7):e102176.
373. Lux ML, Rubin BP, Biase TL, Chen CJ, Maclure T, Demetri G, et al. KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol*. 2000 Mar;156(3):791-5.
374. Dy GK, Miller AA, Mandrekar SJ, Aubry MC, Langdon RM, Jr., Morton RF, et al. A phase II trial of imatinib (ST1571) in patients with c-kit expressing relapsed small-cell lung cancer: a CALGB and NCCTG study. *Ann Oncol*. 2005 Nov;16(11):1811-6.
375. Rappa G, Anzanello F, Lorico A. Imatinib mesylate enhances the malignant behavior of human breast carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. Apr;67(4):919-26.
376. Cristofanilli M, Morandi P, Krishnamurthy S, Reuben JM, Lee BN, Francis D, et al. Imatinib mesylate (Gleevec) in advanced breast cancer-expressing C-Kit or PDGFR-beta: clinical activity and biological correlations. *Ann Oncol*. 2008 Oct;19(10):1713-9.
377. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jun;8(6):467-77.
378. Rody A, Holtrich U, Pusztai L, Liedtke C, Gaetje R, Ruckhaeberle E, et al. Tcell metagene predicts a favorable prognosis in estrogen receptor-negative and HER2positive breast cancers. *Breast Cancer Res*. 2009;11(2):R15.
379. Sabatier R, Finetti P, Mamessier E, Raynaud S, Cervera N, Lambaudie E, et al. Kinome expression profiling and prognosis of basal breast cancers. *Mol Cancer*.10:86.
380. Teschendorff AE, Miremadi A, Pinder SE, Ellis IO, Caldas C. An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. *Genome Biol*. 2007;8(8):R157.
381. Bianchini G, Qi Y, Alvarez RH, Iwamoto T, Coutant C, Ibrahim NK, et al. Molecular anatomy of breast cancer stroma and its prognostic value in estrogen receptor-positive and -negative cancers. *J Clin Oncol*. Oct 1;28(28):4316-23.
382. Sabatier R, Finetti P, Cervera N, Lambaudie E, Esterni B, Mamessier E, et al. A gene expression signature identifies two prognostic subgroups of basal breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. Apr;126(2):407-20.
383. Lee JH, Chun T, Park SY, Rho SB. Interferon regulatory factor-1 (IRF-1) regulates VEGF-induced angiogenesis in HUVECs. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Sep;1783(9):1654-62.
384. Butte MJ, Pena-Cruz V, Kim MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. Interaction of human PD-L1 and B7-1. *Mol Immunol*. 2008 Aug;45(13):3567-72.

385. Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J, et al. PD1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC θ . *FEBS Lett.* 2004 Sep 10;574(13):37-41.
386. Mozaffarian N, Wiedeman AE, Stevens AM. Active systemic lupus erythematosus is associated with failure of antigen-presenting cells to express programmed death ligand-1. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Sep;47(9):1335-41.
387. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 1;10(15):5094-100.
388. Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Apr 1;13(7):2151-7.
389. Badoual C, Hans S, Merillon N, Van Ryswick C, Ravel P, Benhamouda N, et al. PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res.* Jan 1;73(1):128-38.
390. Droezer RA, Hirt C, Viehl CT, Frey DM, Nebiker C, Huber X, et al. Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* Jun;49(9):2233-42.
391. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Feb 27;104(9):3360-5.
392. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, Tsurui Y, Hamada K, Ikeda N, et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Apr 15;11(8):2947-53.
393. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT, et al. Upregulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8⁺ T cells. *Sci Transl Med.* Aug 28;5(200):200ra116.
394. Strome SE, Dong H, Tamura H, Voss SG, Flies DB, Tamada K, et al. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2003 Oct 1;63(19):6501-5.
395. Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, et al. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007 Mar 15;13(6):1757-61.
396. Vine AM, Heaps AG, Kaftantzi L, Mosley A, Asquith B, Witkover A, et al. The role of CTLs in persistent viral infection: cytolytic gene expression in CD8⁺ lymphocytes distinguishes between individuals with a high or low proviral load of human T cell lymphotropic virus type 1. *J Immunol.* 2004 Oct 15;173(8):5121-9.
397. Wintterle S,

- Schreiner B, Mitsdoerffer M, Schneider D, Chen L, Meyermann R, et al. Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis. *Cancer Res.* 2003 Nov 1;63(21):7462-7.
398. Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, Qattan A, Lehe C, Al-Qudaihi G, et al. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia.* 2006 Mar;8(3):190-8.
 399. Ghebeh H, Tulbah A, Mohammed S, Elkum N, Bin Amer SM, Al-Tweigeri T, et al. Expression of B7-H1 in breast cancer patients is strongly associated with high proliferative Ki-67-expressing tumor cells. *Int J Cancer.* 2007 Aug 15;121(4):751-8.
 400. Qin T, Zeng YD, Qin G, Xu F, Lu JB, Fang WF, et al. High PD-L1 expression was associated with poor prognosis in 870 Chinese patients with breast cancer. *Oncotarget.* Oct 20;6(32):33972-81.
 401. Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res.* Apr;2(4):361-70.
 402. Ali HR, Glont SE, Blows FM, Provenzano E, Dawson SJ, Liu B, et al. PD-L1 protein expression in breast cancer is rare, enriched in basal-like tumours and associated with infiltrating lymphocytes. *Ann Oncol.* Jul;26(7):1488-93.
 403. Muenst S, Schaerli AR, Gao F, Daster S, Trella E, Droeser RA, et al. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* Jul;146(1):15-24.
 404. Soliman H, Khalil F, Antonia S. PD-L1 expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells. *PLoS One.* 9(2):e88557.
 405. Guo L, Li W, Zhu X, Ling Y, Qiu T, Dong L, et al. PD-L1 expression and CD274 gene alteration in triple-negative breast cancer: implication for prognostic biomarker. *Springerplus.* 5(1):805.
 406. Sabatier R, Finetti P, Mamessier E, Adelaide J, Chaffanet M, Ali HR, et al. Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget.* Mar 10;6(7):5449-64.
 407. Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D, Wimberly H, Brown J, Pusztai L, et al. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* May 15;20(10):2773-82.
 408. Bertucci F, Finetti P, Colpaert C, Mamessier E, Parizel M, Dirix L, et al. PDL1 expression in inflammatory breast cancer is frequent and predicts for the pathological response to chemotherapy. *Oncotarget.* May 30;6(15):13506-19.
 409. Gadiot J, Hooijkaas AI, Kaiser AD, van Tinteren H, van Boven H, Blank C. Overall survival and PD-L1 expression in metastasized malignant melanoma. *Cancer.* May 15;117(10):2192-201.

