

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA” BUCUREȘTI**



REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Aspecte morfologice și corelații imunohistochimice
privind heterogenitatea leziunilor mamare maligne**

Conducător științific:

Prof. Dr. Maria SAJIN

Doctorand:

Dr. Adrian-Vasile DUMITRU

București

2017

CUPRINS

Cuvânt înainte	i
Cuprins.....	ii
Lista abrevierilor utilizate în text.....	iii
INTRODUCERE	1
Partea întâi: STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
CAPITOLUL 1. – Elemente de embriologie, anatomie și histo-fiziologie a glandei mamar	
1.1. Dezvoltarea embriologică și anatomia glandei mamare.....	3
1.2. Aspecte histo-fiziologice ale glandei mamare.....	5
CAPITOLUL 2. – Epidemiologia și patogeniza cancerului glandei mamare	
2.1. Epidemiologia cancerului mamar.....	9
2.2. Factorii etiologici implicați în dezvoltarea cancerului mamar.....	10
CAPITOLUL 3 – Aspecte histopatologice și stadializarea leziunilor mamare maligne	
3.1. Clasificarea histopatologică OMS a leziunilor mamare maligne.....	15
3.2. Forme histopatologice de carcinom mamar invaziv.....	19
3.3. Carcinomul mamar microinvaziv, carcinomul mamar inflamator și carcinoamele mamare bilaterale.....	23
3.4. Heterogenitatea clinică și imagistică a leziunilor mamare maligne.....	24
3.5. Stadializarea cancerului mamar	28
3.6. Grading-ul leziunilor mamare maligne și aplicabilitatea sa	32
3.7. Factori morfopatologici cu rol prognostic și predictiv.....	34
CAPITOLUL 4 – Aspecte imunohistochimice în carcinoamele mamare invazive	
4.1. Biomarkeri cu importanță prognostică și predictivă	39
4.2. Biomarkeri utili în diagnosticul histopatologic	39
CAPITOLUL 5 – Clasificarea moleculară a carcinoamelor mamare invazive	
5.1. Clasificarea moleculară intrinsecă.....	41

5.2. Clasificarea moleculară pe baza criteriilor imunohistochimice „surogat” 41

CAPITOLUL 6 – Heterogenitatea histopatologică și imunohistochimică intra și intertumorală a leziunilor mamare maligne

6.1. Heterogenitatea intratumorală a carcinoamelor mamare.....44

6.2. Carcinomul mamar multiplu și heterogenitatea intertumorală a leziunilor mamare maligne.....45

6.3. Fenomenul de *mismatch* histopatologic și IHC a leziunilor mamare maligne multiple sincrone.....46

Partea a doua: PARTEA SPECIALĂ DE CONTRIBUȚII PERSONALE

CAPITOLUL 7 – Motivația, scopul și obiectivele studiului doctoral

7.1. Motivația studiului doctoral47

7.2. Scopul și obiectivele studiului doctoral47

CAPITOLUL 8 – Metodologia generală a cercetării

8.1. Criterii de eligibilitate și de excludere50

8.2. Etapele procesării histopatologice.....51

8.2.1. Analiza, orientarea și procesarea macroscopică.....52

8.2.1.1. Descrierea macroscopică a pieselor chirurgicale.....52

8.2.1.2. Orientarea pieselor chirurgicale.....53

8.2.2. Prelucrarea histopatologică a pieselor de rezecție56

8.2.3. Evaluarea microscopică a cazurilor incluse în studiu.....58

8.3. Principii și tehnici imunohistochimice utilizate.....62

8.3.2. Criteriile imunohistochimice surogat pentru stabilirea subtipurilor moleculare.....69

8.4. Colectarea și analiza statistică a datelor.....70

REZULTATE

CAPITOLUL 9 Evaluarea heterogenității clinico-imunohistopatologice și analiza statistică a lotului de pacienți cu tumori mamare maligne

9.1. Mediul de proveniență, sexul și vârsta la momentul diagnosticului.....72

9.2. Distribuția eșantionului în funcție de lateralitatea leziunilor.....75

9.3. Diametrul tumoral și stadializarea pTNM.....77

9.4. Distribuția loturilor în funcție de focalitatea leziunilor.....	81
9.5. Studiul histopatologic al cazurilor de tumori mamare maligne	85
9.5.1. Carcinomul mamar NST.....	89
9.5.2. Carcinomul mamar lobular invaziv.....	95
9.5.3. Carcinomul mamar cu caracteristici medulare.....	101
9.5.4. Carcinomul mamar mixt.....	105
9.5.5. Carcinomul mamar mucinos hipoceular (coloid) și hipercelular.....	107
9.5.6. Tumora phyllodes malignă asociată cu DCIS microinvaziv.....	110
9.5.7. Carcinom mamar metaplastic.....	113
9.5.8. Carcinomul mamar microinvaziv.....	114
9.5.9. Carcinomul tubular.....	116
9.5.10. Carcinomul mamar neuroendocrin.....	117
9.5.11. Carcinomul mamar cribriform invaziv.....	118
9.5.12. Carcinomul mamar papilar invaziv, micropapilar și papilar intrachistic.....	119
9.5.13. Carcinomul mamar adenoid chistic și carcinomul mamar apocrin.....	121
9.5.14. Angiosarcomul mamar și sindromul Stewart Treves.....	123
9.5.15. Limfoamele mamare.....	124
9.6. Indici histopatologici utili în evaluarea diagnostică a heterogenității leziunilor mamare maligne.....	125
9.6.1. Gradul de diferențiere tumorală.....	125
9.6.2. Metastazele limfoganglionare.....	129
9.6.3. Invazia angiolimfatică.....	133
9.6.4. Invazia perineurală.....	136
9.6.4. Calcificările distrofice asociate proliferărilor tumorale mamare.....	138
9.6.5. Necroza tumorală.....	139
9.7. Analiza multiparametrică a indicilor histopatologici utili în evaluarea diagnostică a heterogenității leziunilor mamare maligne.....	140
9.8. Analiza imunohistochimică a heterogenității leziunilor mamare maligne.....	144

