



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ**

*‘Διερεύνηση του ρόλου φλεγμονωδών κυττάρων του στρώματος σε
διηθητικά καρκινώματα μαστού και συσχέτιση με
κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους’*

**ΖΩΗ ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ
ΙΑΤΡΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ**

*‘Διερεύνηση του ρόλου φλεγμονωδών κυττάρων του στρώματος σε
διηθητικά καρκινώματα μαστού και συσχέτιση με
κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους’*

**ΖΩΗ ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ
ΙΑΤΡΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020

‘Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του ιατρικού τμήματος)’

Ημερομηνία αίτησης της κ. Ευαγγέλου Ζωής: 23-6-2015

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 780^α/2-7-2015

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

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

Μέλη

Στεφάνου Δημήτριος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γούσια Άννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 14-7-2015

«Διερεύνηση του ρόλου των φλεγμονοδών κυττάρων του στρώματος σε διηθητικά καρκινώματα μαστού και συσχέτιση με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 929^α/29-6-2020

Γούσια Άννα	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κουρέα Ελένη	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών
Μπατιστάτου Άννα	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Στεφάνου Δημήτριος	ομότιμος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χαρίσης Χαράλαμπος	Καθηγητής Γενικής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χαραλαμπόπουλος Αλέξανδρος	Αναπληρωτής Καθηγητής, Γενικής Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
Παπούδου-Μπάη Αλεξάνδρα	Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 30-7-2020

Ιωάννινα 9-9-2020

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατιστάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Στην μνήμη της γιαγιάς μου της Ελπίδας
Στην μητέρα μου, τον πατέρα μου και τον σύζυγο μου με ευγνωμοσύνη

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Τη δυνατότητα εκπόνησης της διδακτορικής αυτής διατριβής μου έδωσαν οι Καθηγήτριές μου κ. Άννα Μπατιστάτου και Άννα Γούσια, καθώς και ο καθηγητής μου κ. Δημήτριος Στεφάνου, τους οποίους ευχαριστώ θερμά για την πίστη και εμπιστοσύνη που έδειξαν σε εμένα από τα πρώτα μου βήματα ως ειδικευόμενη Παθολογικής Ανατομίας. Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά την Διευθύντρια ΕΣΥ κ. Σεβαστή Καμηνά που μεταλαμπάδευσε τις γνώσεις τις στην ιστολογία και ιστοπαθολογία του μαστού, δίνοντας μου γερές βάσεις τόσο για την διεκπεραίωση της διατριβής αυτής αλλά και για τα μετέπειτα μου βήματα ως ειδική παθολογοανατόμο. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Αλεξάνδρα Παπούδου-Μπάη για την καθοδήγηση και την καθοριστική συμβολή της στην απόκτηση των δεδομένων για αυτό το διδακτορικό. Επιπλέον, ευχαριστώ την Καθηγήτρια κ. Ελένη Κουρέα για την συμβολή της στα δεδομένα που αφορούν στο PD-L1. Ευχαριστώ πολύ τον Καθηγητή κ. Χαράλαμπο Χαρίση και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αλέξανδρο Χαραλαμπόπουλο για τον χρόνο, τις παρατηρήσεις τους και την συνολική συμβολή τους στην ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης την Υπατία Καψάλη και την Ειρήνη Πάτρα για την πολύτιμη βοήθειά τους στη διενέργεια του τεχνικού μέρους της διδακτορικής διατριβής. Ευχαριστώ ακόμη τον Γιώργο Δημακόπουλο για την καθοδήγηση και την συνεισφορά του στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων. Για την επιμέλεια και την διόρθωση του κειμένου ευχαριστώ πολύ τον κ. Κωνσταντίνο Σαλάπα.

Μεγάλη ευγνωμοσύνη οφείλω στην καθηγήτριά μου, την κ. Άννα Μπατιστάτου, η οποία πιστεύοντας στις δυνατότητές μου, επιστημονικές και μη, μου άνοιξε τα φτερά στο πεδίο της έρευνας και με μεγάλη εμπιστοσύνη, συνεργασία και καθοδήγηση μου επέτρεψε να διαμορφώσω τεκμηριωμένα την προσωπική μου σκέψη σε θέματα επιστημονικά, συνεργασίας και επίτευξης στόχων, συμβάλλοντας στην πρόοδό μου ως επιστήμονα και ανθρώπου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον σύζυγό μου Γιώργο, τη μητέρα μου και τον πατέρα μου, που όλα αυτά τα χρόνια με έχουν στηρίξει πρακτικά και ψυχικά σε όλα τα βήματα της επιστημονικής μου κατάρτισης.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο μαστός είναι ένα όργανο στο οποίο μπορεί να αναπτυχθούν πολλές παθήσεις κατά τη διάρκεια της ζωής, είτε καλοήθειες είτε κακοήθειες. Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί το συχνότερο καρκίνωμα εμφάνισης στον γυναικείο πληθυσμό, καθώς και το δεύτερο σε συχνότητα καρκίνωμα που οδηγεί στον θάνατο, μετά το καρκίνωμα πνεύμονα. Η ηλικία αποτελεί έναν σημαντικό προγνωστικό παράγοντα, καθώς διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην πιθανότητα υποτροπής, το προσδόκιμο επιβίωσης, αλλά και στην ποιότητα ζωής των ασθενών με καρκίνο μαστού.

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί μια ετερογενή νόσο με ποικίλη κλινική εμφάνιση, μικροσκοπική εικόνα και βιολογική συμπεριφορά. Την τελευταία εικοσαετία, με την ανακάλυψη και εισαγωγή της μοριακής ταξινόμησης, έχουν γίνει μεγάλα άλματα προόδου στην κατηγοριοποίηση των νεοπλασμάτων του μαστού. Με βάση τα μοριακά δεδομένα, σήμερα στην κλινική πράξη τα καρκινώματα μαστού ταξινομούνται σε υπότυπους με βάση την ανοσοϊστοχημική έκφραση δεικτών. Απαραίτητη είναι πια η εκτίμηση των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης, της υπερέκφρασης/ενίσχυσης του ογκογονιδίου HER2/neu και η έκφραση του δείκτη πολλαπλασιασμού MIB1/Ki67 στα νεοπλασματικά κύτταρα. Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων αυτών οδηγεί στην κατάταξη των καρκινωμάτων σε υποτύπους (Luminal A, luminal B, triple negative, Her2-positive). Περαιτέρω υποταξινόμηση είναι δυνατή με βάση την έκφραση άλλων δεικτών (claudin, p53 κλπ). Ωστόσο, παρά τη μεγάλη αυτή πρόοδο, η δυνατότητα πρόβλεψης της βιολογικής συμπεριφοράς των καρκινωμάτων του μαστού και η ανταπόκρισή τους στη θεραπεία παραμένει απρόβλεπτη.

Τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ενδιαφέρον αναπτύσσεται στη διερεύνηση του ρόλου του μικροπεριβάλλοντος του μαστού. Συγκεκριμένα, οι έρευνες στρέφονται στη μελέτη του στρώματος μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και την ανάλυση των φλεγμονωδών κυττάρων σε αυτό. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον φαίνεται να διαδραματίζει η παρουσία των λεμφοκυττάρων (Tumor-infiltrating Lymphocytes/TILs) μεταξύ των νεοπλασματικών κυττάρων ενός καρκινώματος και στο ενδιάμεσο στρώμα μεταξύ αυτών, σε πολλά είδη συμπαγών όγκων, μεταξύ αυτών και του μαστού. Το ποσοστό των TILs, καθώς και ο αριθμός των CD3 και CD8 λεμφοκυττάρων σε αυτό φαίνεται να διαδραματίζουν ρόλο στην εξέλιξη των καρκινωμάτων.

Ένας δεύτερος άξονας, ο οποίος αυξανόμενα συγκεντρώνει το ενδιαφέρον των ερευνητών, είναι αυτός του PD1/PD-L1 (programmed cell death 1/ programmed cell death ligand 1). Το ισοζύγιο έκφρασης αυτών μπορεί να εξουδετερώσει ή να ενισχύσει την ανοσολογική απάντηση του οργανισμού απέναντι στα καρκινώματα. Ο άξονας αυτός έχει μελετηθεί εκτενώς στα συμπαγή καρκινώματα του πνεύμονα, επιτυγχάνοντας άλματα στον περιορισμό της εξέλιξης των καρκινωμάτων με τη χρήση της ανοσοθεραπείας, και φαίνεται πως αυτό μπορεί να εφαρμοστεί και σε άλλα συμπαγή καρκινώματα, όπως και στον μαστό.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη και συσχέτιση των TILs, CD3⁺ και CD8⁺ λεμφοκυττάρων και της έκφρασης του PD-L1 με άλλες κλινικοπαθολογοανατομικές παράμετρους σε πρωτοπαθή καρκινώματα μαστού σε νεαρές γυναίκες (≤ 40 ετών) και σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα βιβλιογραφικά δεδομένα για τις γυναίκες του γενικού πληθυσμού, όλων των ηλικιών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	9-12
• Ανάπτυξη.....	9
• Ανατομική Δομή.....	9-10
• Ιστολογία.....	10-12
2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	12-19
• Φυλή.....	14
• Ηλικία εμμηναρχής , τεκνοποίηση, ηλικία απόκτησης 1 ^{ου} τέκνου.....	14-15
• Θηλασμός.....	15
• Ηλικία εμμηνόπαυσης.....	15
• Από του στόματος αντισυλληπτικά.....	15
• Ορμονοθεραπεία.....	15-16
• Διατροφικές συνήθειες.....	16
• Φυσική άσκηση.....	16
• Ανθρωπομετρικοί παράγοντες.....	17
• Μαστογραφική πυκνότητα μαστού.....	17
• Περιβαλλοντικοί παράγοντες-επαγγελματική έκθεση.....	18
• Γενετικοί παραγόντες κινδύνου.....	18-19
3. ΚΛΙΝΙΚΑ – ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	19-28
• Εντόπιση.....	19
• Διάγνωση	20-21
• Μακροσκοπική εικόνα.....	21-22
• Ιστολοπαθολογική ταξινόμηση.....	22-26
• Μοριακή ταξινόμηση.....	26-29

4. ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ – ΠΡΟΒΛΕΠΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	29-39
• Ηλικία.....	30-33
• Επιμέρους μορφολογικά χαρακτηριστικά ευρήματα.....	33-34
• Ανοσοϊστοχημικοί δείκτες-έκφραση ορμονικών υποδοχέων....	34-39
5. ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	40-44
• Εντοπισμένη θεραπεία	40-41
• Συστηματική θεραπεία.....	41-43
• Στοχευμένη θεραπεία	43-44
6. ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΟΝ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΝ.....	44-67
• Λειτουργία ανοσολογικού συστήματος.....	44-52
• Το ποσοστό των διηθούντων τον όγκο λεμφοκυττάρων (TILs).....	52-62
• Ο αξονας programmed cell death 1/programmed cell death ligand 1 (PD1/PD-L1).....	62-67

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	69-86
• Υλικά.....	69-70
• Μέθοδοι	71-86
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	86-98
• Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά.....	86-88
• Συσχέτιση της έκφρασης του PDL1TC με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά	89-93
• Συσχέτιση της έκφρασης του PDL1IC με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά.....	93-94
• Συσχέτιση του ποσοστού των στρωματικών TILs με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά.....	94-96

- Συσχέτιση της έκφρασης του PDL1TC και PDL1IC, των στρωματικών TILs και του ποσού των CD3+ και CD8+ λεμφοκυττάρων97-98

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....99-106
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....106-107
5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....108-109
6. SUMMARY.....110-111
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....112-161

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Κατά την 6^η περίπου εβδομάδα της εμβρυικής ανάπτυξης, στην πρόσθια επιφάνεια του σώματος και αμφοτερόπλευρα παρατηρείται μια πάχυνση της επιδερμίδας, η μαστική γραμμή, η οποία θα αποτελέσει το εκμαγείο σχηματισμού του μαζικού αδένου. Η αρχέγονη αυτή γραμμή με την πάροδο του χρόνου ατροφεί, εκτός από το σημείο απ' όπου τελικά θα αναπτυχθεί ο μαζικός αδένου.

Κατά τον έκτο μήνα αναπτύσσονται περίπου 15 έως 20 αθροίσεις επιθηλιακών κυττάρων, η καθμία από τις οποίες σχηματίζει αυλό μέχρι και τον ένατο μήνα. Κατ' αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένα σύστημα διακλαδιζόμενων πόρων, το οποίο περιβάλλεται από μεσεγχυματικό ιστό, ο οποίος αρχικά θα διαφοροποιηθεί σε συνδετικό ιστό. Κατά την ήβη και ιδιαίτερα πριν από την εμμηναρχή παρατηρείται ανάπτυξη του μεγέθους των μαστών λόγω της υπερπλασίας του επιθηλίου των πόρων και του περιβάλλοντος αυτών στρώματος (1).

ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΔΟΜΗ

Ο μαστός εντοπίζεται στον θώρακα και επικάθεται σε μεγάλη έκταση στον θωρακικό μυ και σε μικρότερη έκταση στον οδοντωτό μυ. Από αυτούς διαχωρίζεται με μια περιτονία, την εν τω βάθει ή θωρακική, καθώς και με μια λεπτή ζώνη χαλαρού συνδετικού ιστού, η οποία επιτρέπει μια ελαφρά κινητικότητα στο όργανο. Για περιγραφικούς και πρακτικούς λόγους, ο μαστός χωρίζεται σε τέσσερα νοητά τεταρτημόρια, άνω έσω,

κάτω έσω, άνω έξω και κάτω έξω, και μια κεντρική περιοχή 1 εκ. περίξ της θηλαίας άλω.

Ο μαστός αποτελείται από τον αδενικό ιστό και το υπόστρωμα. Ο αδενικός ιστός αντιστοιχεί σε ένα σύστημα διακλαδιζόμενων πόρων, ενώ το υπόστρωμα αφορά στο στρώμα μεταξύ αυτών, το οποίο είναι πυκνός συνδετικός ιστός και λιπώδης συνδετικός ιστός σε ποικίλες αναλογίες. Ο κάθε λοβός αποτελείται από μια ομάδα κυψελοειδών αδενών, οι οποίοι εκβάλλουν στους ενδολοβιακούς πόρους, που συνεννώνονται και σχηματίζουν τον τελικό λοβιακό/γαλακτοφόρο πόρο. Ο κάθε γαλακτοφόρος πόρος έχει ανεξάρτητη έξοδο στη θηλή. Ανάλογα με την ηλικία και το επίπεδο των ορμονών μεταβάλλεται και η ιστολογία του μαζικού αδένου. Οι νεαρές γυναίκες ή εγκυμονούσες εμφανίζουν μεγαλύτερη πυκνότητα αδενίων και λιγότερο ποσό λιπώδους ιστού, ενώ όσο αυξάνει η ηλικία και σε εμμηνοπαυσιακές γυναίκες η αναλογία καθίσταται αντιστρόφως ανάλογη.

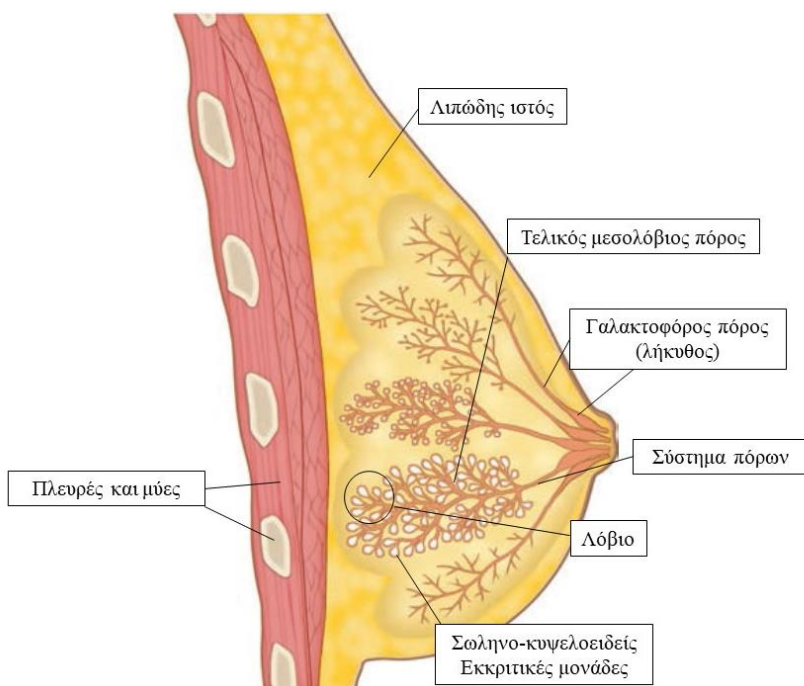
Ο μαστός διαχωρίζεται επιπλέον σε εκκριτικό και εκφορητικό μέρος. Το εκκριτικό μέρος διαμορφώνεται από τη λοβιακή μονάδα, η οποία αποτελείται από το λόβιο και τους λοβιακούς πόρους. Το εκφορητικό μέρος αποτελείται από τους κύριους εκφορητικούς πόρους (γαλακτοφόροι πόροι), οι οποίοι λίγο πριν από τη θηλή διευρύνονται και σχηματίζουν τον γαλακτοφόρο κόλπο (2).

ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ

Η πορολοβιακή μονάδα ξεχωρίζει μικροσκοπικά και ιστολογικά λόγω της λοβιοειδούς αρχιτεκτονικής της και του εξειδικευμένου, χαλαρού, ορμονοευαίσθητου συνδετικού ιστού/στρώματος που την

περιβάλλει, ο οποίος στερείται ελαστικών ινών. Οι πορολοβιακές μονάδες επενδύονται από μονό στίχο χαμηλού κυβικού επιθηλίου, το οποίο επικάθεται σε χαλαρά τοποθετημένα μυοεπιθηλιακά κύτταρα περιβαλλόμενα από τη βασική μεμβράνη. Αντίθετα από τις μικρές πορολοβιακές μονάδες, οι μεγαλύτεροι πόροι περιβάλλονται από στρώμα λιγότερο εξειδικευμένο, με καλά ανεπτυγμένη στιβάδα ελαστικών ινών, και επενδύονται από κυλινδρικό επιθήλιο και μια συνεχή στιβάδα μυοεπιθηλιακών κυττάρων. Τα κύτταρα των μεγάλων πόρων επικάθονται στη βασική μεμβράνη, η οποία επαλείφεται από ελαστικές ίνες. Μεταξύ των κυττάρων του επικαλυπτικού επιθηλίου των πόρων βρίσκεται και ένας ακόμα πληθυσμός κυττάρων, τα ενδιάμεσα ή βασικού τύπου. Αυτά διατάσσονται διάσπαρτα μεμονωμένα και είναι ικανά να διαφοροποιηθούν σε κυλινδρικά ή κυβοειδή ή μυοεπιθηλιακά κύτταρα. Τέλος, μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων αναγνωρίζονται σπάνια διάσπαρτα νευροενδοκρινικά κύτταρα (1).

Οι γαλακτοφόροι πόροι εγγύς της θηλής επαλείφονται, όπως και η ίδια, από πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο. Περιφερικά του γαλακτοφόρου



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της ανατομίας και ιστολογίας του γυναικείου μαστού (Junqueira et al. (1), 2018)]

κόλπου αναγνωρίζεται η συμβολή πολύστιβου πλακώδους και κυλινδρικού επιθηλίου. Στο ανώτερο αυτό σημείο των γαλακτοφόρων πόρων, εγγύς της θηλής, αυτοί περιβάλλονται από λείες μυϊκές ίνες, οι οποίες λειτουργούν ως ορθωτήρες μύες και προσφύονται στο δέρμα θηλής και άλω.

Η θηλή επενδύεται από πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο. Σε αυτήν αναγνωρίζεται εναπόθεση μελανίνης στη βασική στιβάδα μετά την έναρξη της εμμηνου ρύσης. Όμοιες μεταβολές παρατηρούνται και στο τμήμα δέρματος της θηλής και στη θηλαία άλω. Η θηλαία άλως αποτελεί ένα εξειδικευμένο τμήμα δέρματος το οποίο έχει αδένες του Montgomery, τροποποιημένους σμηγματογόνους αδένες, ανεξάρτητους των θύλακων των τριχών, που εκβάλλουν στην επιφάνεια της άλω μέσω των φυματίων του Morgagni (1).

2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο συχνή κακοήθεια που αναπτύσσεται στις γυναίκες παγκοσμίως, με διάγνωση περίπου 1,7 εκατομμυρίων νέων περιστατικών ανά έτος, που αντιστοιχεί σε ποσοστό 12% των συνολικά νέων διαγνωσθέντων καρκινωμάτων ανά έτος και το 25% των συνολικών καρκινωμάτων σε γυναίκες (3). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), μία στις οκτώ γυναίκες παγκοσμίως θα νοσήσει από καρκίνο του μαστού κατά τη διάρκεια του βίου της (4). Στην Ελλάδα, για την πενταετία 2009-2013 διαγνώστηκαν 33,304 περιστατικά διηθητικού καρκινώματος μαστού, καθιστώντας τη συγκεκριμένη κακοήθεια τη συχνότερη που αναπτύσσεται στις Ελληνίδες γυναίκες (5). Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί επίσης τη δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου σχετιζόμενη με κακοήθεια, μετά τον καρκίνο του

πνεύμονα στις γυναίκες. Την τελευταία περίπου δεκαετία οι περιπτώσεις καρκίνου του μαστού έχουν αυξηθεί κατά 37%, ένα ποσοστό το οποίο φαινομενικά εκπλήσσει αρνητικά, ωστόσο αυτό φαίνεται να αντανακλά στην πιο επιθετική πρόληψη που ακολουθούν οι νεότερες γυναίκες. Αυτό τεκμηριώνεται και από το γεγονός του ότι ο αριθμός των θανάτων από καρκίνο του μαστού την αντίστοιχη αυτή δεκαετία έχει μειωθεί κατά 27% (6). Σε έρευνα του 2018 διαπιστώθηκε πως το 62% των καρκινωμάτων μαστού διεγνώσθησαν σε πρώιμο στάδιο χωρίς να συνυπάρχει μετάσταση (7). Η πενταετής επιβίωση εξαρτάται από το στάδιο του καρκινώματος κατά τη διάγνωση. Ασθενείς με διηθητικό καρκίνωμα μαστού χωρίς συνοδό μετάσταση έχουν κατά 90% 5ετή επιβίωση και 83% 10ετή επιβίωση. Φαίνεται πως ο σημαντικότερος παράγοντας για την ανάπτυξη καρκινώματος του μαστού είναι η ηλικία. Η μέση ηλικία εμφάνισής του σε γυναίκες είναι τα 61 έτη, ενώ η μέση ηλικία θανάτου σχετιζόμενη με καρκίνωμα του μαστού είναι τα 68 έτη. Εξαιρετικά σπάνιες είναι οι περιπτώσεις διάγνωσης σε ηλικίες <25 ετών, με το 95% των νεοδιαγνωσθέντων καρκινωμάτων μαστού να λαμβάνουν μέρος μετά την ηλικία των 40 ετών (8). Πολλές είναι οι επιδημιολογικές μελέτες που αναλύουν διάφορους τροποποιητικούς και μη τροποποιητικούς παράγοντες κινδύνου, οι οποίοι σχετίζονται είτε με την πιθανότητα εμφάνισης, την πιθανότητα κατάληξης, είτε τους υπότυπους καρκινωμάτων, οι σημαντικότεροι εκ των οποίων είναι η φυλή, η ηλικία εμφάνισης της εμμηναρχής και εμμηνόπαυσης, η τεκνοποίηση, ο θηλασμός, η εξωγενής χορήγηση ορμονών, οι διατροφικές συνήθειες, η φυσική άσκηση, οι ανθρωπομετρικοί παράγοντες, η πυκνότητα του μαζικού αδένα, η περιβαλλοντική και επαγγελματική έκθεση και οι γενετικοί παράγοντες.

Ο καρκίνος μαστού στους άνδρες είναι σπάνιος, και η επίπτωση του είναι μόνο το 1% αυτής των γυναικών.

ΦΥΛΗ

Ο καρκίνος του μαστού διαγιγνώσκεται συχνότερα σε Καυκάσιες γυναίκες του δυτικού κόσμου, ωστόσο οι γυναίκες της Αφρικανικής φυλής εμφανίζουν τα μεγαλύτερα ποσοστά θανάτου σχετιζόμενα με το καρκίνωμα του μαστού (9). Ο καρκίνος μαστού στις γυναίκες της Αφρικανικής φυλής εμφανίζει πιο επιθετική συμπεριφορά απ' ό,τι στις Καυκάσιες, αφού είναι συχνότερα ER αρνητικά καρκινώματα ή τριπλά αρνητικά καρκινώματα (ER-, PR-, HER2-) (10,11).

ΗΛΙΚΙΑ ΕΜΜΗΝΑΡΧΗΣ, ΤΕΚΝΟΠΟΙΗΣΗ, ΗΛΙΚΙΑ ΑΠΟΚΤΗΣΗΣ 1^{ΟΥ} ΤΕΚΝΟΥ

Η μικρή ηλικία εμμηναρχής, οι πολλές κυήσεις και η μεγάλη ηλικία απόκτησης 1^{ου} τέκνου συμβάλλουν στην αύξηση κινδύνου ανάπτυξης καρκινώματος του μαστού. Αυτό αποδίδεται στην συνεχή έκθεση στις ορμόνες του φύλου, είτε μέσω εμμενουσών μεταβολών στους ιστούς του μαστικού αδένου ή μέσω άλλων βιολογικών μηχανισμών (12). Οι αναπαραγωγικές ορμόνες προκαλούν αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, που αυξάνει την πιθανότητα βλάβης του DNA, συνεπώς και την πιθανότητα ανάπτυξης καρκινώματος του μαστού (13).

Η ατοκία, μεμονωμένα και ειδικότερα όταν συνδυάζεται με παχυσαρκία, αυξάνει την πιθανότητα ανάπτυξης καρκινώματος του μαστού, ενώ το ιστορικό κυήσεων (άνω των 20 εβδομάδων) τη μειώνει,

αφου φαίνεται να καθιστά τον μαστό λιγότερο επιρρεπή σε καρκινογόνους παράγοντες (14,15).

ΘΗΛΑΣΜΟΣ

Ο θηλασμός μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος του μαστού και είναι μια σημαντική μεταβλητή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέσο πρόληψης. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι όσο μεγαλύτερο είναι το διάστημα θηλασμού τόσο μεγαλύτερη και η μείωση εμφάνισης της νόσου (16).

ΗΛΙΚΙΑ ΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΗΣ

Η όψιμη εμμηνόπαυση και ιδιαίτερα όταν αυτή συνδυάζεται με πρόωμη εμμηναρχή αυξάνει κατα πολύ τις πιθανότητες εμφάνισης καρκινώματος του μαστού, αφου ο μαζικός αδένας εκτίθεται για μεγάλο χρονικό διάστημα στις αναπαραγωγικές ορμόνες (12).

ΑΠΟ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΤΟΣ ΑΝΤΙΣΥΛΛΗΠΤΙΚΑ

Η από του στόματος χρήση αντισυλληπτικών σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος μαστού, ωστόσο η σχέση αυτή δεν αποδεικνύεται στατιστικά σημαντική (17,18).

ΟΡΜΟΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η εξωγενής λήψη ορμονών μετά την εμμηνόπαυση έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος μαστού (19–21). Ειδικότερα, μεγαλύτερο κίνδυνο εμφανίζουν τα σκευάσματα που

συνδιάζουν οιστρογόνα-προγεστερόνη σε σχέση με αυτά που περιέχουν μόνο οιστρογόνα. Αυτό τεκμηριώνεται από το γεγονός ότι η επίπτωση του καρκινώματος μαστού μειώθηκε κατά 5-10% μετά τη διακοπή χρήσης σκευασμάτων προγεστερόνης-οιστρογόνων σε Αμερική και Ευρώπη (22).

ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΕΣ ΣΥΝΗΘΕΙΕΣ

Η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ, κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος, καθώς και τα ζωικά λίπη, αποτελούν παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη καρκινώματος του μαστού. Ειδικότερα το αλκοόλ φαίνεται να σχετίζεται γραμμικά με την πιθανότητα ανάπτυξης καρκινώματος μαστού, αφού το αλκοόλ επηρεάζει τα επίπεδα κυκλοφορούντων οιστρογόνων στο αίμα (23–26). Αντιθέτως, η διατροφή πλούσια σε φρούτα και λαχανικά, ασβέστιο, βιταμίνη D, σόγια και αντιοξειδωτικά φαίνεται να δρα προστατευτικά (27–30). Αρκετές είναι οι έρευνες οι οποίες αποδεικνύουν την αντιστρόφως ανάλογη συσχέτιση της μεσογειακής διατροφής με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος μαστού και ER αρνητικών καρκινωμάτων (31–33).

ΦΥΣΙΚΗ ΑΣΚΗΣΗ

Η εντατική φυσική άσκηση μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος μαστού, μειώνοντας την αντίσταση στην ινσουλίνη και τα επίπεδα κυκλοφορούντων στο αίμα ορμονών φύλου (34,35). Η μείωση εμφάνισης της νόσου μπορεί να φτάσει έως και το 14% σε εντατική και καθημερινή άσκηση (36).

ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Το ύψος, το σωματικό βάρος και η παχυσαρκία σχετίζονται με το καρκίνωμα του μαστού (37,38). Το σωματικό λίπος παρέχει τη δυνατότητα περιφερικής μετατροπής των ανδρογόνων σε οιστρογόνα στον λιπώδη ιστό (39). Οι μελέτες υποδεικνύουν πως ο αυξημένος δείκτης μάζας σώματος (Body Mass Index-BMI) σχετίζεται με την ανάπτυξη καρκινωμάτων, μεταξύ αυτών και του μαστού (40). Αυτή σχετίζεται γραμμικά με την ανάπτυξη καρκινώματος μαστού όταν μεταβάλεται κατά την ενήλικη ζωή, ενώ αποτελεί αμετάβλητο προδιαθεσικό παράγοντα όταν είναι αυξημένη από την προεφηβική ηλικία. Έτσι, η ηλικία κατά την οποία είναι αυξημένο το BMI διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πιθανότητα ανάπτυξης καρκινώματος του μαστού (41).

ΜΑΣΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΜΑΣΤΟΥ

Η αυξημένη πυκνότητα του μαστικού αδένου είναι ένας από τους πιο εδραιωμένους παράγοντες κινδύνου στην ανάπτυξη του καρκινώματος μαστού, αυξάνοντας κατά 4 φορές την πιθανότητα ανάπτυξής του (42). Επιπλέον, η πυκνότητα του μαστικού αδένου φαίνεται να σχετίζεται και με τα επιμέρους χαρακτηριστικά του καρκινώματος που αναπτύσσεται, όπως την έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων και τον βαθμό κακοηθείας (43).

Η πυκνότητα του μαστικού αδένου εξαρτάται από ποικίλλους παράγοντες, όπως τον αριθμό των κυήσεων και τεκνοποιήσεων, την εμμηνόπαυση, την ορμονοθεραπεία και την ηλικία.

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΚΘΕΣΗ

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία σχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη διηθητικού καρκινώματος μαστού, μέσω της πρόκλησης μεταλλάξεων του DNA (44). Αν και έχουν θεωρηθεί καρκινογόνες οι οργανοχλωρίνες και διάφορα είδη φυτοφαρμάκων, σε αυτό δεν φαίνεται να συμφωνούν όλες οι μελέτες (45,46). Οι διαταραχές στον κερκάδιο ρυθμό έχουν στοχοποιηθεί για την πιθανότητα συσχέτισής τους με την εμφάνιση καρκινώματος του μαστού.

Η μελατονίνη έχει προστατευτική επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό. Σε ανθρώπους με νυκτερινή εργασία το ποσό της μελατονίνης μειώνεται αισθητά, με αποτέλεσμα την αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης καρκινώματος του μαστού (47).

Επιπλέον, η μεθυλίωση του DNA, αποτέλεσμα έκθεσης σε καπνό τσιγάρων και ρύπους, συνδέεται άρρηκτα με το καρκίνωμα του μαστού (48).

ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Το θετικό οικογενειακό ιστορικό επηρεάζει κατά πολύ την πιθανότητα εμφάνισης καρκινώματος μαστού, αυξάνοντας κατα δύο φορές την πιθανότητα ανάπτυξής του καρκίνου στην 1^ο βαθμού συγγένεια. Η πιθανότητα αυτή αυξάνει όσο μειώνεται η ηλικία διάγνωσης του συγγενή. Το 20% περίπου των διαγνωσθέντων καρκινωμάτων μαστού σχετίζονται με θετικό οικογενειακό ιστορικό (7).

Οι μονήρεις γενετικοί πολυμορφισμοί του XRCC2 και XRCC3, καθώς και η caspase 8 (CASP8), μια πρωτεάση που συμμετέχει στη διαδικασία της απόπτωσης κυττάρων, φαίνεται να συμμετέχουν στην ανάπτυξη καρκινώματος του μαστού (49–52).

Οι μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 και BRCA2 αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος του μαστού από 40-87% μέχρι και την ηλικία των 70. Οι δύο αυτές μεταλλάξεις σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκινωμάτων σε μαστό, ωθήκες και άλλους ιστούς και αποτελούν το 15%-20% των οικογενών καρκινωμάτων μαστού (53,54).

Άλλα οικογενή (γενετικά) σύνδρομα που σχετίζονται με την εμφάνιση καρκινώματος του μαστού αποτελούν το σύνδρομο Li Fraumeni, το σύνδρομο Cowden και το σύνδρομο Peutz Jeghers (55).

3. ΚΛΙΝΙΚΑ - ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

ΕΝΤΟΠΙΣΗ

Ο μαστός για περιγραφικούς λόγους όπως αναφέραμε ανωτέρω, χωρίζεται σε τέσσερα νοητά τεταρτημόρια. Το ήμισυ περίπου των περιπτώσεων καρκινωμάτων μαστού εντοπίζονται στο άνω έξω τεταρτημόριο και αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι σε αυτό το τεταρτημόριο είναι μεγαλύτερη η ποσότητα του μαζικού παρεγχύματος. Το 20% περίπου των περιπτώσεων έχει κεντρική (περιοχή της θηλής) εντόπιση, ενώ η κατανομή στα λοιπά τεταρτημόρια είναι περίπου ίση (10%). Πολυεστιακότητα ανευρίσκεται σε περίπου 13% των περιπτώσεων, ενώ σε ποσοστό 3% είναι αμφοτερόπλευρα (56).

ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Ζώντας στην εποχή της προληπτικής πια ιατρικής, κάθε γυναίκα γνωρίζει πως ο πιο εύκολος, ανώδυνος και άμεσος τρόπος ανίχνευσης του καρκίνου του μαστού πραγματοποιείται με την αυτοεξέταση μέσω της διαδικασίας της ψηλάφησης. Άλλες μεθόδους ανίχνευσης καρκινωμάτων του μαστού αποτελούν η μαστογραφία, ο υπέρηχος μαστού και η μαγνητική τομογραφία, η επιλογή των οποίων εξαρτάται από άλλες επιμέρους κλινικές παραμέτρους.

Κλινική εξέταση: Η ψηλάφηση αποτελεί έναν άμεσο και αξιόπιστο τρόπο ανίχνευσης μεταβολών της ανατομίας του μαστού. Αυτή μπορεί να εφαρμοστεί από την ίδια την ασθενή και από τον ιατρό εύκολα και ανώδυνα. Παρ' όλα αυτά, η ευαισθησία της εξέτασης αυτής είναι περιορισμένη, αφού μόνο το 60% των αλλοιώσεων που ανιχνεύονται μαστογραφικά είναι και ανιχνεύσιμες με ψηλάφηση.

Μαστογραφία: Αποτελεί τον κύριο τρόπο ανίχνευσης καρκινωμάτων του μαστού σε γυναίκες άνω των 40 ετών. Βασική προϋπόθεση για την αυξημένη ευαισθησία των αποτελεσμάτων είναι ο μαστός να μην είναι πυκνός (57). Ειδικότερα μετά την εμμηνόπαυση, που η πυκνότητα του μαστού μειώνεται, η μαστογραφία είναι ειδική στο να ανιχνεύει μικρές αλλοιώσεις που δεν ανιχνεύονται με ψηλάφηση, καθώς και επασβεστώσεις. Ένα ποσοστό περίπου 11% των καρκινωμάτων μαστού δεν γίνονται αντιληπτά από τη μαστογραφία, γεγονός που επισημαίνει την αναγκαιότητα της φυσικής εξέτασης (57). Οι πιο συχνές οντότητες που υποδιαγιγνώσκονται σε περιπτώσεις μαστογραφίας είναι κάποιοι υπότυποι λοβιακών καρκινωμάτων, η νόσος Paget, τα

φλεγμονώδη καρκινώματα μαστού και μικρά περιφερικά καρκινώματα μαστού (58).

Υπέρηχος μαστού: Σε αντίθεση με τη μαστογραφία, ο υπέρηχος αποτελεί πιο αποτελεσματική μέθοδο για την ανίχνευση μικρών ογκιδίων σε πυκνούς μαστούς και διάκριση αυτών από κυστικές αλλοιώσεις (59). Η ιδιότητα ανίχνευσης αλλοιώσεων με μεγάλη ακρίβεια σε πυκνούς μαστούς την καθιστά ειδική για τον έλεγχο προεμμηνοπαυσιακών γυναικών (60).

Μαγνητική τομογραφία: Η μαγνητική τομογραφία χρησιμοποιείται κυρίως ως μέθοδος αναφοράς σε περιπτώσεις που οι συμβατικές μέθοδοι (μαστογραφία, υπέρηχος) αποτυγχάνουν να δώσουν μια ξεκάθαρη απάντηση, καθώς και σε ασθενείς υψηλού κινδύνου, όπως οι BRCA-θετικοί ασθενείς με μεγάλη διαγνωστική ευαισθησία. Επιπλέον, είναι ιδιαίτερα βοηθητική μέθοδος για την αξιολόγηση πιθανών λεμφαδενικών μεταστάσεων, καθώς και στην εκτίμηση υποστροφής νόσου μετά από χημειοθεραπεία (58). Ωστόσο, παρά τη μεγάλη διαγνωστική της ακρίβεια, ο αριθμός των ψευδώς θετικών περιπτώσεων παραμένει υψηλός και για τον λόγο αυτόν δεν αποτελεί διαγνωστική μέθοδο εκλογής σε όλο τον πληθυσμό (61,62).

ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Μακροσκοπικά τα καρκινώματα μαστού αποτελούν κατα κύριο λόγο εντοπισμένες αλλοιώσεις στο μαζικό παρέγχυμα, οι οποίες διαφέρουν από παρακείμενες καλοήθειες αλλοιώσεις λόγω του διαφορετικού σχήματος, χρώματος και σύστασης. Τα καρκινώματα μαστού έχουν συνήθως ανώμαλο περίγραμμα, λευκόφαιη χροιά και υπόσκληρη

σύσταση. Στην όψη διατομής τους αναγνωρίζονται γκριζωπές-λευκόφαιες ή κιτρινόφαιες γραμμώσεις (4).

ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΝ ΜΑΣΤΟΥ

Το καρκίνωμα του μαστού περιλαμβάνει μια μεγάλη ομάδα νεοπλασμάτων, με διαφορετικά μορφολογικά, φαινοτυπικά και μοριακά χαρακτηριστικά. Η σύγχρονη ταξινόμηση αυτών τα διαχωρίζει σε μη διηθητικά, από τα οποία τα πορογενή καρκινώματα *in situ* (DCIS) έχουν την μεγαλύτερη σημασία και σε διηθητικά καρκινώματα μαστού.

In situ πορογενές καρκίνωμα μαστού (DCIS): Αποτελεί έναν πληθυσμό νεοπλασματικών επιθηλιακών κυττάρων των λοβιακών πόρων, με ήπια ως και μεγάλη κυτταρολογική ατυπία. Αν και υπάρχει διχογνωμία για τον τρόπο ταξινόμησης των αλλοιώσεων αυτών, ο ΠΟΥ τις διαχωρίζει με βάση την κυτταρολογική ατυπία, τον κυτταρικό προσανατολισμό και την ύπαρξη ή όχι κεντρικής νέκρωσης σε τρεις βαθμούς κακοηθείας χαμηλό, μέτριο και υψηλό. Με βάση την αρχιτεκτονική δομή ή τα επιμέρους κυτταρολογικά χαρακτηριστικά, το DCIS διαχωρίζεται σε: συμπαγές, ηθμοειδές, θηλώδες, μικροθηλώδες, τοιχωματικό (clinging) και κάποιους πιο σπάνιους υπότυπους, όπως αποκρινές, δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου, νευροενδοκρινικό, ατρακτοκυτταρικό, πλακώδες και διαυγοκυτταρικό (4).