410. Rimm D, Schalper K, Pusztai L. Unvalidated antibodies and misleading results. *Breast Cancer Res Treat.* Sep;147(2):457-8.
411. Lipson EJ, Vincent JG, Loyo M, Kagohara LT, Lubner BS, Wang H, et al. PDL1 expression in the Merkel cell carcinoma microenvironment: association with inflammation, Merkel cell polyomavirus and overall survival. *Cancer Immunol Res.* Jul;1(1):54-63.
412. Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, Anagnostou VK, Syrigos KN, Sznol M, et al. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Invest.* Jan;94(1):107-16.
413. Nanda R, Chow LQ, Dees EC, Berger R, Gupta S, Geva R, et al. Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *J Clin Oncol.* Jul 20;34(21):2460-7.
414. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med.* Jun 28;366(26):2455-65.
415. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* Jun 28;366(26):2443-54.
416. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jul 8;100(14):8418-23.
417. van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, Haas P, Kallioniemi O, Kononen J, et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol.* 2002 Dec;161(6):1991-6.
418. Taylor-Papadimitriou J, Stampfer M, Bartek J, Lewis A, Boshell M, Lane EB, et al. Keratin expression in human mammary epithelial cells cultured from normal and malignant tissue: relation to in vivo phenotypes and influence of medium. *J Cell Sci.* 1989 Nov;94 (Pt 3):403-13.
419. Bryan BB, Schnitt SJ, Collins LC. Ductal carcinoma in situ with basal-like phenotype: a possible precursor to invasive basal-like breast cancer. *Mod Pathol.* 2006 May;19(5):617-21.
420. Thike AA, Iqbal J, Cheok PY, Chong AP, Tse GM, Tan B, et al. Triple negative breast cancer: outcome correlation with immunohistochemical detection of basal markers. *Am J Surg Pathol.* Jul;34(7):956-64.
421. Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell J, Blamey RW, Robertson JF, et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol.* 2004 Jun;203(2):661-71.

422. Sutton LM, Han JS, Molberg KH, Sarode VR, Cao D, Rakheja D, et al. Intratumoral expression level of epidermal growth factor receptor and cytokeratin 5/6 is significantly associated with nodal and distant metastases in patients with basal-like triple-negative breast carcinoma. *Am J Clin Pathol.* Nov;134(5):782-7.
423. Rao C, Shetty J, Prasad KH. Immunohistochemical profile and morphology in triple - negative breast cancers. *J Clin Diagn Res.* Jul;7(7):1361-5.
424. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* Nov 11;363(20):1938-48.
425. Ryu DW, Jung MJ, Choi WS, Lee CH. Clinical significance of morphologic characteristics in triple negative breast cancer. *J Korean Surg Soc.* May;80(5):301-6.
426. Gao W. Androgen receptor as a therapeutic target. *Adv Drug Deliv Rev.* Oct 30;62(13):1277-84.
427. Burger HG. Androgen production in women. *Fertil Steril.* 2002 Apr;77 Suppl 4:S3-5.
428. Friedlander TW, Ryan CJ. Targeting the androgen receptor. *Urol Clin North Am.* Nov;39(4):453-64.
429. Macias H, Hinck L. Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* Jul-Aug;1(4):533-57.
430. Li S, Han B, Liu G, Ouellet J, Labrie F, Pelletier G. Immunocytochemical localization of sex steroid hormone receptors in normal human mammary gland. *J Histochem Cytochem.* Jun;58(6):509-15.
431. Yeh S, Hu YC, Wang PH, Xie C, Xu Q, Tsai MY, et al. Abnormal mammary gland development and growth retardation in female mice and MCF7 breast cancer cells lacking androgen receptor. *J Exp Med.* 2003 Dec 15;198(12):1899-908.
432. Zhou J, Ng S, Adesanya-Famuyiwa O, Anderson K, Bondy CA. Testosterone inhibits estrogen-induced mammary epithelial proliferation and suppresses estrogen receptor expression. *FASEB J.* 2000 Sep;14(12):1725-30.
433. Peters AA, Ingman WV, Tilley WD, Butler LM. Differential effects of exogenous androgen and an androgen receptor antagonist in the peri- and postpubertal murine mammary gland. *Endocrinology.* Oct;152(10):3728-37.
434. Collavin L, Lunardi A, Del Sal G. p53-family proteins and their regulators: hubs and spokes in tumor suppression. *Cell Death Differ.* Jun;17(6):901-11.
435. He J, Peng R, Yuan Z, Wang S, Peng J, Lin G, et al. Prognostic value of androgen receptor expression in operable triple-negative breast cancer: a retrospective analysis based on a tissue microarray. *Med Oncol.* Jun;29(2):406-10.
436. 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 Aug 15;98(4):703-11.

437. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, Tubiana-Hulin M, Fumoleau P, Larsimont D, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene*. 2005 Jul 7;24(29):4660-71.
438. Ortmann J, Prifti S, Bohlmann MK, Rehberger-Schneider S, Strowitzki T, Rabe T. Testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone inhibit in vitro growth of human breast cancer cell lines. *Gynecol Endocrinol*. 2002 Apr;16(2):113-20.
439. Dimitrakakis C, Zhou J, Wang J, Belanger A, LaBrie F, Cheng C, et al. A physiologic role for testosterone in limiting estrogenic stimulation of the breast. *Menopause*. 2003 Jul-Aug;10(4):292-8.
440. Greeve MA, Allan RK, Harvey JM, Bentel JM. Inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation by 5alpha-dihydrotestosterone; a role for p21(Cip1/Waf1). *J Mol Endocrinol*. 2004 Jun;32(3):793-810.
441. Macedo LF, Guo Z, Tilghman SL, Sabnis GJ, Qiu Y, Brodie A. Role of androgens on MCF-7 breast cancer cell growth and on the inhibitory effect of letrozole. *Cancer Res*. 2006 Aug 1;66(15):7775-82.
442. Birrell SN, Bentel JM, Hickey TE, Ricciardelli C, Weger MA, Horsfall DJ, et al. Androgens induce divergent proliferative responses in human breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995 May;52(5):459-67.
443. Lin HY, Sun M, Lin C, Tang HY, London D, Shih A, et al. Androgen-induced human breast cancer cell proliferation is mediated by discrete mechanisms in estrogen receptor-alpha-positive and -negative breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009 Feb;113(3-5):182-8.
444. Maggiolini M, Donze O, Jeannin E, Ando S, Picard D. Adrenal androgens stimulate the proliferation of breast cancer cells as direct activators of estrogen receptor alpha. *Cancer Res*. 1999 Oct 1;59(19):4864-9.
445. Birrell SN, Hall RE, Tilley WD. Role of the androgen receptor in human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1998 Jan;3(1):95-103.
446. Garay JP, Karakas B, Abukhdeir AM, Cosgrove DP, Gustin JP, Higgins MJ, et al. The growth response to androgen receptor signaling in ERalpha-negative human breast cells is dependent on p21 and mediated by MAPK activation. *Breast Cancer Res*. Feb 9;14(1):R27.
447. Hickey TE, Robinson JL, Carroll JS, Tilley WD. Minireview: The androgen receptor in breast tissues: growth inhibitor, tumor suppressor, oncogene? *Mol Endocrinol*. Aug;26(8):1252-67.
448. Park S, Koo JS, Kim MS, Park HS, Lee JS, Kim SI, et al. Androgen receptor expression is significantly associated with better outcomes in estrogen receptorpositive breast cancers. *Ann Oncol*. Aug;22(8):1755-62.

449. Hu R, Dawood S, Holmes MD, Collins LC, Schnitt SJ, Cole K, et al. Androgen receptor expression and breast cancer survival in postmenopausal women. *Clin Cancer Res.* Apr 1;17(7):1867-74.
450. Ogawa Y, Hai E, Matsumoto K, Ikeda K, Tokunaga S, Nagahara H, et al. Androgen receptor expression in breast cancer: relationship with clinicopathological factors and biomarkers. *Int J Clin Oncol.* 2008 Oct;13(5):431-5.
451. Meijnen P, Peterse JL, Antonini N, Rutgers EJ, van de Vijver MJ. Immunohistochemical categorisation of ductal carcinoma in situ of the breast. *Br J Cancer.* 2008 Jan 15;98(1):137-42.
452. Hanley K, Wang J, Bourne P, Yang Q, Gao AC, Lyman G, et al. Lack of expression of androgen receptor may play a critical role in transformation from in situ to invasive basal subtype of high-grade ductal carcinoma of the breast. *Hum Pathol.* 2008 Mar;39(3):386-92.
453. Kuenen-Boumeester V, Van der Kwast TH, Claassen CC, Look MP, Liem GS, Klijn JG, et al. The clinical significance of androgen receptors in breast cancer and their relation to histological and cell biological parameters. *Eur J Cancer.* 1996 Aug;32A(9):1560-5.
454. Hall RE, Tilley WD, McPhaul MJ, Sutherland RL. Regulation of androgen receptor gene expression by steroids and retinoic acid in human breast-cancer cells. *Int J Cancer.* 1992 Nov 11;52(5):778-84.
455. Bentel JM, Birrell SN, Pickering MA, Holds DJ, Horsfall DJ, Tilley WD. Androgen receptor agonist activity of the synthetic progestin, medroxyprogesterone acetate, in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1999 Aug 20;154(1-2):1120.
456. Robinson JL, Macarthur S, Ross-Innes CS, Tilley WD, Neal DE, Mills IG, et al. Androgen receptor driven transcription in molecular apocrine breast cancer is mediated by FoxA1. *EMBO J.* Jun 24;30(15):3019-27.
457. Ni M, Chen Y, Lim E, Wimberly H, Bailey ST, Imai Y, et al. Targeting androgen receptor in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Cell.* Jul 12;20(1):119-31.
458. Qi JP, Yang YL, Zhu H, Wang J, Jia Y, Liu N, et al. Expression of the androgen receptor and its correlation with molecular subtypes in 980 chinese breast cancer patients. *Breast Cancer (Auckl).* 6:1-8.
459. Sutton LM, Cao D, Sarode V, Molberg KH, Torgbe K, Haley B, et al. Decreased androgen receptor expression is associated with distant metastases in patients with androgen receptor-expressing triple-negative breast carcinoma. *Am J Clin Pathol.* Oct;138(4):511-6.
460. Pistelli M, Caramanti M, Biscotti T, Santinelli A, Pagliacci A, De Lisa M, et al. Androgen receptor expression in early triple-negative breast cancer: clinical significance and prognostic associations. *Cancers (Basel).* Jun 27;6(3):1351-62.
461. Luo X, Shi YX, Li ZM, Jiang WQ. Expression and clinical significance of androgen