9.8.1 Analiza imunoexpresiei receptorilor estrogenici (ER).....	145
9.8.2. Analiza imunoexpresiei receptorilor progesteronici (PR).....	150
9.8.3. Evaluarea expresiei imunohistochimice a oncoproteinei HER2neu.....	154
9.8.4. Evaluarea expresiei imunohistochimice a P53.....	157
9.8.5. Evaluarea expresiei imunohistochimice a Ki67 și Top2alpha.....	159
9.9. Analiza multiparametrică a indicilor imunohistochimici utili în evaluarea diagnostică a heterogenității leziunilor mamare maligne.....	167
CAPITOLUL 10 - Încadrarea cazurilor conform criteriilor de diagnostic imunohistochimic „surogat”	
10.1. Carcinoamele mamare subtip Luminal A.....	174
10.2. Carcinoamele mamare subtip Luminal B.....	178
10.3. Carcinoamele mamare subtip Triplu Negativ.....	180
10.4. Carcinoamele mamare cu supraexpresia Her2/neu.....	182
CAPITOLUL 11 - Contribuții privind analiza heterogenității intertumorale a cazurilor de carcinom mamar multiplu.....	
CAPITOLUL 12. Discuții și considerații finale.....	
CAPITOLUL 13. Concluzii.....	
Bibliografie	
Anexe	
1. Lista lucrărilor științifice elaborate și publicate	229
2. Cinci dintre lucrărilor științifice elaborate în contextul temei tezei doctorale și publicate în calitate de autor principal în publicații B+/BDI.....	243

INTRODUCERE

Cancerul mamar este o cauză majoră de mortalitate la sexul feminin, fiind raportate, anual, peste 521000 de decese la nivel global [1]. Este cea mai frecventă formă de cancer la femei, însumând mai bine de un sfert din totalitatea malignităților diagnosticate la sexul feminin. De asemenea, cancerul mamar este de departe cea mai frecventă tumoră malignă diagnosticată la femeile din România, cu peste 8981 cazuri noi diagnosticate și aproximativ 3244 de decese raportate în anul 2016. Incidența cancerului mamar este de 66,2/100000 locuitori iar mortalitatea de 21,6/100000 în populația de sex feminin. În Europa incidența cancerului mamar ocupă locul întâi încă din anul 2012, cu o pondere de 13,45% iar decesele secundare acestuia, au o proporție de 7,48%, fiind responsabile de a treia cauză de mortalitate, după cancerul pulmonar și cel gastrointestinal [2]. Belgia, Danemarca și Franța au cele mai multe cazuri noi raportate la 100000 de locuitori cu 111,9, 105 și respectiv 104 cazuri la sută de mii de locuitori. Din păcate, incidența cancerului mamar continuă să crească ușor în fiecare an iar mortalitatea nu s-a modificat foarte mult în ultimii 20 de ani, menținându-se extrem de ridicată [2,3].

Tendința de creștere a incidenței patologiei mamare maligne urmează îndeaproape tendința generală de creștere a incidenței cazurilor de cancer în general, ultimile estimări preconizând o triplare a numărului de cazuri până în 2030 atât în țările dezvoltate cât mai ales în cazul celor curs de dezvoltare [4]. Promovarea programele de screening prin politici adecvate de sănătate publică, inițiate în țările occidentale au favorizat diagnosticarea precoce a cancerului mamar, în stadii incipiente, ceea ce a impus abordarea unor metode terapeutice mai conservatoare și mai eficiente, cu reducerea consecutivă a mortalității și morbidității.

Deși se consideră că neoplazmele mamare maligne sunt vindecabile în proporții importante în stadiile inițiale, teama de diagnostic, ignoranța, lipsa unei educații sanitare continue și temeinice, numărul mic de laboratoare de anatomie patologică, lipsa unor programe de screening la nivel național fac ca în România diagnosticarea tumorilor mamare să se facă în stadii avansate (III – IV), când beneficiile tratamentului sunt reduse iar costurile foarte mari. În multe cazuri tratamentul este doar paliativ, în aceste condiții suferința fiind imensă atât pentru pacient cât și pentru aparținători. La diagnosticul întârziat participă și lipsa studiilor epidemiologice la nivel național precum și datele insuficiente privind factorii de risc, în special

cei genetici cu rol în fiziopatogenia cancerului mamar. S-a constatat la nivel mondial că genetica cancerului mamar este extrem de polimorfă în ceea ce privește pattern-ul mutațional al genelor implicate în apariția, progresia și expansiunea neoplasmelor mamare maligne. Acest lucru se repercutează în fenotipul tumoral fiind o sursă principală de heterogenitate, ceea ce împiedică de multe ori o abordare terapeutică eficientă.

Metodele performante de diagnostic au condus la o modificare continuă a cunoștințelor histo-morfologice clasice, la stabilirea și consolidarea factorilor de prognostic, precum și la dezvoltarea de noi terapii țintite cu o eficacitate superioară și cu un impact major în îmbunătățirea calității vieții pacienților. Se impun în continuare eforturi sporite de cercetare în domeniul patologiei mamare, având drept scop final reducerea morbidității și mortalității cancerului mamar.