Διηθητικό καρκίνωμα μαστού: Ο ΠΟΥ παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για τον τρόπο κατάταξης των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού, με σκοπό την καλύτερη δυνατή επιλογή θεραπείας (4). Ξεκινώντας από το κυτταρολογικό και αρχιτεκτονικό πρότυπο ανάπτυξης,

ο καρκίνος του μαστού διαχωρίζεται σε ιστολογικούς τύπους (Πίνακας 1). Τρεις είναι οι μεγάλες κατηγορίες καρκινώματων, καρκινώματα με ειδικούς χαρακτήρες (15-25%), λοβιακά καρκινώματα (5-15%) και καρκινώματα χωρίς ειδικούς χαρακτήρες, εξ αποκλεισμού (40-75%) (Πίνακας 1). Αν και στις περισσότερες περιπτώσεις η ταξινόμηση είναι φαινομενικά εύκολη, υπάρχουν και περιπτώσεις (10-49%) που τα καρκινώματα εμφανίζουν πάνω από έναν ιστολογικό υπότυπο, στην οποία περίπτωση εάν το δεύτερο στοιχείο καταλαμβάνει πάνω από το 10% του όγκου, τότε ταξινομείται ως μικτό καρκίνωμα. Επιπλέον, κάποιοι υπότυποι καρκινωμάτων σχετίζονται και με υποκείμενες γενετικές μεταλλάξεις όπως είναι το εκκριτικό και το αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα. Σε όλα τα καρκινώματα, ακόμα και στο διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα, τη μεγαλύτερη σε ποσοστό ομάδα με ειδικά χαρακτηριστικά, υπάρχουν επιμέρους στοιχεία που επηρεάζουν την πρόγνωση (63,64). Επομένως, η ιστολογική ταξινόμηση των διηθητικών καρκινωμάτων είναι περιορισμένη σε προγνωστική αξία η οποία ενισχύεται όταν συνδυάζεται με άλλα στοιχεία, όπως τον βαθμό διαφοροποίησης και την έκφραση βιοδεικτών.

Ο βαθμός διαφοροποίησης των καρκινωμάτων μαστού είναι ένας πολύ ισχυρός προγνωστικός δείκτης, που σχετίζεται με τη μορφολογία και τα μοριακά χαρακτηριστικά των καρκινωμάτων μαστού (65–67). Αυτός εκτιμάται με βάση την ταξινόμηση κατά Elston & Ellis, όπου αθροίζονται οι βαθμοί που παίρνει για καθεμιά από τρεις παραμέτρους: το ποσοστό σχηματισμού σωληναρίων στο καρκίνωμα, η πυρηνική ατυπία των κυττάρων και ο αριθμός των μιτώσεων. Σημειώνεται ότι ο αριθμός μιτώσεων που καθορίζει τους βαθμούς εξαρτάται από την μέγιστη διάμετρο του οπτικού πεδίου (66) (Πίνακας 2, 3 και 4).

Πίνακας 1. ΠΟΥ ταξινόμηση καρκινωμάτων μαστού		
1	Διηθητικό καρκίνωμα μαστού μη ειδικού τύπου	40-74%
2	Διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα	5-15%
3	Σωληνώδες καρκίνωμα	2%
4	Ηθμοειδές καρκίνωμα	0.3 – 0.8% Έως και 4%
5	Βλεννώδες καρκίνωμα	2%
6	Καρκίνωμα με μυελοειδή χαρακτηριστικά	<1%
7	Καρκίνωμα με αποκρινή διαφοροποίηση	4%
8	Καρκίνωμα με διαφοροποίηση σε κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου	<1%
9	Διηθητικό μικροθηλώδες καρκίνωμα	0.9-2%
10	Μεταπλαστικό καρκίνωμα μη ειδικού τύπου	0.2-5%
11	Καρκίνωμα με νευροενδοκρινικά χαρακτηριστικά	<1%
12	Εκκριτικό καρκίνωμα	<0.15%
13	Διηθητικό θηλώδες καρκίνωμα	<1%
14	Καρκίνωμα κυψελιδικών κυττάρων	<1%
15	Βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα	0.3%
16	Πολύμορφο καρκίνωμα	<1%
17	Ογκοκυτταρικό καρκίνωμα	<1%
18	Καρκίνωμα πλούσιο σε λιπίδια	<1-1.6%
19	Διαυγοκυτταρικό πλούσιο σε λιπίδια καρκίνωμα	1-3%
20	Σμηγματογόνο καρκίνωμα	<1%
21	Αδενομυοεπιθηλίωμα με καρκίνωμα	<1%
22	Αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα	<0.1%
23	Εγκαψωμένο θηλώδες καρκίνωμα	<2%
24	Διηθητικό συμπαγές θηλώδες καρκίνωμα	<1%

Πίνακας 2. Υπολογισμός βαθμού διαφοροποίησης καρκινώματος μαστού κατά Elston & Ellis:

1.	Σχηματισμός σωληναρίων στο καρκίνωμα	
	Πλειοψηφία του καρκινώματος (>75%)	1
	Μέτριος βαθμός (15-75%)	2
	Ελάχιστα ή καθόλου (<15%)	3
2.	Πυρηνική πλειομορφία	
	Μικρή (Πυρήνες ελαφρά μεγαλύτεροι από τα καλοήθη κύτταρα)	1
	Μέτρια (Πυρήνες 1,5-2 φορές μεγαλύτεροι από τα καλοήθη κύτταρα)	2
	Μεγάλη (Σημαντικά μεγάλοι πυρήνες με μεγάλη ποικιλία σε μέγεθος)	3
3.	Μιτωτικός δείκτης (μιτώσεις/10 X40)	
	≤ 4	1
	5-9	2
	≥ 10	3

Πίνακας 3. Τελικοί βαθμοί διαφοροποίησης κατά Elston & Ellis:

Άθροισμα των τριών παραμέτρων (Πίνακας 2)	
3-5	GRADE 1
6 ή 7	GRADE 2
8 ή 9	GRADE 3

Πίνακας 4. Βαθμονόμηση μιτώσεων με βάση την διάμετρο του οπτικού πεδίου

Διάμετρος οπτικού πεδίου	Αριθμός μιτώσεων (βαθμός)		
	1	2	3
0.40-0.41	≤4	5-9	≥10
0.42-0.45	≤5	6-10	≥11
0.44-0.45	≤5	6-11	≥12
0.46-0.47	≤6	7-12	≥13
0.48-0.49	≤6	7-13	≥14
0.50-0.51	≤7	8-14-	≥15
0.52	≤7	8-15	≥16
0.53-0.54	≤8	9-16	≥17
0.55-0.56	≤8	9-17	≥18
0.57	≤9	10-18	≥19
0.58-0.59	≤9	10-19	≥20
0.60	≤10	11-21	≥21
0.61	≤10	11-21	≥22
0.62-0.63	≤11	12-22	≥23
0.64	≤11	12-23	≥24
0.65-0.66	≤12	12-24	≥25
0.67	≤12	13-25	≥26
0.68	≤13	14-26	≥27
0.69	≤13	14-27	≥28

ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Η μοριακή ταξινόμηση του καρκινώματος μαστού έχει αλλάξει την έννοια της ετερογένειας όπως αυτή ερμηνευόταν πριν από κάποια χρόνια. Οι έρευνες έχουν καταφέρει να αποκωδικοποιήσουν και να ταξινομήσουν νέους υπότυπους καρκινωμάτων μαστού με βάση τις επιμέρους γονιδιακές μεταλλάξεις ή γενετικές αλλαγές ή επιγενετικές αλλαγές (68,69). Οι ‘εγγενείς υπότυποι’ (intrinsic subtypes) με την πάροδο του χρόνου έχουν επιβεβαιωθεί ως ισχυρές βιολογικές οντότητες με ξεχωριστές γονιδιακές αλλαγές και κλινική πρόγνωση (70–73). Οι πέντε κύριοι μοριακοί τύποι που έχουν διαμορφωθεί αποτελούν τα καρκινώματα μαστού αυλικού τύπου Α και αυλικού τύπου Β, τύπου φυσιολογικού μαστού, HER2-εμπλουτισμένα και τα τριπλά αρνητικά/βασικού τύπου (68).

Όπως αναφέρθηκε στα στοιχεία ιστολογίας του μαστού, οι πόροι και τα λόβια επενδύονται από έναν εσωτερικό στίχο κυβοειδών ή κυλινδρικών κυττάρων (αυλικά κύτταρα), τα οποία εκφράζουν τις κερατίνες CK8/18. Αυτά επικάθονται στα βασικά τοποθετημένα μυοεπιθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται σε άμεση επαφή με τη βασική στιβάδα και εκφράζουν την κερατίνη CK5/6. Οι μοριακοί υπότυποι των καρκινωμάτων μαστού αντικατοπτρίζουν το γονιδιακό προφίλ των δύο βασικών τύπων κυττάρου, το αυλικό και το μυοεπιθηλιακό/βασικό που απαντάται στον ώριμο μαστό, με τον κάθε τύπο να εκφράζει και τις αντίστοιχες κερατίνες (68).

Αυλικού τύπου Α: Τα καρκινώματα αυλικού τύπου Α εκφράζουν πάντα τους υποδοχείς οιστρογόνων, έχουν χαμηλό δείκτη κυτταρικού

πολλαπλασιασμού (MIB1), είναι βαθμού κακοηθείας 1 ή 2 και εκφράζουν χαμηλού μοριακού βάρους κερατίνες (CK8/18).

Αυλικού τύπου Β: Τα καρκινώματα αυλικού τύπου Β εκφράζουν πάντοτε τους υποδοχείς οιστρογόνων και με βάση την έκφραση του HER2 διαχωρίζονται επιπλέον σε δύο υποκατηγορίες. Εάν δεν εκφράζουν το HER2 (*Αυλικού τύπου Β – HER2-*), τότε αυτά έχουν είτε υψηλό MIB1 είτε χαμηλή ή και μηδαμινή έκφραση υποδοχέων προγεστερόνης. Εάν υπάρχει έκφραση του HER2 (*Αυλικού τύπου Β – HER2+*), η έκφραση του MIB1 και των υποδοχέων προγεστερόνης μπορεί να κυμαίνεται από χαμηλή/αρνητική έως και υψηλή.

Τύπου φυσιολογικού μαστού: Πρόκειται για καρκινώματα μαστού που εκφράζουν γονίδια του λιπώδους ιστού και των μυοεπιθηλιακών κυττάρων, με παρόμοια πρόγνωση με τα αυλικού τύπου Α καρκινώματα (74). Αποτελεί μια αμφιλεγόμενη ομάδα καρκινωμάτων, αφού η ανακάλυψη αυτών θεωρείται ότι μπορεί και να πρόκειται για αποτέλεσμα τεχνουργήματος λόγω ‘επιμόλυνσης’ ενός νεοπλάσματος χαμηλού βαθμού κακοηθείας με φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα (75).

HER2-εμπλουτισμένα: Τα καρκινώματα αυτά εκφράζουν σε πολύ μικρό βαθμό αυλικού τύπου γονίδια και για τον λόγο αυτόν είναι αρνητικά στους υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης, εμφανίζουν ενίσχυση του γονιδίου του *HER2* και γιαυτό είναι θετικά για την πρωτεΐνη HER2.

Τριπλά αρνητικά/Βασικού τύπου: Είναι τα καρκινώματα μαστού στα οποία συχνά δεν παρατηρείται έκφραση υποδοχέων οιστρογόνων,

προγεστερόνης και HER2 και είναι υψηλού βαθμού κακοηθείας. Αυτά εκφράζουν γονίδια που είναι χαρακτηριστικά των βασικών επιθηλιακών κυττάρων και των μυοεπιθηλιακών κυττάρων του φυσιολογικού μαστού, όπως είναι οι βασικές κερατίνες CK5/6, CK14 και CK17. Η πρόγνωση των καρκινωμάτων αυτού του τύπου επηρεάζεται από το είδος του μικροπεριβάλλοντος και συγκεκριμένα τη συνύπαρξη ή όχι φλεγμονώδους διηθήματος στο διάμεσο των νεοπλασματικών κυττάρων στρώμα (TILs) (76).

Claudin Low: Αποτελεί μια υπο-ομάδα των ER αρνητικών διηθητικών καρκινωμάτων μαστού, μη ειδικού τύπου, τα οποία συνήθως εμφανίζουν μυελοειδή και μεταπλαστικά χαρακτηριστικά. Αυτά είναι εμπλουτισμένα με ένα ‘claudin-low’ σύμπλοκο γονιδίων (77,78).

Molecular apocrine (mApo): Αποτελεί μια ομάδα διηθητικών καρκινωμάτων μαστού που αν και φαινοτυπικά είναι τριπλά αρνητικά καρκινώματα μαστού, εκφράζουν ER-ανταποκρινόμενα, αυλικού τύπου γονίδια λόγω της έκφρασης ανδρογονικών υποδοχέων (79,80).

4. ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ – ΠΡΟΒΛΕΠΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Οι προγνωστικοί παράγοντες όσον αφορά στα καρκινώματα αποτελούν δείκτες που χαρακτηρίζουν το δυναμικό ανάπτυξης και μετάστασης και την πορεία της νόσου ανεξάρτητα από την θεραπεία, ενώ οι προβλεπτικοί παράγοντες αποτελούν δείκτες ανταπόκρισης σε συγκεκριμένη θεραπεία. Πολλοί δείκτες μπορεί να είναι και προγνωστικοί και προβλεπτικοί.

ΗΛΙΚΙΑ

Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκινώματος του μαστού εξαρτάτε από την ηλικία. Η πιθανότητα ανάπτυξης καρκινώματος μαστού ανα έτος ανέρχεται σε 0,04% στις ηλικίες μεταξύ 30-39 ετών, ενώ αυξάνεται κατά 10% ανά έτος σε γυναίκες άνω των 80 ετών (81).

Υπάρχει μια ανομοιομορφία ως προς το ηλικιακό κατώφλι που διαχωρίζει γυναίκες σε νεαρές και μεγαλύτερης ηλικίας. Ξεκινώντας από την ηλικία των 30 έως και την ηλικία των 50 σε διάφορες μελέτες, η Ευρωπαϊκή Κοινότητα Ειδικών στο Καρκίνωμα Μαστού και σε νεαρές γυναίκες όρισε ως νεαρές γυναίκες αυτές που είναι μικρότερες και ίσες των 40 ετών (82–86).

Περίπου μία στις σαράντα γυναίκες που διαγιγνώσκεται με καρκίνωμα μαστού είναι <35 ετών, γεγονός που αποδεικνύει πως είναι σπάνια η ανάπτυξη καρκινωμάτων σε νεαρές ηλικίες. Παρά τη σπανιότητα αυτήν ωστόσο, τα τελευταία χρόνια αναγνωρίζεται αύξηση της επίπτωσης στις νεαρές γυναίκες και φαίνεται πως οι περισσότερες από αυτές τις περιπτώσεις σχετίζονται με θετικό οικογενειακό ιστορικό ή με γονιδιακές μεταλλάξεις σε σχέση με τα περιστατικά εμφάνισης σε μεγαλύτερες ηλικίες (87).

Η ηλικία αποτελεί επίσης ξεχωριστό προγνωστικό παράγοντα στον καρκίνο του μαστού, ελαττώνοντας τον κίνδυνο υποτροπής και τη θνητότητα, όσο αυτή αυξάνεται. Συγκεκριμένα, υπάρχει μια γραμμική συσχέτιση, έχοντας μείωση κατά 4% απομακρυσμένης μετάστασης και 6% υποτροπής για κάθε αύξηση κατά ένα έτος της ηλικίας διάγνωσης του

καρκινώματος μαστού (88). Τέλος, το νεαρό της ηλικίας αυξάνει τη θνησιμότητα, μειώνοντας μέχρι και 4 φορές την 5ετή επιβίωση (84).

Εκτός από τον κίνδυνο υπορτοπής και θνητότητας που αυξάνει κατά τη διάγνωση καρκινώματος του μαστού σε νεαρές γυναίκες, επηρεάζεται επιπλέον πολύ αρνητικά η ποιότητα ζωής των ασθενών αυτών. Εκτός από το βάρος της ίδιας της διάγνωσης, νεαρές γυναίκες έρχονται και αντιμέτωπες με πολλά ψυχο-κοινωνικά και σεξουαλικά θέματα.

Πρόωρη εμμηνόπαυση: Αποτελεί ένα από τα μείζονα προβλήματα σε νεαρές γυναίκες με καρκίνο μαστού και εξαρτάται από τους θεραπευτικούς παράγοντες που θα επιλεγούν, τη δοσολογία και την ηλικία της ασθενούς (89).

Τα συμπτώματα εμμηνόπαυσης σε γυναίκες με ιατρογενή εμμηνόπαυση είναι ιδιαίτερα ενοχλητικά και έντονα, με συχνότερα τις εξάψεις (hot flashes), την κόπωση και την κατάθλιψη (90–93).

Στείρωση: Ο κίνδυνος ατοκίας εξαρτάται αποκλειστικά από την πιθανότητα της πρόωρης εμμηνόπαυσης. Ωστόσο, ακόμα και γυναίκες με φυσιολογικό εμμηνορυσιακό κύκλο μετά από χημειοθεραπεία έχουν μειωμένη πιθανότητα σύλληψης και αυξημένη πιθανότητα εμμηνόπαυσης σε μικρότερη ηλικία (89,93).

Γνωσιακές αλλαγές που σχετίζονται με την θεραπεία του καρκίνου 'χημειο-εγκέφαλος' (Cancer therapy-associated cognitive change "chemobrain"): Ένα φαινόμενο το οποίο παρατηρείται επίσης σε ασθενείς με καρκίνωμα μαστού είναι διαταραχές μνήμης και συγκέντρωσης, στοιχεία τα οποία μειώνουν το γνωστικό επίπεδο, την ψυχολογική κατάσταση, καθώς και την ικανότητα εκτέλεσης επαγγελματικών και

καθημερινών δραστηριοτήτων (94). Τέτοιου τύπου προβλήματα, που αποτελούν παρενέργειες των θεραπειών κατά του καρκίνου, αυξάνονται όλο και περισσότερο την τελευταία 10ετία, μειώνοντας κατα πολύ την ποιότητα ζωής των ασθενών.

‘Οστική υγεία’: Νεαρές γυναίκες με ιατρογενή εμμηνόπαυση λόγω χήμειοθεραπείας έχουν μεγάλο κίνδυνο ανάπτυξης οστεοπενίας και οστεοπόρωσης (83).

Σεξουαλικές διαταραχές: Η έννοια αυτή εμπεριέχει 3 μείζονες διαστάσεις που περιλαμβάνουν τη σεξουαλική ταυτότητα, τη σεξουαλική δυσλειτουργία και τις σεξουαλικές σχέσεις (95).

Η περίπτωση της *σεξουαλικής ταυτότητας* επηρεάζεται στην περίπτωση που η ασθενής υποβληθεί σε μαστεκτομή. Ο μαστός ως σύμβολο θηλυκότητας και ομορφιάς, ειδικότερα στις νεότερες γυναίκες, επηρεάζει κατά πολύ την ψυχολογία και την αυτοπεποίθησή τους μετά την απώλεια αυτού του προτύπου σώματος (96).

Η *σεξουαλική δυσλειτουργία* είναι ένα αυξανόμενο φαινόμενο τόσο κατά τη διάρκεια όσο και μετά τη θεραπεία. Η ποιότητα της σεξουαλικής επαφής μειώνεται αισθητά λόγω της κοιλικής ξηρότητας και δυσπαρενίας που προκύπτει από τη θεραπεία (97).

Η διάγνωση καρκινώματος του μαστού, καθώς και η θεραπεία φαίνεται να αυξάνουν τους ψυχικούς δεσμούς ενός ζευγαριού, αλλά να μειώνουν τις σεξουαλικές επαφές. Έχει αποδειχθεί πως όσο μεγαλύτερο είναι το διάστημα μεταξύ της χειρουργικής θεραπείας και σεξουαλικής επαφής τόσο μεγαλύτερος ο κίνδυνος διαταραχής των *σεξουαλικών σχέσεων* (98).

Με βάση τα ανωτέρω, η ηλικία είναι ένας παράγοντας που επηρεάζει προγνωστικά πολλές παραμέτρους. Ειδικότερα όσον αφορά στις νεαρές γυναίκες, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση, την πιθανότητα υποτροπής και την ποιότητα ζωής, καθιστώντας το υποσύνολο αυτό των γυναικών έναν πιο ευαίσθητο πληθυσμό.

ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ - ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Ο ιστολογικός τύπος, το μέγεθος του όγκου, η διαφοροποίησή του και η κατάσταση των επιχώριων μασχαλιαίων λεμφαδένων αποτελούν από τους σημαντικότερους προβλεπτικούς και προληπτικούς δείκτες, οι οποίοι αναφέρονται στην ιστολογική έκθεση ενός βιοπτικού ή χειρουργικού παρασκευάσματος.

Ιστολογικός τύπος, μέγεθος όγκου, βαθμός διαφοροποίησης: Οι μελέτες έχουν δείξει πως κάποιοι ιστολογικοί τύποι έχουν καλύτερη πρόγνωση από άλλους. Αυτό απορρέει και από το γεγονός ότι κάποιοι τύποι καρκινωμάτων μαστού έχουν εξ ορισμού καλύτερο βαθμό διαφοροποίησης από άλλα, π.χ. το σωληνώδες και ηθμοειδές καρκίνωμα μαστού (4). Το μέγεθος του όγκου και ο βαθμός διαφοροποίησης ήταν από τους πρώτους δείκτες που ανακαλύφθηκαν πως λειτουργούν προγνωστικά, από τους Bloom & Richardson. Οι δύο δείκτες αυτοί εμφανίζουν σχέση αντιστρόφως ανάλογη με την πρόγνωση, αφού όσο αυξάνουν τα μεγέθη αυτών η πρόγνωση καθιστάται δυσμενής (99).

Επιχώριοι μασχαλιαίοι λεμφαδένες: Το στάδιο της νόσου εξαρτάται από την ύπαρξη ή όχι μετάστασης στους επιχώριους λεμφαδένες, στοιχείο προγνωστικής σημασίας. Η παρουσία μεταστάσεων στους μασχαλιαίους

λεμφαδένες εμφανίζει γραμμική συσχέτιση με την πιθανότητα αλλά και το χρονικό εμφάνισης της τοπικής υποτροπής (100).

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ - ΕΚΦΡΑΣΗ ΟΡΜΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

Το στάδιο της νόσου, ο βαθμός διαφοροποίησης, καθώς και το ποσό έκφρασης των ορμονικών υποδοχέων του όγκου, αποτελούν τους ακρογωνιαίους λίθους της πρόγνωσης και των προβλεπτικών αλγορίθμων. Η εκτίμηση της έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων, προγεστερόνης και HER2 είναι απαραίτητη πληροφορία που δίνεται κατά τη διάγνωση των καρκινωμάτων του μαστού, αφού προσφέρει τόσο προγνωστικά όσο και προβλεπτικά στοιχεία, για την επιλογή και την αναμενόμενη ανταπόκριση σε συγκεκριμένους θεραπευτικούς παράγοντες. Οι ορμονικοί δείκτες ελέγχονται με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας, με την οποία εκτιμώνται το ποσό και η ένταση έκφρασής τους στους πυρήνες των κυττάρων. Το HER2 εκτιμάται με την μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας, τον φθορίζοντα *in situ* υβριδισμό (FISH) και τον χρωμογόνο *in situ* υβριδισμό (CISH) και τον *in situ* υβριδισμό αργύρου (SISH).

Οι υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης αποτελούν μέλη της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, οι οποίοι εν τη απουσία του συνδέτη τους βρίσκονται ανενεργά εντός του κυτταροπλάσματος συνδεδεμένοι με ‘heat shock’ πρωτεΐνες (101). Ασθενείς με καρκινώματα τα οποία εκφράζουν αυτούς τους υποδοχείς στα νεοπλασματικά τους κύτταρα είναι υποψήφιοι για θεραπεία με αντι-ορμονικούς παράγοντες, π.χ. ταμοφιζαΐνη. Οι παράγοντες αυτοί, συνδεδεμένοι στους υποδοχείς οιστρογόνων των καρκινικών κυττάρων, αναστέλλουν την έκφραση των

γονιδίων που παράγουν τον TGF- α μεταγραφικό παράγοντα, μειώνοντας έτσι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (102).

Οι ER διαχωρίζονται σε δύο επιμέρους υποτύπους, τους ER α και το ER β , με μικρές μόνο διαφορές μεταξύ των δύο. Έχει ανακαλυφθεί πως σε ένα ποσοστό περίπου 5-10%, σε ER αρνητικά μεταστατικά καρκινώματα μαστού η χορήγηση ταμοξιφαίνης έχει επίδραση στη θεραπεία, γεγονός που θεωρείται ότι οφείλεται στην υπέρξη περισσότερων ER β υποδοχέων (103).

Όσον αφορά στην προγνωστική αξία των ER, αυτή εως και σήμερα παραμένει μικρότερη από την προβλεπτική της αξία (104). Οι αρχικές μελέτες είχαν συνδέσει την έκφραση των ER με μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο νόσου και συνολικής επιβίωσης για τους ασθενείς. Πολλές ήταν επίσης και οι μελέτες που υποστήριζαν μειωμένη την πιθανότητα υποτροπών (105–108). Τις θεωρίες αυτές ακολούθησαν μελέτες με μεγαλύτερο χρονικό διάστημα παρακολούθησης, οι οποίες ανέδειξαν πως με το πέρασμα του χρόνου αυτές οι παράμετροι δεν φαίνεται να συσχετίζονται σημαντικά. Ωστόσο, η ετερογένεια των αποτελεσμάτων αυτών φάνηκε να οφείλεται στον διαφορετικό τρόπο εκτίμησης του δείκτη αυτού. Με βάση τα ανωτέρω, θεωρείται πως η έκφραση των ER φαίνεται να συσχετίζεται με την ταχύτητα ανάπτυξης του όγκου, παρά με την πιθανότητα μετάστασής του (109).

Ξεκινώντας από το 1970, πολλές είναι οι έρευνες που φαίνεται να συσχετίζουν τους ER με την ανταπόκριση στην ορμονοθεραπεία (110,111). Συμπεριλαμβάνοντας ασθενείς με σταθερή νόσο, περίπου το 60% αυτών με ER θετικά καρκινώματα μαστού ωφελούνται από τη χρήση ορμονοθεραπείας και εμφανίζουν σχέση γραμμική μεταξύ ποσού

ορμονοθετικότητας των όγκων και της ανταπόκρισης στην θεραπεία (109,112,113). Επιπλέον, όσοι ασθενείς έχουν ER θετικούς όγκους εμφανίζουν 40-50% μείωση της πιθανότητας υποτροπής, ανεξαιρέτως εμμηνορυσιακού κύκλου, μετά από 5ετή λήψη ταμοξιφαίνης (114). Κατ' αυτόν τον τρόπο, οι ER αποτελούν έναν προβλεπτικό δείκτη ανταπόκρισης των ασθενών με καρκίνωμα μαστού στην ορμονοθεραπεία.

Οι PR εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 1 και η έκφρασή τους συνδέεται άρρηκτα με αυτήν των ER, αφού αυξάνονται σε ιστούς που ανταποκρίνονται σε οιστρογόνα. Έτσι, η παρουσία των PR όχι μόνο τεκμηριώνει την ύπαρξη ER αλλά και την λειτουργικότητα αυτών, καθιστώντας τα έτσι καλύτερους προβλεπτικούς δείκτες για την ανταπόκριση στην ενδοκρινική θεραπεία από ότι οι ER (114,115).

Σε αντίθεση με τους ER, οι PR σχετίζονται κατά μεγαλύτερο βαθμό με τον εμμηνορυσιακό κύκλο της ασθενούς, και συγκεκριμένα την εμμηνόπαυση, παρά με την ηλικία. Προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες έχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις PR απο ότι οι μετεμμηνοπαυσιακές, προφανώς λόγω των υψηλότερων συγκεντρώσεων οιστρογόνων (111). Οι PR, όπως και οι ER, αναγνωρίζονται συχνότερα σε καλής παρά χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα μαστού.

Πολλές είναι οι μελέτες που έχουν αποδείξει την προβλεπτική αξία των PR σε προχωρημένα στάδια καρκινώματος του μαστού (115). Ασθενείς με καρκίνωμα μαστού σε προχωρημένο στάδιο (με μεταστάσεις) και αυξημένες συγκεντρώσεις PR έχουν αυξημένη πιθανότητα ανταπόκρισης στην ταμοξιφαίνη, μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο νόσου και μεγαλύτερο διάστημα συνολικής επιβίωσης (109). Ασθενείς με

μεταστατική νόσο έχουν πιθανότητα ανταπόκρισης στην ορμονοθεραπεία από περίπου 40% έως 60%, ανάλογα με το ποσό συγκέντρωσης PR (109).

Όπως και με τα ER έτσι και για τα PR, η προβλεπτική τους αξία είναι μεγαλύτερη από ότι η προγνωστική τους αξία (104,109). Αρχικά θεωρήθηκε πως, με βάση τον άρρηκτο δεσμό που έχει με τους ER, θα ήταν περισσότερο πιθανό η προγνωστική αξία αυτών να είναι όμοια με αυτά των ER. Ωστόσο, μετά από αρκετές μελέτες με μεγάλο δείγμα πληθυσμού, φάνηκε πως τα καρκινώματα που ήταν ER-θετικά/PR-αρνητικά εμφάνιζαν έως και 28% μεγαλύτερη πιθανότητα υποτροπής και έως και 2,6 φορές μεγαλύτερη θνητότητα σε αντίθεση με τα ER-θετικά/PR-θετικά καρκινώματα. Έτσι, τα αποτελέσματα αυτά κατέταξαν τα PR σε έναν θετικό προγνωστικό δείκτη (116).

Το *Human epidermal growth factor receptor-2* (HER2/erbB-2) είναι ένα Πρωτο-ογκογονίδιο που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17q21. Αυτό κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, την p185^{HER2}, η οποία ονομάζεται HER2 πρωτεΐνη ή υποδοχέας (117). Η HER2 ανήκει στην οικογένεια των EGFR υποδοχέων, η οποία συνολικά απαρτίζεται από τέσσερα μέλη/γονίδια, που κωδικοποιούν τους υποδοχείς HER1 (EGFR ή C-erbB-1), HER2 (C-erbB-2 ή neu), HER3 (C-erbB-3) και HER4 (C-erbB-4), αντίστοιχα (118). Η ενεργοποίηση των HER υποδοχέων μέσω της δραστηριότητας της τυροσινικής κινάσης οδηγεί σε μεταφορά σήματος και ενεργοποίησης του πυρήνα για κυτταρικό πολλαπλασιασμό (119).

Η HER2 εντοπίζεται τόσο σε κύτταρα φυσιολογικών όσο και νεοπλασματικών ιστών. Στα ανθρώπινα έμβρυα έχει ανιχνευθεί στον νευρικό ιστό, στα οστά, στον μυϊκό ιστό, στο δέρμα, στην καρδιά, τους πνεύμονες και το γαστρεντερικό σύστημα (120,121). Μετά τη γέννηση η

HER2 συμμετέχει ενεργά στην ανάπτυξη του μαστικού αδένου, ενώ εκφράζεται και σε άλλους τύπους κύτταρων πλην του αιμοποιητικού συστήματος (122,123). Η υπερέκφραση της HER2 σχετίζεται με μια ποικιλία καρκίνων, μεταξύ αυτών και του μαστού.

Ο υποδοχέας HER αποτελείται από τρία επιμέρους τμήματα, το εξωκυττάριο, το λιπόφιλο διαμεμβρανικό τμήμα (εντός της κυτταρικής μεμβράνης) και το ενδοκυττάριο. Το εξωκυττάριο τμήμα είναι το σημείο όπου ενώνεται ο προσδέτης. Στο διαμεμβρανικό τμήμα λαμβάνει μέρος η αλληλεπίδραση της τυροσινικής κινάσης με τα σηματοδοτούμενα μόρια. Αυτό προκαλεί διμερισμό της τυροσινικής κινάσης και αυτο-φωσφορυλίωση, που έχει αποτέλεσμα την ενεργοποίηση διάφορων μεταγραφικών λειτουργιών (124). Στο ίδιο σημείο πρόσδεσης των σηματοδοτούμενων μορίων, το διαμεμβρανικό τμήμα, προσδέονται και τα αντισώματα κατά τον ανοσοϊστοχημικό έλεγχο ποσού έκφρασης του HER2.

Κάθε υποδοχέας HER έχει ειδικούς προσδέτες που ενώνονται και ενεργοποιούν τις μεταγραφικές λειτουργίες, εκτός από τον HER2. Μέχρι και σήμερα δεν έχει ανευρεθεί ειδικός προσδέτης του υποδοχέα αυτού. Έρευνες έχουν δείξει πως παρά την απουσία ειδικών προσδετών για την ενεργοποίησή του, αυτός καθίσταται λειτουργικός μέσω των προσδετών άλλων υποδοχέων της οικογενείας HER (125). Έτσι, η HER2 θεωρείται ως ένας συν-υποδοχέας, ο οποίος έχει τη δυνατότητα να ετεροδιμερίζεται και να συμμετέχει στην ενεργοποίηση και μετάδοση σήματος χωρίς να έχει κάποιον ειδικό προσδέτη (119). Κατ' αυτόν τον τρόπο εξηγείται η υπερέκφραση/ενίσχυση του HER2 στα καρκινώματα, όπου ενισχύεται η πρόσδεση χαμηλής συγγένειας προσδετών στο HER2, με αποτέλεσμα την αύξηση της ενδοκυττάριας σηματοδότησης (125).

Η εξέταση της πρωτεΐνης HER2 σήμερα είναι απαραίτητη σε κάθε περιστατικό καρκινώματος μαστού. Αυτή εφαρμόζεται σε ιστολογικό υλικό κύβων παραφίνης με διάφορες μεθόδους, όπως με την ανοσοϊστοχημεία (IHC) και τον φθορίζοντα *in situ* υβριδισμό.

Η ενίσχυση του HER2 παρατηρήθηκε αρχικά σε καρκινώματα μαστού και έπειτα σε καρκινώματα ωοθηκών, πνεύμονα, στομάχου και στοματικής κοιλότητας (126–130). Η υπερέκφραση/ενίσχυση του HER2 αναγνωρίζεται στο 15%-20% των καρκινωμάτων μαστού και σχετίζεται με σημαντική μείωση του χρόνου συνολικής επιβίωσης και υποτροπής, σε σχέση με ασθενείς που δεν εμφανίζουν την υπερέκφραση. Επιπλέον, οι ασθενείς με καρκινώματα μαστού που εμφανίζουν ενίσχυση του HER2 αποτελούν υποψήφιους με αυξημένη ευαισθησία στην ανταπόκριση σε αντι-HER2 θεραπεία ο συνδυασμός trastuzumab και χημειοθεραπείας (131). Με βάση τα ανωτέρω, ο HER2 αποτελεί έναν δείκτη με προγνωστική αλλά και προβλεπτική σημασία (132).

Πέρα από την προβλεπτική και προγνωστική σημασία του κάθε δείκτη μεμονωμένα, φαίνεται πως και ο συνδυασμός αυτών δίνει επιπλέον πληροφορίες. Έτσι, καρκινώματα τα οποία είναι ER/PR θετικά τείνουν να έχουν καλύτερο βαθμό διαφοροποίησης, καλύτερη έκβαση και είναι υποψήφια για ενδοκρινική θεραπεία, σε αντίθεση με τα ER/PR αρνητικά καρκινώματα (114,115). Καρκινώματα τα οποία είναι ER/PR/HER2 αρνητικά κατατάσσονται, όπως περιγράφηκε παραπάνω, στα τριπλά αρνητικά καρκινώματα. Λίγες είναι οι γνώσεις μας για τα τριπλά αρνητικά καρκινώματα και την παρούσα περίοδο γίνονται μεγάλες μελέτες αποκρυπτογράφησης αυτού του μοριακού τύπου καρκινώματος σε υποτύπους οι οποίοι θα είναι κατάλληλοι για στοχευμένη θεραπεία με βάση το μικροπεριβάλλον αυτών (133).

5. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Πολλές είναι οι παράμετροι οι οποίες λαμβάνονται υπ' όψιν για τη θεραπεία του διηθητικού καρκινώματος μαστού, όπως τα επιμέρους κλινικά (π.χ ηλικιακή ομάδα) και ιστοπαθολογικά ευρήματα και ο μοριακός τύπος. Οι παράμετροι αυτές συνεχώς εμπλουτίζονται από νέες έρευνες και νέες ανακαλύψεις, οι οποίες συνεχώς μεταβάλλουν τα πρωτόκολλα θεραπείας, βαδίζοντας προς την εξατομικευμένη θεραπεία, με στόχο το όφελος των ασθενών.

ΕΝΤΟΠΙΣΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Χειρουργική θεραπεία

Όλα τα διηθητικά καρκινώματα μαστού, με εξαίρεση αυτά τα οποία συνοδεύονται από απομακρυσμένες μεταστάσεις, αφαιρούνται χειρουργικά (134). Συγκεκριμένα, σήμερα έχουμε τη δυνατότητα αποφυγής ριζικών και επίπονων χειρουργικών μαστεκτομών, όπως αυτές συνηθίζονταν στο παρελθόν. Σε διηθητικά καρκινώματα πρώιμου σταδίου, εφόσον τηρούνται συγκεκριμένες προϋποθέσεις, υπάρχει η δυνατότητα τμηματεκτομής, η οποία ανάλογα με τα ιστολογικά ευρήματα συμπληρώνεται θεραπευτικά από ακτινοβολία στην περιοχή και τη χρήση συστηματικής θεραπείας (135). Τα κύρια ιστολογικά ευρήματα που θα καθορίσουν τον τύπο της επιπρόσθετης θεραπείας είναι η ύπαρξη ή όχι διηθητικού καρκινώματος επί του χειρουργικού ορίου, η ύπαρξη ή όχι DCIS επί του ορίου, με θεμιτή απόσταση αυτού από το τελευταίο τα 2 mm, ο μοριακός τύπος καρκινώματος και η ύπαρξη ή όχι μετάστασης στους επιχώριους λεμφαδένες (136–139).

Οι περιπτώσεις κατά τις οποίες ακολουθείται μαστεκτομή καθορίζονται από το μέγεθος του όγκου, την πολυεστιακότητα, την αδυναμία επίτευξης καθαρών ορίων, το ιστορικό ακτινοβολίας στην περιοχή, την δυνατότητα πλαστικής αποκατάστασης και τη επιθυμία της ίδιας της ασθενούς (140).

Ακτινοβολία

Η ακτινοβολία χρησιμοποιείται συμπληρωματικά στις περιπτώσεις τμηματεκτομής ή μαστεκτομής, όπου τα χειρουργικά όρια του εγχειρητικού παρασκευάσματος έχουν διήθηση από DCIS ή διηθητικό καρκίνωμα (135). Επιπλέον, η ακτινοβολία χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις προχωρημένου σταδίου μεταστατικού καρκινώματος μαστού ως παρηγορητική θεραπεία, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις μεταστάσεων στο ΚΝΣ (141,142).

ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Ορμονοθεραπεία

Η ορμονοθεραπεία χρησιμοποιείται σε όλα τα καρκινώματα των οποίων τα νεοπλασματικά κύτταρα εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς, όπως είναι δηλαδή τα αυλικού τύπου καρκινώματα. Με την ορμονοθεραπεία επιτυγχάνεται η διακοπή ή και η καθυστέρηση της προόδου των ορμονοεξαρτώμενων καρκινωμάτων, διακόπτοντας με ποικίλους τρόπους την οδό σηματοδότησης των ορμονών. Για παράδειγμα, οι αγωνιστές GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) ή αλλιώς LH-RH (luteinizing hormone-releasing hormone) διακόπτουν την ωοθηκική λειτουργία, αναστέλλοντας το ερέθισμα για την παραγωγή ορμονών που

προέρχεται από την υπόφυση (143). Εναλλακτικά, υπάρχουν οι αναστολείς αρωματάσης, οι οποίοι απενεργοποιούν την αρωματάση, η οποία συμμετέχει στην παραγωγή οιστρογόνων από τους περιφερικούς ιστούς. Τέτοιους αποτελούν δύο μη στεροειδικές ουσίες, η Αναστοζόλη και η Λετροζόλη (Anastrozole and letrozole) και η στεροειδική αρωματάση Εξεμεστάνε (Exemestane) (144,145). Οι εκλεκτικοί ρυθμιστές υποδοχέων οιστρογόνων (Selective estrogen receptor modulators-SERMs) αποτελούν μόρια τα οποία συνδέονται στους υποδοχείς οιστρογόνων και εμποδίζουν τη σύνδεση με τα οιστρογόνα. Τον πιο γνωστό SERM αποτελεί η Ταμοξιφαίνη, η οποία δρα ως ανταγωνιστής οιστρογόνων στον μαστό, αλλά έχει την αντίθετη δράση στο ενδομήτριο (146). Η Φουλβεστράντη (fulvestrant) αποτελεί SERM με αποκλειστικά ανταγωνιστική δράση στον μαστό.