- receptor in triple negative breast cancer. *Chin J Cancer*. Jun;29(6):585-90. 462. Gucalp A, Tolaney S, Isakoff SJ, Ingle JN, Liu MC, Carey LA, et al. Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. Oct 1;19(19):5505-12.
463. Robles AJ, Cai S, Cichewicz RH, Mooberry SL. Selective activity of deguelin identifies therapeutic targets for androgen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. Jun;157(3):475-88.
464. Caiazza F, Murray A, Madden SF, Synnott NC, Ryan EJ, O'Donovan N, et al. Preclinical evaluation of the AR inhibitor enzalutamide in triple-negative breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. Apr;23(4):323-34.
465. Nekulova M, Holcakova J, Nenutil R, Stratmann R, Bouchalova P, Muller P, et al. Characterization of specific p63 and p63-N-terminal isoform antibodies and their application for immunohistochemistry. *Virchows Arch*. Sep;463(3):415-25. 466. Nylander K, Vojtesek B, Nenutil R, Lindgren B, Roos G, Zhanxiang W, et al. Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells. *J Pathol*. 2002 Dec;198(4):417-27.
467. Humphries LA, Godbersen JC, Danilova OV, Kaur P, Christensen BC, Danilov AV. Pro-apoptotic TP53 homolog TAp63 is repressed via epigenetic silencing and B-cell receptor signalling in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. Dec;163(5):590-602.
468. Suh EK, Yang A, Kettenbach A, Bamberger C, Michaelis AH, Zhu Z, et al. p63 protects the female germ line during meiotic arrest. *Nature*. 2006 Nov 30;444(7119):624-8.
469. Crum CP, McKeon FD. p63 in epithelial survival, germ cell surveillance, and neoplasia. *Annu Rev Pathol*. 5:349-71.
470. Nekulova M, Holcakova J, Coates P, Vojtesek B. The role of p63 in cancer, stem cells and cancer stem cells. *Cell Mol Biol Lett*. Jun;16(2):296-327.
471. Orzol P, Holcakova J, Nekulova M, Nenutil R, Vojtesek B, Coates PJ. The diverse oncogenic and tumour suppressor roles of p63 and p73 in cancer: a review by cancer site. *Histol Histopathol*. May;30(5):503-21.
472. Barbareschi M, Pecciarini L, Cangi MG, Macri E, Rizzo A, Viale G, et al. p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast. *Am J Surg Pathol*. 2001 Aug;25(8):1054-60.
473. Batistatou A, Stefanou D, Arkoumani E, Agnantis NJ. The usefulness of p63 as a marker of breast myoepithelial cells. *In Vivo*. 2003 Nov-Dec;17(6):573-6. 474. Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*. 1999 Apr 22;398(6729):714-8.

475. Yalcin-Ozuysal O, Fiche M, Guitierrez M, Wagner KU, Raffoul W, Briskin C. Antagonistic roles of Notch and p63 in controlling mammary epithelial cell fates. *Cell Death Differ.* Oct;17(10):1600-12.
476. Yallowitz AR, Alexandrova EM, Talos F, Xu S, Marchenko ND, Moll UM. p63 is a prosurvival factor in the adult mammary gland during post-lactational involution, affecting PI-MECs and ErbB2 tumorigenesis. *Cell Death Differ.* Apr;21(4):645-54.
477. Reis-Filho JS, Milanezi F, Steele D, Savage K, Simpson PT, Nesland JM, et al. Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. *Histopathology.* 2006 Jul;49(1):10-21.
478. Memmi EM, Sanarico AG, Giacobbe A, Peschiaroli A, Frezza V, Cicalese A, et al. p63 Sustains self-renewal of mammary cancer stem cells through regulation of Sonic Hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 17;112(11):3499-504.
479. Buckley NE, Conlon SJ, Jirstrom K, Kay EW, Crawford NT, O'Grady A, et al. The DeltaNp63 proteins are key allies of BRCA1 in the prevention of basal-like breast cancer. *Cancer Res.* Mar 01;71(5):1933-44.
480. Boldrup L, Coates PJ, Gu X, Nylander K. DeltaNp63 isoforms regulate CD44 and keratins 4, 6, 14 and 19 in squamous cell carcinoma of head and neck. *J Pathol.* 2007 Dec;213(4):384-91.
481. Cheung KJ, Gabrielson E, Werb Z, Ewald AJ. Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program. *Cell.* Dec 19;155(7):1639-51.
482. Nekulova M, Holcakova J, Gu X, Hrabal V, Galtsidis S, Orzol P, et al. DeltaNp63alpha expression induces loss of cell adhesion in triple-negative breast cancer cells. *BMC Cancer.* Oct 10;16(1):782.
483. Dohn M, Zhang S, Chen X. p63alpha and DeltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene.* 2001 May 31;20(25):3193-205.
484. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell.* 2006 Dec;10(6):515-27.
485. Bertheau P, Espie M, Turpin E, Lehmann J, Plassa LF, Varna M, et al. TP53 status and response to chemotherapy in breast cancer. *Pathobiology.* 2008;75(2):132-9.
486. Ababneh M, Gotz C, Montenarh M. Downregulation of the cdc2/cyclin B protein kinase activity by binding of p53 to p34(cdc2). *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 May 4;283(2):507-12.
487. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2006 Mar;6(3):184-92.