Pertinența examenului imunohistochimic folosind 4 markeri (ER, PR, HER2, Ki67) drept metodă “surogat” pentru profilul genic-molecular a fost certificată de numeroase studii, acest lucru completând diagnosticul clinico-morfologic clasic și fiind un prim pas pentru o abordare diagnostică personalizată. Raportarea suplimentară a heterogenității intra și interlezionale a cancerului mamar va conduce, cel mai probabil la o perfecționare a taxonomiei leziunilor mamare maligne cu îmbunătățirea consecutivă a răspunsului terapeutic.

Chiar dacă practica medicală actual impune diagnosticul cât mai complet al carcinoamelor mamare, inclusiv încadrarea lor moleculară, totuși, acest aspect este deficitar în multe spitale din România. Lipsa unor studii pe loturi mai mari de pacienți care urmăresc corelațiile între aspectele clinico-patologice și alți biomarkeri cunoscuți și care abordează și aspectele heterogenității leziunilor mamare maligne sunt reduse pe plan european, implicit și în România, constituind un argument puternic în demararea acestui studiu doctoral.

Biomarkeri cu importanță prognostică și predictivă

Proliferările mamare tumorale maligne sau benigne pot fi diagnosticate cu precizie folosind tehnica colorației clasice, hematoxilina-eozină. De asemenea, trebuie precizat că există multe cazuri care pun problem diagnostice, acestea fiind, fie din sfera proliferărilor epiteliale cât și din rândul proliferărilor mezenchimale, așadar efectuarea de teste imunohistochimice suplimentare este o condiție esențială pentru stabilirea exactă a histogenezei, subtipului tumoral sau a altor particularități histopatologice notabile. Pentru pacientele cu carcinom mamar, sunt folosiți în mod curent 4 biomarkeri: Ki67, ER, PR și Her-2/neu [5,6,7,8]. În plus, există o pleiadă de biomarkeri utili pentru a ilustra apartenența la un anumit subtip histopatologic (de exemplu E-cadherina [9,10]) sau pentru a demonstra anumite caracteristici moleculare deosebite cu impact asupra evoluției și tratamentului (de exemplu p53).

Heterogenitatea intratumorală a carcinoamelor mamare

Heterogenitatea intratumorală este principalul obstacol în calea tratamentului eficient al cancerului mamar în era medicinei personalizate. Atât sursele genetice cât și cele epigenetice de heterogenitate intratumorală sunt bine documentate și în acest sens au fost dezvoltate mai multe tehnici pentru caracterizarea lor sau a impactului lor asupra fenotipului tumoral. Odată cu progresele tehnologice din ultimii ani, cercetătorii au argumentat inclusiv heterogenitatea intratumorală la nivel de celulă unică precum și cea din contextul carcinoamelor *in situ*. Cu toate acestea, cunoștințele acumulate despre heterogenitatea intratumorală nu au avut un impact direct asupra practicii clinice curente tocmai pentru că dezvoltarea unor agenți terapeutici implică un proces mai lent [11,12]. O mai bună înțelegere a modificărilor genetice, epigenetice, fenotipic-morfologice și imunohistochimice va avea un impact major în viitor în interpretarea corectă a evoluției tumorilor în timpul progresiei bolii și va avea un impact major asupra tratamentului.

Heterogenitatea intratumorală denotă coexistența unor subpopulații de celule canceroase care diferă prin genetica lor, prin aspectele fenotipice și mai ales prin comportamentul imprezizibil în cadrul unei proliferări tumorale. Această diversitate poate fi atribuită geneticii precum și factorilor epigenetici și a altor mecanisme non-ereditare cum ar fi răspunsurile celulare adaptive sau fluctuațiile căilor de semnalizare intra și intercelulare [11,13]. De exemplu, statusul

genetic și imunohistochimic al HER2/neu, ER și PR poate varia între tumorile primare și metastazele acestora sau între tumora index și diversele focare tumorale în cazul tumorilor multiple [14,15] sau între tumora primară și celulele tumorale circulante (CTC) [16,17]. Astfel, heterogenitatea intratumorală este o provocare extraordinară pentru caracterizarea biomarkerilor imunohistochimici și ridică probleme în selecția tratamentului optim.

Măsurători paralele de secvențiere (*Massively Parallel Sequencing - MPS*) [18], precum și alte studii asupra cancerelor mamare au demonstrat că heterogenitatea spațială și temporală sunt fenomene comune, dar rolul lor asupra răspunsului la tratament încă nu este bine documentată [12,19]. Dând un exemplu concret, biopsiile unei regiuni tumorale mici nu pot oferi o caracterizare reprezentativă a datelor genetice, modificărilor epigenetice și/sau fenotipice (inclusiv imunohistochimice) identificate cu ocazia examinării întregului pat tumoral. Lucrurile se complică și mai mult dacă luăm în calcul complexitatea dată de heterogenitatea spațială și temporală ce caracterizează procesul dinamic de proliferare în cadrul unei tumori maligne [11,12,19]. Perspective noi asupra caracteristicilor care stau la baza mecanismelor și consecințelor heterogenității tumorale vor duce la noi abordări diagnostice și terapeutice, esențiale pentru îmbunătățirea celor deja existente.