Με βάση τα ανωτέρω, στις προεμμηνορρυσιακές γυναίκες που εμφανίζουν αυλικού τύπου διηθητικά καρκινώματα μαστού οι γενικές οδηγίες είναι να λαμβάνουν GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) και Ταμοξιφαίνη ως συστηματική θεραπεία, εκτός κάποιων εξαιρέσεων. Για τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες φαίνεται πως η θεραπεία εκλογής είναι οι αναστολείς αρωματάσης με ή χωρίς συμπληρωματική θεραπεία με Ταμοξιφαίνη (135,147,148).

Χημειοθεραπεία

Η χημειοθεραπεία χρησιμοποιείται κατ' εξοχήν για τη θεραπεία HER2 θετικών και τριπλά αρνητικών καρκινωμάτων μαστού, καθώς και στις περιπτώσεις υψηλού κινδύνου αυλικού τύπου Β καρκινωμάτων μαστού. Αυτή χορηγείται είτε προεγχειρητικά είτε μετεγχειρητικά. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα σχήματα αποτελούν οι ανθρακυκλίνες και οι

ταξάνες, ωστόσο σε ειδικές περιπτώσεις χρησιμοποιείται ακόμη η cyclophosphamide/methotrexate/5-fluorouracil (CMF) (135). Σε αντίθεση με την ορμονοθεραπεία, η οποία διατηρεί θετικά αποτελέσματα σε βαθος χρόνου, η χημειοθεραπεία χρησιμοποιείται για τα άμεσα αποτελέσματα που προκαλεί, μειώνοντας τον ρυθμό της ανεξέλεγκτης ανάπτυξης του νεοπλασματος (149). Η άμεση αυτή ανταπόκριση των καρκινωμάτων στη χημειοθεραπεία οφείλεται στο γεγονός ότι αυτή στοχεύει στην κυτταρική διαίρεση.

Οι ανθρακυκλίνες που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία των καρκινωμάτων του μαστού αφορούν Δοξουβικίνη, Επιρουβικίνη και το PLD (pegylated lipodoxorubicin), με την πρώτη να είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη. Οι ανθρακυκλίνες λειτουργούν καταστρέφοντας το γενετικό υλικό των νεοπλασματικών κυττάρων (144). Η λειτουργία αυτή, όμως, δεν περιορίζεται μόνο στα νεοπλασματικά κύτταρα, με αποτέλεσμα να προκαλούνται αρκετές και βαριές ανεπιθύμητες ενέργειες με τη χορήγηση τους, όπως καρδιοτοξικότητα και αιματολογικές διαταραχές (150).

Η Ντοσεταξέλη και η Πακλιταξέλη (docetaxel and paclitaxel), αποτελούν ταξάνες οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία καρκινώματος του μαστού. Η χρήση τους αποτελεί πρώτη γραμμή επιλογής, ειδικά στις περιπτώσεις όπου έχει προηγηθεί θεραπεία με ανθρακυκλίνες κατά την οποία υπήρξε πρόοδος ή υποτροπή της νόσου (151,152).

ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Όπως αναφερθήκαμε εκτενώς ανωτέρω, όταν τα νεοπλασματικά κύτταρα εκφράζουν εμφανίζουν ενίσχυση του HER2 η διαμεμβρανική

πρωτεΐνη αυτών εκφράζεται σε ανώμαλα υψηλά επίπεδα λειτουργώντας έτσι ως υποδοχέας HER2 (153). Καρκινώματα των οποίων τα νεοπλασματικά κύτταρα εμφανίζουν HER2 ενίσχυση αναφέρονται ως HER2 θετικά καρκινώματα και συνήθως εμφανίζουν αντίσταση προς την ορμονοθεραπεία (154). Για τον λόγο αυτόν, στα καρκινώματα αυτά είναι αναγκαία η χρήση στοχευμένης θεραπείας, η οποία αφορά σε φάρμακα με αντί-HER2 δράση, όπως είναι η Τραστουζουμάμπη ή αλλιώς Herceptin.

6. ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΟΝ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΝ

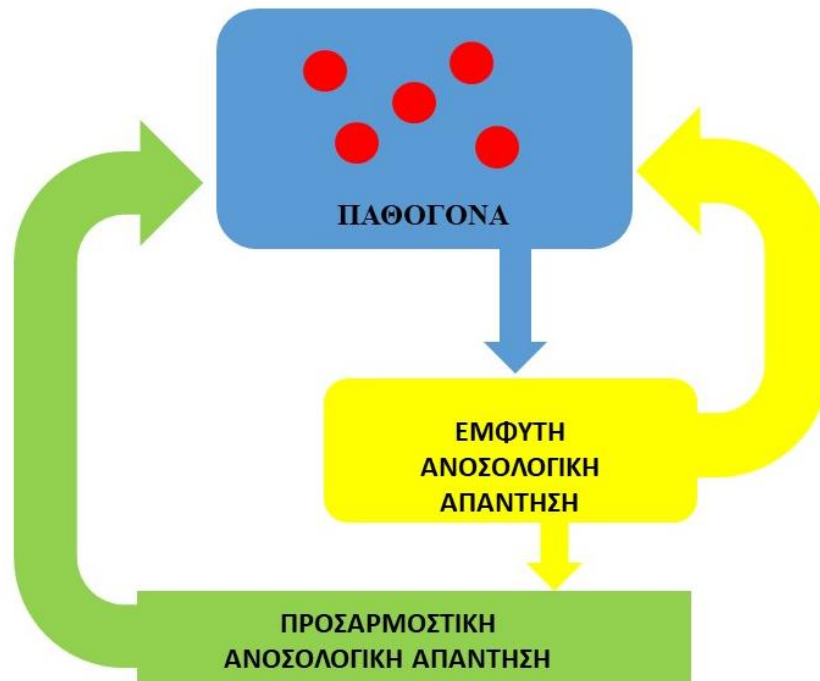
Μη νεοπλασματικά στοιχεία που συμβάλλουν στην ετερογένεια του καρκινώματος του μαστού αποτελούν οι διαλυτές εξωκυττάρειες πρωτεΐνες, ινοβλάστες, το ενδοθήλιο, τα λιποκύτταρα, τα μακροφάγα και άλλα λευκοκύτταρα (155). Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στα στοιχεία του μικροπεριβάλλοντος του καρκίνου του μαστού, διερευνώντας τις κλινικές επιπτώσεις (156,157).

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Μια θεμελιώδης λειτουργία του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος είναι να αναγνωρίζει και να εξαλείφει ανωμαλίες που προκύπτουν από την εμφάνιση νεοπλασματικών νεοαντιγόνων (immune-surveillance/ανοσοεπιτήρηση).

Το ανοσολογικό σύστημα του ανθρώπου στηρίζεται σε δύο μεγάλους πυλώνες: Την *έμφυτη* (innate)/φυσική ανοσολογική απάντηση και την *προσαρμοστική* ανοσολογική απάντηση, καθεμία από τις οποίες

λειτουργεί μεμονωμένα, αλλά και σε συνδυασμό με την άλλη (Εικόνα 2)(158).



Εικόνα 2: Οι δύο πυλώνες της ανοσολογικής απάντησης του ανθρώπου προς τον ξενιστή

Η έμφυτη ανοσολογική απάντηση αποτελεί την πρώτη και παλαιότερη γραμμή υπεράσπισης του ανθρώπινου οργανισμού. Αποτελείται από φυσικά, βιοχημικά και κυτταρικά στοιχεία υπεράσπισης. Φυσικά στοιχεία υπεράσπισης αποτελούν οι ανατομικοί φραγμοί, όπως το δέρμα και οι βλεννογόνοι. Βιοχημικά αποτελούν τα διάφορα πεπτίδια, πρωτεΐνες κ.ά., ενώ στα κύτταρα υπεράσπισης συμπεριλαμβάνονται τα μαστοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα κύτταρα-φυσικοί φονείς, τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα και τα ηωσινόφιλα κοκκικοκύτταρα. Η έμφυτη ανοσολογική απάντηση αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας στον οργανισμό, δρώντας άμεσα εντός των πρώτων ωρών/ημερών έναντι του ξενιστή περιορίζοντας την εξάπλωσή του.

Η *προσαρμοστική* ανοσολογική απάντηση αποτελεί τη δεύτερη γραμμή υπεράσπισης του οργανισμού. Αυτή ενεργοποιείται 4-7 μέρες μετά από αυτή της έμφυτης ανοσολογικής απάντησης, εφόσον αυτή δεν μπορέσει να περιορίσει και να εξουδετερώσει τον ξενιστή. Η προσαρμοστική ανοσολογική απάντηση είναι ειδική ως προς το παθογόνο που παρουσιάζεται, έτσι πιο εξειδικευμένη ως απάντηση από την έμφυτη. Ορόσημο της απάντησης αυτής αποτελεί ο ταχύς πολλαπλασιασμός των T και B λεμφοκυττάρων. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό αποτελεί η ‘μνήμη’ των T λεμφοκυττάρων, ικανότητα η οποία επιτρέπει την άμεση ανταπόκρισή τους στην περίπτωση που το αντιγόνο επανεμφανιστεί σε δεύτερο χρόνο.

Δεδομένου ότι οι διαγνώσεις των καρκινωμάτων μαστού λαμβάνουν μέρος αφού υπάρξει μια ανιχνεύσιμη/ψηλαφητή μάζα, ήδη αυτά έχουν διαφύγει επιτυχώς από τον κύκλο αυτόν της ανοσοπαρακολούθησης. Ωστόσο, η κατάσταση, ακόμα και στο στάδιο αυτό, μπορεί να αντιστραφεί είτε με τη χρήση χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας, οι οποίες θα προκαλέσουν την παραγωγή νέων αντιγόνων, που θα ενεργοποιήσουν την ανοσοαπάντηση, είτε με τη χρήση νέων θεραπειών, που επανενεργοποιούν την ανοσιακή απάντηση προς τον νεοπλασματικό ιστό. Τα τελευταία αποτελούν αναστολείς σημείων ελέγχου ανοσιακής απάντησης (immune-checkpoint inhibitors) εξατομικευμένα αντικαρκινικά εμβόλια (personalized cancer vaccines) και προσαρμοστική T κυτταρική θεραπεία (adoptive T-cell therapy), θεραπείες που βρίσκονται ακόμα σε κλινικές δοκιμές (159).

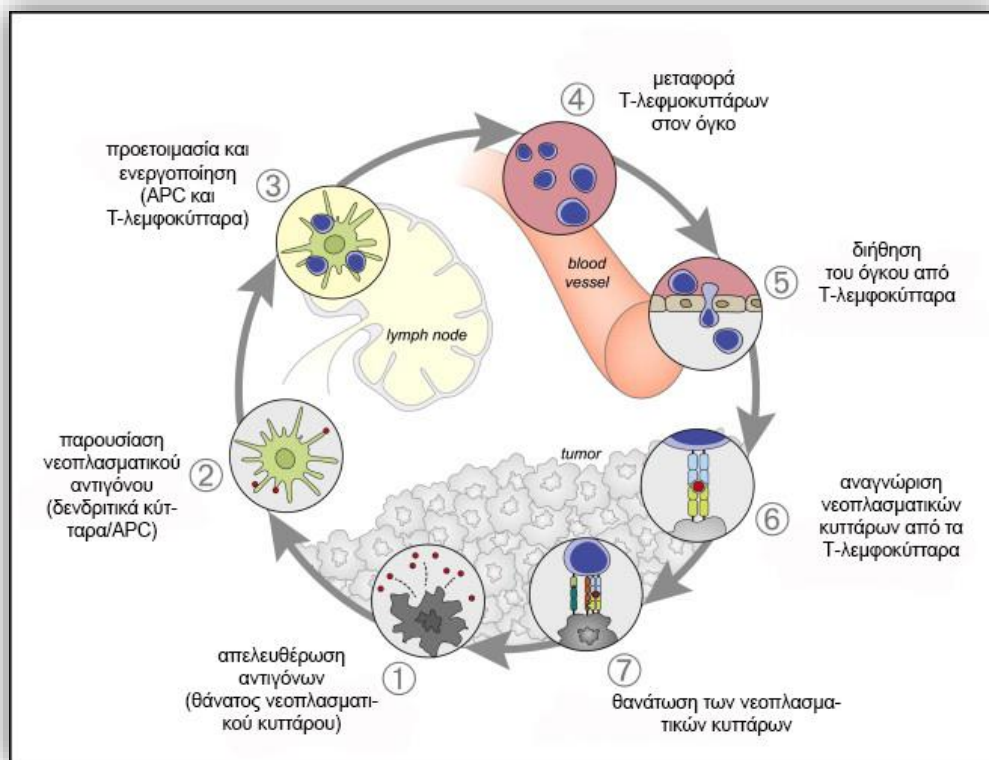
Έχει φανεί πως τριπλά αρνητικά καρκινώματα και HER2+ καρκινώματα εμφανίζουν μεγαλύτερο φορτίο μεταλλάξεων απ' ό,τι τα Luminal A και Luminal B, το οποίο προκαλεί υψηλότερα επίπεδα ογκο-

ειδικών αντιγόνων, γεγονός που οδηγεί σε μεγαλύτερη και πιο ισχυρή ανοσολογική απάντηση (160–162).

Για να κατανοήσει κανείς καλύτερα τα στάδια της ανοσολογικής απάντησης θα πρέπει να αντιληφθεί τον κύκλο σταδιακών γεγονότων που ακολουθεί αυτή απέναντι στα καρκινώματα/ξενιστές, με σκοπό την εξάλειψή τους (163):

1. *Πρώτο στάδιο:* Κατά την κακρινογένεση παράγονται και απελευθερώνονται νεο-αντιγόνα στην κυκλοφορία, τα οποία αιχμαλωτίζονται από τα δενδριτικά κύτταρα μέσω των MHC I και MHC II μορίων για επεξεργασία. Για να προκληθεί η ανοσολογική ανταπόκριση των T λεμφοκυττάρων στη σύνδεση αυτήν θα πρέπει να σηματοδοτηθούν από εξειδικευμένα σηματοδοτικά μόρια, όπως προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και παράγοντες που παράγονται είτε από τα αποπίπτοντα νεοπλασματικά κύτταρα είτε από τη χλωρίδα του εντέρου.
2. *Δεύτερο στάδιο:* Τα αντιγονοπαρουσιαστικά δενδριτικά κύτταρα (antigen presenting cells/APC) παρουσιάζουν τα αιχμαλωτισμένα νεο-αντιγόνα στα T λεμφοκύτταρα.
3. *Τρίτο στάδιο:* Η παρουσίαση αυτή έχει αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των εκτελεστικών T λεμφοκυττάρων (T-Effector Cells), με σκοπό την ανταπόκρισή τους στα νεο-αντιγόνα του καρκινώματος. Η φύση της ανοσιακής απάντησης θα εξαρτηθεί από την αναλογία των εκτελεστικών T λεμφοκυττάρων προς αυτή των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων (T-regulators cells/Tregs) στο σύνολο των ανταποκριθέντων T λεμφοκυττάρων.
4. *Τέταρτο στάδιο:* Το ενεργοποιημένο εκτελεστικό T λεμφοκύτταρο ταξιδεύει μέσω των αγγείων στον νεοπλασματικό ιστό.

5. *Πέμπτο στάδιο:* Φτάνοντας στον νεοπλασματικό ιστό, διηθεί το νεοπλασματικό στρώμα αυτού.
6. *Έκτο στάδιο:* Τα εκτελεστικά T λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν και προσδέονται στα νεοπλασματικά κύτταρα μέσω της αλληλεπίδρασης μεταξύ του T λεμφοκυτταρικού υποδοχέα και του αντιγόνου που βρίσκεται συνδεδεμένο στο ΜΗCI.
7. *Έβδομο στάδιο:* Με την ολοκλήρωση της σύνδεσης T λεμφοκύτταρο-νεοπλασματικό αντιγόνο το νεοπλασματικό κύτταρο εξαλείφεται. Ο θάνατος του νεοπλασματικού κυττάρου απελευθερώνει επιπλέον αντιγόνα στην κυκλοφορία, τα οποία θα συνεχίσουν και θα ενδυναμώσουν τον κύκλο της ανοσιακής απάντησης (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Ο κύκλος καρκίνου-ανοσολογικής απάντησης (Τροποποιημένο σχήμα από Chen D. και Mellman I., 2013)(160)

Η σημαντική αυτή κατανόηση της ανοσιακής απάντησης του οργανισμού έναντι των καρκινωμάτων επήλθε με τη διαπίστωση πως ο κύκλος αυτός

δεν λειτουργεί ιδανικά ως προς την εξάλειψη του καρκίνου, αφού στην αντίθετη περίπτωση ο οργανισμός ο ίδιος θα μπορούσε να εξαλείψει την ύπαρξη οποιασδήποτε νεοπλασματικής εξεργασίας.

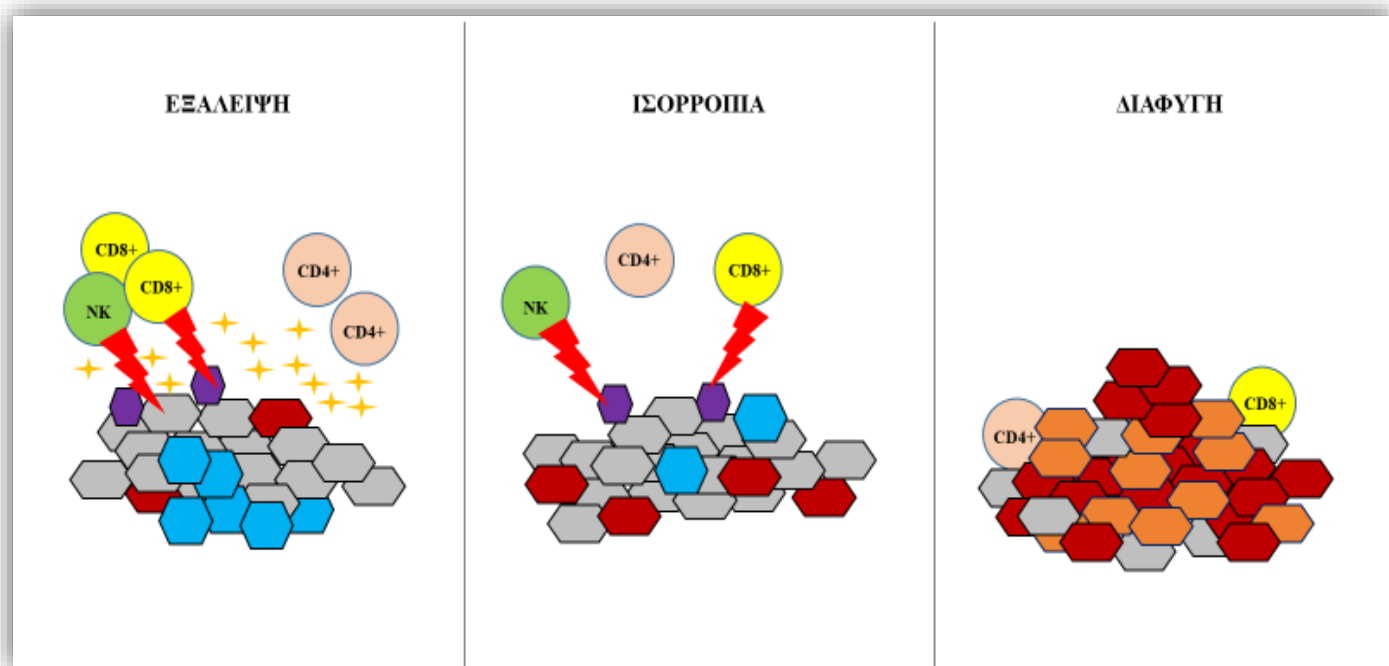
Η παρατήρηση αυτή οδήγησε αρκετούς ερευνητές να χρησιμοποιούν τον όρο ‘ανοσο-επεξεργασία’ (*immunoediting*) έναντι του όρου ‘ανοσο-επιτήρηση’, διαχωρίζοντας την απάντηση του οργανισμού έναντι των καρκινωμάτων σε 3 στάδια.

Το 1^ο στάδιο, ‘η εξάλειψη’ (*elimination*), αποτελεί την ανοσολογική απάντηση του οργανισμού προς τη διηθητική ανάπτυξη του καρκινώματος, όπως αυτή περιγράφεται ανωτέρω.

Το 2^ο στάδιο αποτελεί την ‘ισορροπία’ (*equilibrium process*), κατά την οποία τα νεοπλασματικά κύτταρα τα οποία έχουν επιβιώσει από τη φάση εξάλειψης και τα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος έρχονται σε μια δυναμική ισορροπία. Η κοίτη του όγκου (*tumor bed*) περιέχει πολλά γενετικά ασταθή και ταχέως μεταλλάσσόμενα νεοπλασματικά κύτταρα. Σε αυτή τη φάση όσα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν επιβιώσει ανιχνεύονται και εξαλείφονται, αλλά τα νέοσχηματιζόμενα φέρουν μεταβολές ανθεκτικές προς την αρχική ανοσολογική απάντηση. Η όλη αυτή διαδικασία αποτελεί και την πιο χρονοβόρα από τα τρία στάδια, διαρκώντας μέχρι και χρόνια.

Στο τρίτο στάδιο, αυτό της ‘διαφυγής’ (*escape*), τα νεοπλασματικά κύτταρα έμφανίζουν πλέον ισχυρή αντίσταση ως προς την αναγνώριση ή/και εξουδετέρωση τους από το ανοσολογικό σύστημα, μέσω των

γενετικών και επιγενετικών αλλαγών, με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους (Εικόνα 4) (164).



Εικόνα 4: Ανοσοεπεξεργασία. Η 'εξάλειψη' αντιστοιχεί στην ανοσοπαρακολούθηση. Στο στάδιο της 'ισορροπίας' η συνεχής ανοσολογική απάντηση και αλληλεπίδραση της με τα νεοπλασματικά κύτταρα δημιουργεί ένα νεοπλασματικό στρώμα (tumor bed) που περιέχει πολλά γενετικά ασταθή και ταχέως μεταλλάσσόμενα νεοπλασματικά κύτταρα. Η 'διαφυγή' αποτελεί το στάδιο όπου τα νεοπλασματικά κύτταρα αναπτύσσουν ισχυρή αντίσταση προς την ανοσολογική απάντηση με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους.

Πράσινο: κύτταρα φυσικοί φονείς, Κίτρινο: CD8+ T-λεμφοκύτταρα, Ροζ: CD4+ T-λεμφοκύτταρα, Πορτοκαλί αστέρι: Κυτταροκίνες, Γκρι: κύτταρα στρώματος, Μπλε: νεοσχηματισθέντα νεοπλασματικά κύτταρα, Κόκκινος κεραυνός: κυτταροτοξική αντίδραση T-λεμφοκυττάρων έναντι των νεοπλασματικών κυττάρων, Μωβ: Εξουδετερωμένο νεοπλασματικό κύτταρο, Κεραμιδί: τύπος νεοπλασματικού κύτταρου, Πορτοκαλί: Νεοπλασματικό κύτταρο ανθεκτικό προς την ανοσολογική απάντηση.

Συμπερασματικά, σε κάθε στάδιο μπορεί να υπάρξουν επιπλοκές, με αποτέλεσμα τη διατάραξη της ομαλής ροής του κύκλου της ανοσιακής απάντησης. Σε κάποιες περιπτώσεις τα νεο-αντιγόνα που παράγονται από τα καρκινικά κύτταρα δεν αναγνωρίζονται και διαφεύγουν των δενδριτικών κυττάρων, ενώ σε άλλες περιπτώσεις, όταν αυτά αιχμαλωτίζονται από τα δενδριτικά κύτταρα, αναγνωρίζονται ως αντιγόνα του ίδιου οργανισμού και όχι του όγκου, με αποτέλεσμα την κινητοποίηση των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων έναντι των εκτελεστικών. Σε άλλες

περιπτώσεις, τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα δεν μπορούν να μεταναστεύσουν στον όγκο ή να διηθήσουν το στρώμα ή και καταστέλλεται η λειτουργία τους από άλλα στοιχεία του μικροπεριβάλλοντος (165).

Το κάθε στάδιο στον κύκλο της ανοσίας αποτελεί σταθμό (checkpoint) διερεύνησης με στόχο τη δημιουργία ανοσοθεραπειών που θα ενισχύσουν την ανοσιακή απάντηση προς τα καρκινικά κύτταρα, χωρίς αυτή να καταστεί επιβλαβής προς τα μη νεοπλασματικά κύτταρα (166,167).

Ένα πεδίο το οποίο έχει μελετηθεί και κατανοηθεί σε μεγάλο ποσοστό αποτελεί η συμμετοχή της αγγειακής αιμάτωσης στην πρόοδο της νόσου και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Ο συνεχής πολλαπλασιασμός που παρατηρείται στα συμπαγή νεοπλάσματα οδηγεί σε υποξία των ιστών και συνεχή αγγειογένεση, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός δυσλειτουργικού μικροαγγειακού υποστρώματος, στο οποίο παράδοξα υπάρχει μικρή και αργή αιματική ροή (168–170). Το γεγονός αυτό δεν επιτρέπει στον θεραπευτικό παράγοντα να διεισδύσει εύκολα στους ιστούς αυτούς και επιπλέον μειώνεται η αποτελεσματικότητα αυτού λόγω της υποξίας (171). Επιπλέον, η υποξία των ιστών σχετίζεται με μεσεγχυματικούς/stem cell υποτύπους, τη φλεγμονή, την ίνωση, τη μειωμένη απορρόφηση φαρμάκων και τη μείωση της ανοσοαπάντησης (172). Έτσι, οι γνώσεις αυτές βοήθησαν στη δημιουργία θεραπευτικών παραγόντων, που θα έχουν στόχο τη μείωση της αγγειογένεσης και τη δημιουργία ενός πιο ‘φυσιολογικού’ νεοπλασματικού υποστρώματος, όπως τους αναστολείς έναντι του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα ανάπτυξης και του υποδοχέα αυτών (VEGF/VEGFR).

Δύο άλλα πεδία στα οποία έχουν στραφεί την τελευταία πενταετία οι έρευνες είναι η κατανόηση της προγνωστικής και προβλεπτικής αξίας του ποσοστού των διηθούντων τον όγκο λεμφοκυττάρων (TILs) καθώς και στον άξονα PD1/PD-L1.

ΤΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΤΩΝ ΔΙΗΘΟΥΝΤΩΝ ΤΟΝ ΟΓΚΟ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ (TILs)

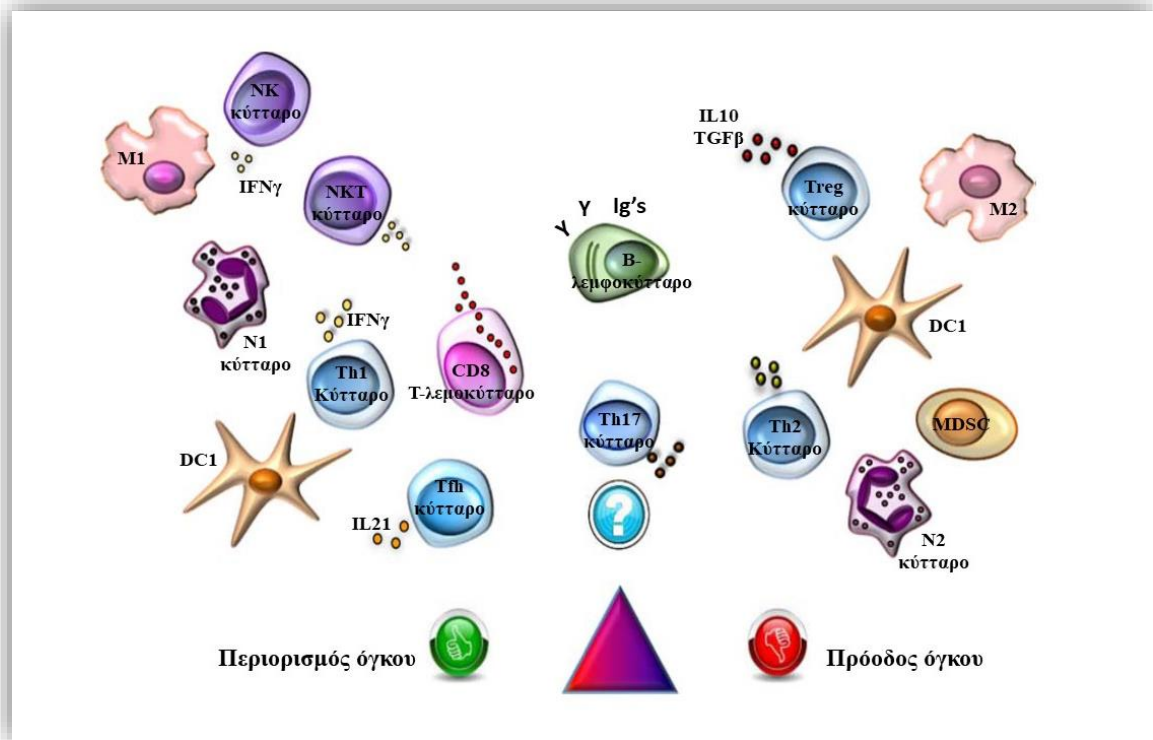
Με τις έρευνες να στρέφονται στη μελέτη του μικροπεριβάλλοντος του καρκινώματος του μαστού και άλλων συμπαγών όγκων, τεκμηριωμένα πια υπάρχουν αρκετά δεδομένα που να ανάγουν τα TILs σε δείκτη που μπορεί να ληφθεί υπ' όψιν και να συμμετέχει στη διαμόρφωση της κλινικής διαχείρισης των ασθενών.

Τα TILs μπορεί να λειτουργήσουν με δύο άκρως αντίθετους τρόπους, είτε ελέγχοντας την ανάπτυξη και πρόοδο του καρκινώματος είτε ανοσοκατασταλτικά, επιτρέποντας τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων (173). Η επίδραση και το αποτέλεσμα της παρουσίας των TILs εξαρτάται από το είδος και το ποσό των διάφορων μονοκυτταρικών φλεγμονωδών στοιχείων που την απαρτίζουν.

Τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα, τα CD4⁺ T βοηθητικά κύτταρα (T helper 1-Th1), που παράγουν ιντερφερόνη, τα κύτταρα-φυσικοί φονείς (natural killer cells), καθώς και μερικοί υπότυποι μακροφάγων, αποτελούν μονοκυτταρικά φλεγμονώδη στοιχεία που ελέγχουν την ανάπτυξη και την πρόοδο του καρκινώματος. Αντίθετα, η παρουσία T βοηθητικών κυττάρων 2 (T helper 2-Th2), M2 μακροφάγων, DC2 δενδριτικών κυττάρων, μυελικής προέλευσης ανοσοκατασταλτικών κυττάρων (myeloid-derived suppressor cells -MDSC) και FOXP3⁺ ρυθμιστικών T

λεμφοκυττάρων (Treg) σχετίζεται με λιγότερο ευνοϊκά αποτελέσματα ως προς τον περιορισμό των καρκινωμάτων (Εικόνα 5) (174). Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί πως η παρουσία NK και Th1 κυττάρων σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση, ενώ η παρουσία MDSC και Tregs καταστέλλει την ανοσολογική απάντηση έναντι του καρκίνου και έτσι μειώνει την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία (175–178). Τέλος, τα B λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα έχουν είτε ρυθμιστικό είτε εκτελεστικό χαρακτήρα, δρώντας κατασταλτικά ή διεγερτικά στην ανοσολογική απάντηση έναντι του καρκίνου. Η διαμόρφωση αυτή εξαρτάται από το πλαίσιο στο οποίο θα γίνει η αλληλεπίδραση.

Παρά την περιπλοκότητα που προκύπτει από τα ανωτέρω, δεν υπάρχει ακόμα σαφής οδηγία για την αναγνώριση του ποσού και του υποσυνόλου των TILs στα καρκινώματα μαστού, ενώ η χρήση ανοσοϊστοχημείας λαμβάνει μέρος κυρίως και στη διάκριση μεταξύ καρκινικών κυττάρων και TILs (179).



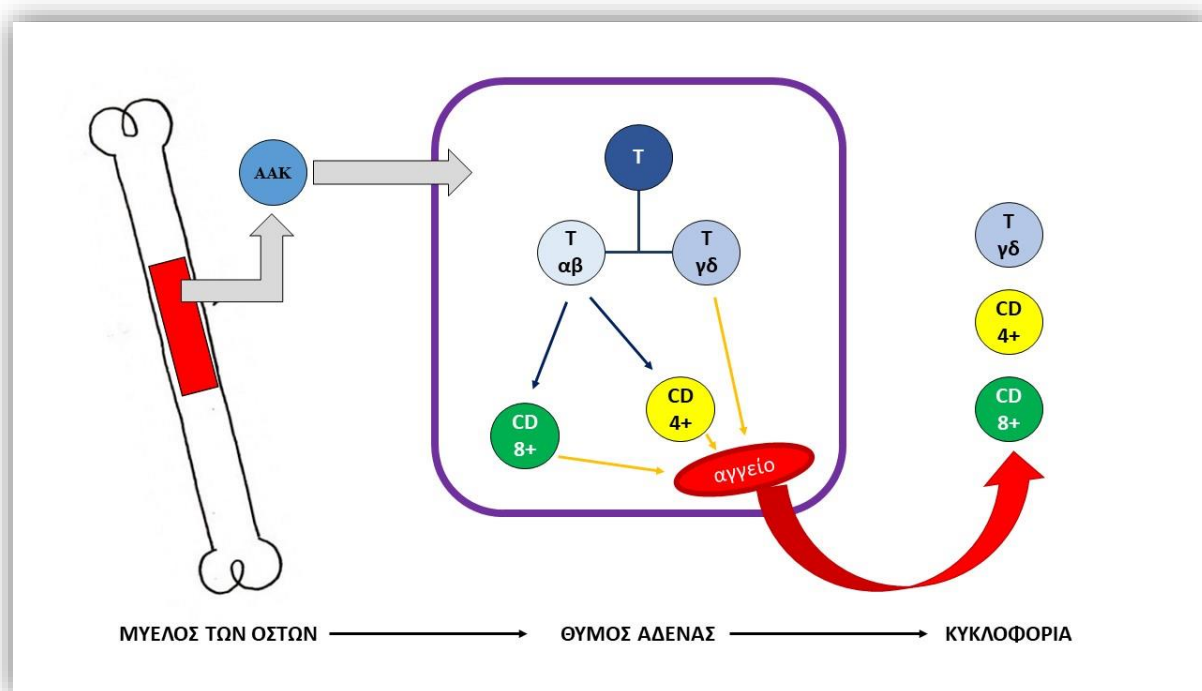
Εικόνα 5: Τα κυτταρικά στοιχεία της ανοσολογικής απάντησης μπορούν να ελέγξουν και να περιορίσουν την ανάπτυξη του όγκου ή να συνεισφέρουν στην δημιουργία ενός ανοσοκατασταλτικού περιβάλλοντος που θα επιτρέψει την πρόοδο και ανάπτυξη του όγκου.

M: μακροφάγο, DC: δενδριτικό κύτταρο, IFN γ : ιντερφερόνη γ , Ig's: ανοσοσφαιρίνες, IL10: ιντερλευκίνη-10, IL21: ιντερλευκίνη-21, MDSC: ανοσοκατασταλτικό κύτταρο προερχόμενο από τον μυελό, N: πολυμορφοπύρηνικο ουδετερόφιλο λευκοκύτταρο, NK: κύτταρα φονείς, NKT: T-λεμφοκύτταρα φυσικοί φονείς, Tfh: Βοηθητικό T-λεμφοκύτταρο του βλαστικού κέντρου, Th: Βοηθητικό CD4+ T-λεμφοκύτταρο, TGF β : Μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β , Treg: Ρυθμιστικό T-λεμφοκύτταρο. (Salgado et. al., 2017)(171)

T λεμφοκύτταρο

Τα T λεμφοκύτταρα προέρχονται από τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, τα οποία παράγονται κατά την εμβρυϊκή ηλικία στο ήπαρ, έπειτα στον μυελό των οστών και μέσω του θύμου αδένος διαφοροποιούνται στους διάφορους υποτύπους, που χαρακτηρίζονται από διαφορετικές μεταξύ τους λειτουργίες. Με την είσοδο των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στον θύμο αδένος, αυτά μπορεί να ωριμάσουν προς B ή T λεμφοκύτταρα, κύτταρα-φυσικούς φονείς (natural killer cells), μυελοειδή και δενδριτικά κύτταρα (180).

Τα Τ λεμφοκύτταρα διαχωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες η κάθε μια απο τις οποίες υποταξινομείται σε άλλες μικρότερες. Οι δύο αυτές κατηγορίες προκύπτουν από την διαμόρφωση των Τ κυτταρικών υποδοχέων (T cell receptor-TCR) εντός του θύμου αδένου, όπου η μια κατηγορία αφορά στα κύτταρα τα οποία διαμορφώνουν στις $\alpha\beta$ αλυσίδες του TCR και υποταξινομούνται αργότερα σε CD4+ και CD8+ Τ λεμφοκύτταρα και η άλλη κατηγορία αφορά στα κύτταρα που διαμορφώνουν τις $\gamma\delta$ αλυσίδες του TCR απο τα οποία θα δημιουργηθούν άλλοι υπότυποι Τ λεμφοκυττάρων με ειδικά λειτουργικά χαρακτηριστικά (εικόνα 6)(181,182).



Εικόνα 6: Ανάπτυξη Τ λεμφοκυττάρων και ωρίμανση αυτών

CD8+ T λεμφοκύτταρα

Τα CD8+ λεμφοκύτταρα ανήκουν στην ομάδα των εκτελεστικών T λεμφοκυττάρων, τα οποία είναι κυτταροτοξικά (CD8+ cytotoxic T lymphocytes - CTLs) (183). Αναγνωρίζει κακοήθη ή ιικά μολυσμένα κύτταρα και προκαλεί απόπτωση των κυττάρων στόχων με την απελευθέρωση κυτταρολυτικών κοκκίων ή με την έκφραση προσδεμάτων υποδοχέων θανάτου (death receptors), όπως είναι το FasL. Η αναγνώριση των αντιγόνων γίνεται μέσω του μορίου μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I, που εντοπίζεται στα διάφορα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (184,185).

CD3+ T λεμφοκύτταρα

Το CD3 (cluster of cell differentiation 3) αφορά ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών στο TCR που ενεργοποιεί τα άωρα T λεμφοκύτταρα σε CD8+ T λεμφοκύτταρα. Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από τέσσερις αλυσίδες, την CD3γ αλυσίδα, την CD3δ αλυσίδα και δύο CD3ε αλυσίδες (186). Η παρουσία του CD3 σε όλα τα στάδια διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων το καθιστά έναν χρήσιμο δείκτη για την ταυτοποίηση αυτών στους διάφορους ιστούς.

CD4+ T λεμφοκύτταρα

Τα CD4+ T λεμφοκύτταρα διαιρούνται σε πολλούς κυτταρικούς υποπληθυσμούς ή φαινότυπους, κάτι το οποίο καθορίζεται από τη φύση και συγκέντρωση των αντιγόνων, τον τύπο των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, τις κυτταροκίνες στις οποίες θα εκτεθούν καθώς και πληθώρα άλλων μορίων του μικροπεριβάλλοντος. Το CD4+ λεμφοκύτταρο

μετατρέπεται σε ένα T βοηθητικό κύτταρο (T-helper/Th) με σκοπό την ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων, μέσω κυτταροκινών, για την παραγωγή αντισωμάτων.

Συνολικά υπάρχουν 7 υπότυποι CD4⁺ T βοηθητικών κυττάρων. Τα Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh (Βοηθητικό T λεμφοκύτταρο του βλαστικού κέντρου) και τα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (Tregs).

Th1: Η μετατροπή προς Th1 προκαλείται μέσω των ιντερλευκινών 12 και 18 και των τύπου 1 Ιντερφερονών (Ιντερφερόνη-α και Ιντερφερόνη-β), που εκκρίνονται από τα δενδριτικά κύτταρα και μακροφάγα μετά την ενεργοποίησή τους από ενδοκυττάρια παθογόνα. Αυτό διεγείρει την ισχυρή ανοσολογική απάντηση έναντι των αντιγόνων, αλλά συμμετέχει και στην παθογένεια αυτοάνοσων νοσημάτων και την ανάπτυξη αντιδράσεων επιβραδυνόμενης υπερευαισθησίας (187).