488. Dong Y, Hakimi MA, Chen X, Kumaraswamy E, Cooch NS, Godwin AK, et al. Regulation of BRCC, a holoenzyme complex containing BRCA1 and BRCA2, by a signalosome-like subunit and its role in DNA repair. *Mol Cell*. 2003 Nov;12(5):1087-99.
489. Luciani MG, Hutchins JR, Zheleva D, Hupp TR. The C-terminal regulatory domain of p53 contains a functional docking site for cyclin A. *J Mol Biol*. 2000 Jul 14;300(3):503-18.
490. Olivier M, Petitjean A, Marcel V, Petre A, Mounawar M, Plymoth A, et al. Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther*. 2009 Jan;16(1):1-12.
491. Han JS, Cao D, Molberg KH, Sarode VR, Rao R, Sutton LM, et al. Hormone receptor status rather than HER2 status is significantly associated with increased Ki67 and p53 expression in triple-negative breast carcinomas, and high expression of Ki-67 but not p53 is significantly associated with axillary nodal metastasis in triplenegative and high-grade non-triple-negative breast carcinomas. *Am J Clin Pathol*. Feb;135(2):230-7.
492. Petit T, Wilt M, Velten M, Millon R, Rodier JF, Borel C, et al. Comparative value of tumour grade, hormonal receptors, Ki-67, HER-2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2004 Jan;40(2):205-11.
493. Tewari M, Krishnamurthy A, Shukla HS. Predictive markers of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Surg Oncol*. 2008 Dec;17(4):301-11.
494. Maeda T, Nakanishi Y, Hirotani Y, Fuchinoue F, Enomoto K, Sakurai K, et al. Immunohistochemical co-expression status of cytokeratin 5/6, androgen receptor, and p53 as prognostic factors of adjuvant chemotherapy for triple negative breast cancer. *Med Mol Morphol*. Mar;49(1):11-21.
495. Coradini D, Biganzoli E, Ardoino I, Ambrogi F, Boracchi P, Demicheli R, et al. p53 status identifies triple-negative breast cancer patients who do not respond to adjuvant chemotherapy. *Breast*. Jun;24(3):294-7.
496. Xu H, Cheung IY, Wei XX, Tran H, Gao X, Cheung NK. Checkpoint kinase inhibitor synergizes with DNA-damaging agents in G1 checkpoint-defective neuroblastoma. *Int J Cancer*. Oct 15;129(8):1953-62.
497. Sausville E, Lorusso P, Carducci M, Carter J, Quinn MF, Malburg L, et al. Phase I dose-escalation study of AZD7762, a checkpoint kinase inhibitor, in combination with gemcitabine in US patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. Mar;73(3):539-49.
498. Rosenbluth JM, Mays DJ, Pino MF, Tang LJ, Pietersen JA. A gene signaturebased approach identifies mTOR as a regulator of p73. *Mol Cell Biol*. 2008 Oct;28(19):5951-64.

499. Leong CO, Vidnovic N, DeYoung MP, Sgroi D, Ellisen LW. The p63/p73 network mediates chemosensitivity to cisplatin in a biologically defined subset of primary breast cancers. *J Clin Invest*. 2007 May;117(5):1370-80.
500. Ma CX, Cai S, Li S, Ryan CE, Guo Z, Schaiff WT, et al. Targeting Chk1 in p53-deficient triple-negative breast cancer is therapeutically beneficial in human-inmouse tumor models. *J Clin Invest*. Apr;122(4):1541-52.
501. Jones CB, Clements MK, Wasi S, Daoud SS. Enhancement of camptothecin-induced cytotoxicity with UCN-01 in breast cancer cells: abrogation of S/G(2) arrest. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2000;45(3):252-8.
502. Tse AN, Rendahl KG, Sheikh T, Cheema H, Aardalen K, Embry M, et al. CHIR-124, a novel potent inhibitor of Chk1, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase I poisons in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*. 2007 Jan 15;13(2 Pt 1):591-602.
503. Verlinden L, Vanden Bempt I, Eelen G, Drijckoningen M, Verlinden I, Marchal K, et al. The E2F-regulated gene Chk1 is highly expressed in triple-negative estrogen receptor /progesterone receptor /HER-2 breast carcinomas. *Cancer Res*. 2007 Jul 15;67(14):6574-81.
504. Fracasso PM, Williams KJ, Chen RC, Picus J, Ma CX, Ellis MJ, et al. A Phase 1 study of UCN-01 in combination with irinotecan in patients with resistant solid tumor malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol*. Jun;67(6):1225-37.
505. Muller P, Ceskova P, Vojtesek B. Hsp90 is essential for restoring cellular functions of temperature-sensitive p53 mutant protein but not for stabilization and activation of wild-type p53: implications for cancer therapy. *J Biol Chem*. 2005 Feb 25;280(8):6682-91.
506. Peng Y, Chen L, Li C, Lu W, Chen J. Inhibition of MDM2 by hsp90 contributes to mutant p53 stabilization. *J Biol Chem*. 2001 Nov 2;276(44):40583-90.
507. Whitesell L, Sutphin PD, Pulcini EJ, Martinez JD, Cook PH. The physical association of multiple molecular chaperone proteins with mutant p53 is altered by geldanamycin, an hsp90-binding agent. *Mol Cell Biol*. 1998 Mar;18(3):1517-24.
508. Hagn F, Lagleder S, Retzlaff M, Rohrberg J, Demmer O, Richter K, et al. Structural analysis of the interaction between Hsp90 and the tumor suppressor protein p53. *Nat Struct Mol Biol*. Sep 4;18(10):1086-93.
509. Caldas-Lopes E, Cerchietti L, Ahn JH, Clement CC, Robles AI, Rodina A, et al. Hsp90 inhibitor PU-H71, a multimodal inhibitor of malignancy, induces complete responses in triple-negative breast cancer models. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 May 19;106(20):8368-73.
510. Lustberg MB, Ramaswamy B. Epigenetic targeting in breast cancer: therapeutic impact and future direction. *Drug News Perspect*. 2009 Sep;22(7):369-81.
511. Kim TY, Bang YJ, Robertson KD. Histone deacetylase inhibitors for cancer therapy. *Epigenetics*. 2006 Jan-Mar;1(1):14-23.