Carcinomul mamar multiplu și heterogenitatea intertumorală a leziunilor mamare maligne

În mod tradițional, heterogenitatea intertumorală a cancerului de sân a fost documentată în termeni de subtipuri histologice diferite, profiluri imunohistochimice diferite sau sensibilitate diferită la un anumit tratament. Rezultatele studiilor de genetică moleculară de mare capacitate au arătat ulterior adevărata amploare a acestei heterogenități. Îmbunătățind în continuare acest scenariu, expresia heterogenă a receptorului estrogen (ER), a receptorului de progesteron (PR) a HER2/neu și a Ki67 a fost raportată în diferite zone ale aceleiași tumori precum și în diverse focare tumorale atunci când au fost evaluate carcinoame mamare multiple [15,20,21,23]. Mai mult, neconcordanțele în ceea ce privește expresia ER, PR și HER2, au fost, de asemenea, raportate între tumorile primare și respectiv metastazele lor ganglionare sau din alte organe [22,23].

Totodată, studiile de genetică moleculară au confirmat faptul că heterogenitatea intratumorală spațială și temporală a cancerelor mamare există la un nivel care depășește

așteptările obișnuite [19], lucru care complică enorm modul de raportare, taxonomierea leziunilor precum și abordarea terapeutică ulterioară.

Descrierea diferitelor niveluri de heterogenitate tumorală și discutarea unor ipoteze privind strategiile care pot fi adoptate de clinicieni pentru a aborda problemele terapeutice și problemele de rezistență la tratament sunt un pas rațional pe care trebuie să-l facă cercetările ulterioare. Identificarea celor mai potrivite strategii și mai ales implementarea lor în practica medicală se va dovedi extrem de provocatoare și va necesita adoptarea unor practici noi pentru gestionarea clinică optimă a afecțiunilor maligne ale sânului în lumina noilor date.

Fenomenul de mismatch histopatologic și imunohistochimic al leziunilor mamare maligne multiple sincrone

Incidența carcinoamelor mamare multiple este foarte variabilă (sunt studii care citează incidente între 6,1% și 77% pe loturile studiate) și este de la sine înțeles că date precum cele privind prognosticul acestor tumori sunt contradictorii [21,24]. Ghidurile terapeutice internaționale recomandă terapia endocrină adjuvantă sau Herceptin pentru pacienții cu carcinom mamar în care tumora exprimă receptori de estrogen (ER) și / sau progesteron (PR), precum și HER2 [25]. O creștere a indicelui proliferativ Ki67, cu un grad histopatologic ridicat (G2-G3), și negativitatea ER/PR sunt factori care indică utilizarea chimioterapiei. Ghidurile diagnostice în vigoare recomandă raportarea dimensiunii, tipului și gradul histologic precum și caracterile imunohistochimice numai în cazul tumorii index (focarul cel mai mare în cazul tumorilor mamare multiple) [5,6,25,26].

Parametrii biologici (ER, PR, Ki-67, HER2) sunt evaluați numai în focarul tumoral menționat mai sus, în timp ce focarele tumorale (secundare) suplimentare sau caracteristicile imunohistochimice ale posibilelor metastaze sunt raportate și evaluate numai în cazul în care acestea diferă morfologic de tumora principală [24,27], ceea ce se întâmplă rar.

Nu a fost acordată suficientă atenție în literatura de specialitate heterogenității imunohistochimice a focarelor tumorale secundare în cazul leziunilor mamare maligne multiple sincrone. În acest sens considerăm îndreptățită orice cercetare care evidențiază concordanțele sau disconcordanțele între diversele focare tumorale, în speranța că rezultatele ar putea avea implicații terapeutice și prognostice deosebite.

La început, heterogenitatea extraordinară și evoluția continuă a tumorilor pare a fi descurajantă și face ca raportarea corectă, tratamentul sau chiar controlul local al cancerului să devină o sarcină aproape imposibilă. Cu toate acestea, cred cu tărie că o înțelegere aprofundată a heterogenității tumorale va conduce la scăderea numărului de cazuri și chiar la prevenirea acestei boli printr-un management terapeutic adecvat.

Motivația studiului doctoral

În ultimul timp, abordarea diagnostică și terapeutică a neoplasmelor mamare maligne s-a schimbat foarte mult, ca urmare a apariției unor studii științifice ce ofera rezultate valide care fac lumină, cel puțin în parte, asupra mecanismelor patogenice responsabile de apariția cancerului mamar. În acest sens, cancerul mamar este considerat ca fiind un ansamblu de alterări heterogene, individualizate prin diferențe la nivel molecular, histopatologic, imunohistochimic și nu în ultimul rând, clinic. Introducerea de parametrii imunohistochimici cu rol prognostic și predictiv în studiul tumorilor mamare maligne a permis lărgirea orizonturilor diagnostice și deschide noi perspective pentru studii științifice novative care pot întregi imaginea de ansamblu a acestei patologii atât de frecvente în populația generală.

Motivația care a stat la baza studiului doctoral a fost formarea unei imagini de ansamblu asupra heterogenității tumorilor mamare maligne, în special a celor de origine epitelială și descrierea factorilor morfologici și imunohistochimici responsabili de heterogenitatea lezională în încercarea de a înțelege în ce fel heterogenitatea tumorală intra sau interlezională poate explica anumite fenomene morfologice sau evoluția clinică particulară a unor tumori. De asemenea, studiul își propune să aducă un plus de informație în ceea ce privește caracterizarea și evaluarea corectă a tumorilor mamare heterogene și mai ales a carcinoamelor mamare multiple, pentru care nu există la ora actuală o metodă standardizată de raportare. Nu în ultimul rând studiul și-a propus ca prin evaluarea corectă a tumorilor mamare cu *missmach* imunohistochimic între tumora index și/sau tumorile secundare să stabilească dacă datele privind heterogenitatea imunohistochimica ar putea optimiza evaluarea pacienților sau ar putea schimba, cel puțin la nivel ipotetic, tratamentul inițial.