Th2: Η μετατροπή προς αυτόν τον τύπο οφείλεται σε εξωκυττάρια παθογόνα, και στη διαδικασία αυτήν συμμετέχουν οι ιντερλευκίνες 4, 25, 33 και 11, που εκκρίνονται από τα μαστοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα κοκκιοκύτταρα και τα T λεμφοκύτταρα-φυσικούς φονείς (188).

Th9: Αυτός ο τύπος CD4⁺ λεμφοκυττάρου προκαλεί την άυξηση παραγωγής βλέννης, ηωσινοφιλίας, την υπερπλασία του επιθηλίου και τη μυϊκή σύσπαση ως απάντηση προς διάφορες αλλεργιογόνες διαδικασίες. Στη μετατροπή του συμμετέχουν οι Ιντερλευκίνες 9 και 10 (189).

Th17: Αυτά οφείλονται στη συνδυαστική δράση των Ιντερλευκινών 6, 21 και 23, καθώς και στον μεταμορφωτικό αυξητικό παράγοντα β (TGF-β). Τα Th17 εντοπίζονται κυρίως στον βλεννογόνο του γαστρεντερικού και

στον πνεύμονα και προάγουν την παραγωγή κυτταροκινών και φλεγμονωδών διαμεσολαβητών. Η παρουσία τους έχει συσχετισθεί με νοσήματα που συνοδεύονται από έντονα φλεγμονώδη περιβάλλοντα, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος κ.ά. (190).

Th22: Ο ρόλος τους είναι η παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων, η επαγωγή πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων και η συμμετοχή στην επούλωση του δέρματος. Στην διαμόρφωσή τους συμμετέχουν οι Ιντερλευκίνες 6 και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (TNF-α) (191).

Tfh: Εντοπίζονται στα βλαστικά κέντρα των λεμφαδένων και συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων για παραγωγή αντισωμάτων. Επιπλέον, συμμετέχουν στη δημιουργία βλαστικών κέντρων, τη μετατροπή Β λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα και την παραγωγή Β λεμφοκυττάρων μνήμης (192).

Ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (Tregs): Αποτελούν το 5%-10% των συνολικών βοηθητικών T λεμφοκυττάρων σε υγιείς ενήλικες. Θεωρούνται ανενεργά σε απουσία Ιντερλευκινών-2. Η δράση και η προέλευσή τους τα διαχωρίζει σε δύο υποτύπους, τα φυσικά Tregs προερχόμενα από τον θύμο αδένα και αυτά που παράγονται στην περιφέρεια (193,194). Η παραγωγή των Tregs είναι ουσιαστική για την αποφυγή αυτοάνοσων νοσημάτων σε περιπτώσεις παρατεταμένης ανοσολογικής απάντησης. Καταστέλλουν την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την εκτελεστική δράση ανοσολογικών κυττάρων όπως τα CD8⁺ και CD4⁺ T λεμφοκύτταρα. Έτσι, σε περιπτώσεις καρκινωμάτων τα Tregs συμμετέχουν στην ανοσοδιαφυγή τους (194).

Η μελέτη των TILs τα τελευταία χρόνια οδήγησε στη συσσώρευση αρκούντων δεδομένων ώστε να αποκτήσουν ενεργό ρόλο στην κλινική διαχείριση ασθενών. Αρχικά, γνωρίζουμε πως τα υψηλά TILs απαντώνται κυρίως σε τριπλά αρνητικά και HER2 θετικά καρκινώματα μαστού, καρκινώματα με υψηλό φορτίο μεταλλάξεων, σε αντίθεση με τα αυλικού τύπου καρκινώματα μαστού, των οποίων το φορτίο των μεταλλάξεων και κατ' επέκταση το ποσοστό των TILs είναι χαμηλό (117,195,196).

Τα TILs έχουν αποδειχθεί προγνωστικοί δείκτες, αφού πολλές είναι οι μελέτες και οι μετα-αναλύσεις, οι οποίες αποδεικνύουν πως η παρουσία υψηλού ποσοστού TILs σε τριπλά αρνητικά και HER2+ καρκινώματα αυξάνει τη διάρκεια ελεύθερης νόσου και τη συνολική επιβίωση, απ' ό,τι σε αυτά με χαμηλό ποσοστό (195,196).

Φαίνεται, επίσης, πως τα TILs μπορούν να δράσουν προβλεπτικά στην ανταπόκριση ορισμένων ασθενών με καρκίνωμα μαστού σε νεοεπικουρικές θεραπείες μέσω της διέγερσης της έμφυτης και προσαρμοστικής αντίστασης (197,198). Πολλές είναι οι μελέτες στις οποίες ασθενείς με τριπλά αρνητικά καρκινώματα μαστού και HER2+ καρκινώματα μαστού με υψηλά ποσοστά TILs που έλαβαν νεοεπικουρική χημειοθεραπεία είχαν και μεγαλύτερα ποσοστά πλήρους παθολογικής ανταπόκρισης (pathological complete response), καθώς και συνολικής επιβίωσης (199,200). Σημαντικό ρόλο στην πρόβλεψη πλήρους παθολογικής ανταπόκρισης φαίνεται να διαδραματίζει το σύνολο των συμμετέχοντων στο φλεγμονώδες διήθημα κυττάρων, αφού πολλές είναι οι μελέτες που έχουν συσχετίσει τα CD8+ T λεμφοκύτταρα με την αύξηση του χρόνου υποτροπής νόσου (201,202). Συγκεκριμένα, ασθενείς με υψηλότερες αναλογίες CD8+/CD4+ και CD8+/FOXP3+ κύτταρα

προθεραπευτικά έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα πλήρους παθολογικής αναπόκρισης (203).

Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, η ανοσολογική ανταπόκριση προς τον καρκίνο υπάρχει, ιδιαίτερα σε κάποιους ειδικούς υποτύπους καρκινωμάτων μαστού. Έτσι, η ενίσχυση της ανταπόκρισης αυτής αποτελεί αντικείμενο μελέτης των επιστημόνων, με τις έρευνες να στρέφονται κυρίως στον σχεδιασμό εμβολίων και επαγωγέων κυτταρικού θανάτου μέσω της ανοσολογικής απάντησης (inducers of immunogenic cell death) σε διάφορες κλινικές μελέτες ή/και στη χρήση ακτινοθεραπείας.

Η χρήση εμβολίου *μαστοσφαιρίνης-A* φαίνεται να συσχετίζεται με τη μείωση του ποσοστού των Tregs και αύξηση της παραγωγής Ιντερφερόνης γ, συμβάλλοντας έτσι στην ενίσχυση της ανοσολογικής απάντησης (204).

Το MUC-1, μια γλυκοπρωτεΐνη που εντοπίζεται στην επιφάνεια των κυττάρων, αναγνωρίζεται σε υψηλές ποσότητες στα νεοπλασματικά κύτταρα καρκινωμάτων μαστού. Ο σχεδιασμός εμβολίου με *αντι-MUC1* ιδιότητες σε αρχικές μελέτες φαίνεται να συμβάλλει στην παράταση επιβίωσης ασθενών με καρκίνο μαστού, ωστόσο χρειάζονται επιπλέον μελέτες προς επιβεβαίωση αυτού (205).

Το *PANVAC* αποτελεί εμβόλιο με γονίδια που στοχεύουν στο CEA και MUC-1, και στις υπάρχουσες μελέτες φαίνεται πως αυξάνει τον λόγο των κυτταροροξικών T-λεμφοκυττάρων/Tregs (206).

Οι ενέσιμοι *HER2* μεσολαβητές (*HER2* mediators) φαίνεται να αποτελούν υποσχόμενα θεραπευτικά μέσα, αυξάνοντας τον

πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων, ακόμα και στις περιπτώσεις καρκινωμάτων μαστού με ήπια έκφραση του HER2 στα νεοπλασματικά κύτταρα (207–209).

Οι *ανθρακυκλίνες*, αποτελούν χημειοθεραπευτικούς παράγοντες που φαίνεται να αυξάνουν την ανοσολογική απάντηση προς τον καρκίνο. Συγκεκριμένα, η χορήγησή τους προκαλεί αύξηση του ολικού αριθμού των T λεμφοκυττάρων και ειδικότερα των Tγδ κυττάρων που παράγουν IL-17, των αντιγονοπαρουσιαστικών δενδριτικών κυττάρων, καθώς και στην επαγωγή θανάτου ανοσολογικών κυττάρων (197,198,210–212).

Οι *ταξάνες* φαίνεται να επηρεάζουν την ανοσολογική απάντηση. Συγκεκριμένα, οι μελέτες έχουν δείξει πως αυξάνουν το ποσό της ανοσολογικής απάντησης μέσω της αύξησης των NK, των T λεμφοκυττάρων και της Ιντερφερόνης-γ. Επιπλέον, αυξάνουν την T λεμφοκυτταρική διήθηση και μειώνουν το ποσό των Tregs, των IL-1, TNF, των προσταγλανδινών E2, καθώς και τη μεταφορά σήματος στο STAT3 (213–217).

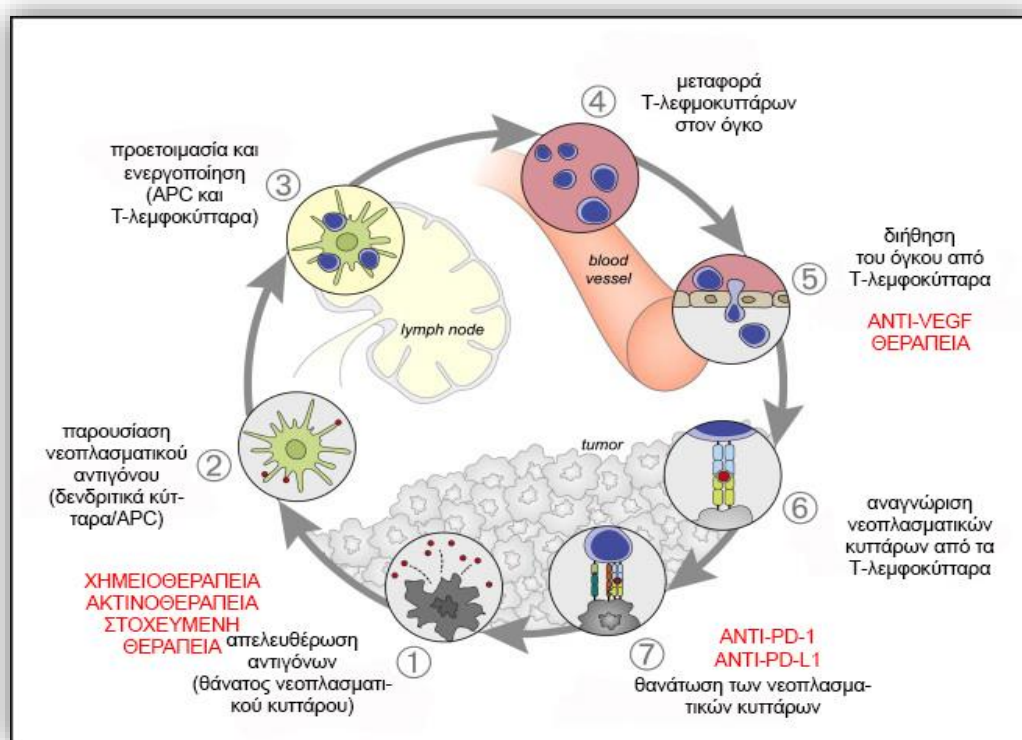
Η *carboplatin* συμβάλλει στη μείωση των Tregs και αύξηση της Ιντερφερόνης γ και των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων. Οι έρευνες δείχνουν πως τα TILs σε ασθενείς με TNBC και HER2⁺ καρκινώματα μαστού έχουν προβλεπτική αξία στις περιπτώσεις χορήγησης carboplatin (218,219).

Η *κυκλοφωσφαμίδη* αποτελεί ένα φάρμακο γνωστό για τις ανοσοκατασταλτικές του ιδιότητες. Ωστόσο, αυτές φαίνεται να εξαρτώνται από τον τρόπο χορήγησής του. Η μετρονομική χορήγηση σε μικρές δόσεις φαίνεται να ευνοεί την ανοσολογική απάντηση, μειώνοντας τον συνολικό αριθμό και τη δραστηριότητα των Tregs (212,214,220).

Η ακτινοθεραπεία αποτελεί ήδη μέρος υπαρχόντων πρωτοκόλλων θεραπειών στον καρκίνο του μαστού. Όσον αφορά στη συμμετοχή της ως επαγωγέα ανοσολογικής απάντησης έναντι των καρκινωμάτων μαστού, φαίνεται πως μπορεί να δράσει βοηθητικά. Η γ-ακτινοβολία φαίνεται πως μπορεί να προκαλέσει τον θάνατο των νεοπλασματικών κυττάρων μέσω της ανοσολογικής απάντησης, με τη διαδικασία της απόπτωσης που προκαλείται από την τριφωσφορική αδενοσίνη, την έκκριση πρωτεΐνης B1 και την έκφραση της καλρετικουλίνης (221).

Ο ΑΞΟΝΑΣ PROTEIN CELL DEATH 1/PROTEIN CELL DEATH LIGAND 1 (PD1/PD-L1)

Ένας άξονας ο οποίος παρουσιάζει ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον και συμμετέχει στον κύκλο της ανοσιακής απάντησης είναι αυτός του PD1/PD-L1 (εικόνα 7).



Εικόνα 7: Θεραπείες στόχοι – ανοσολογικός κύκλος (Τροποποιημένο σχήμα από Chen D. και Mellman I., 2013)(160)

PD1

Το PD1 είναι μια μοριακού βάρους 55KDa διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία αποτελεί συντονιστικό παράγοντα της οικογενείας B7/CD28. Εντοπίζεται μεταξύ άλλων στη μεμβρανική επιφάνεια CD8+ και CD4+ T λεμφοκυττάρων, σε κύτταρα-φυσικούς φονείς (Natural Killer cells), σε B λεμφοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα (222,223).

Η κύρια λειτουργία του PD1 είναι να περιορίζει την δραστηριότητα των T λεμφοκυττάρων στους περιφερικούς ιστούς μετά την ενεργοποίησή τους λόγω φλεγμονής και έτσι τον περιορισμό της αυτοάνοσης απάντησης (224–228). Κατ' αυτόν τον τρόπο, αποτελεί έναν ανασταλτικό μηχανισμό προς την αυτοάνοση απάντηση εντός του μικροπεριβάλλοντος των όγκων (229–231). Η έκφραση του PD1 προκαλείται με την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων (223). Η σύνδεση του PD1 με έναν από τους προσδέτες του, το PD-L1 ή το PD-L2, αναστέλλει την παραγωγή κινασών, οι οποίες υπό αντίθετες συνθήκες ενεργοποιούν τα T λεμφοκύτταρα μέσω της φωσφατάσης SHP2, αλλά και άλλων οδών (222).

PD-L1

Το PD-L1 ή αλλιώς B7H1 ή CD274 αποτελεί έναν από τους πιο μελετημένους προσδέτες του PD1. Εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ποικίλων τύπων κυττάρων, όπως των αιμοποιητικών π.χ. T λεμφοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα και μαστοκύτταρα, αλλά και σε μη αιμοποιητικά κύτταρα, όπως ενδοθηλιακά, επιθηλιακά και μυϊκά κύτταρα (232).

Τα επίπεδα του PD-L1 σε φυσιολογικούς ιστούς είναι εξαιρετικά χαμηλά, ενώ η συγκέντρωσή τους ανευρίσκεται υψηλή σε νεοπλασματικά κύτταρα (233).

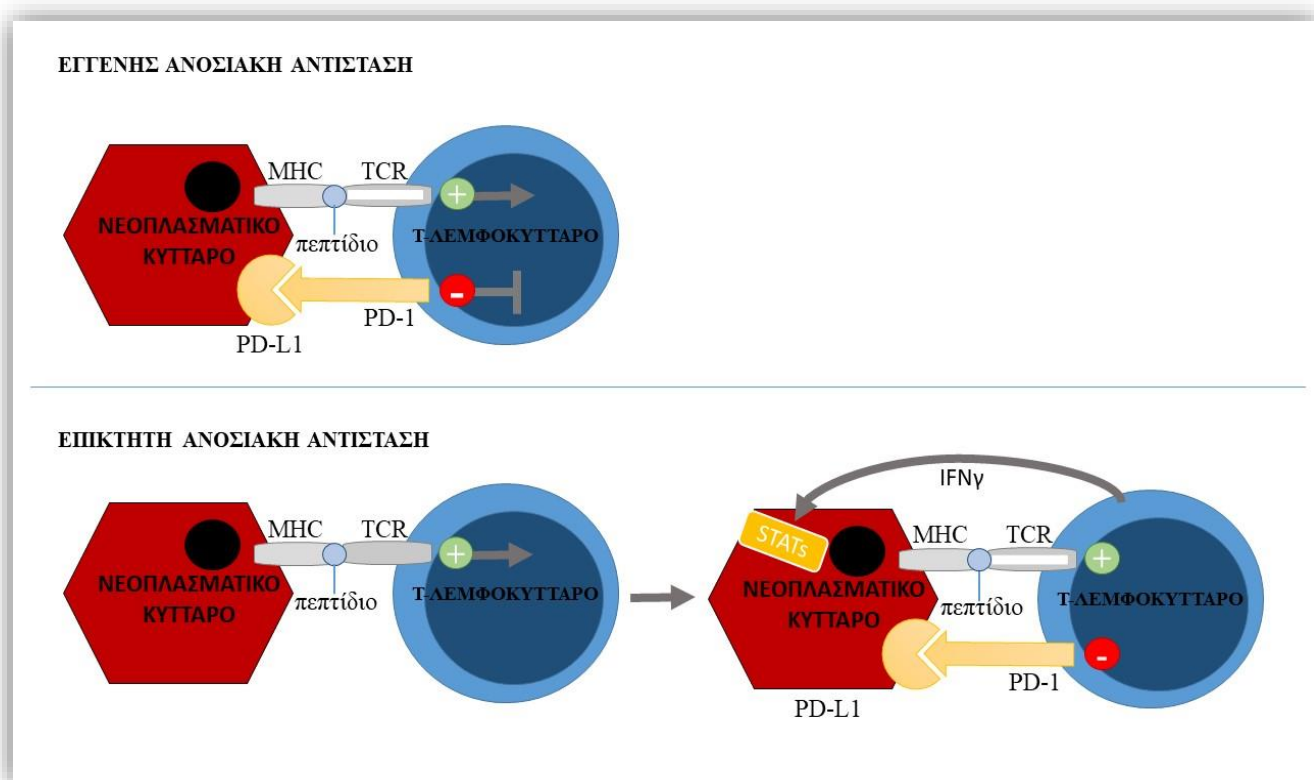
ΟΛΟΙ ΕΚΦΡΑΣΗΣ PD-L1 ΣΕ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΑ ΚΑΙ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΕΝΤΟΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ

Όλο και περισσότερες είναι οι ερευνητικές μελέτες που υποστηρίζουν πως η ανοσοθεραπεία μπορεί να αποβεί θεραπευτική σε καρκινώματα προχωρημένου σταδίου. Παρά την παρουσία κλινικών πλεονεκτημάτων με τη χρήση ανασταλτικών παραγόντων έναντι του άξονα PD1/PD-L1, η προβλεπτική αξία του PD-L1 δεν έχει ακόμα εδραιωθεί (234). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ενώ η έκφραση του PD-L1 στα νεοπλασματικά κύτταρα θα μπορούσε να αποτελέσει έναν πολλά υποσχόμενο βιοδείκτη ανταπόκρισης σε μια θεραπεία με παράγοντες έναντι του άξονα PD1/PD-L1, έχουν ανευρεθεί περιστατικά σε PD-L1 αρνητικούς ασθενείς με ανταπόκριση σε αντι-PD1/PD-L1 θεραπεία (235,236). Επιπλέον, υπάρχουν μελέτες που επιδεικνύουν μια συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης PD-L1 σε λεμφοκύτταρα και ανταπόκρισης σε αντι-PD1/PDL1 θεραπεία (237–239).

Δεδομένης της ετερογένειας έκφρασης του PD-L1 στους διάφορους ιστούς, είναι σημαντικό να κατανοήσουμε τη σηματοδότηση που προκαλεί την έκφραση του PD-L1 στα νεοπλασματικά και αιμοποιητικά κύτταρα εντός του μικροπεριβάλλοντος του καρκινώματος.

Δύο είναι οι μηχανισμοί ρύθμισης της έκφρασης του PD-L1, η *επίκτητη αντίσταση-εξωγενής μηχανισμός όγκου* και η *εγγενής αντίσταση-εσωτερικός*

μηχανισμός όγκου (Εικόνα 8). Στην πρώτη περίπτωση το νεοπλασματικό κύτταρο ενεργοποιεί τον ίδιο μηχανισμό που χρησιμοποιεί ένα φυσιολογικό κύτταρο, το οποίο σε περιπτώσεις όπου υπάρχει μια φλεγμονώδης απάντηση προς κάποιον ξενιστή εκφράζει PD-L1 με σκοπό να μετριάσει τη βλάβη που θα προκληθεί σε αυτό. Το PD-L1 εκφράζεται στα νεοπλασματικά κύτταρα ως ανταπόκριση σε φλεγμονώδη σήματα, όπως είναι οι ιντερφερόνες. Στη δεύτερη περίπτωση η έκφραση του PD-L1 αποτελεί μέρος εσωτερικών σηματοδοτικών οδών εντός του νεοπλασματικού κυττάρου. Τέτοιες οδοί είναι της *PI3K-AKT*, που παρατηρείται συχνότερα σε γλοιοβλαστώματα, η οδός του *ALK* (Anaplastic Lymphoma Kinase), που απαντάται κυρίως στα λεμφώματα, και σπανιότερα η οδός του *STAT3* (signal transducer and activator of transcription 3), που εντοπίζεται συχνότερα στα καρκινώματα του πνεύμονα (240).



Εικόνα 8: Εγγενής και επίκτητη ανοσολογική αντίσταση

ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ – ΣΤΟΧΟΙ

Οι πολλαπλές μελέτες που έχουν γίνει και συνεχίζουν να διεξάγονται επικεντρωμένες στον άξονα του PD1-PD-L1 στους συμπαγείς όγκους διάφορων συστημάτων έχουν ήδη κατά πολύ εμπλουτίσει τις γνώσεις των ερευνητών (237,241). Στον μαστό, η χρήση των αντι-PD-L1 παραγόντων βρίσκεται ακόμα στην φάση των κλινικών δοκιμών και περιορίζεται σε μεταστατικά καρκινώματα μαστού (242).

Το MPDL3280A (ATEZOLIZUMAB) αποτελεί μια ανθρώπινη IgG1, ένα μονοκλωνικό αντι-PD-L1 αντίσωμα με έναν τροποποιημένο Fc υποδοχέα. Ο τροποποιημένος αυτός Fc υποδοχέας αναστέλλει την εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταροτοξικότητα (antibody dependent cellular cytotoxicity- ADCC). Η μελέτη του σε διάφορες κλινικές δοκιμές μεταστατικών TNBC έδειξε πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα, με ένα συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης να κυμαίνεται από 19%-38%, πλήρη ανταπόκριση έως και 3%, μερική ανταπόκριση έως 34% και σταθερή νόσο έως και σε 44% των συμμετεχόντων (243,244).

Το AVELUMAB είναι επίσης μια ανθρώπινη IgG1 και ένα μονοκλωνικό αντι-PD-L1 αντίσωμα, το οποίο προσφέρει κλινικό όφελος σε ασθενείς με μεταστατικά TNBC. Συγκεκριμένα, σε κλινική δοκιμή 58 ατόμων με χρήση του AVELUMAB ως μονοθεραπεία το συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης ήταν 5,2%, με 3 εξ αυτών να έχουν μερική ανταπόκριση και 15 εξ αυτών να εμφανίζουν σταθερή νόσο. Κανένας ασθενής δεν εμφάνισε πλήρη ανταπόκριση. Η χρήση AVELUMAB σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικό παράγοντα σε άλλη κλινική δοκιμή με μεταστατικά τριπλά αρνητικά καρκινώματα μαστού (TNBC) ανέδειξε υψηλότερα ποσοστά συνολικής ανταπόκρισης, με 3% των συμμετεχόντων

να εμφανίζει πλήρη ανταπόκριση, 34% μερική ανταπόκριση και 44% αυτών σταθερή νόσο (244).

Δύο ακόμα παράγοντες που μελετώνται σε πολλαπλές κλινικές μελέτες, χωρίς ωστόσο να υπάρχουν ακόμα σαφή συμπεράσματα ως προς τον τρόπο και την απόδοση της χρήσης τους, αποτελούν το DURVALUMAB και το BMS-936559 (233,244).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ

Στην παρούσα αναδρομική μελέτη αρχικά αναζητήθηκαν στο ηλεκτρονικό αρχείο του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (GiCell) όλα τα καρκινώματα μαστού που διεγνώσθησαν το 2016. Τυπώθηκαν όλες οι εκθέσεις και επελέγησαν αυτές που αφορούσαν σε διηθητικά καρκινώματα μαστού. Όλα τα περιστατικά καταγράφηκαν σε αρχείο excel και μελετήθηκαν τα επιμέρους κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών και των καρκινωμάτων αυτών. Συγκεκριμένα, καταγράφηκαν το γένος και η ηλικία των ασθενών, ο ιστολογικός βαθμός κακοηθείας των καρκινωμάτων, ο ιστολογικός υπότυπος, η μέγιστη διάμετρος, ο αριθμός εστιών και η ύπαρξη ή όχι νεοπλασματικών εμβόλων, περινευρικής διήθησης ή/και η νεοπλασματική μετάσταση σε λεμφαδένα/ες. Επιπλέον, καταχωρήθηκαν ο βαθμός έκφρασης των οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων, η κατάσταση του HER2 και ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1/ki67 αυτών. Στο στάδιο αυτό, ο αριθμός περιστατικών που αφορούσε σε νεαρές γυναίκες (≤ 40 ετών) ήταν περιορισμένος (4 περιστατικά). Για τον λόγο αυτόν προβήκαμε επιπλέον σε μια αναδρομική αναζήτηση δεκαετίας στο ηλεκτρονικό αρχείο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (έως και το 2007), ώστε να συλλέξουμε ικανό αριθμό περιστατικών που αφορούσαν σε νεαρές γυναίκες και έτσι να κάνουμε μια πιο ολοκληρωμένη μελέτη. Ανευρέθησαν συνολικά 104 ασθενείς, όλες γυναίκες, με μέση ηλικία τα 35 έτη (20-40 ετών).

Η πλειονότητα των καρκινωμάτων ήταν μη ειδικού τύπου, ενώ 3/104 (2,9%) ήταν νευροενδοκρινικά, ένα ήταν λοβιακό, ένα βλεννώδες, ένα μεταπλαστικό, ένα μικροθηλώδες, ένα συμπαγές θηλώδες, ένα ενδοκυστικό θηλώδες και ένα μεικτού τύπου καρκίνωμα.

Από το σύνολο αυτό των νεαρών γυναικών, για περαιτέρω διερεύνηση επηλέγησαν μόνο όσα καρκινώματα μαστού ήταν μη ειδικού τύπου και επρόκειτο για χειρουργικά παρασκευάσματα μαστού. Από το αρχειακό υλικό του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων αναζητήθηκε σε κάθε περιστατικό μια ιστική τομή αιματοξυλίνης-ηωσίνης που περιείχε κέντρο και περιφέρεια του όγκου. Από τα 90 περιστατικά τελικά συνελλέχθησαν 45, είτε γιατί τα υλικά των ασθενών είχαν διεκδικηθεί από τους ασθενείς, είτε γιατί δεν περιείχαν αρκετή έκταση όγκου ή/και περιφέρειάς του, είτε γιατί αφορούσαν σε βιοπτικό υλικό (οι βιοψίες μαστού δεν συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη αυτήν). Αφού ανευρέθηκε η καλύτερη τομή αιματοξυλίνης-ηωσίνης, συνελλέχθησαν και οι αντίστοιχοι κύβοι παραφίνης. Αυτοί περιέχουν αντιπροσωπευτική τομή του νεοπλάσματος που κατά την μακροσκοπική επεξεργασία (όταν αυτή έγινε σε παρελθόντα χρόνο) μονιμοποιήθηκαν εγκαίρως, σε διάλυμα ουδέτερης φορμόλης, επεξεργάστηκαν βάσει πρωτοκόλλου και εγκλείστηκαν σε κύβους παραφίνης. Απο τον κάθε κύβο παραφίνης κόπηκαν στον μικροτόμο 10 τομές πάχους 3-4 μm για περαιτέρω ανοσοϊστοχημικό έλεγχο (CD3+, CD8+, PD-L1).

ΜΕΘΟΔΟΣ

Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά ασθενών και καρκινωμάτων αυτών

Δεδομένου ότι η μελέτη είναι αναδρομική, πολλά από τα δεδομένα συσχέτισης υπήρχαν από τις υπάρχουσες ιστολογικές εκθέσεις που ανασύρθηκαν από το αρχειακό υλικό του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Συγκεκριμένα, κατεγράφησαν το γένος και η ηλικία των ασθενών, ο βαθμός διαφοροποίησης των καρκινωμάτων, ο ιστολογικός υπότυπος, η μέγιστη διάμετρος, ο αριθμός εστιών και η ύπαρξη ή όχι νεοπλασματικών εμβόλων, η περινευρική διήθηση ή/και η νεοπλασματική μετάσταση σε λεμφαδένα/ες. Παράλληλα, καταχωρήθηκαν ο βαθμός έκφρασης των οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων, το HER2 και ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1/ki67 αυτών. Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, τα δεδομένα καταγράφηκαν σε αρχείο excel.

Εκτίμηση του ποσοστού μονοκυτταρικών φλεγμονωδών κυττάρων (TILs)

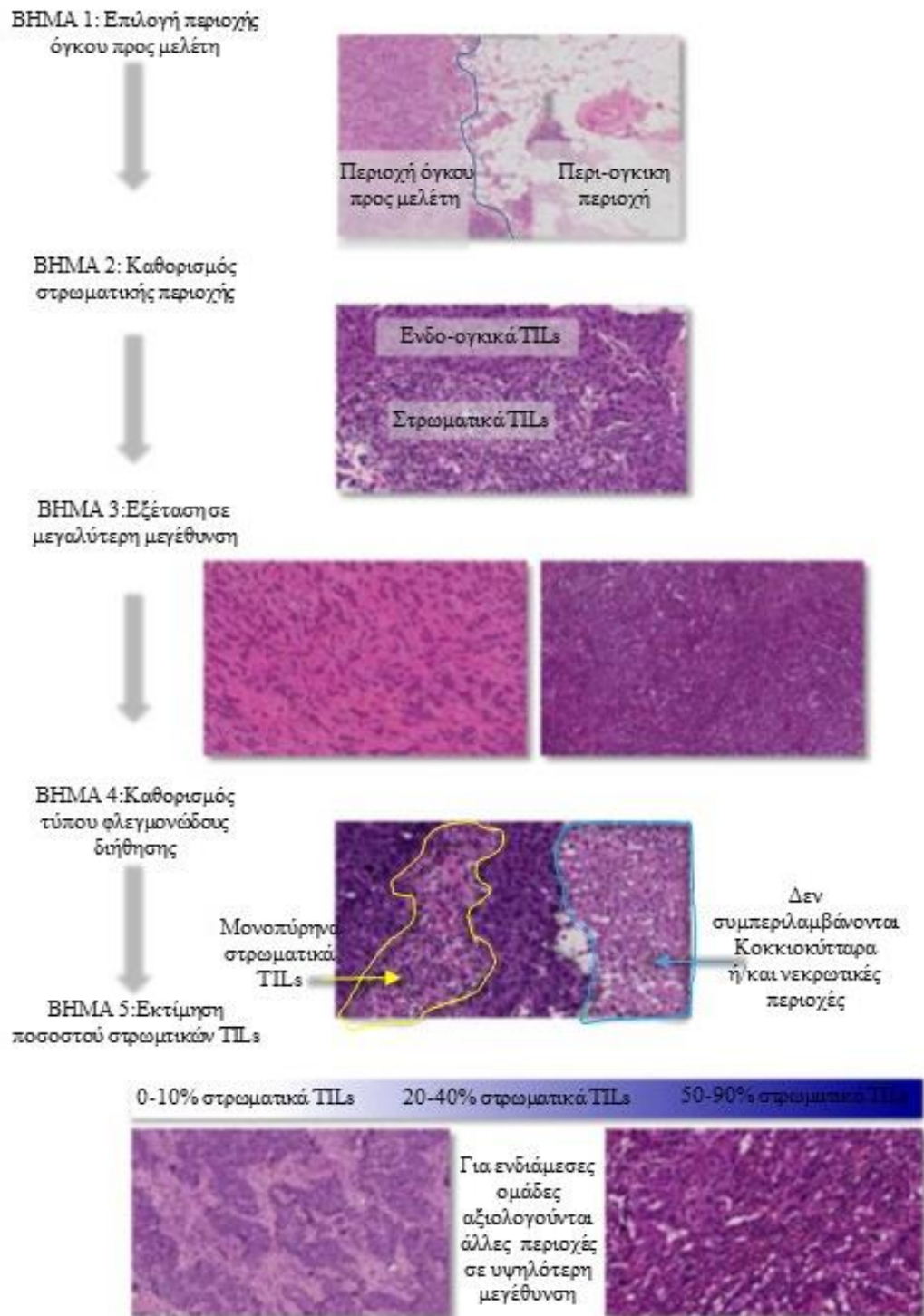
Στις ιστολογικές τομές αιματοξυλίνης ηωσίνης που συνελλέχθησαν και επελέχθησαν τελικά για συμμετοχή στη μελέτη έγινε εκτίμηση του ποσοστού μονοκυτταρικών φλεγμονωδών κυττάρων (TILs) που διηθούσαν το νεοπλασματικό στρώμα σύμφωνα με τις προτεινόμενες οδηγίες της διεθνούς ομάδας εργασίας των TILs (174).

Η επιλογή των 45 πλακιδίων (από 45 ασθενείς) έγινε ώστε να υπάρχει σαφής απεικόνιση του διηθητικού ορίου του καρκινώματος,

καθώς και επαρκής νεοπλασματικός ιστός για την εκτίμηση του ποσοστού των TILs στο στρώμα, καταλήγοντας τελικά στο αντιπροσωπευτικότερο για την κάθε ασθενή πλακίδιο (245).

Στην μελέτη αυτήν έγινε εκτίμηση του ποσοστού των στρωματικών TILs με βάση τις τελευταίες οδηγίες των Salgado et al. (171). Σύμφωνα με αυτές, υπάρχουν τα εξής στάδια (Εικόνα 9):

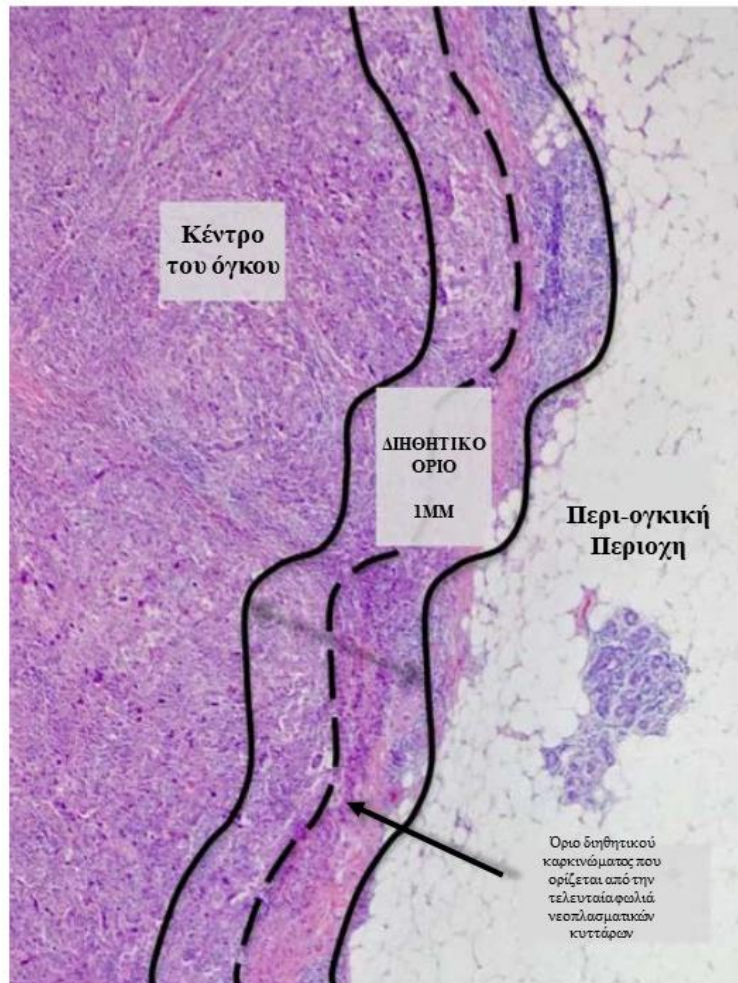
1. Επιλογή της περιοχής του όγκου που θα μελετηθεί
2. Προσδιορισμός στρωματικών και ενδο-ογκικών TILs
3. Σάρωση του όγκου σε μικρή μεγέθυνση
4. Διάκριση τύπου φλεγμονώδους διήθησης
5. Εκτίμηση ποσοστού TILs στο νεοπλασματικό στρώμα



Εικόνα 9: Τυποποιημένη προσέγγιση για την αξιολόγηση των TILs στον καρκίνο του μαστού (Salgado et. al., 2015)(176)

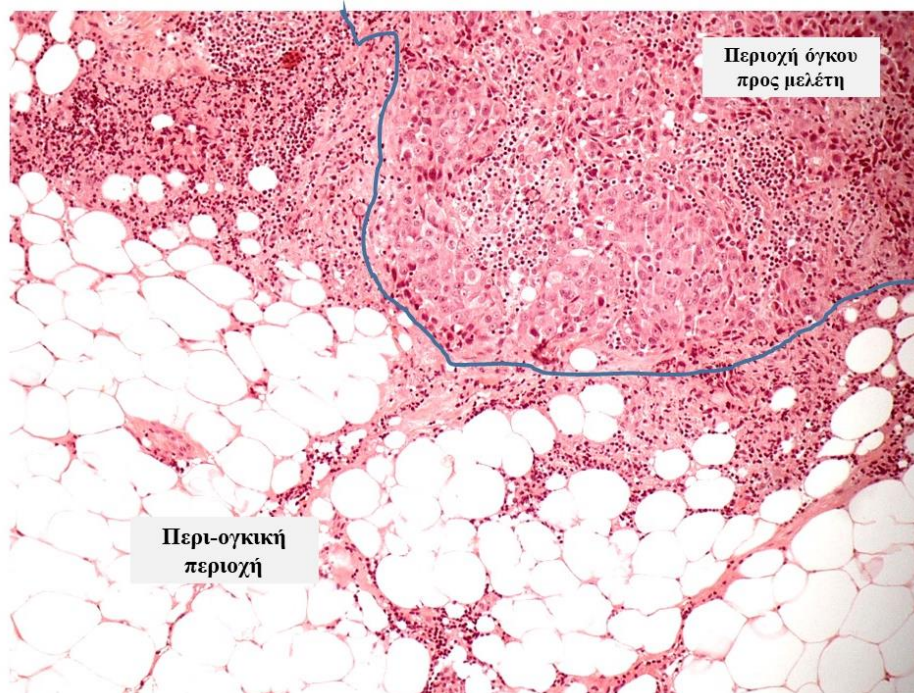
Η εκτίμηση έγινε με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου συμπαρατήρησης από μια παθολογοανατόμο και την ερευνήτρια, κατά τη διάρκεια της οποίας ελήφθησαν υπ' όψιν και οι εξής παράμετροι (174):

- Τα TILs εκτιμήθηκαν εντός των ορίων του διηθητικού καρκινώματος, συμπεριλαμβάνοντας το κέντρο του όγκου και τα διηθητικά όρια. Διηθητικό όριο αποτελεί η περιοχή 1 χιλιοστού που διαχωρίζει το νεοπλασματικό κύτταρο στην περιφέρεια του διηθητικού καρκινώματος από τον λοιπό μαζικό αδένα της ασθενούς. Το κέντρο του όγκου ορίζεται ως όλη η λοιπή περιοχή του καρκινώματος από το νεοπλασματικό κύτταρο που αναφέρεται ανωτέρω (Εικόνες 10 και 11).
- TILs εκτός των ορίων που αναφέρονται ανωτέρω ονομάζονται 'περιογικά TILs' και δεν συμπεριελήφθησαν στη μέτρηση.
- TILs σε περιοχές με μηχανικές αλλοιώσεις, νέκρωση, αντιδραστική υαλοειδοποίηση σε περιοχές απ' όπου έχει ληφθεί βιοψία δεν συμπεριελήφθησαν στη μέτρηση.
- Το ποσοστό των TILs εκτιμήθηκε μόνο με βάση τα μονοπύρρηνα φλεγμονώδη κύτταρα. Τα πολυπύρρηνα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα δεν συμπεριελήφθησαν στη μέτρηση αυτήν.
- Αν και η εκτίμηση του ποσοστού των TILs σε μόνο ένα πεδίο (4-5 μm , μεγέθυνση X200 έως 400) ανά ασθενή θεωρείται επαρκής, εφόσον υπήρχε η δυνατότητα εκτίμησης περισσότερων πεδίων, αυτά καταγράφονταν και κατέληγε με έναν μέσο όρο, αποφεύγοντας τις μετρήσεις που αφορούσαν μόνο 'hot spots'.