512. Sutherland RL, Musgrove EA. CDK inhibitors as potential breast cancer therapeutics: new evidence for enhanced efficacy in ER+ disease. *Breast Cancer Res.* 2009;11(6):112.
513. The scent of Nobel Prize success. *Funct Neurol.* 2004 Oct-Dec;19(4):217-8.
514. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Feb;2(2):127-37.
515. Harari PM, Allen GW, Bonner JA. Biology of interactions: antiepidermal growth factor receptor agents. *J Clin Oncol.* 2007 Sep 10;25(26):4057-65.
516. Flynn JF, Wong C, Wu JM. Anti-EGFR Therapy: Mechanism and Advances in Clinical Efficacy in Breast Cancer. *J Oncol.* 2009;2009:526963.
517. Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H, et al. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature.* 1985 Jan 10;313(5998):144-7.
518. Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P, et al. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature.* 1984 Feb 9-15;307(5951):521-7.
519. Schulze WX, Deng L, Mann M. Phosphotyrosine interactome of the ErbB receptor kinase family. *Mol Syst Biol.* 2005;1:2005 0008.
520. Burness ML, Grushko TA, Olopade OI. Epidermal growth factor receptor in triple-negative and basal-like breast cancer: promising clinical target or only a marker? *Cancer J.* Jan-Feb;16(1):23-32.
521. Guerin M, Gabillot M, Mathieu MC, Travagli JP, Spielmann M, Andrieu N, et al. Structure and expression of c-erbB-2 and EGF receptor genes in inflammatory and non-inflammatory breast cancer: prognostic significance. *Int J Cancer.* 1989 Feb 15;43(2):201-8.
522. Wang F, Weaver VM, Petersen OW, Larabell CA, Dedhar S, Briand P, et al. Reciprocal interactions between beta1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Dec 8;95(25):14821-6.
523. Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist.* 2002;7 Suppl 4:31-9.
524. Milanezi F, Carvalho S, Schmitt FC. EGFR/HER2 in breast cancer: a biological approach for molecular diagnosis and therapy. *Expert Rev Mol Diagn.* 2008 Jul;8(4):417-34.
525. Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Cammer M, Cox D, Pixley FJ, et al. Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res.* 2005 Jun 15;65(12):5278-83.

526. Jin Q, Esteva FJ. Cross-talk between the ErbB/HER family and the type I insulin-like growth factor receptor signaling pathway in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2008 Dec;13(4):485-98.
527. Siziopikou KP, Cobleigh M. The basal subtype of breast carcinomas may represent the group of breast tumors that could benefit from EGFR-targeted therapies. *Breast*. 2007 Feb;16(1):104-7.
528. Bhargava R, Gerald WL, Li AR, Pan Q, Lal P, Ladanyi M, et al. EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Mod Pathol*. 2005 Aug;18(8):1027-33.
529. Kersting C, Tidow N, Schmidt H, Liedtke C, Neumann J, Boecker W, et al. Gene dosage PCR and fluorescence in situ hybridization reveal low frequency of egfr amplifications despite protein overexpression in invasive breast carcinoma. *Lab Invest*. 2004 May;84(5):582-7.
530. Reis-Filho JS, Pinheiro C, Lambros MB, Milanezi F, Carvalho S, Savage K, et al. EGFR amplification and lack of activating mutations in metaplastic breast carcinomas. *J Pathol*. 2006 Aug;209(4):445-53.
531. Weber F, Fukino K, Sawada T, Williams N, Sweet K, Brena RM, et al. Variability in organ-specific EGFR mutational spectra in tumour epithelium and stroma may be the biological basis for differential responses to tyrosine kinase inhibitors. *Br J Cancer*. 2005 May 23;92(10):1922-6.
532. van der Groep P, Bouter A, van der Zanden R, Menko FH, Buerger H, Verheijen RH, et al. Re: Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2004 May 5;96(9):712-3; author reply 4. 533. Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, Penault-Llorca F, van der Vijver M, Parry S, et al. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res*. 2005 Jul 15;11(14):5175-80. 534. 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*. Mar 1;17(5):1082-9.
535. Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol*. 2001 Sep;3(9):802-8.
536. Arora P, Cuevas BD, Russo A, Johnson GL, Trejo J. Persistent transactivation of EGFR and ErbB2/HER2 by protease-activated receptor-1 promotes breast carcinoma cell invasion. *Oncogene*. 2008 Jul 24;27(32):4434-45.
537. Zheng X, Jiang F, Katakowski M, Zhang ZG, Lu QE, Chopp M. ADAM17 promotes breast cancer cell malignant phenotype through EGFR-PI3K-AKT activation. *Cancer Biol Ther*. 2009 Jun;8(11):1045-54.