Scopul și obiectivele studiului doctoral

Studiul de față își propune să identifice principalele subtipuri moleculare ale carcinoamelor mamare, folosind criterii „surogat” imunohistochimice și să stabilească corelații clinic–morfologice și imunohistochimice precum și implicațiile pe care le impune caracterizarea heterogenității leziunilor mamare maligne. Un alt scop important al studiului doctoral este evidențierea parametrilor clinic-morfologici prognostici și predictivi ai tumorilor mamare maligne multiple și conturarea diferențelor acestor parametrii comparativ cu cei ai tumorilor unifocale.

Lucrarea este structurată în două părți, repartizată în 13 capitole. Pentru realizarea acestui studiu și pentru compararea rezultatelor obținute, am consultat un număr de 225 referințe bibliografice. De asemenea studiul doctoral include o iconografie bine reprezentată folosind imagini originale, numeroase grafice, diagrame și tabele. Pentru argumentarea rezultatelor și în vederea completării informației științifice din domeniu am introdus 188 figuri și 30 tabele.

- *Obiectivele studiului doctoral:*
 - ❖ stabilirea loturilor de studiu și a principalilor parametrii clinico-morfologici
 - ❖ includerea loturilor și a parametrilor urmăriți într-o bază de date electronică, pentru facilitarea analizei statistice
 - ❖ evaluarea macroscopică a specimenelor chirurgicale
 - ❖ analiza histopatologică și imunohistochimică a cazurilor incluse în studiu diferențiat incluse în două mari loturi: tumori mamare maligne unifocale și tumori mamare maligne multiple
 - ❖ stabilirea corelațiilor semnificative statistic între parametrii clinici, histopatologici și imunohistochimici studiați și cuantificarea valorii prognostice și predictive a acestora
 - ❖ încadrarea cazurilor în clasele „surogat” moleculare
 - ❖ stabilirea unei metode alternative de raportare a cazurilor de cancer mamar multiplu heterogen în funcție de „dominanța” imunohistochimică a focarului tumoral evaluat ca fiind cel mai agresiv.
 - ❖ formularea concluziilor

Metodologia generală a cercetării

Cercetările personale în vederea întocmirii studiului doctoral s-au bazat pe o analiză retrospectivă, cu caracter descriptiv, desfășurată într-un interval de aproximativ 5 ani, perioadă cuprinsă între 1.01.2013 – 02.05.2017. Cazuistica a cuprins tumori mamare maligne operate și diagnosticate în secțiile de chirurgie și ginecologie ale Spitalului Universitar Urgență București (SUUB) și care au beneficiat de un examen histopatologic complet în Departamentul de Anatomie Patologică al aceluiași spital.

Studiului retrospectiv a fost realizat accesând registrele histopatologice din cadrul departamentului de anatomie-patologică cât și baza de date informatizată a Spitalului Universitar Urgență București. Anterior acestui lucru, studiul doctoral a obținut avizul comisiei de etică a spitalului, respectând astfel standardele etice din Declarația de la Helsinki din 1975, revizuită în 2000, precum și legislația națională. De asemenea, după demararea studiului au fost verificate suplimentar anexele de însoțire ale produselor biologice prelevate de la pacienți (Anexa 4) în care aceștia își exprimă acorul în vederea folosirii materialului biologic inclusiv în scop științific.

Din fișele de însoțire, registrele histopatologice și baza de date a spitalului au fost extrase principalele date clinice (vârstă, sex, mediul de proveniență, localizarea anatomică a tumorilor, data diagnosticului), aspectele anatomo-patologice ale tumorilor, diagnosticul histopatologic, gradul de diferențiere și stadiul pTNM. Am selectat un lot principal ce a cuprins un număr de 235 de pacienți, reprezentând cazurile pentru care diagnosticul histopatologic a fost realizat pe piese chirurgicale. Preparatele histopatologice au fost reevaluate și baza de date a fost completată cu date histopatologice suplimentare ce au inclus: focalitatea leziunilor, heterogenitatea intra și intertumorală a leziunilor, necroza, calcificările, invazia tumorală angiolimfatică și perineurală. Deși marea majoritate a cazurilor de carcinoame mamare au beneficiat de diagnostic histopatologic ce a inclus și analiza unor markeri prognostici și predictivi, datele imunohistochimice nu erau complete sau ilustrative pentru a demonstra anumite caractere histopatologice particulare, așadar unele cazuri au beneficiat de o reevaluare completă sau parțială pentru completarea datelor imunohistochimice. În final, 198 de cazuri din acest lot principal au beneficiat de analiza imunohistochimică completă, folosind un panel obligatoriu, principal, reprezentat de patru biomarkeri (ER, PR, HER2neu, Ki67). Acolo unde particularitățile cazului au impus adăugarea unor teste suplimentare, au fost folosiți imunomarkeri pentru

rafinarea diagnosticului histopatologic sau a subtipurilor moleculare (CK5/6, p53, mamaglobina, s100, CD117, EGFR, E-cadherină, sinaptofizină, ENS, cromogranină, SMA, Top2 alfa, ș.a). După obținerea rezultatelor, baza de date a fost reactualizată. Din acest lot principal s-a ales un lot secundar alcătuit din 37 de cazuri cu tumori mamare multiple maligne (multifocale + multicentrice), deoarece am considerat că aceste tumori sunt prototipul ideal pentru studiul heterogenității tumorale intra și interlezionale. Analiza acestui lot secundar s-a realizat cu scopul de a stabili impactul pe care l-ar putea reprezenta heterogenitatea histopatologică și imunohistochimică în încadrarea acestor tumorilor mamare în subtipuri moleculare surogat sau posibila reevaluare în vederea schimbării managementului terapeutic.