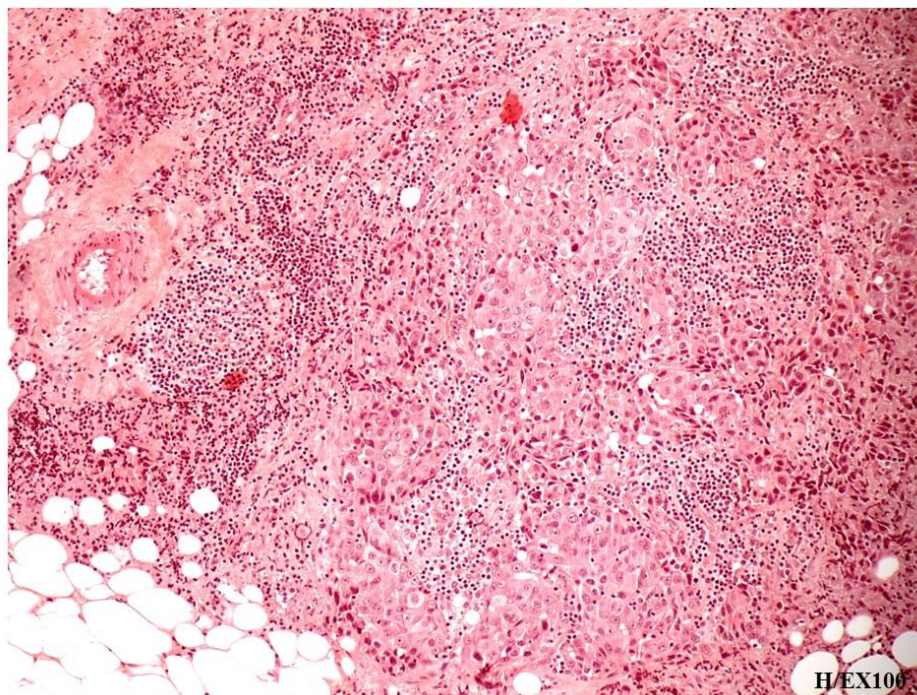


Εικόνα 10: Περιοχές του διηθητικού καρκινώματος όπως ορίζονται από τον Salgado et. al. 2017 (171).

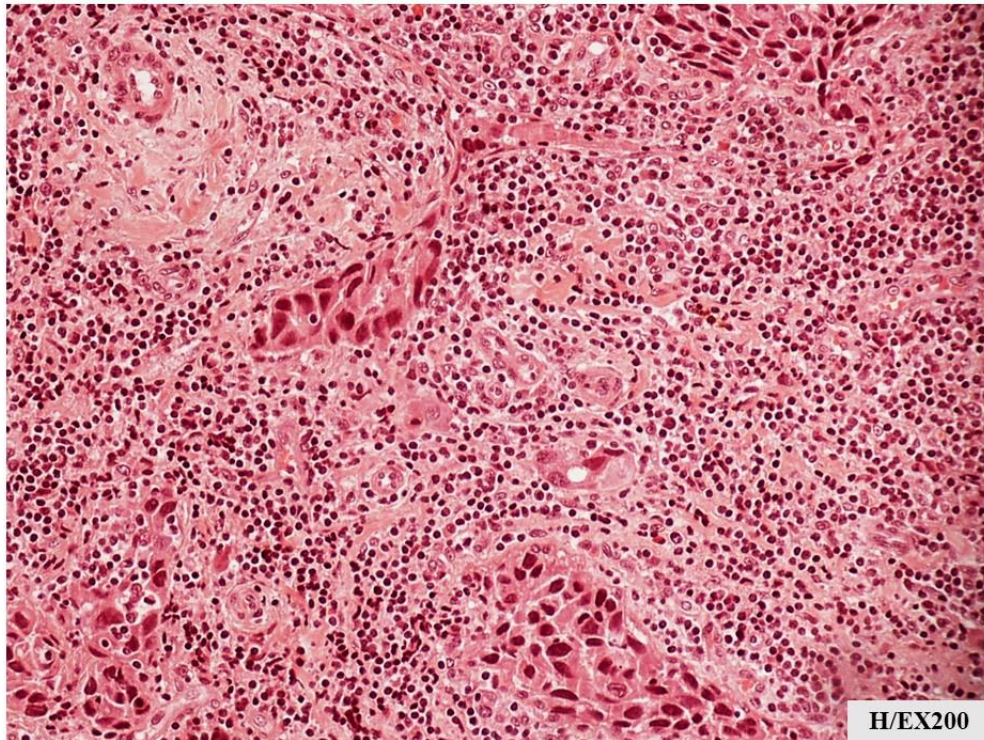
Μετά τη λεπτομερή καταμέτρηση των ποσοστών των TILs, τα καρκινώματα αρχικά διαχωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες $\leq 10\%$, 11-60% και $>60\%$, με βάση τις αρχικές κατευθυντήριες οδηγίες που υπήρχαν στη βιβλιογραφία τη δεδομένη περίοδο. Αυτές οι τρεις κατηγορίες τελικά διαχωρίστηκαν σε δύο, με χαμηλά TILs να ορίζεται το ποσοστό $<60\%$ και υψηλά TILs αυτά που είναι $\geq 60\%$ (179).



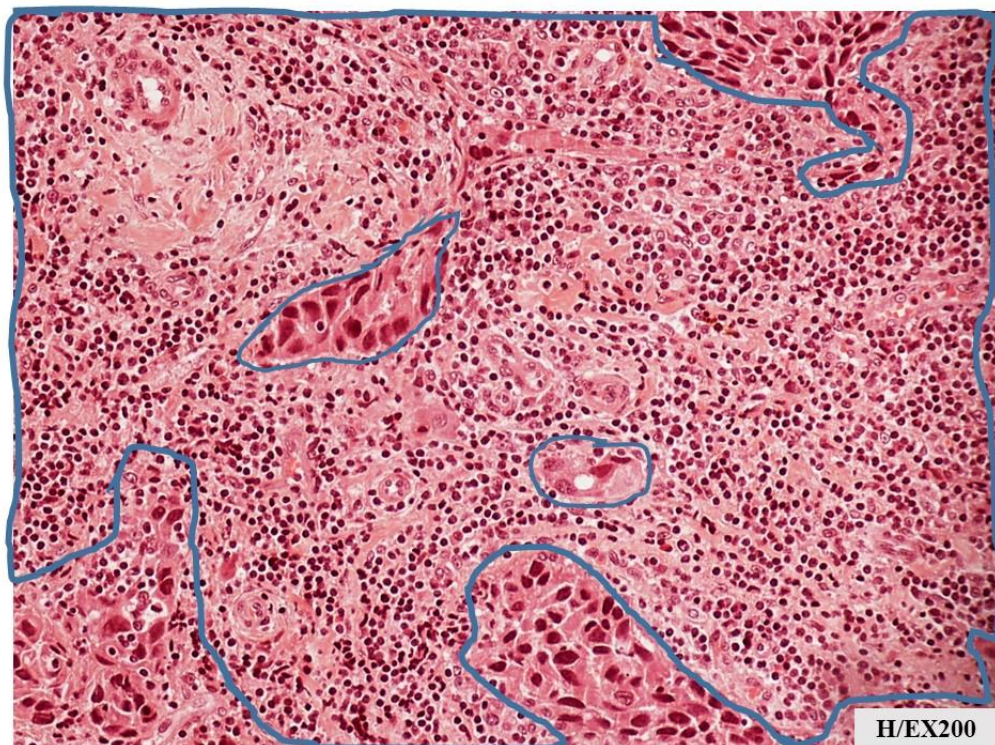
Εικόνα 11α: Παράδειγμα εκτίμησης του ποσοστού των στρωματικών TILs σε περιστατικό της έρευνας. Επιλογή περιοχής όγκου προς μελέτη.



Εικόνα 11β: Παράδειγμα εκτίμησης του ποσοστού των στρωματικών TILs σε περιστατικό της έρευνας. Καθορισμός στρωματικής περιοχής.



Εικόνα 11γ: Παράδειγμα εκτίμησης του ποσοστού των στρωματικών TILs σε περιστατικό της έρευνας. Εξέταση σε μεγαλύτερη μεγέθυνση.



Εικόνα 11δ: Παράδειγμα εκτίμησης του ποσοστού των στρωματικών TILs σε περιστατικό της έρευνας. Καθορισμός τύπου φλεγμονής και εκτίμηση ποσοστού στρωματικών TILs. Στο συγκεκριμένο περιστατικό το ποσοστό των στρωματικών TILs εκτιμήθηκε ως υψηλό.

Ανοσοϊστοχημική μελέτη

Για την πραγματοποίηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τα CD3 και CD8, από τους κύβους παραφίνης των περιστατικών κόπηκαν τομές πάχους 4 μm και τοποθετήθηκαν σε θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρες πλάκες. Στη συνέχεια για το κάθε αντίσωμα ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα, σε ημιαυτοματοποιημένο μηχάνημα DAKO Autostainer Link 48:

1. Θερμική επεξεργασία σε κλίβανο.
2. Τοποθέτηση αυτοκόλλητης ταινίας με γραμμοκώδικα.
3. Θέρμανση και αποπαραφίνωση του ιστού.
4. Αποκάλυψη του αντιγονικού επιτόπου με την χρήση κατάλληλου διαλύματος.
5. Επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα (Πίνακας 5).
6. Ενίσχυση με το σύστημα ενίσχυσης DAKO.
7. Χρήση του DAB Detection Kit (DAKO)
8. Αντιχρώση με αιματοξυλίνη

Για την πραγματοποίηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για το PD-L1, από τους κύβους παραφίνης των περιστατικών κόπηκαν τομές πάχους 3 mm και τοποθετήθηκαν σε θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρες πλάκες. Στη συνέχεια για το κάθε αντίσωμα ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

1. Αποπαραφίνωση των τομών σε ξυλόλη για 20 λεπτά.
2. Ενυδάτωση των ιστών σε κατιούσα αλκοολών (20 εμβαπτίσεις σε αλκοόλη 100%, 100%, 96%, 80% και 70%) και τοποθέτησή τους για μεταφορά σε απεσταγμένο H_2O .

3. Ανάκτηση των αντιγονικών επιτόπων με θερμική επεξεργασία σε φούρνο μικροκυμάτων. Τοποθέτηση των τομών εντός ρυθμιστικού διαλύματος EDTA (1000ml απεσταγμένο H₂O + 0,37 gr EDTA, pH=8) και θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων στα 800 Watt για 2 λεπτά και στα 300 Watt για 7 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε ξέπλυμα με H₂O βρύσης.
4. Εμβάπτιση των τομών σε διάλυμα 0,3% H₂O₂ σε σκοτεινό μέρος για 10 λεπτά, για την απάλειψη της ενεργότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης, και ξέπλυμα με H₂O βρύσης
5. Ξέπλυμα (5 λεπτά x 2) με TBS (1800ml N/S + 200 ml Tris όπου Tris:1000ml απεσταγμένο H₂O + 6,1 gr Tris , pH=7,6).
6. Ο τομές επώαστηκαν με το κατάλληλα διαλυμένο (όπου χρειαζόταν) πρωτογενές αντίσωμα για μισή ώρα τουλάχιστον. Τα στοιχεία του αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.
7. Ξέπλυμα (5 λεπτά x 3) με TBS.
8. Επώαση των τομών για μισή ώρα με το ειδικό σημασμένο πολυμερές DAKO EnVision (Dako, CA, USA), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως σύστημα ανίχνευσης.
9. Ξέπλυμα (5 λεπτά x 3) με TBS.
10. Επώαση για 5 λεπτά με τη χρωμογόνο 3,3'-τετραϋδροχλωρική-διαμινο-βενζιδίνη (DAB) (Dako, CA, USA) και ξέπλυμα με H₂O βρύσης.
11. Τοποθέτηση για 1 λεπτό σε αιματοξυλίνη Harris για χρωματική αντίθεση των πυρήνων και ξέπλυμά τους με H₂O βρύσης.
12. Δυο εμβαπτίσεις σε οξιτισμένη αλκοόλη και ξέπλυμα με τρεχούμενο H₂O βρύσης.
13. Αφυδάτωση των ιστών σε ανιούσα αλκοολών (20 εμβαπτίσεις σε αλκοόλη 70%, 80%, 96%, 100% και 100%).

14. Διαύγαση των τομών σε ξυλόλη.

15. Επικόλληση των καλυπτρίδων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, κλώνοι, αραιώσεις, μέθοδος ανάκλησης αντιγόνου και προέλευση αντισωμάτων

Αντιγόνο	Catalog no	Κλώνος	Αραίωση	Ανάκληση αντιγόνου	Εταιρεία
CD3	A0452	Polyclonal	1:300	EDTA, pH=8.0	Dako, CA, USA
CD8	M7103	C8/144B	1:50	EDTA, pH=8.0	Dako, CA, USA
PD-L1	13684	E1L3N	1:100	EDTA, pH=8.0	Cell Signaling Technology, Danvers, MA

Εκτίμηση ανοσοϊστοχημείας και καταμέτρηση της πυκνότητας των CD3+ και CD8+ T λεμφοκυττάρων

Μετά την ολοκλήρωση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης οι τομές εκτιμήθηκαν ταυτόχρονα με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου συμπαρατήρησης από την ερευνήτρια και μια παθολογοανατόμο.

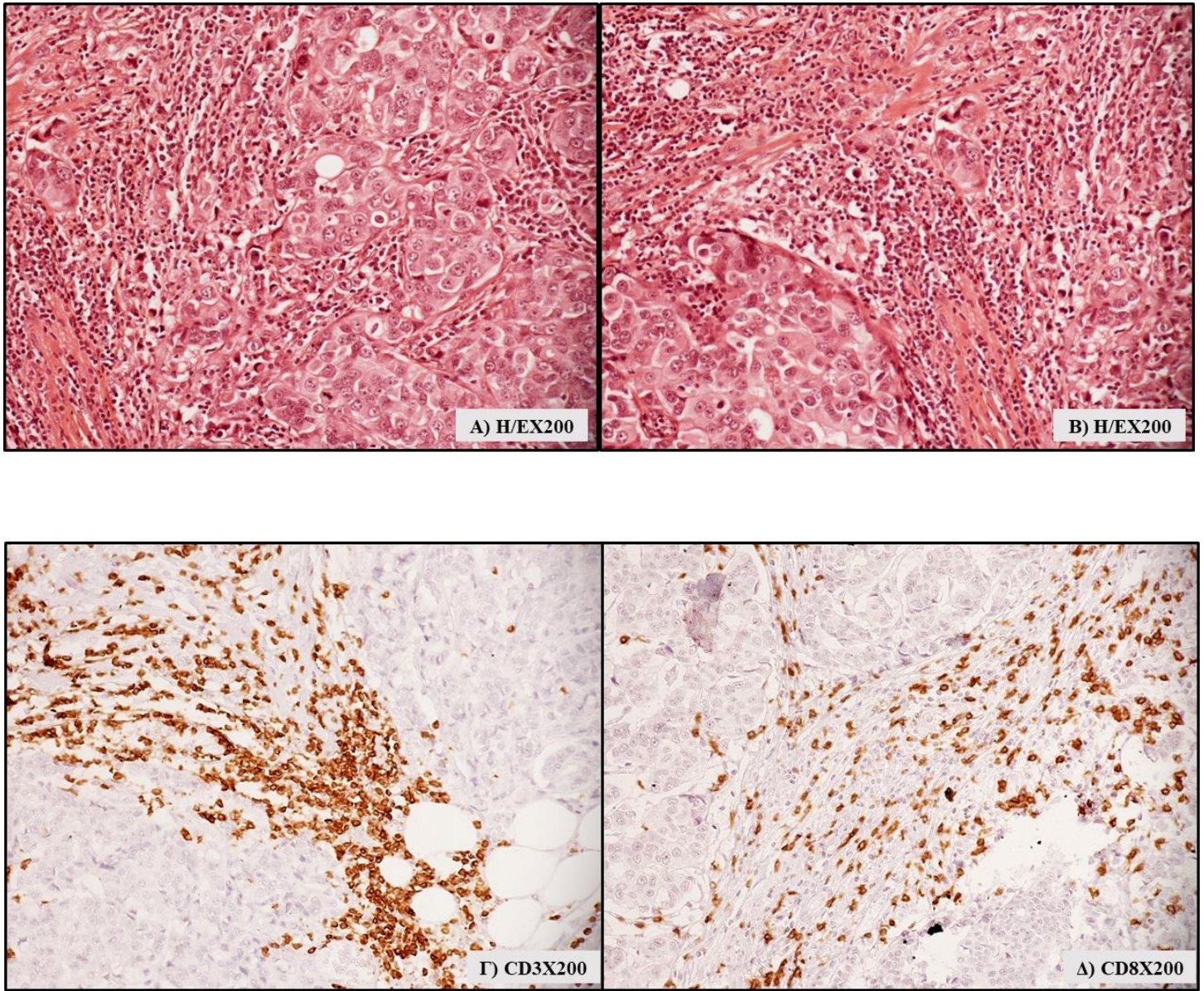
Οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις θεωρούνταν θετικές εφόσον τα μονοπύρρηνα φλεγμονώδη κύτταρα είχαν μεμβρανική/κυτταροπλασματική. Η εκτίμηση αυτών έγινε στις ίδιες περιοχές όπου εκτιμήθηκε το ποσοστό των TILs, με βάση τις ανωτέρω οδηγίες, και το σύνολο αυτών ήταν το αποτέλεσμα του μέσου όρου καταμέτρησής τους. Έπειτα, το ποσό της καταμέτρησης των CD3+ και CD8+ λεμφοκυττάρων χωρίστηκε αρχικά σε τρεις κατηγορίες, χαμηλή (+1-25 κύτταρα), μέτρια (++ 26-50) και υψηλή (+++ 51), αλλά όπως και στην περίπτωση των TILs χωρίστηκε τελικά σε δύο κατηγορίες, χαμηλή (1-25 κύτταρα) και υψηλή (>26 κύτταρα) (Εικόνες 12, 13, 14).

Εκτίμηση ανοσοϊστοχημείας και καταμέτρηση PD-L1 σε νεοπλασματικά και φλεγμονώδη λεμφοκύτταρα

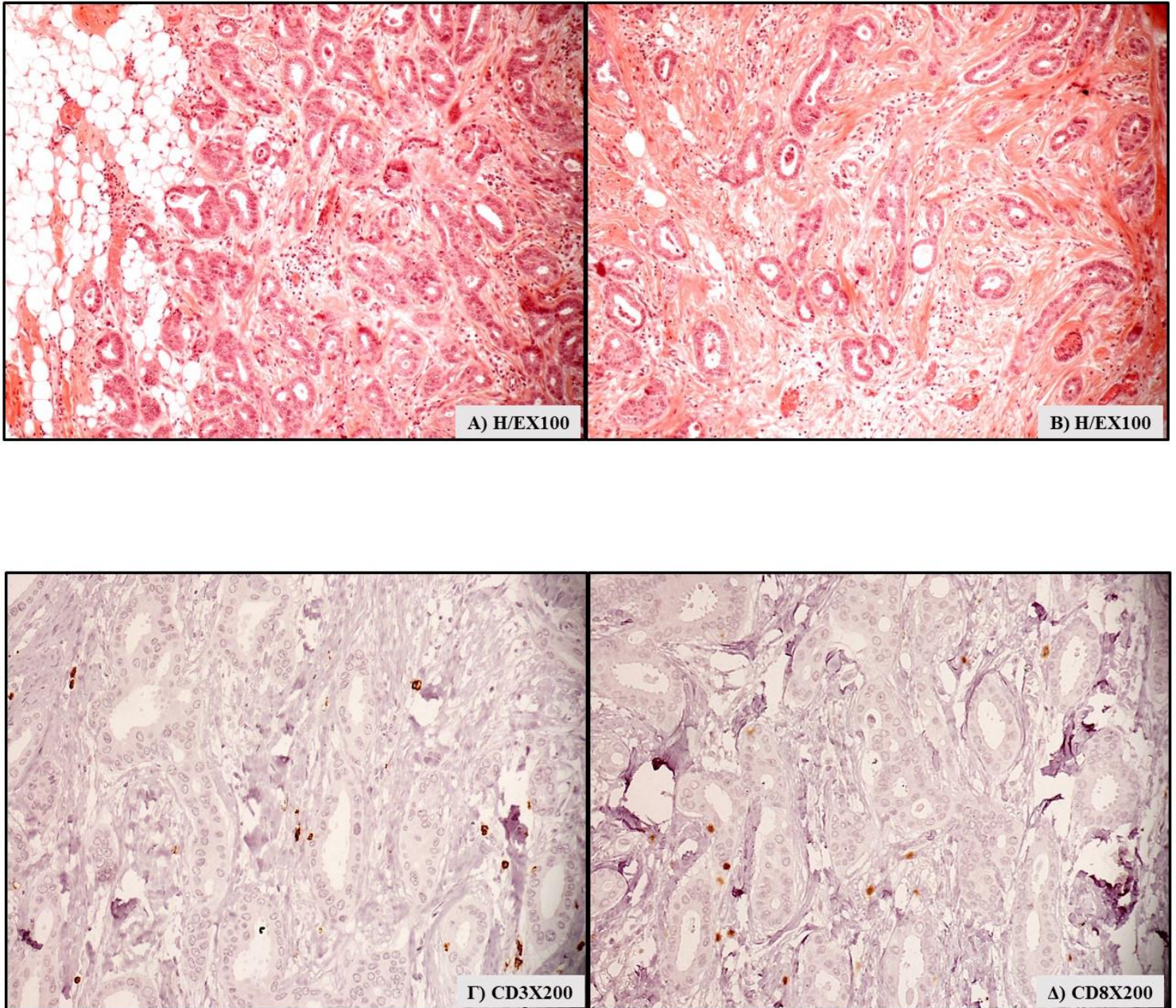
Μετά την ολοκλήρωση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης οι τομές εκτιμήθηκαν ταυτόχρονα με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου συμπαρατήρησης από την ερευνήτρια και μια παθολογοανατόμο. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινος πλακούντας.

Για τα νεοπλασματικά κύτταρα (PD-L1 tumor cells, PDL1TC) η θετική χρώση εκτιμήθηκε αρχικά με βάση την έκταση και την ένταση έκφρασής της στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Τελικώς, θετική ανοσοχρώση θεωρήθηκε, με βάση τα νεότερα δεδομένα, η μερική ή πλήρης κυτταροπλασματική έκφραση του PD-L1 σε $\geq 1\%$ των νεοπλασματικών κύτταρων, ανεξαρτήτως έντασης (246).

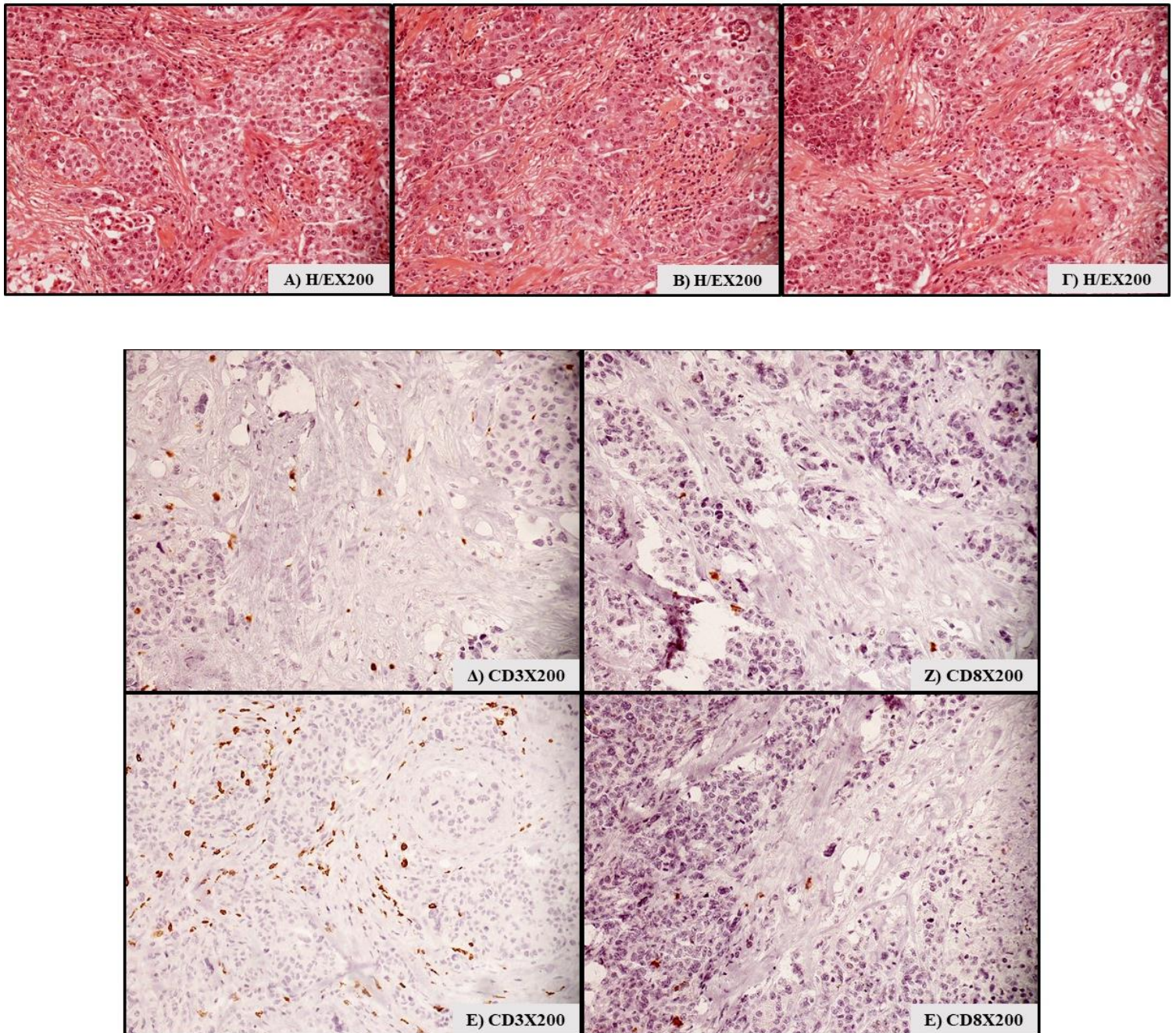
Για την εκτίμηση της έκφρασης του PD-L1 στα μονοπύρρηνα φλεγμονώδη λεμφοκύτταρα (PD-L1 immune cells, PDL1IC), θετική θεωρήθηκε η κυτταροπλασματική ή/και μεμβρανική χρώση, ανεξαρτήτως έντασης σε ποσοστό $\geq 1\%$ αυτών. Για την καταμέτρηση αυτήν χρησιμοποιήθηκαν τα φλεγμονώδη κύτταρα εντός του στρώματος του όγκου, όπως αυτή καθορίστηκε ανωτέρω.



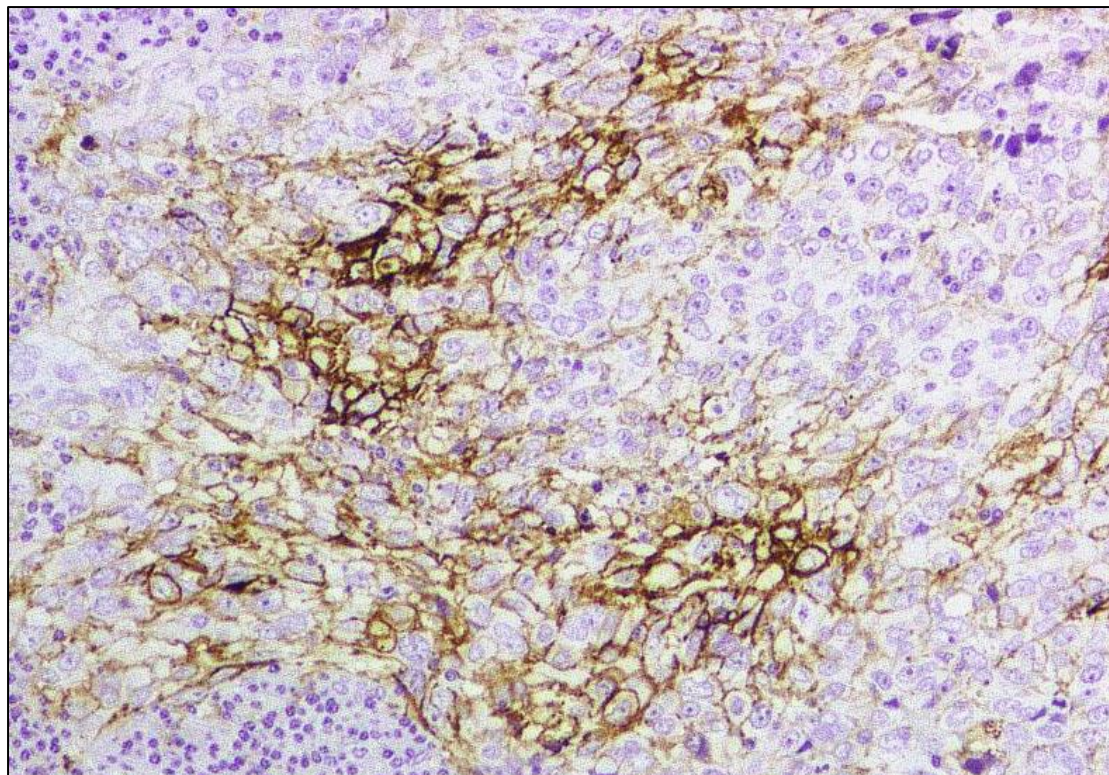
Εικόνα 12: Διθητικό καρκίνωμα μαστού NST, grade 3, με υψηλό ποσοστό στρωματικών TILs (A,B) και υψηλό ποσό CD+3 και CD8+ λεμφοκυττάρων (Γ,Δ) (περιστατικό της μελέτης)



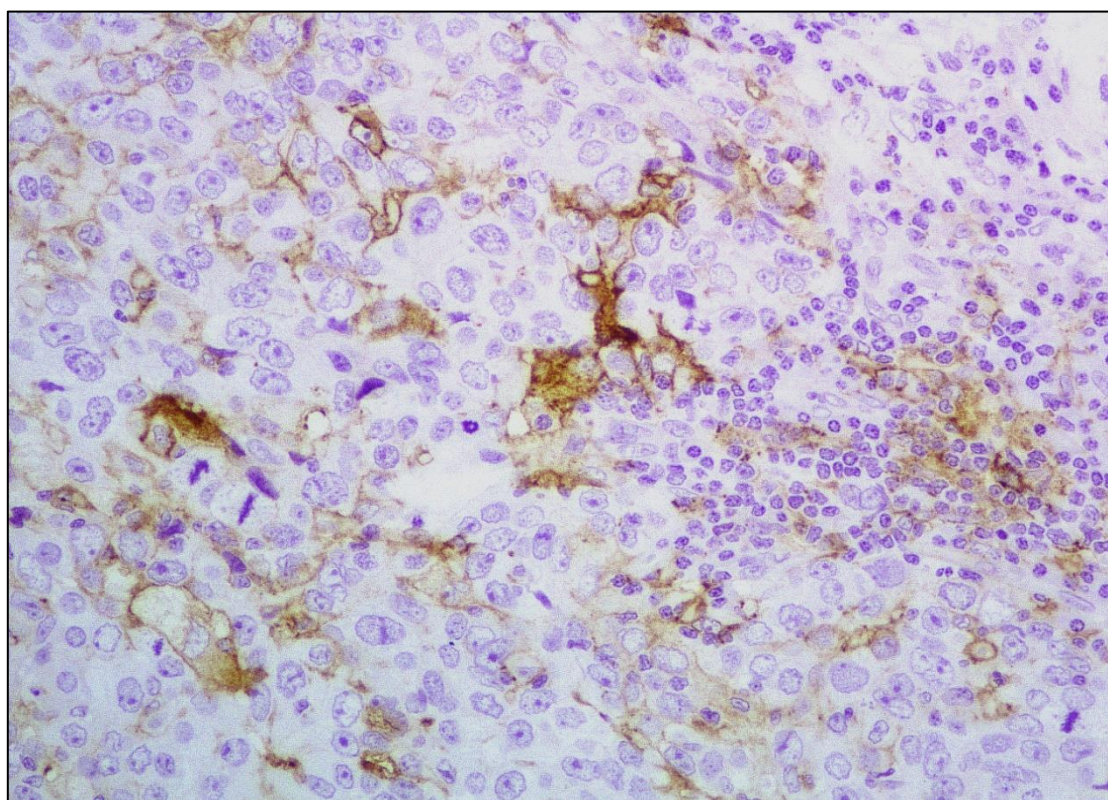
Εικόνα 13: Διθητικό καρκίνωμα μαστού NST, grade 1 με χαμηλό ποσοστό στρωματικών TILs (A,B) και χαμηλό ποσό CD3+ και CD8+ λεμφοκυττάρων (Γ,Δ) (περιστατικό της μελέτης)



Εικόνα 14: Διηθητικό καρκίνωμα μαστού NST, grade 3 με μέσο ορο ποσοστού στρωματικών TILs <60% (A,B,Γ) και χαμηλό ποσό CD3+ και CD8+ λεμφοκυττάρων (Δ,Ε,Ζ,Η) (περιστατικό της μελέτης)



Εικόνα 15: PDL1 έκφραση σε νεοπλασματικά κύτταρα



Εικόνα 16: PDL1 έκφραση σε νεοπλασματικά και μονοπύρρηνα φλεγμονώδη λεμφοκύτταρα

Στατιστική ανάλυση δεδομένων

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές τόσο της Περιγραφικής όσο και της Επαγωγικής Στατιστικής. Οι ποσοτικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση, ενώ οι ποιοτικές μεταβλητές με πίνακες συχνότητας. Για την αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ ποιοτικών και ποσοτικών μεταβλητών, λόγω του μικρού αριθμού ατόμων σε κάθε ομάδα, εφαρμόστηκε ο μη παραμετρικός έλεγχος των Mann-Whitney.

Για την αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ ανεξάρτητων ποιοτικών μεταβλητών εφαρμόστηκαν, κατά περίπτωση, ο έλεγχος χ^2 , χ^2 για γραμμική τάση και ο έλεγχος Fisher. Η σχέση μεταξύ εξαρτημένων ποιοτικών μεταβλητών αξιολογήθηκε μέσω του ελέγχου Mc Nemar. Η στατιστική σημαντικότητα (P) αξιολογήθηκε κατά ζεύγη και διαφορές $>0,05$ δεν θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά

Ο αριθμός των νεαρών γυναικών που συνελλέχθησαν για τη μελέτη αυτήν ήταν 45, με μέση ηλικία τα 34,71 έτη. Η μικρότερη ασθενής ήταν 20 ετών και η μεγαλύτερη 40. Στον Πίνακα 6 καταγράφονται όλες οι πληροφορίες που ελήφθησαν από τις ιστολογικές εκθέσεις που ανασύρθηκαν από το αρχειακό υλικό του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Τα περισσότερα διηθητικά καρκινώματα ήταν ≤ 2 εκ. (48,89%) ενώ μόνο 4 ήταν πάνω από 5 εκ. σε μέγεθος. Η πλειονότητα αυτών ήταν βαθμού κακοηθείας 3 (62,22%), ενώ ελάχιστα ήταν αυτά με βαθμό κακοηθείας 1 (4,45%), με αποτέλεσμα τα τελευταία να εξαιρεθούν της στατιστικής ανάλυσης. Τα περισσότερα διηθητικά καρκινώματα ήταν μονοεστιακά (86,67%) και μαζί με το διηθητικό στοιχείο συνυπήρχε DCIS σε ποσοστό 84,44%. Οι μισές περίπου περιπτώσεις συνοδεύονταν από την παρουσία νεοπλασματικών εμβόλων και λεμφαδενικών μεταστάσεων (53,33% και 46,67%, αντίστοιχα), ενώ σπάνια ήταν η παρουσία περινευρικών διηθήσεων (13,33%).

Από τα σαράντα πέντε διηθητικά καρκινώματα μαστού τα 32 (71,11%) εξέφραζαν οιστρογονικούς υποδοχείς, 38 (84,44%) εξ αυτών προγεστερινικούς υποδοχείς και 12 (26,67%) εμφάνιζαν υπερενίσχυση του HER2. Ο περιορισμένος αριθμός των τριπλά αρνητικών και HER2 εμπλουτισμένων καρκινωμάτων δεν μας επέτρεψε τη συσχέτισή τους με τις λοιπές παραμέτρους, βάσει της μοριακής τους ταξινόμησης.

Από την παθολογοανατομική εκτίμηση προέκυψε πως 13 (28,89%) διηθητικά καρκινώματα είχαν υψηλά TILs. Το 44,44% ($n=20$) των διηθητικών καρκινωμάτων είχαν υψηλό ποσό CD3+ και CD8+ και έκφραση του PD-L1 στα μονοπύρρηνα φλεγμονώδη λεμφοκύτταρα (PDL1IC), ενώ 9 (20%) ήταν τα διηθητικά καρκινώματα με έκφραση του PD-L1 στα νεοπλασματικά κύτταρα (PDL1TC).

Πίνακας 6. Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά νεαρών γυναικών με διηθητικό καρκίνωμα μαστού		
Χαρακτηριστικά ασθενών	n (=45)	Ποσοστό %
Μέγιστη Διάμετρος		
≤2 cm	22	48.89
>2 - 5 cm	19	42.22
>5 cm	4	8.89
Βαθμός Κακοηθείας		
1	2	4.45
2	15	33.33
3	28	62.22
Συνύπαρξη DCIS		
Ναι	38	84.44
Όχι	7	15.56
Αριθμός νεοπλασματικών εστιών		
Μονήρης	39	86.67
Πολλαπλές	6	13.33
Λεμφαγγειακή Διήθηση		
Ναι	24	53.33
Όχι	21	46.67
Περινευρική Διήθηση		
Ναι	6	13.33
Όχι	39	86.67
Λεμφαδενική Μετάσταση		
Ναι	21	46.67
Όχι	24	53.33
Έκφραση ER		
Θετική	32	71.11
Αρνητική	13	28.89
Έκφραση PR		
Θετική	38	84.44
Αρνητική	7	15.56
Έκφραση MIB1/ki67		
Χαμηλή (<20%)	20	44.44
Υψηλή (≥20%)	25	55.56
Έκφραση HER2		
Θετική	12	26.67
Αρνητική	33	73.33
TILs		
Χαμηλά	32	71.11
Υψηλά	13	28.89
Ποσό στρωματικών CD3+		
Χαμηλό (1)	25	55.56
Υψηλό (2-3)	20	44.44
Ποσό στρωματικών CD8+		
Χαμηλό (1)	25	55.56
Υψηλό (2-3)	20	44.44
Έκφραση PDL1TC		
Θετική	9	20
Αρνητική	36	80
Έκφραση PDL1IC		
Θετική	20	44.44
Αρνητική	25	55.56

Συσχέτιση της έκφρασης του PDL1TC με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά

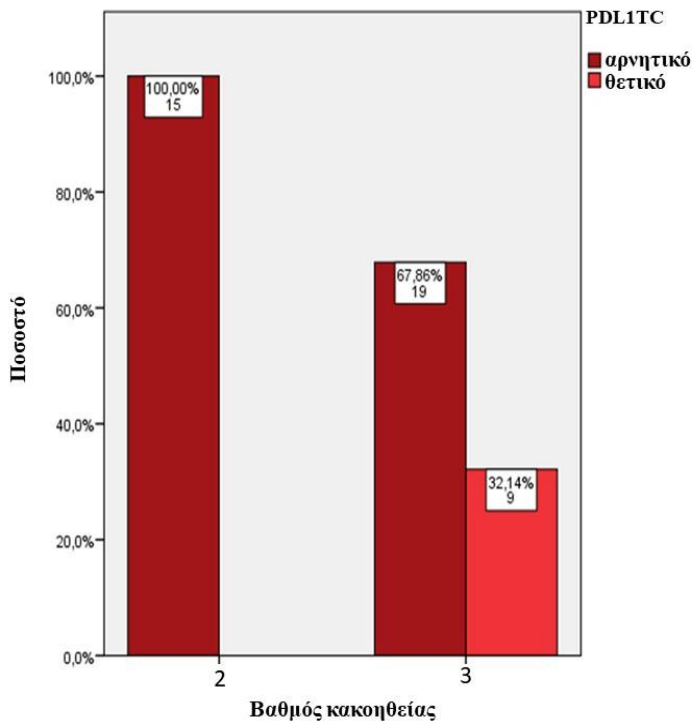
Από τα 45 περιστατικά διηθητικού καρκινώματος που μελετήθηκαν, το 20% ($n=9$) αυτών είχε νεοπλασματικά κύτταρα που εξέφραζαν τον δείκτη PD-L1. Η στατιστική ανάλυση ανέδειξε την ύπαρξη στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων της έκφρασης του PDL1TC με τον βαθμό κακοηθείας των καρκινωμάτων, την έκφραση ER και PR και του MIB1/Ki67, καθώς και με τη μέγιστη διάμετρο (Πίνακας 7, Γράφημα 1-4).