538. Kenny PA, Bissell MJ. Targeting TACE-dependent EGFR ligand shedding in breast cancer. *J Clin Invest.* 2007 Feb;117(2):337-45.
539. Agelopoulos K, Kersting C, Korsching E, Schmidt H, Kuijper A, August C, et al. Egfr amplification specific gene expression in phyllodes tumours of the breast. *Cell Oncol.* 2007;29(6):443-51.
540. Brandt B, Hermann S, Straif K, Tidow N, Buerger H, Chang-Claude J. Modification of breast cancer risk in young women by a polymorphic sequence in the egfr gene. *Cancer Res.* 2004 Jan 1;64(1):7-12.
541. Liu W, James CD, Frederick L, Alderete BE, Jenkins RB. PTEN/MMAC1 mutations and EGFR amplification in glioblastomas. *Cancer Res.* 1997 Dec 1;57(23):5254-7.
542. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* 2003 Dec;112(12):1776-84.
543. Radisky DC. Epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci.* 2005 Oct 1;118(Pt 19):4325-6.
544. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009 Nov 25;139(5):871-90.
545. Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res.* 2005 Jul 15;65(14):5991-5; discussion 5.
546. Klijn JG, Berns PM, Schmitz PI, Foekens JA. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr Rev.* 1992 Feb;13(1):3-17.
547. Torregrosa D, Bolufer P, Lluch A, Lopez JA, Barragan E, Ruiz A, et al. Prognostic significance of c-erbB-2/neu amplification and epidermal growth factor receptor (EGFR) in primary breast cancer and their relation to estradiol receptor (ER) status. *Clin Chim Acta.* 1997 Jun 27;262(1-2):99-119.
548. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med.* 2008 Mar 13;358(11):1160-74.
549. Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Hachitanda Y, Oda S. Prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its relationship to the estrogen receptor status in 1029 patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2002 Jan;71(1):67-75.
550. Arnes JB, Begin LR, Stefansson I, Brunet JS, Nielsen TO, Foulkes WD, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in relation to BRCA1 status, basal-like markers and prognosis in breast cancer. *J Clin Pathol.* 2009 Feb;62(2):139-46.
551. Buchholz TA, Tu X, Ang KK, Esteva FJ, Kuerer HM, Pusztai L, et al. Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor survival in patients who have breast carcinoma treated with doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *Cancer.* 2005 Aug 15;104(4):676-81.

552. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*. 2008 Mar 1;14(5):1368-76.
553. Cho EY, Choi YL, Han JJ, Kim KM, Oh YL. Expression and amplification of Her2, EGFR and cyclin D1 in breast cancer: immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization. *Pathol Int*. 2008 Jan;58(1):17-25.
554. Mizukami Y, Nonomura A, Noguchi M, Taniya T, Koyasaki N, Saito Y, et al. Immunohistochemical study of oncogene product ras p21, c-myc and growth factor EGF in breast carcinomas. *Anticancer Res*. 1991 Jul-Aug;11(4):1485-94.
555. Baselga J, Gomez P, Greil R, Braga S, Climent MA, Wardley AM, et al. Randomized phase II study of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab with cisplatin versus cisplatin alone in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. Jul 10;31(20):2586-92.
556. Nabholz JM, Chalabi N, Radosevic-Robin N, Dauplat MM, Mouret-Reynier MA, Van Praagh I, et al. Multicentric neoadjuvant pilot Phase II study of cetuximab combined with docetaxel in operable triple negative breast cancer. *Int J Cancer*. May 1;138(9):2274-80.
557. Crozier JA, Advani PP, LaPlant B, Hobday T, Jaslowski AJ, Moreno-Aspitia A, et al. N0436 (Alliance): A Phase II Trial of Irinotecan With Cetuximab in Patients With Metastatic Breast Cancer Previously Exposed to Anthracycline and/or Taxane-Containing Therapy. *Clin Breast Cancer*. Feb;16(1):23-30.
558. Yardley DA, Ward PJ, Daniel BR, Eakle JF, Lamar RE, Lane CM, et al. Panitumumab, Gemcitabine, and Carboplatin as Treatment for Women With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: A Sarah Cannon Research Institute Phase II Trial. *Clin Breast Cancer*. May 14.
559. Nabholz JM, Abrial C, Mouret-Reynier MA, Dauplat MM, Weber B, Gligorov J, et al. Multicentric neoadjuvant phase II study of panitumumab combined with an anthracycline/taxane-based chemotherapy in operable triple-negative breast cancer: identification of biologically defined signatures predicting treatment impact. *Ann Oncol*. Aug;25(8):1570-7.
560. Green MD, Francis PA, GebSKI V, Harvey V, Karapetis C, Chan A, et al. Gefitinib treatment in hormone-resistant and hormone receptor-negative advanced breast cancer. *Ann Oncol*. 2009 Nov;20(11):1813-7.
561. Gutteridge E, Agrawal A, Nicholson R, Leung Cheung K, Robertson J, Gee J. The effects of gefitinib in tamoxifen-resistant and hormone-insensitive breast cancer: a phase II study. *Int J Cancer*. Apr 15;126(8):1806-16.
562. von Minckwitz G, Jonat W, Fasching P, du Bois A, Kleeberg U, Luck HJ, et al. A multicentre phase II study on gefitinib in taxane- and anthracycline-pretreated metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2005 Jan;89(2):165-72.