8.1. Criterii de eligibilitate și de excludere

Criterii de eligibilitate

- Cazurile înregistrate în cadrul departamentului de Anatomie Patologica al Spitalului Universitar Urgență București (SUUB) care au beneficiat de tratament chirurgical.
- Cazurile confirmate din punct de vedere histopatologic și imunohistochimic cu diagnosticul de tumora mamară malignă.
- Cazurile cu examen imunohistochimic cât mai complet pentru încadrarea exactă a originii histologice (epiteliale= carcinoame, mezenchimale= sarcoame, reticulo-endoteliale= limfoame) sau a subtipului histologic.
- În loturile de studiu au fost incluse și carcinoamele ductale *in situ* cu microinvazie confirmată imunohistochimic.
- Pentru cazurile de tumori mamare multiple, focarul tumoral cu diametrul cel mai mare a fost considerat tumora index.
- Am considerat că o tumoră este multiplă (multifocală sau multicentrică dacă are mai mult de 2 focare tumorale invazive, indiferent de histogeneză sau mărime, confirmate histopatologic, imagistic sau în urma examinării macro și microscopice a piesei de rezecție.
- Focarele tumorale multiple trebuie să fie separate de țesut sănătos, leziuni *in situ* sau leziuni proliferative benigne.

Criteria de excludere

- Cazurile în care diagnosticul histopatologic a fost reprezentat de proliferari tumorale epiteliale intraductale, fără decelarea microinvaziei (de exemplu cazurile „pure” de DCIS, LCIS) sau proliferările tumorale benigne.
- Cazurile confirmate cu diagnosticul de boală Paget fără componentă de carcinom mamar invaziv.
- Cazurile în care diagnosticul histopatologic sau / și imunohistochimic a fost stabilit doar prin puncție biopsie sau prin aspirat cu ac fin.
- Cazurile cu diagnosticul de tumoră mamară malignă la care s-a efectuat tumorectomie, lumpectomie sau mastectomie în alta unitate sanitară și pentru care datele clinico-patologice nu au fost accesibile.
- Cazurile de boală metastatică în care a fost confirmată originea mamară, dar care au beneficiat de tratament chirurgical în altă unitate spitalicească
- Cazurile de carcinoame mamare care au beneficiat de chimioterapie înainte de efectuarea tratamentului chirurgical.

EVALUAREA HETEROGENITĂȚII CLINICO- IMUNOHISTOPATOLOGICE ȘI ANALIZA STATISTICĂ A LOTULUI DE PACIENȚI CU TUMORI MAMARE MALIGNE

Majoritatea cazurilor (n=147/ 62,6%) provin de la pacienți cu domiciliul stabil în mediul urban. Raport dintre sexe este disproporționat, așa cum era de așteptat, în prezentul studiu au fost incluse 229 de cazuri (97,4%) ce aparțin sexului feminin, restul fiind observate la sexul masculin (6 cazuri- 2,6%).

Histograma de frecvență pentru vârsta la diagnostic a pacientelor cu tumori mamare maligne (Figura 1), arată o distribuție ușor asimetrică, cu subțiere la dreapta (*right skewed distribution*), având valoarea mediei (59.93) mai mare decât valoarea medianei (61). Acest lucru este de așteptat având în vedere ca majoritatea tumorilor mamare maligne sunt diagnosticate la pacientele cu status hormonal postmenopauzal. Pentru pacienții diagnosticați cu tumori mamare maligne media de vârstă a fost de 56,66 (cel mai tânăr pacient având 24 ani, iar cel mai vârstnic 83 de ani), valori comparabile cu cele preconizate de studiilor epidemiologice de amploare.

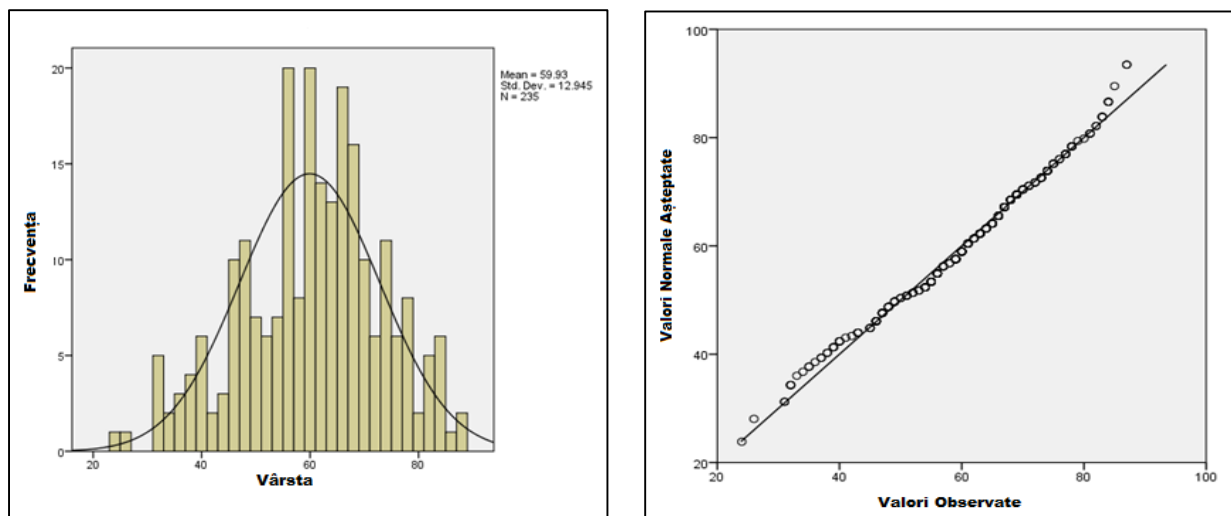


Figura 1. Histograma de frecvență pentru vârsta la diagnostic a pacienților cu tumori mamare maligne. **Figura 2** Normal Q-Q Plot pentru vârsta la diagnostic a pacienților