Συγκεκριμένα, ανευρέθη στατιστικά σημαντική συσχέτιση του PDL1TC με διηθητικά καρκινώματα μεγίστης διαμέτρου >2 εκ. (36,84%, $p=0,023$), βαθμού κακοηθείας 3 (32,14%, $p=0,017\%$), ER αρνητικά (53,84%, $p=0,001$), PR αρνητικά (71,42%, $p=0,002$) και υψηλή έκφραση MIB1/ki67 (32%, $p=0.030$) (γραφήμα 1, 2 και 3). Επιπλέον, η συσχέτιση του PDL1TC με συνεχόμενες μεταβλητές, όπως η ηλικία, η μέγιστη διάμετρος και MIB1/Ki67, ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα τελευταία δύο και όχι με την ηλικία (Πίνακας 8). Με τα λοιπά κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα δεν ανευρέθησαν άλλες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Συσχετίσεις των TILs, PDL1TC και PDL1IC με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους

	TILs			PDL1TC			PDL1IC		
	Υψηλή n(%)	Χαμηλή n(%)	p-Value	Θετική n(%)	Αρνητική n(%)	p-Value	Θετική n(%)	Αρνητική n(%)	p-Value
Μέγιστη Διάμετρος									
≤2 cm	3 (13.64%)	19 (86.36%)	0.016	1 (4.55%)	21 (95.45%)	0.023	7 (31.82%)	15 (68.18%)	0.185
>2-5 cm	10 (52.63%)	9 (47.36%)		7 (36.84%)	12 (63.16%)		10 (52.63)	9 (47.37)	
>5 cm	0	4 (100%)		1 (25%)	3 (75%)		3 (75%)	1 (25%)	
Βαθμός κακοηθείας (n=43)*									
2	2 (13.33%)	13 (86.67%)	0.096	0	15 (100%)	0.017	4 (22.22%)	14 (77.78%)	0.199
3	11 (39.28%)	17 (60.71%)		9 (32.14%)	19 (67.86%)		14 (50%)	14 (50%)	
Συνόπαρξη DCIS									
Ναι	10 (26.31%)	28 (73.68%)	0.394	7 (18.42%)	31 (81.57%)	0.614	16 (42.11%)	22 (57.89%)	0.682
Όχι	3 (42.86%)	4 (57.14)		2 (28.57%)	5 (71.42%)		4 (57.14%)	3 (42.86%)	
Αριθμός νεοπλασματικών εστιών									
Μονήρης	1 (2.22%)	27 (96.42%)	0.656	8 (20.51%)	31 (79.48%)	1.000	17 (43.59%)	22 (56.41%)	1.000
Πολλαπλές	12 (70.58%)	5 (29.41%)		1 (16.66%)	5 (83.33%)		3 (50%)	3 (50%)	
Λεμφαγγειακή Διήθηση									
Ναι	8 (33.33%)	16 (66.66%)	0.528	7 (29.16%)	17 (70.83%)	0.143	12 (50%)	12 (50%)	0.423
Όχι	5 (23.80%)	16 (76.19%)		2 (9.51%)	19 (90.47%)		8 (38.10%)	13 (61.90%)	
Περινευρική Διήθηση									
Ναι	0	6 (100%)	0.160	2 (33.33%)	4 (66.66%)	0.583	3 (50%)	3 (50%)	1.000
Όχι	13 (33.33%)	26 (66.66%)		7 (17.94%)	32 (82.05%)		17 (43.59%)	22 (56.41%)	
Λεμφαδενική μετάσταση									
Ναι	5 (23.80%)	16 (76.19%)	0.528	4 (19.04%)	17 (80.95%)	1.000	10 (47.62%)	11 (52.38%)	0.688
Όχι	8 (33.33%)	16 (66.66%)		5 (20.83%)	19 (79.16%)		10 (41.67%)	14 (58.33%)	
Έκφραση ER									
Θετική	4 (12.5%)	28 (87.5%)	0.000	2 (6.25%)	30 (93.75%)	0.001	9 (28.13%)	23 (71.87%)	0.001
Αρνητική	9 (69.23%)	4 (30.76%)		7 (53.84%)	6 (46.15%)		11 (84.62%)	2 (15.38%)	
Έκφραση PR									
Θετική	9 (23.28%)	29 (76.32%)	0.168	4 (10.52%)	34 (89.47%)	0.002	13 (34.21%)	25 (65.79%)	0.001
Αρνητική	4 (57.14%)	3 (42.86%)		5 (71.42%)	2 (28.57%)		7 (100%)	0	
Έκφραση MIB1/ki67									
(<20%)	2 (10%)	18 (90%)	0.012	1 (5%)	19 (95%)	0.030	6 (30%)	14 (70%)	0.081
(≥20%)	11 (44%)	14 (56%)		8 (32%)	17 (68%)		14 (56%)	11 (44%)	
Έκφραση HER2									
Θετική	6 (50%)	6 (50%)	0.076	2 (16.66%)	10 (83.33%)	1.000	7 (58.33%)	5 (41.67%)	0.258
Αρνητική	7 (21.21%)	26 (78.78%)		7 (21.21%)	26 (78.78%)		13 (39.39%)	20 (60.61%)	
Ποσό στρωματικών CD3									
Χαμηλό	0	25 (100%)	0.000	2 (8%)	23 (92%)	0.024	7 (28%)	18 (72%)	0.013
Υψηλό	13 (65%)	7 (35%)		7 (35%)	13 (65%)		13 (65%)	7 (35%)	
Ποσό στρωματικών CD8									
Χαμηλό	0	25 (100%)	0.000	2 (8%)	23 (92%)	0.024	7 (28%)	18 (72%)	0.013
Υψηλό	13 (65%)	7 (35%)		7 (35%)	13 (65%)		13 (65%)	7 (35%)	

*Τα διηθητικά καρκινώματα βαθμού κακοηθείας 1 δεν συμπεριλήφθηκαν στην στατιστική ανάλυση λόγω του περιορισμένου αριθμού.

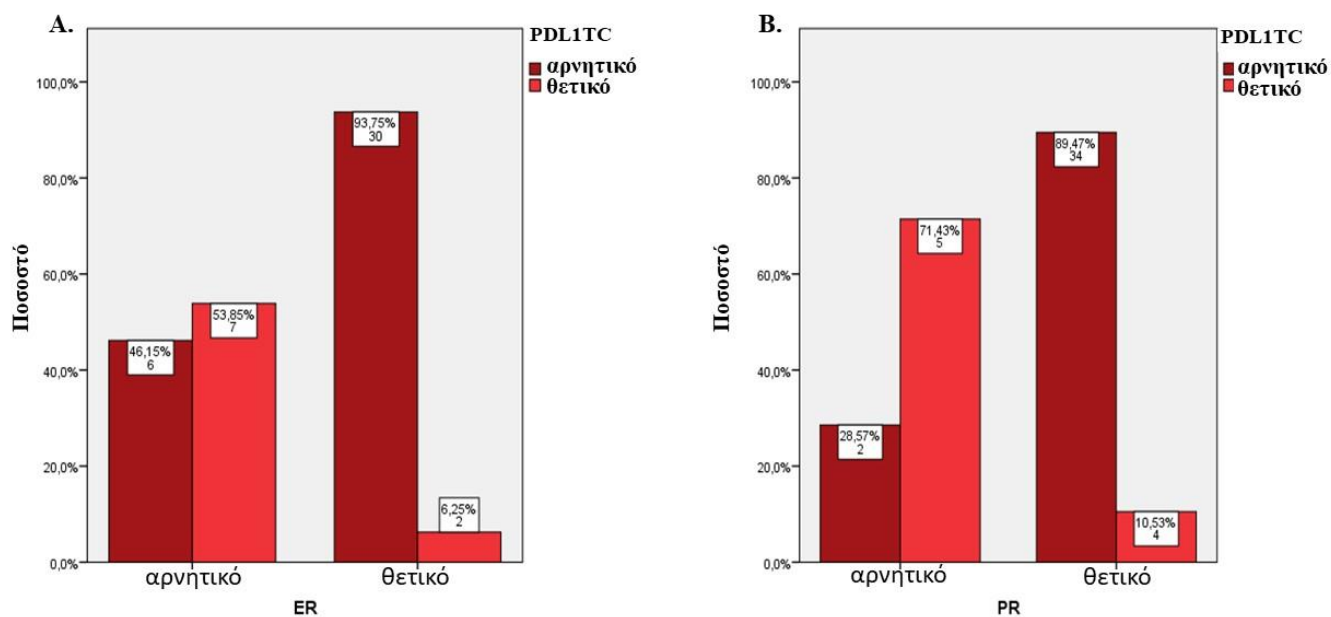


		Crosstab			
Count		ΒΑΘΜΟΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ			ΣΥΝΟΛΟ
		1	2	3	
PDL1TC	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	2	15	19	36
	ΘΕΤΙΚΟ	0	0	9	9
ΣΥΝΟΛΟ		2	15	28	45

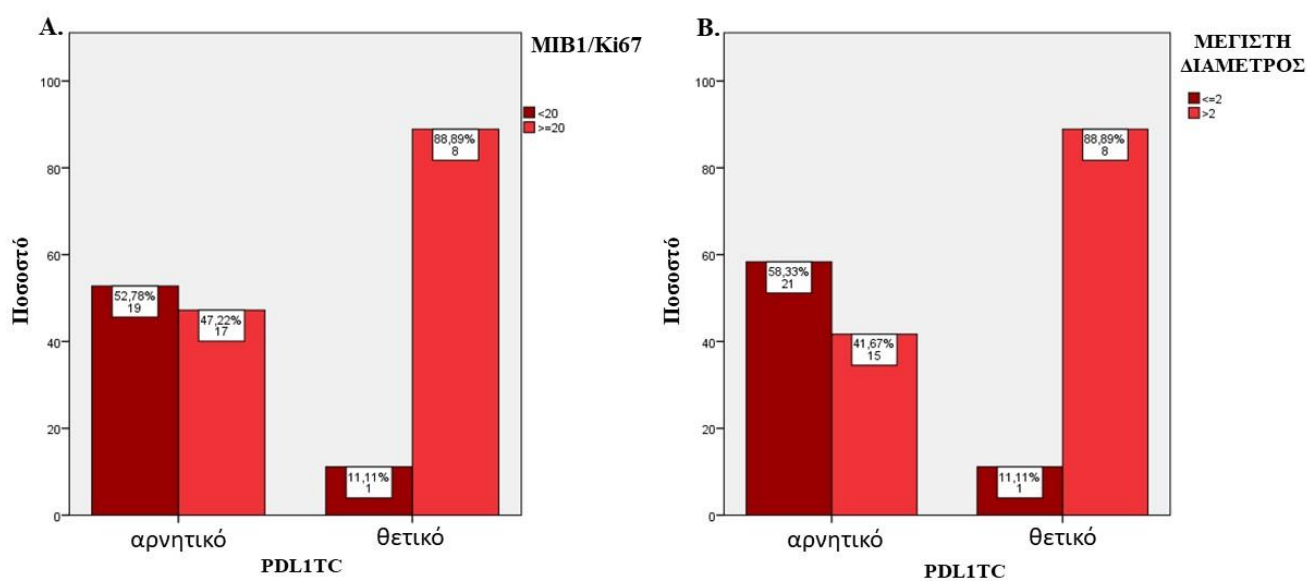
		Crosstab		
Count		ΒΑΘΜΟΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ		ΣΥΝΟΛΟ
		2	3	
PDL1TC	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	15	19	34
	ΘΕΤΙΚΟ	0	9	9
ΣΥΝΟΛΟ		15	28	43

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	6,098 ^a	1	,014	,017
Continuity Correction ^b	4,310	1	,038	
Likelihood Ratio	8,956	1	,003	,017
Fisher's Exact Test				,017
Linear-by-Linear Association	5,956 ^d	1	,015	,017
N of Valid Cases	43			

Γράφημα 1: Συσχέτιση PDL1TC με τον βαθμό κακοηθείας των διηθητικών καρκινωμάτων μαστού



Γράφημα 2: Συσχέτιση PDL1TC με τους ER (A) και τους PR (B) των διηθητικών καρκινωμάτων μαστού



Γράφημα 3: Συσχέτιση PDL1TC με MIB1/Ki67 (A) και μέγιστη διάμετρο (B) διηθητικών καρκινωμάτων μαστού

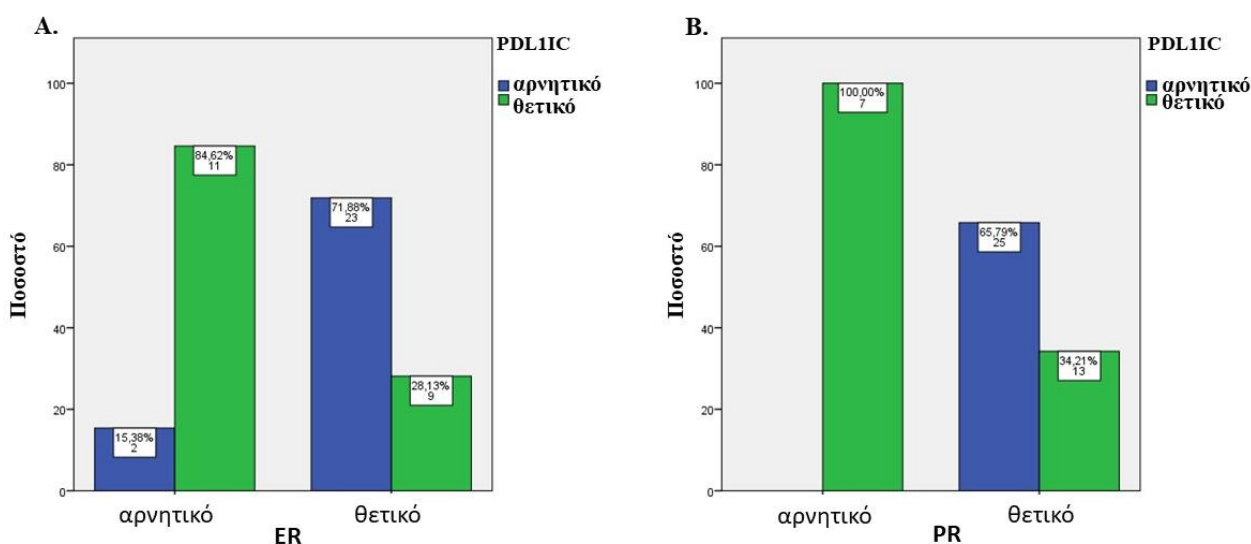
ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Σχέση της έκφρασης του PD-L1 και των TILs με συνεχόμενες παραμέτρους			
PD-L1/Ηλικία	Mean	Standard Deviation	p-Value
Αρνητικό	35.22	4.599	0.076
Θετικό	32.67	3,742	
Σύνολο	34,71	4,521	
PD-L1/Μέγιστη Διάμετρος			
Αρνητικό	2,53	2,126	0.028
Θετικό	3,34	1,516	
Σύνολο	2,69	2,030	
PD-L1/Ki67			
Αρνητικό	33,95	21,473	0.000
Θετικό	79,00	11,402	
Σύνολο	42,30	26,653	
TILs/Ηλικία			
Χαμηλό	34,81	4,935	0.126
Υψηλό	34,46	3,455	
Σύνολο	34,71	4,521	
TILs/Μέγιστη Διάμετρος			
Χαμηλό	2,70	2,363	0.527
Υψηλό	2,67	0,825	
Σύνολο	2,69	2,030	
TILs/Ki67			
Χαμηλό	24.28	19.06	0.000
Υψηλό	56.77	27.58	
Σύνολο	33.67	26.18	
PDL1IC/Ηλικία			
Αρνητικό	35.12	4.92	0.069
Θετικό	34.20	4.03	
Σύνολο	34.71	4.52	
PDL1IC/Μέγιστη Διάμετρος			
Αρνητικό	2.17	1.08	0.019
Θετικό	3.34	2.69	
Σύνολο	2.69	2.03	
PDL1IC/Ki67			
Χαμηλό	22.76	17.09	0.04
Υψηλό	47.30	29.42	
Σύνολο	33.67	26.18	

Συσχέτιση της έκφρασης του PDL1IC με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά

Έκφραση του PD-L1 στα φλεγμονώδη μονοπύρηννα λεμφοκύτταρα παρατηρήθηκε στα 20 (44,44%) από τα 45 περιστατικά διηθητικών καρκινωμάτων μαστού. Τα PDL1IC φάνηκε να συσχετίζονται σημαντικά

με την έκφραση των ER, PR, το μέγεθος του διηθητικού καρκινώματος και το MIB1/Ki67 αυτών.

Συγκεκριμένα, η πιθανότητα ανεύρεσης PDL1IC είναι μεγαλύτερη σε ER και PR αρνητικά διηθητικά καρκινώματα μαστού (84.62%, $p=0.001$, 100%, $p=0.001$, αντίστοιχα) (πίνακας 7, γράφημα 4). Επιπλέον, συγκρίνοντας το PDL1IC με τη μέγιστη διάμετρο των διηθητικών καρκινωμάτων και την έκφραση του MIB1/Ki67 ως συνεχόμενες μεταβλητές, φάνηκε σημαντική συσχέτιση ($p=0.019$, $p=0.04$) (πίνακας 8). Δεν ανευρέθη στατικά σημαντική συσχέτιση με τα λοιπά κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα.



Γράφημα 4: Συσχέτιση PDL1IC με τους ER (Α) και τους PR (Β) σε διηθητικά καρκινώματα μαστού

Συσχέτιση του ποσοστού στρωματικών TILs με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά

Τα δεκατρία (28,88%) από τα σαράντα πέντε περιστατικά της μελέτης αυτής είχαν υψηλά στρωματικά TILs. Η παρουσία των υψηλών στρωματικών TILs ήταν ιδιαίτερα αυξημένη στις περιπτώσεις διηθητικών

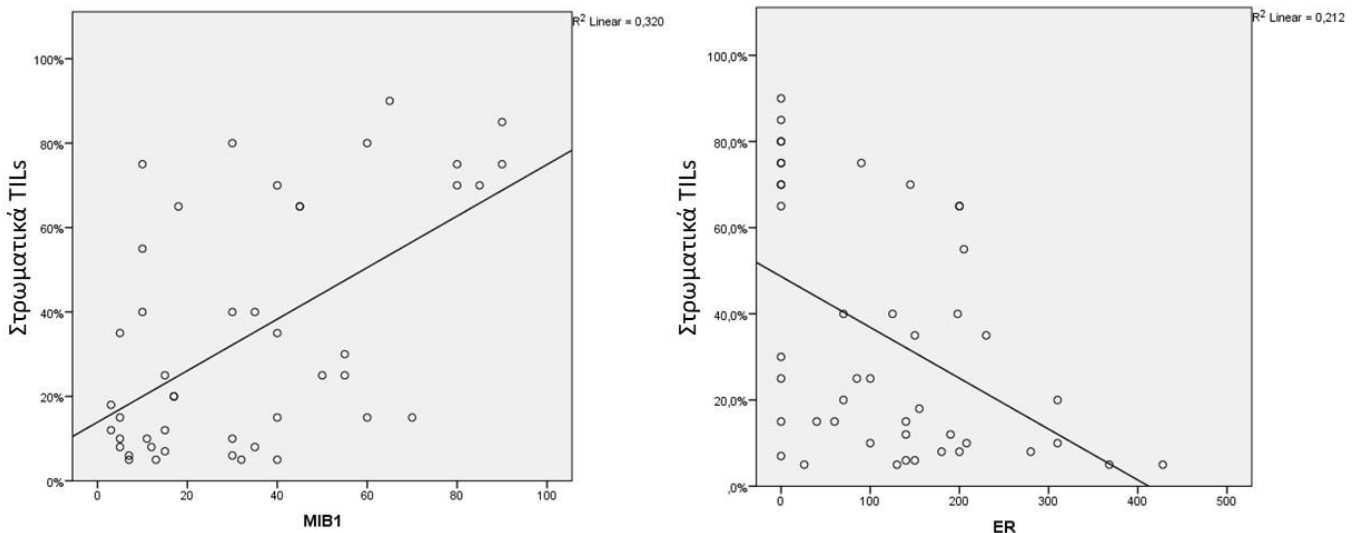
καρκινωμάτων μεγίστης διαμέτρου $>2\text{εκ}$ (52.63% , $p=0.016$), σε διηθητικά καρκινώματα μαστού με αρνητική έκφραση των ER (69.23% , $p=0,000$) και υψηλή έκφραση του MIB1/Ki67 (44% , $p=0.012$) (πίνακας 9, γράφημα 5). Επίσης, συσχετίζοντας ως συνεχόμενη μεταβλητή τα στρωματικά TILs με την ηλικία των ασθενών, τη διάμετρο των διηθητικών καρκινωμάτων και την έκφραση του MIB1/Ki67, αναδείχθηκε πως είναι περισσότερο πιθανή η ανεύρεση υψηλών στρωματικών TILs σε περιστατικά με υψηλό MIB1/Ki67 ($p=0.000$) (πίνακας 8). Δεν ανευρέθησαν άλλες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με τα λοιπά κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα.

Crosstab						
Count		Στρωματικά TILs		Σύνολο		
		Χαμηλά	υψηλά			
Μέγιστη Διάμετρος	<=2	19	3	22		
	2,1 - 5,0	9	10	19		
	>5	4	0	4		
Σύνολο		32	13	45		

Chi-Square Tests						
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Monte Carlo Sig. (2-sided)		
				Significance	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound	
Pearson Chi-Square	9,330 ^a	2	,009	,014	,011	,016
Likelihood Ratio	10,291	2	,006	,014	,011	,016
Fisher's Exact Test	8,356			,016	,014	,019
Linear-by-Linear Association	1,225 ^c	1	,268	,316	,307	,325
N of Valid Cases	45					

a. 2 cells (33,3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,16.
c. The standardized statistic is 1,107.

Πίνακας 9: Από τον έλεγχο Fisher's Exact test φαίνεται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δύο μεταβλητών και το p-value σημειώνεται με κίτρινο. Συγκεκριμένα στις ασθενείς με υψηλά στρωματικά TILs είναι σημαντικά συχνότερο να έχουν διηθητικό καρκίνωμα μαστού με μέγιστη διάμετρο 2,1-5 εκ. (10 στις 13) συγκριτικά με τις ασθενείς που έχουν χαμηλά στρωματικά TILs.

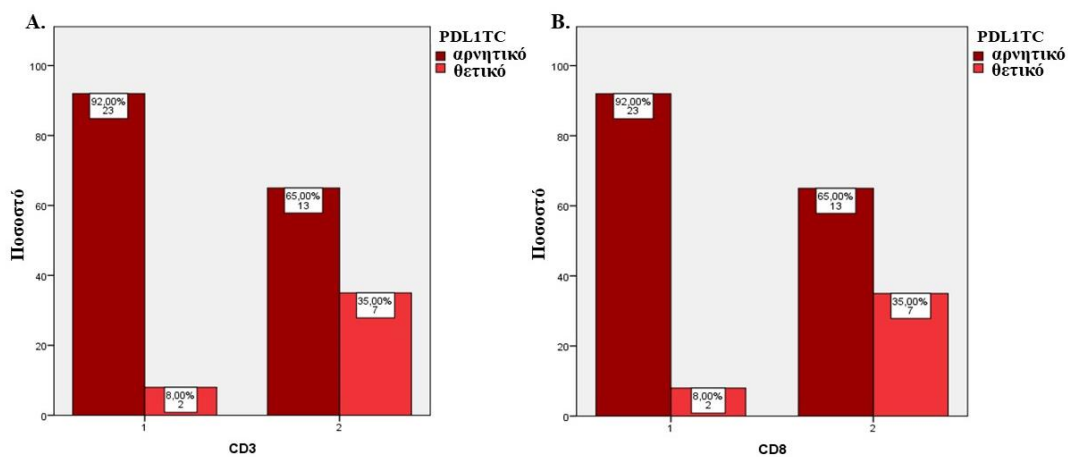


Γράφημα 5: Στα ανωτέρω γραφήματα φαίνεται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του υψηλού ποσοστού TIL's και των ER και MIB1. Πιο συγκεκριμένα, αναμένουμε χαμηλότερες τιμές του ER για μεγαλύτερες τιμές των στρωματικών TILs. Αντιθέτως η συσχέτιση με το MIB1 είναι θετική δηλώνοντας ότι αναμένουμε υψηλότερες τιμές του MIB1 για μεγαλύτερες τιμές των στρωματικών TILs.

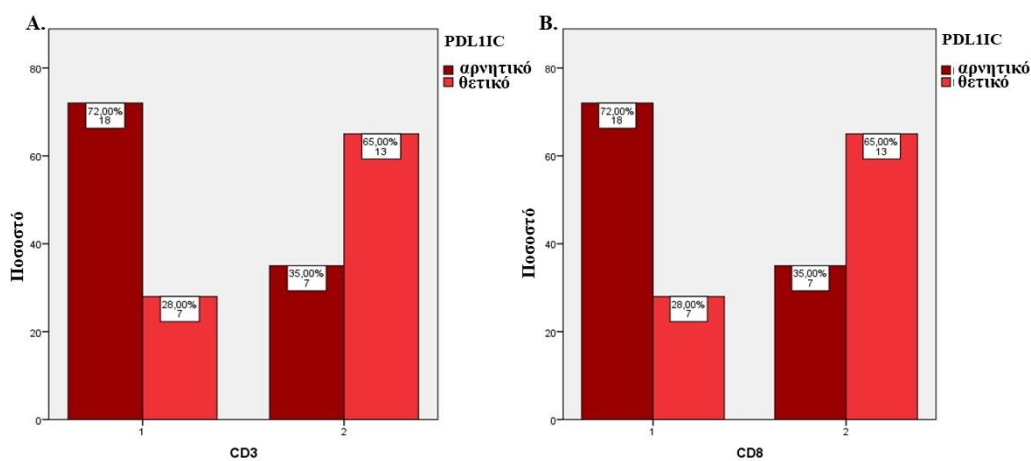
Συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης του PDL1TC και PDL1IC, των στρωματικών TILs και του ποσού των CD3+ και CD8+

Τόσο η έκφραση του PDL1TC όσο και αυτή του PDL1IC εμφάνισαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα υψηλά TILs (77.78%, $p=0.001$, 79.92%, $p=0.005$, αντίστοιχα) (πίνακας 10). Η έκφραση του PDL1TC, PDL1IC, καθώς και η παρουσία υψηλών TILs (35%, $p=0.024$, 65%, $p=0.013$, 100%, $p=0.000$, αντίστοιχα) σχετίζονται σημαντικά με την παρουσία υψηλού ποσού CD3+. Παρομοίως, η έκφραση του PDL1TC (35%, $p=0.024$), PDL1IC (65%, $p=0.013$) και η παρουσία υψηλών TILs σχετίζονται σημαντικά με την παρουσία υψηλού ποσού CD8+ (100%, $p=0.000$) (Πίνακας 7)(Γραφήματα 6, 7, 8).

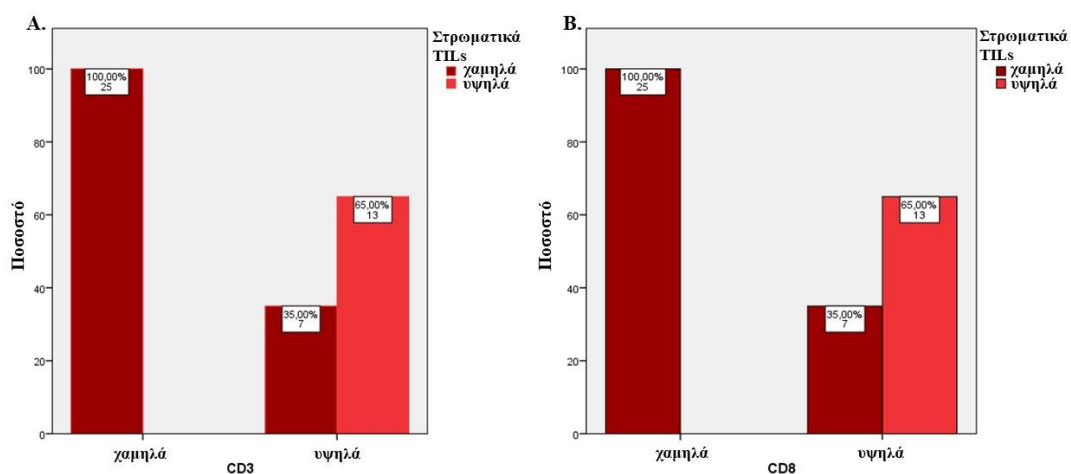
ΠΙΝΑΚΑΣ 10: Συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης του PDL1TC και PDL1IC με τα στρωματικά TILs						
	PDL1TC			PDL1IC		
	Θετικό (n=9)	Αρνητικό (n=36)	p-Value	Θετικό (n=20)	Αρνητικό (n=25)	p-Value
TILs						
Υψηλό (n=13)	7 (77.78%)	6 (16.67%)	0.001	10 (79.92%)	3 (23.07%)	0.005
Χαμηλό(n=32)	2 (22.22%)	30 (83.33%)		10 (31.25%)	22 (68.75%)	



Γράφημα 6: Συσχετίσεις PDL1TC με το ποσό CD3 και CD8 λεμφοκυττάρων



Γράφημα 7: Συσχετίσεις PDL1IC με το ποσό CD3 και CD8 λεμφοκυττάρων



Γράφημα 8: Συσχετίσεις TILs με το ποσό CD3 και CD8 λεμφοκυττάρων

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο συχνή κακοήθεια που αναπτύσσεται στις γυναίκες παγκοσμίως και η διάγνωσή του σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες συνεχώς αυξάνεται. Οι νεαρές γυναίκες αποτελούν μια πιο ευάλωτη ομάδα, αφού το νεαρό της ηλικίας από μόνο του αποτελεί έναν αρνητικό προγνωστικό παράγοντα, σχετιζόμενο με μεγαλύτερη πιθανότητα υποτροπής και μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης (84,247–250). Επιπλέον, πέραν των παραμέτρων που συνηθέστερα αποτελούν αντικείμενο της έρευνας στις μελέτες, η διάγνωση του καρκινώματος μαστού σε νεαρές γυναίκες συνοδεύεται από σοβαρές επιπτώσεις στην ποιότητα της ζωής αυτών (134,135,251,252).

Συγκεκριμένα, η περίπτωση διάγνωσης μιας νεαρής γυναίκας με διηθητικό καρκίνωμα μαστού συνοδεύεται από μεγάλη πιθανότητα πρόωρης εμμηνόπαυσης και δυσκολίας στη σύλληψη τέκνου, ακόμα κι αν μετά τη χημειοθεραπεία επανέλθει φυσιολογικά ο κύκλος της ασθενούς (89,253). Αυξημένος είναι ο κίνδυνος ανάπτυξης οστεοπόρωσης λόγω της ιατρογενώς προκαλούμενης με τη χημειοθεραπεία εμμηνόπαυσης (253).

Επίσης, ένα ακόμη φαινόμενο των τελευταίων ετών είναι η ανάπτυξη ‘χημειο-εγκεφάλου’. Σύμφωνα με αυτό, λόγω της χημειοθεραπείας δημιουργούνται διαταραχές μνήμης και συγκέντρωσης στους πάσχοντες, σε επίπεδα τέτοια ώστε να μην μπορούν να είναι λειτουργικοί στις καθημερινές τους δραστηριότητες (εργασία, αυτοσυντήρηση κ.λπ.) (82).

Ο μαστός, ως σύμβολο του θηλυκού φύλου, αδιαμφισβήτητα προκαλεί διαταραχές στην ταυτότητα του ατόμου που θα τον απολέσει.

Έτσι, στην περίπτωση της μαστεκτομής οι γυναίκες βιώνουν την απώλεια της θηλυκής τους υπόστασης, με αποτέλεσμα να χάνουν τη σεξουαλική τους ταυτότητα. Αυτό, σε συνδυασμό με τις παρενέργειες των θεραπειών (κολπική ξηρότητα κ.λπ.), συμβάλλει στη δημιουργία σεξουαλικών δυσλειτουργιών και προβλημάτων των ερωτικών σχέσεων μεταξύ συντρόφων (95,134,135,251,252).

Τέλος, ο συνδυασμός όλων των ανωτέρω δημιουργεί -το καθένα μεμονωμένα αλλά και συνδυαστικά- μεγάλο ψυχολογικό βάρος στις ασθενείς, που χωρίς την κατάλληλη στήριξη οδηγεί στην κατάθλιψη και έτσι σε έναν φαύλο κύκλο γεγονότων (135).

Για τον λόγο αυτόν είναι σημαντικό να εμπλουτιστούν οι γνώσεις μας στο μικροπεριβάλλον των διηθητικών καρκινωμάτων μαστού για την ευάλωτη αυτή ομάδα γυναικών. Ενώ υπάρχουν πολλές μελέτες που επικεντρώνονται στην έκφραση του PD-L1 και στα στρωματικά TILs στα διηθητικά καρκινώματα μαστού, πολύ λίγες είναι αυτές που έχουν μελετήσει συγκεκριμένα τα χαρακτηριστικά αυτής της ομάδας γυναικών.

Όπως φάνηκε από την έρευνα αυτήν, η παρουσία των στρωματικών TILs δεν είναι συχνό φαινόμενο, εύρημα το οποίο είναι σύμφωνο και με άλλες έρευνες που περιλαμβάνουν γυναίκες με διηθητικά καρκινώματα μαστού όλων των ηλικιών (254,255). Από την άλλη, το PD-L1 εμφανίζει ένα ευρύ φάσμα ποσοστού έκφρασης, τόσο στα νεοπλασματικά όσο και στα φλεγμονώδη κύτταρα. Στις υπάρχουσες μελέτες το ποσοστό έκφρασης του PD-L1 στα νεοπλασματικά κύτταρα κυμαίνεται στο 20%-60% των διηθητικών καρκινωμάτων μαστού, ενώ στα λεμφοκύτταρα στο 2%-90% (236,256–260).

Στη δική μας μελέτη το ποσοστό των περιστατικών με PDL1TC και PDL1IC που ανευρέθησαν ήταν 20% (9/45 περιστατικά) και 44,44% (20/45 περιστατικά) αντίστοιχα, αποτελέσματα τα οποία συμφωνούν με την διεθνή βιβλιογραφία όπου περιλαμβάνονται όλες οι ηλικίες γυναικών με καρκίνο μαστού. Ένας πιθανός τρόπος εξήγησης του περιορισμένου αυτού αριθμού περιστατικών με υψηλά TILs και έκφρασης του PDL1TC είναι το γεγονός ότι τα δύο αυτά ευρήματα απαντώνται πιο συχνά σε τριπλά αρνητικά καρκινώματα μαστού (257). Έτσι και στη δική μας μελέτη, ο περιορισμένος αριθμός τριπλά αρνητικών καρκινωμάτων μπορεί να δικαιολογήσει τον αριθμό αυτόν. Τέλος, στην έρευνα αυτήν αναδείχθηκαν περίπου τα διπλάσια περιστατικά PDL1IC έναντι των PDL1TC, εύρημα το οποίο συνάδει με άλλες μελέτες των οποίων τα PDL1TC είναι πάντα πολύ λιγότερα σε αριθμό από τα PDL1IC (261).

Οι συσχετίσεις μεταξύ του PDL1TC και των κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων ανέδειξαν μια θετική συσχέτιση αυτού με τα διηθητικά καρκινώματα μαστού που έχουν βαθμό κακοηθείας 3, απουσία έκφρασης ER και PR, καθώς και μεγάλη διάμετρο και υψηλή έκφραση MIB1/Ki67. Με τις λοιπές κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους δεν ανευρέθησαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις. Τα ευρήματα αυτά είναι συμβατά με τις περισσότερες υπάρχουσες μελέτες (262–265).

Στη μελέτη αυτήν το HER2 δεν ανευρέθη να σχετίζεται σημαντικά με το PDL1TC, το οποίο συνάδει με υπάρχουσες έρευνες της βιβλιογραφίας, όπως την πρόσφατη σχετικά μετ-ανάλυση του Huang *et al.* (260), που συμπεριλαμβάνει 47 ερευνητικές μελέτες, στην οποία ερεύνησαν τη σχέση μεταξύ άλλων του PDL1TC με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους των ασθενών. Όπως και στη

δική μας, δεν ανευρέθη στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του PDL1TC και του HER2. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι η σχέση της έκφρασης του HER2 και του PD-L1 είναι αμφιλεγόμενη, με αρκετές μελέτες να εμφανίζουν αντικρουόμενα ευρήματα (260,266). Η πιο ισχύουσα άποψη για τα αντιφατικά αυτά ευρήματα της βιβλιογραφίας είναι η ανεπάρκεια μιας τυποποιημένης μεθοδολογίας μέτρησης του PD-L1(260).

Λίγες είναι οι υπάρχουσες μελέτες που ερευνούν την έκφραση του PD-L1 στα TILs, παρ' όλα αυτά τα η σύγκριση αυτών με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους των ασθενών δείχνουν ότι τα αποτελέσματα εμφανίζουν ομοιομορφία (234,259,267). Έτσι και στη δική μας μελέτη αναδείχθηκε πως ασθενείς με διηθητικά καρκινώματα μαστού και πιθανότητα ανεύρεσης PDL1IC είναι αυτές που έχουν ER ή PR αρνητικά καρκινώματα, μεγάλη διάμετρο όγκου (>2 εκ) και υψηλό MIB1/Ki67. Όλοι δείκτες δυσμενούς πρόγνωσης.

Τα υψηλά στρωματικά TILs, η έκφραση του PDL1TC και του PDL1IC στη μελέτη αυτήν φάνηκε να συσχετίζονται μεταξύ τους, εύρημα το οποίο είναι σύμφωνο με πολλές άλλες μελέτες της βιβλιογραφίας (255,257,259,268). Παρομοίως, η ανάδειξη της στατιστικά σημαντικής συσχέτισης μεταξύ των υψηλών στρωματικών TILs με τα διηθητικά καρκινώματα μαστού που δεν εκφράζουν ER και έχουν υψηλό MIB1/Ki67 αντίστοιχα είναι αποτέλεσμα που δεν διαφοροποιείται από τα υπάρχοντα δεδομένα στη βιβλιογραφία (269,270).

Η μη ανάδειξη στατιστικά σημαντικής σχέσης μεταξύ των υψηλών στρωματικών TILs και των διηθητικών καρκινωμάτων με θετικό HER2 εμφανίζει απόκλιση από τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Το εύρημα των

υψηλών στρωματικών TILs φαίνεται να αποτελεί χαρακτηριστικό των HER2 θετικών διηθητικών καρκινωμάτων και τριπλά αρνητικών καρκινωμάτων μαστού (269,271). Εκτιμάται ότι το εύρημα αυτό επηρεάζεται από τον σχετικά χαμηλό αριθμό των περιλαμβανομένων στην μελέτη HER2 θετικών περιστατικών που καθιστούν δύσκολη την ανάδειξη μιας στατιστικά σημαντικής συσχέτισης μεταξύ των δύο.