563. Dickler MN, Cobleigh MA, Miller KD, Klein PM, Winer EP. Efficacy and safety of erlotinib in patients with locally advanced or metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 May;115(1):115-21.
564. Dickler MN, Rugo HS, Eberle CA, Brogi E, Caravelli JF, Panageas KS, et al. A phase II trial of erlotinib in combination with bevacizumab in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2008 Dec 1;14(23):7878-83.
565. Twelves C, Trigo JM, Jones R, De Rosa F, Rakhit A, Fettner S, et al. Erlotinib in combination with capecitabine and docetaxel in patients with metastatic breast cancer: a dose-escalation study. *Eur J Cancer.* 2008 Feb;44(3):419-26.
566. Zheng JN, Ma TX, Cao JY, Sun XQ, Chen JC, Li W, et al. Knockdown of Ki67 by small interfering RNA leads to inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human renal carcinoma cells. *Life Sci.* 2006 Jan 11;78(7):724-9.
567. Masuda H, Masuda N, Kodama Y, Ogawa M, Karita M, Yamamura J, et al. Predictive factors for the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy and prognosis in triple-negative breast cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* Apr;67(4):911-7.
568. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Jr., Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. 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):150413.
569. Harvey JA, Santen RJ, Petroni GR, Bovbjerg VE, Smolkin ME, Sheriff FS, et al. Histologic changes in the breast with menopausal hormone therapy use: correlation with breast density, estrogen receptor, progesterone receptor, and proliferation indices. *Menopause.* 2008 Jan-Feb;15(1):67-73.
570. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* Aug;22(8):1736-47.
571. Selz J, Stevens D, Jouanneau L, Labib A, Le Scodan R. Prognostic value of molecular subtypes, ki67 expression and impact of postmastectomy radiation therapy in breast cancer patients with negative lymph nodes after mastectomy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Dec 1;84(5):1123-32.
572. Faratian D, Munro A, Twelves C, Bartlett JM. Membranous and cytoplasmic staining of Ki67 is associated with HER2 and ER status in invasive breast carcinoma. *Histopathology.* 2009 Jan;54(2):254-7.
573. Klintman M, Bendahl PO, Grabau D, Lovgren K, Malmstrom P, Ferno M. The prognostic value of Ki67 is dependent on estrogen receptor status and histological grade in premenopausal patients with node-negative breast cancer. *Mod Pathol.* Feb;23(2):251-9.

574. Luporsi E, Andre F, Spyratos F, Martin PM, Jacquemier J, Penault-Llorca F, et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat.* Apr;132(3):895-915.
575. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast.* 2008 Aug;17(4):323-34.
576. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005 Oct 1;23(28):7212-20.
577. Colleoni M, Rotmensz N, Peruzzotti G, Maisonneuve P, Viale G, Renne G, et al. Minimal and small size invasive breast cancer with no axillary lymph node involvement: the need for tailored adjuvant therapies. *Ann Oncol.* 2004 Nov;15(11):1633-9.
578. Pathmanathan N, Balleine RL, Jayasinghe UW, Bilinski KL, Provan PJ, Byth K, et al. The prognostic value of Ki67 in systemically untreated patients with node-negative breast cancer. *J Clin Pathol.* Mar;67(3):222-8.
579. Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, Wale C, Salter J, Quinn E, et al. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. *J Clin Oncol.* Nov 10;29(32):4273-8.
580. Aleskandarany MA, Rakha EA, Macmillan RD, Powe DG, Ellis IO, Green AR. MIB1/Ki-67 labelling index can classify grade 2 breast cancer into two clinically distinct subgroups. *Breast Cancer Res Treat.* Jun;127(3):591-9.
581. Fasching PA, Heusinger K, Haerberle L, Niklos M, Hein A, Bayer CM, et al. Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer.* 11:486.
582. Tanei T, Shimomura A, Shimazu K, Nakayama T, Kim SJ, Iwamoto T, et al. Prognostic significance of Ki67 index after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Eur J Surg Oncol.* Feb;37(2):155-61.
583. Keam B, Im SA, Lee KH, Han SW, Oh DY, Kim JH, et al. Ki-67 can be used for further classification of triple negative breast cancer into two subtypes with different response and prognosis. *Breast Cancer Res.* 13(2):R22.
584. Munzone E, Botteri E, Sciandivasci A, Curigliano G, Nole F, Mastropasqua M, et al. Prognostic value of Ki-67 labeling index in patients with node-negative, triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* Jul;134(1):277-82.
585. Li H, Han X, Liu Y, Liu G, Dong G. Ki67 as a predictor of poor prognosis in patients with triple-negative breast cancer. *Oncol Lett.* Jan;9(1):149-52.

586. Niikura N, Masuda S, Kumaki N, Xiaoyan T, Terada M, Terao M, et al. Prognostic significance of the Ki67 scoring categories in breast cancer subgroups. *Clin Breast Cancer*. Oct;14(5):323-9 e3.
587. Sueta A, Yamamoto Y, Hayashi M, Yamamoto S, Inao T, Ibusuki M, et al. Clinical significance of pretherapeutic Ki67 as a predictive parameter for response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: is it equally useful across tumor subtypes? *Surgery*. May;155(5):927-35.
588. Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan MM, Coates AS, Mastropasqua MG, Dell'Orto P, et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *J Clin Oncol*. 2008 Dec 1;26(34):5569-75.
589. Yoshioka T, Hosoda M, Yamamoto M, Taguchi K, Hatanaka KC, Takakuwa E, et al. Prognostic significance of pathologic complete response and Ki67 expression after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer*. Mar;22(2):185-91. 590. Jones RL, Salter J, A'Hern R, Nerurkar A, Parton M, Reis-Filho JS, et al. Relationship between oestrogen receptor status and proliferation in predicting response and long-term outcome to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. Jan;119(2):315-23.
591. Tan QX, Qin QH, Yang WP, Mo QG, Wei CY. Prognostic value of Ki67 expression in HR-negative breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy. *Int J Clin Exp Pathol*. 7(10):6862-70.
592. Hao S, He ZX, Yu KD, Yang WT, Shao ZM. New insights into the prognostic value of Ki-67 labeling index in patients with triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. Apr 26;7(17):24824-31.
593. Abubakar M, Orr N, Daley F, Coulson P, Ali HR, Blows F, et al. Prognostic value of automated KI67 scoring in breast cancer: a centralised evaluation of 8088 patients from 10 study groups. *Breast Cancer Res*. Oct 18;18(1):104.