Reprezentările grafice de tip "cuantilă-cuantilă" Normal Q-Q Plot și Detrended Normal Q-Q Plot pentru vârsta la diagnostic a pacienților cu tumori mamare maligne au fost efectuate pentru tot lotul de pacienți incluși în studiul doctoral (Figura 2) și evidențiază o deviație minimă față de distribuția normală, cu o dependență aproximativ liniară între valorile obținute (observate) și cele așteptate.

Valoarea medie a diametrului tumoral obținută a fost de 2.80 cm cu o deviație standard de 2.6 cm și o valoare mediană de 2.1 cm. 50% dintre cazuri au avut diametrul tumoral sub 2.1 cm. 25% dintre cazuri au avut un diametru mai mare de 3.1 cm (quartila 4)

În ceea ce privește stadializarea finală pTNM cele mai multe femei din eșantionul studiat 28.4% (n=59) sunt în stadiul IIA, 20.7% (n=43) au avut un stadiu IA și în 19.7% dintre cazuri boala avansase până la stadiul IIB (n=41). Pentru stadiul III (cumulat pentru III A, B și C) procentul de paciente aflate în acest stadiu de boală a fost de 15.5% similar cu procentajul pacientelor cu stadiu avansat de boală (stadiul IV) care a reprezentat 15.4% din total.

Multifocalitatea este printre cele mai importante cauze ale heterogenității tumorilor mamare, tumorile multiple fiind un prototip ideal pentru studiul acesteia. În prezentul studiu doctoral am identificat 37 de cazuri de tumori mamare multiple: 6 cazuri de tumori mamare maligne multicentrice (2.8 % , n=6) și 31 de de cazuri cu tumori multifocale (14.4%, n=31),

reprezentând 17,7% din totalitatea cazurilor incluse în studiu. Pentru 19 cazuri nu au existat date privind focalitatea iar celelalte 179 de cazuri rămase (83%) au fost tumori unifocale

Analiza statistică efectuată sugerează ca nu există diferențe majore între vârsta medie la diagnostic între pacienții cu tumori unice/ unifocale comparativ cu tumorile multiple (multifocale și multicentrice), singurele diferențe remarcabile fiind vârstele minime și maxime la diagnostic și de asemenea vârsta mediană a pacientelor cu tumori multicentrice (mai mică cu aproximativ 3 ani față de restul grupurilor), după cum reiese și din Figura 3

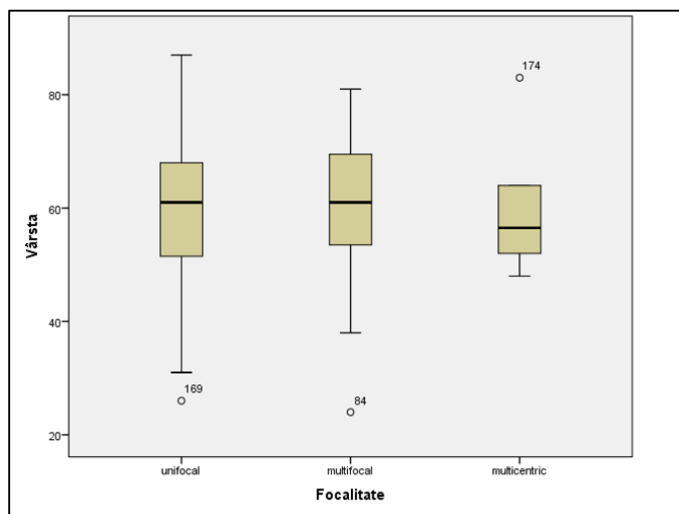


Figura 3. Box-plot pentru vârsta la diagnostic a pacienților cu tumori mamare maligne în funcție de focalitatea leziunilor

Diagnosticul histopatologic al leziunilor mamare maligne incluse în studiul doctoral s-a făcut în conformitate cu criteriile de diagnostic în vigoare ale ediției a-VI-a a OMS privind clasificarea și diagnosticul leziunilor mamare. Spectrul leziunilor mamare maligne a inclus o gamă largă de entități, atât cu origine epitelială, cât și mezenchimală și chiar și câteva cazuri de proliferări maligne limfomatoase. Leziunile mezenchimale au fost incluse în studiu fie pentru că prezentau proliferări epiteliale concomitente de tip *in situ* sau invazive, fie pentru că din punct de vedere clinic mimau clinic leziuni epiteliale. Din motive asemănătoare au fost incluse în studiu și câteva cazuri de limfoame mamare primare, pentru acestea din urmă principalul diagnostic diferențial făcându-se cu carcinoamele mamare inflamatorii. Variabilitatea histotipurilor microscopice argumentează de asemenea heterogenitatea leziunilor mamare maligne și impune examenul histopatologic clasic completat de tehnici adecvate de imunohistochimie ca metodă standard de diagnostic.