Η μελέτη της πυκνότητας CD3⁺ και CD8⁺ λεμφοκυττάρων στα TILs ανέδειξε τη στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των TILs, PDL1TC και PDL1IC. Όπως αναφέρεται εκτενέστερα στην εισαγωγή, τα TILs αποτελούνται από μια ποικιλία B και T λεμφοκυττάρων, ο κάθε τύπος του οποίου έχει και διαφορετική προγνωστική ή/και προβλεπτική αξία (272). Τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα αποτελούν ένα υποσύνολο των συνολικών CD3⁺ T-λεμφοκυττάρων, για το λόγο αυτό υπάρχει μεταξύ των δύο πληθυσμών γραμμική συσχέτιση.

Βιβλιογραφικά είναι πολλές οι μελέτες, όπως αυτή του Denkert *et. al.*(254), που υποδεικνύουν πως η παρουσία στρωματικών TILs, ανεξάρτητα από τα κύτταρα που τα απαρτίζουν σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση. Αυτές όμως έρχονται να αντικρούσουν άλλες νεότερες, οι οποίες τεκμηριωμένα παραθέτουν δεδομένα που μεταβάλλουν την προγνωστική αξία των TILs με βάση τα κύτταρα που τα απαρτίζουν.

Ο Seo *et. al.*(273) ανέδειξε πως η παρουσία CD8⁺ λεμφοκυττάρων σε διηθητικά καρκινώματα μαστού σχετίζεται με καλύτερα κλινικά αποτελέσματα, ενώ η παρουσία CD3⁺ λεμφοκυττάρων με καλύτερη συνολική πρόγνωση. Σύμφωνα με τον Teschendorff *et. al.* (274), τα CD4⁺ Th2 κύτταρα συμβάλλουν στη μείωση της ανοσολογικής απάντησης και έτσι στην πρόοδο της νόσου, καθιστώντας τα ένα δείκτη με αρνητική

προγνωστική αξία. Με βάση αυτά και τις λοιπές μελέτες, προτάθηκε από τον Mori *et. al.* (275) να μελετώνται και να αναγράφονται οι πληθυσμοί κυττάρων που συνθέτουν τα TILs, λόγω της ετερογένειας που προκύπτει στα αποτελέσματα του χρόνου ελεύθερης νόσου (Relapse-Free Survival-RFS) και συνολικής επιβίωσης (Overall Survival - OS).

Σε κάθε περίπτωση, παρά την ετερογένεια απόψεων μεταξύ των υπάρχουσών μελετών, με βάση τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης φαίνεται πως νεαρές γυναίκες με διηθητικά καρκινώματα μαστού οι οποίες έχουν υψηλά στρωματικά TILs ή/και έκφραση PDL1TC ή/και PDL1IC είναι περισσότερο πιθανό να εμφανίσουν υψηλό ποσό CD3+ και CD8+ λεμφοκυττάρων, εύρημα το οποίο, όπως τεκμηριώνεται και παραπάνω, συνδέεται με καλύτερα κλινικά αποτελέσματα.

Όσο αφορά στην προγνωστική αξία των PDL1TC, PDL1IC και TILs στα διηθητικά καρκινώματα μαστού, η απάντηση σε αυτό δεν είναι απόλυτη, με αρκετές μετα-αναλύσεις να μην έχουν ομόφωνα αποτελέσματα (234,260,276).

Οι Kim *et. al.* (234) σε μια μετα-ανάλυση που περιελάμβανε 7,877 περιστατικά διηθητικών καρκινωμάτων μαστού κατέληξε στο συμπέρασμα πως η έκφραση του PDL1TC σχετίζεται με μικρότερο RFS και OS. Από την άλλη, στη μετα-ανάλυση του Huang *et. al.*, αν και βρέθηκε η ίδια συσχέτιση μεταξύ του PD-L1 και RFS, η συσχέτιση αυτή δεν αποδείχθηκε και για το OS. Στη δική μας μελέτη η έκφραση του PDL1TC φάνηκε να σχετίζεται με πολλούς κακούς προγνωστικούς για τον ασθενή δείκτες, όπως ο υψηλός βαθμός κακοηθείας, η μεγάλη διάμετρος όγκου, η μη έκφραση των ER, PR καθώς και η υψηλή έκφραση MIB1/Ki67. Παρ' όλα αυτά, η απουσία δεδομένων επιβίωσης των

ασθενών στην έρευνα αυτή, δεν μας επιτρέπει την εκτίμηση του PDL1TC σε παράγοντα με ανεξάρτητη προγνωστική αξία.

Οι μελέτες που επικεντρώνονται στην έκφραση του PD-L1 στα φλεγμονώδη κύτταρα είναι περιορισμένες σε αριθμό, ωστόσο από τα υπάρχοντα αυτά δεδομένα της βιβλιογραφίας η παρουσία του φαίνεται να έχει καλή προγνωστική αξία (277). Φαίνεται πως σε σχέση με το PDL1TC, η έκφραση του PDL1IC έχει αντίθετη προγνωστική αξία, η παρουσία της οποίας συνδέεται με μεγαλύτερο χρόνο ελεύθερης νόσου (Disease free survival-DFS), RFS και OS. Μια πιθανή εξήγηση για την αντίθετη προγνωστική αξία που εμφανίζουν οι δύο αυτές παράμετροι έρχεται από τον Zhao *et. al.* (277), ο οποίος μελετώντας την έκφραση του PD-L1 σε ποικίλους συμπαγείς όγκους κατέληξε πως η παρουσία του συνδέεται με καλή πρόγνωση, ειδικά στις περιπτώσεις των διηθητικών καρκινωμάτων μαστού. Η πιθανή εξήγησή του έγκειται στον μηχανισμό έκφρασης του PD-L1, που αναλύθηκε εκτενώς στην εισαγωγή. Η έκφραση του PD-L1 στα νεοπλασματικά κύτταρα επιτυγχάνεται κυρίως μέσω του ενδοκυττάριου εγγενούς μηχανισμού, ενώ η έκφραση του PDL1IC ρυθμίζεται κυρίως από τον επίκτητο μηχανισμό, που έμμεσα ορίζει την ύπαρξη υψηλών στρωματικών TILs, μιας αντι-νεοπλασματικής απάντησης ως αποτέλεσμα ενός ενεργοποιημένου PD1/PD-L1 άξονα (278). Πάντως, η διαφορά της προγνωστικής αξίας μεταξύ των δύο, PDL1TC και PDL1IC, υποδεικνύει τη σημασία εκτίμησης των δύο αυτών παραμέτρων ξεχωριστά σε κάθε περίπτωση διηθητικού καρκινώματος.

Σημαντική είναι η μέτρηση του ποσοστού των στρωματικών TILs, αφού η παρουσία αυτών συνδέεται με καλύτερη συνολική πρόγνωση για τον ασθενή. Αρκετές είναι πλέον οι έρευνες που επικεντρώνονται στη μελέτη νεοεπικουρικών θεραπειών σε διηθητικά καρκινώματα μαστού και

υψηλά TILs, αποδεικνύοντας ακόμα και περιπτώσεις με πλήρη ανταπόκριση του όγκου στη θεραπεία και έτσι εξαιρετική πρόγνωση για τους ασθενείς. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και στις περιπτώσεις διηθητικών καρκινωμάτων με υψηλό ποσό CD3+ (257,259).

Αδιαμφισβήτητα, η ανακάλυψη του άξονα του PD1/PD-L1 άνοιξε νέους ορίζοντες ως προς την κατανόηση της ανοσιακής απάντησης του οργανισμού έναντι του όγκου. Έτσι, η ενίσχυση της ανοσιακής αυτής απάντησης με την εισαγωγή της ανοσοθεραπείας, σε συνδυασμό με τις ήδη υπάρχουσες στοχευουσες θεραπείες έναντι των ER, PR και HER2, αναμένεται να δώσει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα (244). Η άποψή μας είναι πως τα στρωματικά TILs, τα PDL1TC και PDL1IC μπορούν, όπως και στις μεγαλύτερες ηλικιακά γυναίκες, να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί παράγοντες και να συμπληρώσουν τις ήδη υπάρχουσες στοχευμένες θεραπείες.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μελέτη αυτή εμφανίζει κάποιους περιορισμούς λόγω της αναδρομικής της φύσης και του περιορισμένου αριθμού περιστατικών σε αυτή καθώς και την έλλειψη δεδομένων της μετέπειτα παρακολούθησης των ασθενών αυτών. Παρ' όλα αυτά είναι μια έρευνα που εστιάζει σε μια σπάνια ηλικιακή ομάδα ασθενών, για την οποία υπάρχουν λίγες μελέτες στην βιβλιογραφία.

Το διηθητικό καρκίνωμα μαστού σε νεαρές γυναίκες αποτελούσε ένα σπάνιο εύρημα πριν από κάποιες δεκαετίες, ενώ η επίπτωση εμφάνισης του στην σημερινή εποχή είναι αυξανόμενη και συνδέεται με κακή πρόγνωση (135,251). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως ενώ έχουν γίνει

άλματα προόδου, όσο αφορά στην πρόγνωση και διάγνωση των μεγαλύτερων ηλικιακά γυναικών, αυτό δεν φαίνεται να έχει αντίκτυπο στις νεαρές γυναίκες. Στις λίγες μελέτες που υπάρχουν στην βιβλιογραφία οι οποίες περιλαμβάνουν αμιγώς νεαρές γυναίκες με διηθητικά καρκινώματα μαστού, αυτές επικεντρώνονται κυρίως στην διερεύνηση της πιθανότητας τα καρκινώματα αυτά να έχουν κάποιο ιδιαίτερο επιμέρους χαρακτηριστικό (279,280). Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που διερευνά και συγκρίνει το ποσοστό των στρωματικών TILs και την έκφραση του PD-L1 σε διηθητικά καρκινώματα μαστού σε νεαρές γυναίκες.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, με αυτά της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, φαίνεται πως η έκφραση του PD-L1, το ποσοστό των TILs και το ποσό των στρωματικών CD3+ και CD8+ λεμφοκυττάρων στις νεαρές γυναίκες με διηθητικό καρκίνωμα μαστού είναι όμοιο με αυτό που παρατηρείται και σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας (281).

Με βάση τα ανωτέρω θεωρούμε πως οι παράμετροι αυτοί πρέπει να περιλαμβάνονται και να μελετώνται στις περιπτώσεις νεαρών γυναικών με διηθητικά καρκινώματα μαστού. Τα δεδομένα αυτά θα προσφέρουν επιπλέον προγνωστικά δεδομένα στην ευάλωτη αυτή ομάδα γυναικών ενώ τους δίνεται η ευκαιρία μιας υποψήφιας ανοσοθεραπείας, η οποία θα συμπληρώσει και θα ενδυναμώσει την ήδη υπάρχουσα στοχευμένη θεραπεία με στόχο το βέλτιστο αποτέλεσμα.

5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το καρκίνωμα του μαστού είναι η συχνότερη διαγνωσμένη κακοήθεια στις γυναίκες. Ιδιαίτερα στις περιπτώσεις νεαρών γυναικών (≤ 40 ετών), η πρόγνωση είναι πιο φτωχή λόγω του μεγαλύτερου κινδύνου υποτροπών και θανάτου. Επιπλέον, οι γυναίκες αυτές έρχονται αντιμέτωπες με άλλους παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα ζωής τους, όπως είναι η διατήρηση της γονιμότητας, η τεκνοποίηση, η εξωτερική εμφάνιση, σεξουαλική ζωή και η ψυχική υγεία. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν γίνει άλματα προόδου στην διάγνωση, πρόγνωση και θεραπεία στον καρκίνο του μαστού με τις τελευταίες έρευνες να στρέφονται πλέον στην μελέτη του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, όπως στο ποσοστό παρουσίας των λεμφοκυττάρων (Tumor-infiltrating Lymphocytes/TILs) στο διάμεσο μεταξύ των νεοπλασματικών κυττάρων στρώμα καθώς και στον άξονα PD1/PD-L1. Η παρουσία αυξημένου ποσοστού TILs έχει συσχετισθεί με καλύτερη πρόγνωση και ιδιαίτερα όταν υπάρχουν υψηλά ποσά CD3+ και CD8+ T λεμφοκύτταρα σε αυτά. Η προγνωστική αξία της παρουσίας PD-L1 σε διηθητικά καρκινώματα μαστού εξαρτάται από τα κύτταρα τα οποία την εκφράζουν, με τις περισσότερες έρευνες να καταλήγουν πως αυτό έχει κακή πρόγνωση στις περιπτώσεις που εκφράζεται από τα νεοπλασματικά κύτταρα και καλή όταν αυτή εντοπίζεται στα λεμφοκύτταρα του περιξ του όγκου στρώματος.

Στην αναδρομική αυτήν μελέτη συμπεριλήφθησαν 45 διηθητικά καρκινώματα μαστού νεαρών γυναικών και μελετήθηκαν σε ολόκληρες τομές παραφίνης το ποσοστό των στρωματικών TILs, το ποσό των CD3+ και CD8+ λεμφοκυττάρων, η έκφραση του PD-L1 σε νεοπλασματικά κύτταρα (PDL1TC) και λεμφοκύτταρα (PDL1IC) και η συσχέτιση τους με τις λοιπές κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους των γυναικών αυτών.

Από το σύνολο των γυναικών το 20% των περιστατικών εμφάνισε έκφραση PDL1TC και το 44.44% PDL1IC. Το 28,88% αυτών είχε υψηλό TILs. Τόσο η έκφραση του PDL1TC όσο και έκφραση PDL1IC φάνηκε να συσχετίζεται σημαντικά με την μέγιστη διάμετρο του όγκου, την έκφραση του ER και PR καθώς και με το MIB1/Ki67. Επιπλέον, η έκφραση του PDL1TC εμφάνισε σημαντική συσχέτιση με τον βαθμό κακοηθείας των καρκινωμάτων. Στατιστικά σημαντική συσχέτιση υπήρξε και μεταξύ των υψηλών TILs και την μέγιστη διάμετρο του όγκου, την έκφραση των ER και του MIB1/Ki67. Τελος, η έκφραση του PDL1TC, PDL1IC και το ποσοστό των TILs φάνηκε να σχετίζεται με το ποσό των CD3+ και CD8+ T λεμφοκυττάρων. Δεν ανευρέθη στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του PD-L1 και των HER2, ωστόσο η γνώμη μας είναι ότι η συσχέτιση αυτή δεν επετεύχθη λόγω του περιορισμένου αριθμού HER2 θετικών καρκινωμάτων.

Τα ευρήματα της έρευνας αυτής για το σύνολο των νεαρών γυναικών δείχνουν ότι το ποσοστό των στρωματικών TILs, το ποσό CD3+ και CD8+ T λεμφοκυττάρων και η έκφραση του PD-L1, δεν φαίνεται να διαφέρουν από τα αντίστοιχα δεδομένα της βιβλιογραφίας που περιλαμβάνει γυναίκες όλων των ηλικιών. Για την ευάλωτη αυτή ομάδα γυναικών, οι παράμετροι αυτοί θα πρέπει να εκτιμώνται και να καταγράφονται ώστε γυναίκες νεαρές να έχουν επιπλέον δείκτες προγνωστικής και προβλεπτικής αξίας οι οποίοι είναι δυνατόν να συμβάλουν σε ανοσοθεραπευτική προσέγγιση, στοχεύοντας στο βέλτιστο αποτέλεσμα.

6. SUMMARY

Breast cancer is the most common malignancy diagnosed among women of all ages. Especially when it comes to younger women with breast cancer, they have a higher risk of recurrence and death, compared to older women. Additionally, this patient group shares considerations that must be taken into account when treated, such as fertility preservation, pregnancy, sexual life and external appearance. Over the past decade great improvement in diagnosis, prognosis and treatment has been achieved with numerous studies focusing on the tumor microenvironment and more specifically on the Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) and the amount of CD3+ and CD8+ T lymphocytes among them, as well as the PD/PD-L1 axis. It has been shown that high TILs in solid tumors, breast cancer included, is associated with better prognosis. The prognostic value of PD-L1, on the other hand, is depended on the type of cell that it is dependent. While expression of PD-L1 on the neoplastic cells of a carcinoma is linked to poor prognosis, the expression of PD-L1 on the stromal lymphocytes of the carcinoma is linked to good prognosis.

Forty-five young women with IBC were included in this retrospective study. Whole tissue sections were used to evaluate stromal TILs, the amount of CD3+ and CD8+ T lymphocytes in it and PD-L1 expression on both tumor cells (PDL1TC) and immune cells (PDL1IC). The association of these results was further correlated with other clinicopathological parameters.

Twenty percent (20%) of cases showed PD-L1 expression by tumor cells (PDL1TC) and 44.4% showed PD-L1 expression by immune cells (PDL1IC). Furthermore, 28.88% revealed high stromal TILs. PDL1TC and

PDL1IC expression were significantly associated with tumor diameter and expression of estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors and Ki67. PDL1TC expression was also associated with grade. High TILs were associated with tumor diameter, ER and Ki67 expression. PDL1TC, PDL1IC expression and TILs were associated with the density of CD3+ and CD8+ lymphocytes.

The results of our study show that the PDL1, CD3 and CD8 expression status in younger women are similar to other age groups as reported in the literature. These parameters should be evaluated and reported in order to be used in cases of young women with IBC and complement existing targeted immunotherapeutical approaches, aiming for a better outcome.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mescher AL. Junqueira's Basic Histology: text and atlas. 15th ed. McGraw-Hill Education; 2018. 562 p.
2. Goldblum J, Lamps L, McKenney J, Myers J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 11th ed. Elsevier; 2017. 2306 p.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2019 Jan 8;69(1):7–34. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21551>
4. Lakhani S, Ellis I, Schnitt S, Tan P, van de Vijver M. WHO Classification of Tumours of the Breast. 4th ed. International Agency for Research on Cancer; 2012. 240 p.
5. Patsea E, Kaklamanis L, Batistatou A. The first report of a 5-year period cancer registry in Greece (2009–2013): a pathology-based cancer registry. *Virchows Arch* [Internet]. 2018 Apr 4;472(4):677–82. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00428-017-2287-8>
6. DeSantis C, Howlader N, Cronin KA, Jemal A. Breast Cancer Incidence Rates in U.S. Women Are No Longer Declining. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2011 May 1;20(5):733–9. Available from: <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-11-0061>
7. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2018 Jan;68(1):7–30. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21442>
8. DeSantis CE, Fedewa SA, Goding Sauer A, Kramer JL, Smith RA, Jemal A. Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2016 Jan;66(1):31–42. Available from:

- <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21320>
9. Noone A-M, Cronin KA, Altekruze SF, Howlader N, Lewis DR, Petkov VI, et al. Cancer Incidence and Survival Trends by Subtype Using Data from the Surveillance Epidemiology and End Results Program, 1992–2013. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2017 Apr;26(4):632–41. Available from: <http://cebp.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1055-9965.EPI-16-0520>
 10. Dunn BK, Agurs-Collins T, Browne D, Lubet R, Johnson KA. Health disparities in breast cancer: biology meets socioeconomic status. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2010 Jun 1;121(2):281–92. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-010-0827-x>
 11. Copson E, Maishman T, Gerty S, Eccles B, Stanton L, Cutress RI, et al. Ethnicity and outcome of young breast cancer patients in the United Kingdom: the POSH study. *Br J Cancer* [Internet]. 2014 Jan 22;110(1):230–41. Available from: <http://www.nature.com/articles/bjc2013650>
 12. Russo J, Moral R, Balogh GA, Mailo D, Russo IH. The protective role of pregnancy in breast cancer. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2005 Jun 7;7(3):131. Available from: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr1029>
 13. DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, Newman LA, Miller KD, Goding Sauer A, et al. Breast cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2019 Nov 2;69(6):438–51. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21583>
 14. Jatoi I, Anderson WF. Qualitative age interactions in breast cancer studies: a mini-review. *Futur Oncol* [Internet]. 2010 Nov;6(11):1781–8. Available from:

- <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fon.10.139>
15. Opdahl S, Alsaker MDK, Janszky I, Romundstad PR, Vatten LJ. Joint effects of nulliparity and other breast cancer risk factors. *Br J Cancer* [Internet]. 2011 Aug 2;105(5):731–6. Available from: <http://www.nature.com/articles/bjc2011286>
 16. Palmer JR, Boggs DA, Wise LA, Ambrosone CB, Adams-Campbell LL, Rosenberg L. Parity and Lactation in Relation to Estrogen Receptor Negative Breast Cancer in African American Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2011 Sep 1;20(9):1883–91. Available from: <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-11-0465>
 17. Grevers X, Grundy A, Poirier AE, Khandwala F, Feldman M, Friedenreich CM, et al. Cancer incidence attributable to the use of oral contraceptives and hormone therapy in Alberta in 2012. *C Open* [Internet]. 2016 Dec 12;4(4):E754–9. Available from: <http://cmajopen.ca/cgi/doi/10.9778/cmajo.20160046>
 18. Marchbanks PA, Curtis KM, Mandel MG, Wilson HG, Jeng G, Folger SG, et al. Oral contraceptive formulation and risk of breast cancer. *Contraception* [Internet]. 2012 Apr;85(4):342–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001078241100480X>
 19. Calle EE, Feigelson HS, Hildebrand JS, Teras LR, Thun MJ, Rodriguez C. Postmenopausal hormone use and breast cancer associations differ by hormone regimen and histologic subtype. *Cancer* [Internet]. 2009 Mar 1;115(5):936–45. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.24101>
 20. 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 meta-analysis. *Lancet Oncol* [Internet]. 2006 Nov;7(11):910–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204506709111>
21. Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, Stefanick ML, Gass M, Lane D, et al. Influence of Estrogen Plus Progestin on Breast Cancer and Mammography in Healthy Postmenopausal Women. *JAMA* [Internet]. 2003 Jun 25;289(24):3243. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.289.24.3243>
 22. Pelucchi C, Levi F, La Vecchia C. The rise and fall in menopausal hormone therapy and breast cancer incidence. *The Breast* [Internet]. 2010 Jun;19(3):198–201. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096097761000038X>
 23. Chen WY, Rosner B, Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC. Moderate Alcohol Consumption During Adult Life, Drinking Patterns, and Breast Cancer Risk. *JAMA* [Internet]. 2011 Nov 2;306(17):1884. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2011.1590>
 24. Tjønneland A, Christensen J, Olsen A, Stripp C, Thomsen BL, Overvad K, et al. Alcohol intake and breast cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Cancer Causes Control* [Internet]. 2007 May 15;18(4):361–73. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10552-006-0112-9>
 25. Kim HJ, Jung S, Eliassen AH, Chen WY, Willett WC, Cho E. Alcohol Consumption and Breast Cancer Risk in Younger Women According to Family History of Breast Cancer and Folate Intake. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2017 Sep 1;186(5):524–31. Available

- from: <https://academic.oup.com/aje/article/186/5/524/3831268>
26. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 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* [Internet]. 2002 Nov 12;87(11):1234–45. Available from: <http://www.nature.com/articles/6600596>
 27. Farvid MS, Chen WY, Michels KB, Cho E, Willett WC, Eliassen AH. Fruit and vegetable consumption in adolescence and early adulthood and risk of breast cancer: population based cohort study. *BMJ* [Internet]. 2016 May 11;i2343. Available from: <http://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.i2343>
 28. Farvid MS, Cho E, Chen WY, Eliassen AH, Willett WC. Dietary protein sources in early adulthood and breast cancer incidence: prospective cohort study. *BMJ* [Internet]. 2014 Jun 10;348(jun10 3):g3437–g3437. Available from: <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.g3437>
 29. Pan SY, Zhou J, Gibbons L, Morrison H, Wen SW. Antioxidants and breast cancer risk- a population-based case-control study in Canada. *BMC Cancer* [Internet]. 2011 Dec 24;11(1):372. Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-11-372>
 30. Dong J-Y, Qin L-Q. Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2011 Jan 27;125(2):315–23. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-010-1270-8>
 31. van den Brandt PA, Schulpen M. Mediterranean diet adherence and risk of postmenopausal breast cancer: results of a cohort study and

- meta-analysis. *Int J Cancer* [Internet]. 2017 May 15;140(10):2220–31. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.30654>
32. Buckland G, Travier N, Cottet V, González CA, Luján-Barroso L, Agudo A, et al. Adherence to the mediterranean diet and risk of breast cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition cohort study. *Int J Cancer* [Internet]. 2013 Jun 15;132(12):2918–27. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.27958>
33. Van Ryswyk K, Villeneuve PJ, Johnson KC. Dietary patterns and the risk of female breast cancer among participants of the Canadian National Enhanced Cancer Surveillance System. *Can J Public Heal* [Internet]. 2016 Jan 17;107(1):e49–55. Available from: <http://link.springer.com/10.17269/cjph.107.5230>
34. Neilson HK, Farris MS, Stone CR, Vaska MM, Brenner DR, Friedenreich CM. Moderate-vigorous recreational physical activity and breast cancer risk, stratified by menopause status. *Menopause* [Internet]. 2017 Mar;24(3):322–44. Available from: <http://journals.lww.com/00042192-201703000-00014>
35. Friedenreich CM, Neilson HK, Lynch BM. State of the epidemiological evidence on physical activity and cancer prevention. *Eur J Cancer* [Internet]. 2010 Sep;46(14):2593–604. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804910007069>
36. McTiernan A, Kooperberg C, White E, Wilcox S, Coates R, Adams-Campbell LL, et al. Recreational Physical Activity and the Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women. *JAMA* [Internet]. 2003 Sep 10;290(10):1331. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.290.10.1331>

37. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* [Internet]. 2008 Feb;371(9612):569–78. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067360860269X>
38. Green J, Cairns BJ, Casabonne D, Wright FL, Reeves G, Beral V. Height and cancer incidence in the Million Women Study: prospective cohort, and meta-analysis of prospective studies of height and total cancer risk. *Lancet Oncol* [Internet]. 2011 Aug;12(8):785–94. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204511701541>
39. McTiernan A, Ulrich C, Slate S, Potter J. Physical activity and cancer etiology: associations and mechanisms. *Cancer Causes Control* [Internet]. 1998 Oct;9(5):487–509. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9934715>
40. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. *N Engl J Med* [Internet]. 2003 Apr 24;348(17):1625–38. Available from:
<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa021423>
41. Baer HJ, Tworoger SS, Hankinson SE, Willett WC. Body Fatness at Young Ages and Risk of Breast Cancer Throughout Life. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2010 Jun 1;171(11):1183–94. Available from:
<https://academic.oup.com/aje/article-lookup/doi/10.1093/aje/kwq045>
42. Harris HR, Tamimi RM, Willett WC, Hankinson SE, Michels KB. Body Size Across the Life Course, Mammographic Density, and Risk of Breast Cancer. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2011 Oct 15;174(8):909–18. Available from:

- <https://academic.oup.com/aje/article-lookup/doi/10.1093/aje/kwr225>
43. Yaghjian L, Tamimi RM, Bertrand KA, Scott CG, Jensen MR, Pankratz VS, et al. Interaction of mammographic breast density with menopausal status and postmenopausal hormone use in relation to the risk of aggressive breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2017 Sep 17;165(2):421–31. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-017-4341-2>
 44. Hancock SL, Tucker MA, Hoppe RT. Breast Cancer After Treatment of Hodgkin's Disease. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1993 Jan 6;85(1):25–31. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/85.1.25>
 45. Millikan R, DeVoto E, Duell EJ, Tse CK, Savitz DA, Beach J, et al. Dichlorodiphenyldichloroethene, polychlorinated biphenyls, and breast cancer among African-American and white women in North Carolina. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2000 Nov;9(11):1233–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11097232>
 46. Krieger N, Wolff MS, Hiatt RA, Rivera M, Vogelmann J, Orentreich N. Breast Cancer and Serum Organochlorines: a Prospective Study Among White, Black, and Asian Women. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1994 Apr 20;86(8):589–99. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/86.8.589>
 47. Blask DE, Hill SM, Dauchy RT, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, et al. Circadian regulation of molecular, dietary, and metabolic signaling mechanisms of human breast cancer growth by the nocturnal melatonin signal and the consequences of its disruption

- by light at night. *J Pineal Res* [Internet]. 2011 Oct;51(3):259–69. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-079X.2011.00888.x>
48. Terry MB, Delgado-Cruzata L, Vin-Raviv N, Wu HC, Santella RM. DNA methylation in white blood cells. *Epigenetics* [Internet]. 2011 Jul 27;6(7):828–37. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/epi.6.7.16500>
49. Zhang B, Beeghly-Fadiel A, Long J, Zheng W. Genetic variants associated with breast-cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. *Lancet Oncol* [Internet]. 2011 May;12(5):477–88. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204511700766>
50. Lin W-Y, Camp NJ, Cannon-Albright LA, Allen-Brady K, Balasubramanian S, Reed MWR, et al. A role for XRCC2 gene polymorphisms in breast cancer risk and survival. *J Med Genet* [Internet]. 2011 Jul 1;48(7):477–84. Available from: <http://jmg.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jmedgenet-2011-100018>
51. Silva SN, Tomar M, Paulo C, Gomes BC, Azevedo AP, Teixeira V, et al. Breast cancer risk and common single nucleotide polymorphisms in homologous recombination DNA repair pathway genes XRCC2, XRCC3, NBS1 and RAD51. *Cancer Epidemiol* [Internet]. 2010 Feb;34(1):85–92. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877782109001465>
52. Fulda S. Caspase-8 in cancer biology and therapy. *Cancer Lett* [Internet]. 2009 Aug;281(2):128–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383508008999>
53. Turnbull C, Rahman N. Genetic Predisposition to Breast Cancer: Past, Present, and Future. *Annu Rev Genomics Hum Genet* [Internet]. 2008 Sep;9(1):321–45. Available from:

- <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.genom.9.081307.164339>
54. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2003 May;72(5):1117–30. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707606405>
 55. Mavaddat N, Antoniou AC, Easton DF, Garcia-Closas M. Genetic susceptibility to breast cancer. *Mol Oncol* [Internet]. 2010 Jun;4(3):174–91. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1016/j.molonc.2010.04.011>
 56. Hutter RVP, Kim DU. The problem of multiple lesions of the breast. *Cancer* [Internet]. 1971 Dec;28(6):1591–607. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/1097-0142%28197112%2928%3A6%3C1591%3A%3AAID-CNCR2820280639%3E3.0.CO%3B2-J>
 57. Benson SRC, Blue J, Judd K, Harman JE. Ultrasound is now better than mammography for the detection of invasive breast cancer. *Am J Surg* [Internet]. 2004 Oct;188(4):381–5. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002961004002995>
 58. Gordon PB, Goldenberg SL. Malignant breast masses detected only by ultrasound. A retrospective review. *Cancer* [Internet]. 1995 Aug 15;76(4):626–30. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1002/1097-0142%2819950815%2976%3A4%3C626%3A%3AAID-CNCR2820760413%3E3.0.CO%3B2-Z>
 59. Helvie MA, Chan HP, Adler DD, Boyd PG. Breast thickness in

- routine mammograms: effect on image quality and radiation dose. *Am J Roentgenol* [Internet]. 1994 Dec;163(6):1371–4. Available from: <http://www.ajronline.org/doi/10.2214/ajr.163.6.7992731>
60. Crystal P, Strano SD, Shcharynski S, Koretz MJ. Using Sonography to Screen Women with Mammographically Dense Breasts. *Am J Roentgenol* [Internet]. 2003 Jul;181(1):177–82. Available from: <http://www.ajronline.org/doi/10.2214/ajr.181.1.1810177>
61. Szabo BK, Aspelin P, Kristoffersen Wiberg M, Bone B. Dynamic MR Imaging Of The Breast. Analysis of kinetic and morphologic diagnostic criteria. *Acta radiol* [Internet]. 2003 Jul;44(4):379–86. Available from: <http://www.informaworld.com/openurl?genre=article&doi=10.1034/j.1600-0455.2003.00084.x&magic=crossref%7C%7CD404A21C5BB053405B1A640AFFD44AE3>
62. Heywang-Köbrunner SH, Bick U, Bradley Jr. WG, Boné B, Casselman J, Coulthard A, et al. International investigation of breast MRI: results of a multicentre study (11 sites) concerning diagnostic parameters for contrast-enhanced MRI based on 519 histopathologically correlated lesions. *Eur Radiol* [Internet]. 2001 Mar 28;11(4):531–46. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s003300000745>
63. Persson M, Andren Y, Mark J, Horlings HM, Persson F, Stenman G. Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2009 Nov 3;106(44):18740–4. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0909114106>
64. Weigelt B, Horlings H, Kreike B, Hayes M, Hauptmann M, Wessels L, et al. Refinement of breast cancer classification by

- molecular characterization of histological special types. *J Pathol* [Internet]. 2008 Oct;216(2):141–50. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.2407>
65. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, et al. Gene Expression Profiling in Breast Cancer: Understanding the Molecular Basis of Histologic Grade To Improve Prognosis. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2006 Feb 15;98(4):262–72. Available from: <http://academic.oup.com/jnci/article/98/4/262/2521968/Gene-Expression-Profiling-in-Breast-Cancer>
66. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2010 Aug 30;12(4):207. Available from: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2607>
67. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AHS, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z, et al. Prognostic Significance of Nottingham Histologic Grade in Invasive Breast Carcinoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008 Jul 1;26(19):3153–8. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2007.15.5986>
68. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* [Internet]. 2000 Aug;406(6797):747–52. Available from: <http://www.nature.com/articles/35021093>
69. 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* [Internet]. 2001 Sep 11;98(19):10869–74. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.191367098>
70. Rouzier R. Breast Cancer Molecular Subtypes Respond Differently

- to Preoperative Chemotherapy. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2005 Aug 15;11(16):5678–85. Available from:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-04-2421>
71. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Jul 10;28(20):3271–7. Available from:
<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2009.25.9820>
72. Korde LA, Lusa L, McShane L, Lebowitz PF, Lukes L, Camphausen K, et al. Gene expression pathway analysis to predict response to neoadjuvant docetaxel and capecitabine for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2010 Feb 11;119(3):685–99. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s10549-009-0651-3>
73. Harrell JC, Prat A, Parker JS, Fan C, He X, Carey L, et al. Genomic analysis identifies unique signatures predictive of brain, lung, and liver relapse. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2012 Apr 14;132(2):523–35. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s10549-011-1619-7>
74. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* [Internet]. 2012 Oct 23;490(7418):61–70. Available from:
<http://www.nature.com/articles/nature11412>
75. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol* [Internet]. 2020 Jan;27(1):27–35. Available from:
<http://journals.lww.com/10.1097/PAP.0000000000000232>
76. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SAW, et al. Comprehensive Genomic Analysis Identifies Novel Subtypes and Targets of Triple-Negative Breast Cancer. *Clin*

- Cancer Res [Internet]. 2015 Apr 1;21(7):1688–98. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-14-0432>
77. Hennessy BT, Gonzalez-Angulo A-M, Stemke-Hale K, Gilcrease MZ, Krishnamurthy S, Lee J-S, et al. Characterization of a Naturally Occurring Breast Cancer Subset Enriched in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Stem Cell Characteristics. *Cancer Res* [Internet]. 2009 May 15;69(10):4116–24. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-08-3441>
78. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JJ, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2010 Oct 2;12(5):R68. Available from: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2635>
79. Doane AS, Danso M, Lal P, Donaton M, Zhang L, Hudis C, et al. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene* [Internet]. 2006 Jun 20;25(28):3994–4008. Available from: <http://www.nature.com/articles/1209415>
80. 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* [Internet]. 2005 Jul 9;24(29):4660–71. Available from: <http://www.nature.com/articles/1208561>
81. Greif JM. Mammographic screening for breast cancer: An invited review of the benefits and costs. *The Breast* [Internet]. 2010 Aug;19(4):268–72. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960977610000718>

82. Cardoso F, Loibl S, Pagani O, Graziottin A, Panizza P, Martincich L, et al. The European Society of Breast Cancer Specialists recommendations for the management of young women with breast cancer. *Eur J Cancer* [Internet]. 2012 Dec;48(18):3355–77. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804912007927>
83. Partridge AH, Pagani O, Abulkhair O, Aebi S, Amant F, Azim HA, et al. First international consensus guidelines for breast cancer in young women (BCY1). *The Breast* [Internet]. 2014 Jun;23(3):209–20. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960977614000551>
84. Fredholm H, Eaker S, Frisell J, Holmberg L, Fredriksson I, Lindman H. Breast Cancer in Young Women: Poor Survival Despite Intensive Treatment. Aziz SA, editor. *PLoS One* [Internet]. 2009 Nov 11;4(11):e7695. Available from:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0007695>
85. Kroman N. Factors influencing the effect of age on prognosis in breast cancer: population based study Commentary: much still to learn about relations between tumour biology, prognosis, and treatment outcome in early breast cancer. *BMJ* [Internet]. 2000 Feb 19;320(7233):474–9. Available from:
<http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.320.7233.474>
86. van Laar C, van der Sangen MJC, Poortmans PMP, Nieuwenhuijzen GAP, Roukema JA, Roumen RMH, et al. Local recurrence following breast-conserving treatment in women aged 40years or younger: Trends in risk and the impact on prognosis in a population-based cohort of 1143 patients. *Eur J Cancer* [Internet]. 2013 Oct;49(15):3093–101. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804913004383>

87. Samphao S, Wheeler AJ, Rafferty E, Michaelson JS, Specht MC, Gadd MA, et al. Diagnosis of breast cancer in women age 40 and younger: delays in diagnosis result from underuse of genetic testing and breast imaging. *Am J Surg* [Internet]. 2009 Oct;198(4):538–43. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002961009003419>
88. de la Rochefordière A, Campana F, Fenton J, Vilcoq JR, Fourquet A, Asselain B, et al. Age as prognostic factor in premenopausal breast carcinoma. *Lancet* [Internet]. 1993 Apr;341(8852):1039–43. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/014067369392407K>
89. Partridge A, Gelber S, Gelber RD, Castiglione-Gertsch M, Goldhirsch A, Winer E. Age of menopause among women who remain premenopausal following treatment for early breast cancer: Long-term results from International Breast Cancer Study Group Trials V and VI. *Eur J Cancer* [Internet]. 2007 Jul;43(11):1646–53. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804907002912>
90. Graziottin A. Effect of Premature Menopause on Sexuality. *Women's Heal* [Internet]. 2007 Jul 7;3(4):455–74. Available from:
<http://journals.sagepub.com/doi/10.2217/17455057.3.4.455>
91. Stearns V, Beebe KL, Iyengar M, Dube E. Paroxetine Controlled Release in the Treatment of Menopausal Hot Flashes. *JAMA* [Internet]. 2003 Jun 4;289(21):2827. Available from:
<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.289.21.2827>
92. Walker EM, Rodriguez AI, Kohn B, Ball RM, Pegg J, Pocock JR, et al. Acupuncture Versus Venlafaxine for the Management of Vasomotor Symptoms in Patients With Hormone Receptor–Positive

- Breast Cancer: A Randomized Controlled Trial. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Feb 1;28(4):634–40. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2009.23.5150>
93. Loibl S, Lintermans A, Dieudonné AS, Neven P. Management of menopausal symptoms in breast cancer patients. *Maturitas* [Internet]. 2011 Feb;68(2):148–54. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851221000424X>
 94. Kohli S, Fisher SG, Tra Y, Adams MJ, Mapstone ME, Wesnes KA, et al. The effect of modafinil on cognitive function in breast cancer survivors. *Cancer* [Internet]. 2009 Jun 15;115(12):2605–16. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.24287>
 95. Graziottin A, Basson R. Sexual dysfunction in women with premature menopause. *Menopause* [Internet]. 2004 Nov;11(Supplement):766–77. Available from: <http://journals.lww.com/00042192-200411061-00008>
 96. Schover LR. Sexuality and body image in younger women with breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* [Internet]. 1994;(16):177–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7999462>
 97. Ganz PA, Coscarelli A, Fred C, Kahn B, Polinsky ML, Petersen L. Breast cancer survivors: Psychosocial concerns and quality of life. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 1996 Jun;38(2):183–99. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF01806673>
 98. Manganiello A, Hoga LAK, Reberte LM, Miranda CM, Rocha CAM. Sexuality and quality of life of breast cancer patients post mastectomy. *Eur J Oncol Nurs* [Internet]. 2011 Apr;15(2):167–72. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1462388910001213>
 99. Bloom HJG, Richardson WW. Histological Grading and Prognosis in Breast Cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 1957 Sep;11(3):359–77.

- Available from: <http://www.nature.com/articles/bjc195743>
100. Ries L, Eisner M. SEER Survival Monograph: Cancer survival among adults: U.S. SEER Program, 1988-2001, patient and tumor characteristics. Ries L, Young J, Keel G, Eisner M, Lin Y, Horner M-J, editors. National Cancer Institute; 2007.
 101. Richter K, Buchner J. Hsp90: Chaperoning signal transduction. *J Cell Physiol* [Internet]. 2001 Sep;188(3):281–90. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.1131>
 102. O'Regan RM, Jordan VC. Tamoxifen to raloxifene and beyond. *Semin Oncol* [Internet]. 2001 Jun;28(3):asonc0280260. Available from: <http://www.harcourthealth.com/scripts/om.dll/serve?action=searchDB&searchDBfor=art&artType=abs&id=asonc0280260>
 103. Webb P, Nguyen P, Valentine C, Lopez GN, Kwok GR, McInerney E, et al. The Estrogen Receptor Enhances AP-1 Activity by Two Distinct Mechanisms with Different Requirements for Receptor Transactivation Functions. *Mol Endocrinol* [Internet]. 1999 Oct 1;13(10):1672–85. Available from: <https://academic.oup.com/mend/article/13/10/1672/2747780>
 104. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2000 Jul;124(7):966–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10888772>
 105. Nicholson RI, McClelland RA, Gee JM. Steroid hormone receptors and their clinical significance in cancer. *J Clin Pathol* [Internet]. 1995 Oct 1;48(10):890–5. Available from: <http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.48.10.890>
 106. Bishop H., Elston C., Blamey R., Haybittle J., Nicholson R.,

- Griffiths K. RELATIONSHIP OF OESTROGEN-RECEPTOR STATUS TO SURVIVAL IN BREAST CANCER. *Lancet* [Internet]. 1979 Aug;314(8137):283–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673679902952>
107. Westerberg H, Gustafson SA, Nordenskjöld B, Silfverswärd C, Wallgren A. Estrogen receptor level and other factors in early recurrence of breast cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 1980 Oct 15;26(4):429–33. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.2910260407>
108. Allegra JC, Lippman ME, Thompson EB, Simon R, Barlock A, Green L, et al. Association between steroid hormone receptors and response rate to cytotoxic chemotherapy in metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rep* [Internet]. 1978 Sep;62(9):1281–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/688273>
109. Osborne CK. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 1998 Oct;51(3):227–38. Available from: <http://link.springer.com/10.1023/A:1006132427948>
110. McGuire WL. Estrogen Receptors in Human Breast Cancer. *J Clin Invest* [Internet]. 1973 Jan 1;52(1):73–7. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/107175>
111. Clark GM, Osborne CK, McGuire WL. Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor, and patient characteristics in human breast cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 1984 Oct;2(10):1102–9. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.1984.2.10.1102>
112. Lippman ME, Allegra JC. Quantitative estrogen receptor analyses: the response to endocrine and cytotoxic chemotherapy in human breast cancer and the disease-free interval. *Cancer* [Internet]. 1980

- Dec 15;46(12 Suppl):2829–34. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7448729>
113. Campbell FC, Elston CW, Blamey RW, Morris AH, Nicholson RI, Griffiths K, et al. QUANTITATIVE OESTRADIOL RECEPTOR VALUES IN PRIMARY BREAST CANCER AND RESPONSE OF METASTASES TO ENDOCRINE THERAPY. *Lancet* [Internet]. 1981 Dec;318(8259):1317–9. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673681913416>
114. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* (London, England) [Internet]. 1998 May 16;351(9114):1451–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9605801>
115. Ravdin PM, Green S, Dorr TM, McGuire WL, Fabian C, Pugh RP, et al. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* [Internet]. 1992 Aug;10(8):1284–91. Available from:
<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.1992.10.8.1284>
116. Kourea H, Zolota V, Scopa C. Targeted Pathways in Breast Cancer: Molecular and Protein Markers Guiding Therapeutic Decisions. *Curr Mol Pharmacol* [Internet]. 2015 Jan 5;7(1):4–21. Available from:
<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1874-4672&volume=7&issue=1&spage=4>
117. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* (80-) [Internet]. 1986 Jun

- 27;232(4758):1644–6. Available from:
<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.3012781>
118. Lupu R, Cardillo M, Harris L, Hijazi M, Rosenberg K. Interaction between erbB- receptors and heregulin in breast cancer tumor progression and drug resistance. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 1995 Jun;6(3):135–45. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044579X85700168>
119. Yarden Y. Biology of HER2 and Its Importance in Breast Cancer. *Oncology* [Internet]. 2001;61(2):1–13. Available from:
<https://www.karger.com/Article/FullText/55396>
120. Quirke P, Pickles A, Tuzi N, Mohamdee O, Gullick W. Pattern of expression of c-erbB-2 oncoprotein in human fetuses. *Br J Cancer* [Internet]. 1989 Jul;60(1):64–9. Available from:
<http://www.nature.com/articles/bjc1989221>
121. Coussens L, Yang-Feng T, Liao Y, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* (80-) [Internet]. 1985 Dec 6;230(4730):1132–9. Available from:
<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.2999974>
122. Hynes N. The biology of erbB-2/nue/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 1994 Dec 30;1198(2–3):165–84. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304419X94900124>
123. Carraway III KL, Weber JL, Unger MJ, Ledesma J, Yu N, Gassmann M, et al. Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature* [Internet]. 1997 May;387(6632):512–6. Available from:
<http://www.nature.com/articles/387512a0>
124. van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor Protein-Tyrosine

- Kinases and Their Signal Transduction Pathways. *Annu Rev Cell Biol* [Internet]. 1994 Nov;10(1):251–337. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cb.10.110194.001343>
125. Tzahar E. The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 1998 Feb 20;1377(1):M25–37. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X97000322>
126. Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Kinney R, et al. Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* [Internet]. 1990 Jul 1;50(13):4087–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1972347>
127. Slamon D, Godolphin W, Jones L, Holt J, Wong S, Keith D, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* (80-) [Internet]. 1989 May 12;244(4905):707–12. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.2470152>
128. Hou L, Shi D, Tu S-M, Zhang H-Z, Hung M-C, Ling D. Oral cancer progression and c-erbB-2/neu proto-oncogene expression. *Cancer Lett* [Internet]. 1992 Aug;65(3):215–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030438359290234M>
129. Weiner DB, Nordberg J, Robinson R, Nowell PC, Gazdar A, Greene MI, et al. Expression of the neu gene-encoded protein (P185neu) in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res* [Internet]. 1990 Jan 15;50(2):421–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1967224>
130. Yokota J, Yamamoto T, Miyajima N, Toyoshima K, Nomura N,

- Sakamoto H, et al. Genetic alterations of the c-erbB-2 oncogene occur frequently in tubular adenocarcinoma of the stomach and are often accompanied by amplification of the v-erbA homologue. *Oncogene* [Internet]. 1988 Mar;2(3):283–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3281095>
131. Madarnas Y, Trudeau M, Franek JA, McCready D, Pritchard KI, Messersmith H. Adjuvant/neoadjuvant trastuzumab therapy in women with HER-2/neu-overexpressing breast cancer: A systematic review. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2008 Oct;34(6):539–57. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305737208000571>
132. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol* [Internet]. 2018 Jul 10;36(20):2105–22. Available from: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2018.77.8738>
133. 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* [Internet]. 2007 Aug 1;13(15):4429–34. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>
134. Pagni O, Senkus E, Wood W, Colleoni M, Cufer T, Kyriakides S, et al. International Guidelines for Management of Metastatic Breast Cancer: Can Metastatic Breast Cancer Be Cured? *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2010 Apr 7;102(7):456–63. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article->

- lookup/doi/10.1093/jnci/djq029
135. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* [Internet]. 2019 Aug;30(8):1194–220. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753419312876>
 136. Moran MS, Schnitt SJ, Giuliano AE, Harris JR, Khan SA, Horton J, et al. Society of Surgical Oncology–American Society for Radiation Oncology Consensus Guideline on Margins for Breast-Conserving Surgery With Whole-Breast Irradiation in Stages I and II Invasive Breast Cancer. *Int J Radiat Oncol* [Internet]. 2014 Mar;88(3):553–64. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360301613033154>
 137. Houssami N, Macaskill P, Marinovich ML, Dixon JM, Irwig L, Brennan ME, et al. Meta-analysis of the impact of surgical margins on local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy. *Eur J Cancer* [Internet]. 2010 Dec;46(18):3219–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804910007537>
 138. Morrow M, Van Zee KJ, Solin LJ, Houssami N, Chavez-MacGregor M, Harris JR, et al. Society of Surgical Oncology–American Society for Radiation Oncology–American Society of Clinical Oncology Consensus Guideline on Margins for Breast-Conserving Surgery With Whole-Breast Irradiation in Ductal Carcinoma in Situ. *Pract Radiat Oncol* [Internet]. 2016 Sep;6(5):287–95. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1879850016301096>
 139. Schnitt SJ, Moran MS, Houssami N, Morrow M. The Society of Surgical Oncology–American Society for Radiation Oncology

- Consensus Guideline on Margins for Breast-Conserving Surgery With Whole-Breast Irradiation in Stages I and II Invasive Breast Cancer: Perspectives for Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2015 May;139(5):575–7. Available from: <http://www.archivesofpathology.org/doi/10.5858/arpa.2014-0384-ED>
140. Association of Breast Surgery at. Surgical guidelines for the management of breast cancer. *Eur J Surg Oncol* [Internet]. 2009;35:S1–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0748798309000274>
141. Dellas K. Does Radiotherapy Have Curative Potential in Metastatic Patients? The Concept of Local Therapy in Oligometastatic Breast Cancer. *Breast Care* [Internet]. 2011;6(5):363–8. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/333115>
142. Dawood S, Gonzalez-Angulo AM. Progress in the Biological Understanding and Management of Breast Cancer-Associated Central Nervous System Metastases. *Oncologist* [Internet]. 2013 Jun 5;18(6):675–84. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1634/theoncologist.2012-0438>
143. Del Mastro L, Catzeddu T, Boni L, Bell C, Sertoli MR, Bighin C, et al. Prevention of chemotherapy-induced menopause by temporary ovarian suppression with goserelin in young, early breast cancer patients. *Ann Oncol* [Internet]. 2006 Jan;17(1):74–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753419403360>
144. Geisler J, Haynes B, Anker G, Dowsett M, Lønning PE. Influence of Letrozole and Anastrozole on Total Body Aromatization and Plasma Estrogen Levels in Postmenopausal Breast Cancer Patients

- Evaluated in a Randomized, Cross-Over Study. *J Clin Oncol* [Internet]. 2002 Feb 1;20(3):751–7. Available from: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2002.20.3.751>
145. Buzdar A. Exemestane in advanced breast cancer. *Anticancer Drugs* [Internet]. 2000 Sep;11(8):609–16. Available from: <http://journals.lww.com/00001813-200009000-00002>
146. Peng J, Sengupta S, Jordan VC. Potential of selective estrogen receptor modulators as treatments and preventives of breast cancer. *Anticancer Agents Med Chem* [Internet]. 2009 Jun;9(5):481–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19519291>
147. Bertelli G, Garrone O, Merlano M, Occelli M, Bertolotti L, Castiglione F, et al. Sequential Treatment with Exemestane and Non-Steroidal Aromatase Inhibitors in Advanced Breast Cancer. *Oncology* [Internet]. 2005;69(6):471–7. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/90985>
148. Francis PA, Regan MM, Fleming GF, Láng I, Ciruelos E, Bellet M, et al. Adjuvant Ovarian Suppression in Premenopausal Breast Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Jan 29;372(5):436–46. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1412379>
149. Mayer EL, Burstein HJ. Chemotherapy for Metastatic Breast Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* [Internet]. 2007 Apr;21(2):257–72. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889858807000160>
150. Crozier JA. Adjuvant chemotherapy in breast cancer: To use or not to use, the anthracyclines. *World J Clin Oncol* [Internet]. 2014;5(3):529. Available from: <http://www.wjgnet.com/2218-4333/full/v5/i3/529.htm>
151. O’Shaughnessy J. Extending Survival with Chemotherapy in

- Metastatic Breast Cancer. *Oncologist* [Internet]. 2005 Oct;10(S3):20–9. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1634/theoncologist.10-90003-20>
152. Zeichner SB, Terawaki H, Gogineni K. A Review of Systemic Treatment in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Cancer Basic Clin Res* [Internet]. 2016 Jan 22;10:BCBCR.S32783. Available from:
<http://journals.sagepub.com/doi/10.4137/BCBCR.S32783>
153. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *N Engl J Med* [Internet]. 2001 Mar 15;344(11):783–92. Available from:
<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM200103153441101>
154. Lipton A, Ali SM, Leitzel K, Demers L, Chinchilli V, Engle L, et al. Elevated Serum HER-2/ neu Level Predicts Decreased Response to Hormone Therapy in Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2002 Mar 15;20(6):1467–72. Available from:
<https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2002.20.6.1467>
155. Korkaya H, Liu S, Wicha MS. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *J Clin Invest* [Internet]. 2011 Oct 3;121(10):3804–9. Available from:
<http://www.jci.org/articles/view/57099>
156. Allinen M, Beroukhim R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* [Internet]. 2004 Jul;6(1):17–32. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610804001783>

157. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, et al. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* [Internet]. 2008 May 27;14(5):518–27. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm1764>
158. Vesely P. *Molecular biology of the cell*. By Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts and Peter Walter. ISBN 0-8153-3218-1; hardback; 1,616 pages; \$110.00 Garland Science Inc., New York, 2002. Scanning [Internet]. 4th ed. 2006 Dec 6;26(3):153–153. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/sca.4950260309>
159. Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2016 Apr 15;13(4):228–41. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrclinonc.2015.215>
160. Disis ML, Stanton SE. Can Immunity to Breast Cancer Eliminate Residual Micrometastases? *Clin Cancer Res* [Internet]. 2013 Dec 1;19(23):6398–403. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-13-0734>
161. Disis ML, Stanton SE. Triple-Negative Breast Cancer: Immune Modulation as the New Treatment Paradigm. *Am Soc Clin Oncol Educ B* [Internet]. 2015 May;(35):e25–30. Available from: http://ascopubs.org/doi/10.14694/EdBook_AM.2015.35.e25
162. Loi S. Tumor-infiltrating lymphocytes, breast cancer subtypes and therapeutic efficacy. *Oncoimmunology* [Internet]. 2013 Jul 27;2(7):e24720. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/onci.24720>
163. Chen DS, Mellman I. *Oncology Meets Immunology: The Cancer-*

- Immunity Cycle. *Immunity* [Internet]. 2013 Jul;39(1):1–10.
Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761313002963>
164. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* [Internet]. 2002 Nov;3(11):991–8. Available from:
<http://www.nature.com/articles/ni1102-991>
165. Motz GT, Coukos G. Deciphering and Reversing Tumor Immune Suppression. *Immunity* [Internet]. 2013 Jul;39(1):61–73. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761313002896>
166. Predina J, Eruslanov E, Judy B, Kapoor V, Cheng G, Wang L-C, et al. Changes in the local tumor microenvironment in recurrent cancers may explain the failure of vaccines after surgery. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2013 Jan 29;110(5):E415–24. Available from:
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1211850110>
167. Wang L, Qian J, Lu Y, Li H, Bao H, He D, et al. Immune evasion of mantle cell lymphoma: expression of B7-H1 leads to inhibited T-cell response to and killing of tumor cells. *Haematologica* [Internet]. 2013 Sep 1;98(9):1458–66. Available from:
<http://www.haematologica.org/cgi/doi/10.3324/haematol.2012.071340>
168. Monsky WL, Mouta Carreira C, Tsuzuki Y, Gohongi T, Fukumura D, Jain RK. Role of host microenvironment in angiogenesis and microvascular functions in human breast cancer xenografts: mammary fat pad versus cranial tumors. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2002 Apr;8(4):1008–13. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11948107>
169. Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel

- normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2011 Jun 1;10(6):417–27. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrd3455>
170. Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, Klinkert WEF, Goldbrunner R, Herms J, et al. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med* [Internet]. 2010 Jan 20;16(1):116–22. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm.2072>
171. Moeller BJ, Richardson RA, Dewhirst MW. Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2007 Jul 24;26(2):241–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10555-007-9056-0>
172. Jain RK. Antiangiogenesis Strategies Revisited: From Starving Tumors to Alleviating Hypoxia. *Cancer Cell* [Internet]. 2014 Nov;26(5):605–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610814004103>
173. Crusz SM, Balkwill FR. Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2015 Oct 30;12(10):584–96. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrclinonc.2015.105>
174. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, et al. Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors. *Adv Anat Pathol* [Internet]. 2017 Sep;24(5):235–51. Available from: <http://journals.lww.com/00125480-201709000-00001>
175. Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, Coudert B, Martin F, Chauffert B, et al. Pathologic Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy of Breast Carcinoma Is Associated with the Disappearance of Tumor-Infiltrating Foxp3+ Regulatory T Cells. *Clin Cancer Res*

- [Internet]. 2008 Mar 27;14(8):2413–20. Available from:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-07-4491>
176. Ye J, Ma C, Wang F, Hsueh EC, Toth K, Huang Y, et al. Specific Recruitment of Regulatory T Cells in Human Breast Cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2013 Oct 15;73(20):6137–48. Available from:
<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-13-0348>
177. Rody A, Karn T, Liedtke C, Pusztai L, Ruckhaeberle E, Hanker L, et al. A clinically relevant gene signature in triple negative and basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2011 Oct 6;13(5):R97. Available from: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr3035>
178. Mahmoud SMA, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AHS, et al. Tumor-Infiltrating CD8 + Lymphocytes Predict Clinical Outcome in Breast Cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2011 May 20;29(15):1949–55. Available from:
<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2010.30.5037>
179. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol* [Internet]. 2015 Feb;26(2):259–71. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753419313699>
180. Yang Q, Jeremiah Bell J, Bhandoola A. T-cell lineage determination. *Immunol Rev* [Internet]. 2010 Nov;238(1):12–22. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.2010.00956.x>
181. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of

- $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2013 Feb 25;13(2):88–100. Available from:
<http://www.nature.com/articles/nri3384>
182. Carding SR, Egan PJ. $\gamma\delta$ T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2002 May;2(5):336–45. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri797>
183. Cox MA, Kahan SM, Zajac AJ. Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love. *Virology* [Internet]. 2013 Jan;435(1):157–69. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682212004539>
184. Anderson G, Takahama Y. Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. *Trends Immunol* [Internet]. 2012 Jun;33(6):256–63. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490612000555>
185. Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009 Dec;9(12):833–44. Available from:
<http://www.nature.com/articles/nri2669>
186. Baniyash M. TCR ζ -chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2004 Sep;4(9):675–87. Available from:
<http://www.nature.com/articles/nri1434>
187. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2012 Mar 17;12(3):180–90. Available from:
<http://www.nature.com/articles/nri3156>
188. Paul WE, Zhu J. How are TH2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010 Apr;10(4):225–35.

- Available from: <http://www.nature.com/articles/nri2735>
189. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just TH2 cells. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010 Dec 9;10(12):838–48. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri2870>
 190. Hemdan NY, Birkenmeier G, Wichmann G, Abu El-Saad AM, Krieger T, Conrad K, et al. Interleukin-17-producing T helper cells in autoimmunity. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2010 Sep;9(11):785–92. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568997210001400>
 191. Wolk K, Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R. Biology of interleukin-22. *Semin Immunopathol* [Internet]. 2010 Mar 2;32(1):17–31. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00281-009-0188-x>
 192. King C. New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009 Nov;9(11):757–66. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri2644>
 193. Schmetterer KG, Neunkirchner A, Pickl WF. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *FASEB J* [Internet]. 2012 Jun 23;26(6):2253–76. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.11-193672>
 194. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010 Jul 18;10(7):490–500. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri2785>
 195. M. Ibrahim E, Al-Foheidi M, M. Al-Mansour M, A Kazkaz G, E. Yunus T. The Prognostic and Predicting Roles of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Open Breast*

- Cancer J [Internet]. 2014 Oct 21;6(1):9–19. Available from:
<http://benthamopen.com/ABSTRACT/TOBCANJ-6-9>
196. Mao Y, Qu Q, Chen X, Huang O, Wu J, Shen K. The Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. Tagliabue E, editor. PLoS One [Internet]. 2016 Apr 13;11(4):e0152500. Available from:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0152500>
197. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini J-L, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. Nat Med [Internet]. 2007 Jan 24;13(1):54–61. Available from:
<http://www.nature.com/articles/nm1523>
198. Mattarollo SR, Loi S, Duret H, Ma Y, Zitvogel L, Smyth MJ. Pivotal Role of Innate and Adaptive Immunity in Anthracycline Chemotherapy of Established Tumors. Cancer Res [Internet]. 2011 Jul 15;71(14):4809–20. Available from:
<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-11-0753>
199. Mao Y, Qu Q, Zhang Y, Liu J, Chen X, Shen K. The Value of Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) for Predicting Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. Beck AH, editor. PLoS One [Internet]. 2014 Dec 12;9(12):e115103. Available from:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0115103>
200. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. Lancet Oncol [Internet]. 2018 Jan;19(1):40–50. Available from:

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147020451730904X>
201. Liu S, Lachapelle J, Leung S, Gao D, Foulkes WD, Nielsen TO. CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2012 Apr 15;14(2):R48. Available from: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr3148>
 202. Baker K, Lachapelle J, Zlobec I, Bismar TA, Terracciano L, Foulkes WD. Prognostic significance of CD8+ T lymphocytes in breast cancer depends upon both oestrogen receptor status and histological grade. *Histopathology* [Internet]. 2011 Jun;no-no. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2559.2011.03846.x>
 203. Miyashita M, Sasano H, Tamaki K, Hirakawa H, Takahashi Y, Nakagawa S, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2015 Dec 4;17(1):124. Available from: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-015-0632-x>
 204. Tiriveedhi V, Tucker N, Herndon J, Li L, Sturmoski M, Ellis M, et al. Safety and Preliminary Evidence of Biologic Efficacy of a Mammaglobin-A DNA Vaccine in Patients with Stable Metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2014 Dec 1;20(23):5964–75. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-14-0059>
 205. Ibrahim NK, Murray JL, Zhou D, Mittendorf EA, Sample D, Tautchin M, et al. Survival Advantage in Patients with Metastatic

- Breast Cancer Receiving Endocrine Therapy plus Sialyl Tn-KLH Vaccine: Post Hoc Analysis of a Large Randomized Trial. *J Cancer* [Internet]. 2013;4(7):577–84. Available from: <http://www.jcancer.org/v04p0577.htm>
206. Mohebtash M, Tsang K-Y, Madan RA, Huen N-Y, Poole DJ, Jochems C, et al. A Pilot Study of MUC-1/CEA/TRICOM Poxviral-Based Vaccine in Patients with Metastatic Breast and Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2011 Nov 15;17(22):7164–73. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-11-0649>
207. Mittendorf EA, Ardavanis A, Litton JK, Shumway NM, Hale DF, Murray JL, et al. Primary analysis of a prospective, randomized, single-blinded phase II trial evaluating the HER2 peptide GP2 vaccine in breast cancer patients to prevent recurrence. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Oct 4;7(40):66192–201. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.11751>
208. Mittendorf EA, Clifton GT, Holmes JP, Clive KS, Patil R, Benavides LC, et al. Clinical trial results of the HER-2/ neu (E75) vaccine to prevent breast cancer recurrence in high-risk patients. *Cancer* [Internet]. 2012 May 15;118(10):2594–602. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.26574>
209. Clive KS, Tyler JA, Clifton GT, Holmes JP, Ponniah S, Peoples GE, et al. The GP2 peptide: A HER2/neu-based breast cancer vaccine. *J Surg Oncol* [Internet]. 2012 Apr 1;105(5):452–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jso.21723>
210. Ma Y, Aymeric L, Locher C, Mattarollo SR, Delahaye NF, Pereira P, et al. Contribution of IL-17–producing $\gamma\delta$ T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *J Exp Med* [Internet]. 2011 Mar

- 14;208(3):491–503. Available from:
[https://rupress.org/jem/article/208/3/491/41042/Contribution-of-IL17producing- \$\gamma\delta\$ -T-cells-to-the](https://rupress.org/jem/article/208/3/491/41042/Contribution-of-IL17producing-gamma-delta-T-cells-to-the)
211. Fucikova J, Kralikova P, Fialova A, Brtnicky T, Rob L, Bartunkova J, et al. Human Tumor Cells Killed by Anthracyclines Induce a Tumor-Specific Immune Response. *Cancer Res* [Internet]. 2011 Jul 15;71(14):4821–33. Available from:
<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-11-0950>
212. Shurin G V., Tourkova IL, Kaneno R, Shurin MR. Chemotherapeutic Agents in Noncytotoxic Concentrations Increase Antigen Presentation by Dendritic Cells via an IL-12-Dependent Mechanism. *J Immunol* [Internet]. 2009 Jul 1;183(1):137–44. Available from:
<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.0900734>
213. Rogers LM, Geller MA, Bui-Nguyen TM, Ramakrishnan S. Chemotherapy Induces Macrophage Chemoattractant Protein-1 Production in Ovarian Cancer. *Int J Gynecol Cancer* [Internet]. 2010 Jul 1;20(6):918–25. Available from:
<http://ijgc.bmj.com/lookup/doi/10.1111/IGC.0b013e3181e5c442>
214. Kodumudi KN, Woan K, Gilvary DL, Sahakian E, Wei S, Djeu JY. A Novel Chemoimmunomodulating Property of Docetaxel: Suppression of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor Bearers. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2010 Sep 15;16(18):4583–94. Available from:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-10-0733>
215. Ramakrishnan R, Assudani D, Nagaraj S, Hunter T, Cho H-I, Antonia S, et al. Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility

- to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice. *J Clin Invest* [Internet]. 2010 Apr 1;120(4):1111–24. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/40269>
216. Zhu Y, Liu N, Xiong SD, Zheng YJ, Chu YW. CD4+Foxp3+ Regulatory T-cell Impairment by Paclitaxel is Independent of Toll-like Receptor 4. *Scand J Immunol* [Internet]. 2011 Apr;73(4):301–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3083.2011.02514.x>
217. Tsavaris N, Kosmas C, Vadiaka M, Kanelopoulos P, Boulamatsis D. Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes. *Br J Cancer* [Internet]. 2002 Jul 25;87(1):21–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/6600347>
218. Hato S V., Khong A, de Vries IJM, Lesterhuis WJ. Molecular Pathways: The Immunogenic Effects of Platinum-Based Chemotherapeutics. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2014 Jun 1;20(11):2831–7. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-13-3141>
219. Weir GM, Liwski RS, Mansour M. Immune Modulation by Chemotherapy or Immunotherapy to Enhance Cancer Vaccines. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2011 Aug 5;3(3):3114–42. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6694/3/3/3114>
220. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2007 May 8;56(5):641–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00262-006-0225-8>

221. Gameiro SR, Jammeh ML, Wattenberg MM, Tsang KY, Ferrone S, Hodge JW. Radiation-induced immunogenic modulation of tumor enhances antigen processing and calreticulin exposure, resulting in enhanced T-cell killing. *Oncotarget* [Internet]. 2014 Jan 30;5(2):403–16. Available from:
<https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.1719>
222. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J Exp Med* [Internet]. 2000 Oct 2;192(7):1027–34. Available from:
<https://rupress.org/jem/article/192/7/1027/8251/Engagement-of-the-Pd1-Immunoinhibitory-Receptor-by>
223. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* [Internet]. 1992 Nov;11(11):3887–95. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1396582>
224. Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* [Internet]. 2006 Apr 17;203(4):883–95. Available from:
<https://rupress.org/jem/article/203/4/883/46457/Tissue-expression-of-PDL1-mediates-peripheral-T>
225. Nishimura H. Autoimmune Dilated Cardiomyopathy in PD-1 Receptor-Deficient Mice. *Science* (80-) [Internet]. 2001 Jan 12;291(5502):319–22. Available from:
<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.291.5502.319>

226. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor. *Immunity* [Internet]. 1999 Aug;11(2):141–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761300800898>
227. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol* [Internet]. 2007 Jun 22;19(7):813–24. Available from: <https://academic.oup.com/intimm/article-lookup/doi/10.1093/intimm/dxm057>
228. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2008 Apr;26(1):677–704. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331>
229. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* [Internet]. 2002 Aug 24;8(8):793–800. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm730>
230. Blank C, Brown I, Peterson AC, Spiotto M, Iwai Y, Honjo T, et al. PD-L1/B7H-1 Inhibits the Effector Phase of Tumor Rejection by T Cell Receptor (TCR) Transgenic CD8 + T Cells. *Cancer Res* [Internet]. 2004 Feb 1;64(3):1140–5. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-03-3259>
231. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of Inflammatory Response with B7-H1 Expression in Human Melanocytic Lesions Supports an Adaptive Resistance Mechanism of Immune Escape. *Sci Transl Med*

- [Internet]. 2012 Mar 28;4(127):127ra37-127ra37. Available from: <https://stm.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scitranslmed.3003689>
232. Woo S-R, Turnis ME, Goldberg M V., Bankoti J, Selby M, Nirschl CJ, et al. Immune Inhibitory Molecules LAG-3 and PD-1 Synergistically Regulate T-cell Function to Promote Tumoral Immune Escape. *Cancer Res* [Internet]. 2012 Feb 15;72(4):917–27. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-11-1620>
233. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, Hwu W-J, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and Activity of Anti–PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Jun 28;366(26):2455–65. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1200694>
234. Kim A, Lee SJ, Kim YK, Park WY, Park DY, Kim JY, et al. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in tumour cell and tumour infiltrating lymphocytes of HER2-positive breast cancer and its prognostic value. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 15;7(1):11671. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-11905-7>
235. Park IH, Kong S-Y, Ro JY, Kwon Y, Kang JH, Mo HJ, et al. Prognostic Implications of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Association With Programmed Death Ligand 1 Expression in Early-Stage Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* [Internet]. 2016 Feb;16(1):51–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1526820915001664>
236. Muenst S, Schaerli AR, Gao F, Däster S, Trella E, Drosner RA, et al. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated

- with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2014 Jul 20;146(1):15–24. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-014-2988-5>
237. Ali HR, Glont S-E, Blows FM, Provenzano E, Dawson S-J, 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* [Internet]. 2015 Jul;26(7):1488–93. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753419345089>
238. Baptista MZ, Sarian LO, Derchain SFM, Pinto GA, Vassallo J. Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer. *Hum Pathol* [Internet]. 2016 Jan;47(1):78–84. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0046817715003433>
239. Ishii H, Azuma K, Kawahara A, Yamada K, Imamura Y, Tokito T, et al. Significance of Programmed Cell Death-Ligand 1 Expression and its Association with Survival in Patients with Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2015 Mar;10(3):426–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S155608641531649X>
240. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2012 Apr 22;12(4):252–64. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrc3239>
241. Verbrugge I, Hagekyriakou J, Sharp LL, Galli M, West A, McLaughlin NM, et al. Radiotherapy Increases the Permissiveness of Established Mammary Tumors to Rejection by Immunomodulatory Antibodies. *Cancer Res* [Internet]. 2012 Jul 1;72(13):3163–74. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-12-0210>

242. van Rooijen J. Optimizing systemic therapy in metastatic breast cancer: implementation in daily practice and exploration of new drug targets [Internet]. University of Groningen; 2020. Available from: <http://hdl.handle.net/11370/bfb6cdea-4330-4100-86eb-4da0d02f285e>
243. de la Cruz-Merino L, Palazón-Carrión N, Henao-Carrasco F, Nogales-Fernández E, Álamo-de la Gala M, Vallejo-Benítez A, et al. New horizons in breast cancer: the promise of immunotherapy. *Clin Transl Oncol* [Internet]. 2019 Feb 18;21(2):117–25. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12094-018-1907-3>
244. Katz H, Alsharedi M. Immunotherapy in triple-negative breast cancer. *Med Oncol* [Internet]. 2018 Jan 18;35(1):13. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12032-017-1071-6>
245. Mani NL, Schalper KA, Hatzis C, Saglam O, Tavassoli F, Butler M, et al. Quantitative assessment of the spatial heterogeneity of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2016 Dec 29;18(1):78. Available from: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-016-0737-x>
246. Downes MR, Slodkowska E, Katabi N, Jungbluth AA, Xu B. Inter- and intraobserver agreement of programmed death ligand 1 scoring in head and neck squamous cell carcinoma, urothelial carcinoma and breast carcinoma. *Histopathology* [Internet]. 2020 Jan 9;76(2):191–200. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/his.13946>
247. Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, Acharya CR, Foekens JA, Zhang Y, et al. Young Age at Diagnosis Correlates With Worse Prognosis and Defines a Subset of Breast Cancers With Shared Patterns of Gene Expression. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008 Jul

- 10;26(20):3324–30. Available from:
<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2007.14.2471>
248. Bartelink H, Horiot J-C, Poortmans PM, Struikmans H, Van den Bogaert W, Fourquet A, et al. Impact of a Higher Radiation Dose on Local Control and Survival in Breast-Conserving Therapy of Early Breast Cancer: 10-Year Results of the Randomized Boost Versus No Boost EORTC 22881-10882 Trial. *J Clin Oncol* [Internet]. 2007 Aug 1;25(22):3259–65. Available from:
<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2007.11.4991>
249. Anders CK, Johnson R, Litton J, Phillips M, Bleyer A. Breast Cancer Before Age 40 Years. *Semin Oncol* [Internet]. 2009 Jun;36(3):237–49. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093775409000372>
250. Bharat A, Aft RL, Gao F, Margenthaler JA. Patient and tumor characteristics associated with increased mortality in young women (≤ 40 years) with breast cancer. *J Surg Oncol* [Internet]. 2009 Sep 1;100(3):248–51. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1002/jso.21268>
251. Brinton LA, Sherman ME, Carreon JD, Anderson WF. Recent Trends in Breast Cancer Among Younger Women in the United States. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2008 Nov 19;100(22):1643–8. Available from:
<https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djn344>
252. Ribnikar D, Ribeiro JM, Pinto D, Sousa B, Pinto AC, Gomes E, et al. Breast Cancer Under Age 40: a Different Approach. *Curr Treat Options Oncol* [Internet]. 2015 Apr 22;16(4):16. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s11864-015-0334-8>
253. Partridge AH, Ruddy KJ, Gelber S, Schapira L, Abusief M, Meyer

- M, et al. Ovarian reserve in women who remain premenopausal after chemotherapy for early stage breast cancer. *Fertil Steril* [Internet]. 2010 Jul;94(2):638–44. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028209006104>
254. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, et al. Tumor-Associated Lymphocytes As an Independent Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Jan 1;28(1):105–13. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2009.23.7370>
255. Lee A, Happerfield L, Millis R, Bobrow L. Inflammatory infiltrate in invasive lobular and ductal carcinoma of the breast. *Br J Cancer* [Internet]. 1996 Sep;74(5):796–801. Available from: <http://www.nature.com/articles/bjc1996438>
256. 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* [Internet]. 2014 May 15;20(10):2773–82. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-13-2702>
257. 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* [Internet]. 2015 Mar 10;6(7):5449–64. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.3216>
258. Ghebeh H, Tulbah A, Mohammed S, ElKum N, Amer SM Bin, 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* [Internet]. 2007 Aug 15;121(4):751–8. Available

- from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.22703>
259. Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, Qattant 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* [Internet]. 2006 Mar;8(3):190–8. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1476558606800473>
260. Huang W, Ran R, Shao B, Li H. Prognostic and clinicopathological value of PD-L1 expression in primary breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2019 Nov 29;178(1):17–33. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s10549-019-05371-0>
261. Dill EA, Gru AA, Atkins KA, Friedman LA, Moore ME, Bullock TN, et al. PD-L1 Expression and Intratumoral Heterogeneity Across Breast Cancer Subtypes and Stages. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2017 Mar;41(3):334–42. Available from:
<http://journals.lww.com/00000478-201703000-00005>
262. Bae SB, Cho HD, Oh M-H, Lee J-H, Jang S-H, Hong SA, et al. Expression of Programmed Death Receptor Ligand 1 with High Tumor-Infiltrating Lymphocytes Is Associated with Better Prognosis in Breast Cancer. *J Breast Cancer* [Internet]. 2016;19(3):242. Available from:
<https://ejbc.kr/DOIx.php?id=10.4048/jbc.2016.19.3.242>
263. Buisseret L, Garaud S, de Wind A, Van den Eynden G, Boisson A, Solinas C, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte composition, organization and PD-1/ PD-L1 expression are linked in breast cancer. *Oncoimmunology* [Internet]. 2017 Jan 2;6(1):e1257452. Available from:

- <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2016.1257452>
264. Zhang M, Sun H, Zhao S, Wang Y, Pu H, Wang Y, et al. Expression of PD-L1 and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* [Internet]. 2017 May 9;8(19):31347–54. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.15532>
265. Wang Z-Q, Milne K, Derocher H, Webb JR, Nelson BH, Watson PH. PD-L1 and intratumoral immune response in breast cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Aug 1;8(31):51641–51. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.18305>
266. Li S, Chen L, Jiang J. Role of programmed cell death ligand-1 expression on prognostic and overall survival of breast cancer. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2019 Apr;98(16):e15201. Available from: <http://journals.lww.com/00005792-201904190-00026>
267. Botti G, Collina F, Scognamiglio G, Rao F, Peluso V, De Cecio R, et al. Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) Tumor Expression Is Associated with a Better Prognosis and Diabetic Disease in Triple Negative Breast Cancer Patients. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017 Feb 21;18(2):459. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/2/459>
268. Cimino-Mathews A, Thompson E, Taube JM, Ye X, Lu Y, Meeker A, et al. PD-L1 (B7-H1) expression and the immune tumor microenvironment in primary and metastatic breast carcinomas. *Hum Pathol* [Internet]. 2016 Jan;47(1):52–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0046817715003275>
269. Stanton SE, Disis ML. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2016

- Dec 18;4(1):59. Available from:
<http://jitc.bmj.com/lookup/doi/10.1186/s40425-016-0165-6>
270. Polónia A, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, Schmitt FC, Paredes J. Prognostic value of stromal tumour infiltrating lymphocytes and programmed cell death-ligand 1 expression in breast cancer. *J Clin Pathol* [Internet]. 2017 Oct;70(10):860–7. Available from:
<http://jcp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jclinpath-2016-203990>
271. Dieci MV, Criscitiello C, Goubar A, Viale G, Conte P, Guarneri V, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Ann Oncol* [Internet]. 2014 Mar;25(3):611–8. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753419342668>
272. Gooden MJM, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer* [Internet]. 2011 Jun;105(1):93–103. Available from:
<http://www.nature.com/articles/bjc2011189>
273. Seo S-K, Seo H-M, Jeong H-Y, Choi I-W, Park Y-M, Yagita H, et al. Co-inhibitory role of T-cell-associated B7-H1 and B7-DC in the T-cell immune response. *Immunol Lett* [Internet]. 2006 Feb;102(2):222–8. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165247805002816>
274. Teschendorff AE, Gomez S, Arenas A, El-Ashry D, Schmidt M, Gehrman M, et al. Improved prognostic classification of breast cancer defined by antagonistic activation patterns of immune response pathway modules. *BMC Cancer* [Internet]. 2010 Dec 4;10(1):604. Available from:

10-604

275. Mori H, Kubo M, Yamaguchi R, Nishimura R, Osako T, Arima N, et al. The combination of PD-L1 expression and decreased tumor-infiltrating lymphocytes is associated with a poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Feb 28;8(9):15584–92. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.14698>
276. Uhercik M, Sanders AJ, Owen S, Davies EL, Sharma AK, Jiang WG, et al. Clinical Significance of PD1 and PDL1 in Human Breast Cancer. *Anticancer Res* [Internet]. 2017;37(8):4249–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28739716>
277. Zhao T, Li C, Wu Y, Li B, Zhang B. Prognostic value of PD-L1 expression in tumor infiltrating immune cells in cancers: A meta-analysis. Yuan T, editor. *PLoS One* [Internet]. 2017 Apr 28;12(4):e0176822. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0176822>
278. Kim HR, Ha S-J, Hong MH, Heo SJ, Koh YW, Choi EC, et al. PD-L1 expression on immune cells, but not on tumor cells, is a favorable prognostic factor for head and neck cancer patients. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Dec 14;6(1):36956. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep36956>
279. Fu J, Wu L, Fu W, Tan Y, Xu T, Hong Z, et al. How Young Is Too Young in Breast Cancer?—Young Breast Cancer Is Not a Unique Biological Subtype. *Clin Breast Cancer* [Internet]. 2018 Feb;18(1):e25–39. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1526820917300332>
280. Ma W, Gilligan BM, Yuan J, Li T. Current status and perspectives in translational biomarker research for PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade therapy. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2016 Dec

27;9(1):47. Available from:

<http://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-016-0277-y>

281. Evangelou Z, Papoudou-Bai A, Karpathiou G, Kourea H, Kamina S, Goussia A, et al. PD-L1 Expression and Tumor-infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: Clinicopathological Analysis in Women Younger than 40 Years Old. *In Vivo (Brooklyn)* [Internet]. 2020 Feb 28;34(2):639–47. Available from: <http://iv.iiarjournals.org/lookup/doi/10.21873/invivo.11818>