Astfel, am remarcat o varietate mare de forme morfopatologice, dintre care carcinomul mamar de tip NST a predominat pentru ambele sexe, cu o frecvență de 61,6% (n=141) din cazurile de tumori maligne invazive identificate la genul feminin. La sexul masculin, toate cazurile au avut această morfologie (n=6). Cu o proporție de 8,3% (n=19) carcinoamele lobulare invazive au fost a doua cea mai frecventă formă histopatologică de tumori mamare maligne epiteliale. Carcinoamele mamare cu caractere medulare precum și carcinoamele mamare mixte au cuprins câte 19 cazuri fiecare. Carcinoamele mamare mucinoase, fie ele hipocelulare (coloide) sau hipercelulare au reprezentat 3,9% (n=9) din total.

Studiul doctoral a cuprins doar forme de tumoră phyllodes malignă (n=7) asociată cel puțin cu o altă leziune epitelială *in situ* (DCIS) sau franc invazivă. De asemenea, am inclus DCIS cu microinvazie (documentată imunohistochimic) cu o proporție de 2,6% din totalul cazurilor. Forme morfopatologice de tumori epiteliale maligne mamare speciale, mai rar observate au fost: carcinom metaplastic - 6 cazuri; carcinom tubular, carcinom neuroendocrin, carcinom cribriform invaziv, carcinom papilar invaziv, carcinom micropapilar- fiecare cu câte 2 cazuri.

De asemenea, au mai fost identificate: carcinomul adenoid-chistic, carcinomul cu diferențiere apocrină și carcinomul papilar închistat cu câte un 1 caz, două cazuri de angiosarcom mamar primar (dintre care unul în cadrul sindromului Stewart-Treves), un caz de limfom difuz cu celula B mare (DLBCL) primar mamar precum și un caz foarte rar de limfom Hodgkin mamar primar, ultimile două mimând clinic carcinoame mamare inflamatorii.

Indici histopatologici utili în evaluarea diagnostică a heterogenității leziunilor mamare maligne

Pentru întregirea tabloului histopatologic și pentru evaluarea corectă a heterogenității cazurilor incluse în studiul doctoral au fost evaluați o serie de indici histopatologici precum: gradul de diferențiere tumorală; tipul și numărul metastazelor limfoganglionare; invazia angiolimfatică, invazia perineurală, calcificările și prezența sau absența zonelor de necroză. De asemenea, au fost făcute corelații între acești parametri.

Gradul de diferențiere tumorală.

Gradul histopatologic este considerat a fi un indicator puternic al prognosticului în cancerul mamar. Acesta a fost cuantificat pe baza unui sistem de scoruri care permit o estimare relativ corectă a probabilității de recidivă sau de deces. Pentru tumorile cu diferențiere ductală a fost utilizat sistemul de gradare histopatologic Nottingham cu modificările Elston- Ellis, iar pentru celelalte cazuri au fost luate în considerare criteriile de evaluare impuse de ghidurile în vigoare (OMS). Rata de recidivă și invazie tumorală se pare că este direct proporțională cu gradul histopatologic: cu cât este mai mare gradul cu atât crește implicit și agresivitatea tumorii. Acest lucru a fost confirmat și în cazul studiului de față, deși au existat excepții de la aceasta regulă, în special în contextul unor carcinoame de tip NST în care au fost identificate metastaze ganglionare sau focare tumorale invadante la nivelul mușchiului pectoral, care aveau o morfologie discordantă față de tumora primară. Astfel au fost identificate 21 de carcinoame NST în care aveau heterogenitate în ceea ce privește diferențierea ductală la nivelul masei tumorale, în sensul că existau zone bine diferențiate care alternau cu altele slab diferențiate, scorul final Nottingham încadra tumora în categoria G2. Dintre acestea, în 7 cazuri au fost detectate metastaze limfoganglionare care aveau o morfologie sugestivă pentru un carcinom bine diferențiat (G1), în condițiile în care tumora index era moderat sau slab diferențiată. În mod asemănător au fost identificate 2 cazuri în care invazia tumorală la nivelul mușchiului pectoral era G1, în contextul în care tumora index avea un scor Nottingham care o încadra în categoria G3. Un singur caz a prezentat metastaza unică a ambelor contingente tumorale (G1 și G3) într-un limfoganglion, sugerând o clonalitate multiplă a tumorii index.

Această discordanță de grad-ing între tumora index și metastazele ei arată că mecanismele biologice ale procesului de propagare și metastazare sunt mai complexe decât se credea inițial și ar impune fie o adnotare a sistemului inițial de grad-ing, fie o gradare separată a focarelor discordante pentru o evaluare completă și corectă. Maniera în care această discordanță ar putea avea impact asupra tratamentului sau asupra prognosticului este greu de estimat.

Metastazele limfoganglionare

Din totalul de 235 se pacienți, au fost culese informații pentru 214, reprezentând 91.1% din eșantionul studiului doctoral. În 61.7% din cazurile înregistrate nu au fost identificate

metastaze ganglionare în limfoganglionii recoltați și examinați. 30.4% dintre pacienți au prezentat metastaze în 1-3 limfoganglioni (pN1). Doar 5.6% dintre pacienți au avut metastaze în 4-9 limfoganglioni (pN2) și 2.3% au avut metastaze în mai mult de 10 ganglioni (pN3).

Invazia angiolimfatică

Emboliile tumorale au fost întâlnite aproape în toate cazurile de boală metastatică documentată clinic, precum și la 24% din pacientele aflate în stadiu pT4 cu ulcerarea tegumentului.

Invazia perineurală

Invazia perineurală (Figura 5) este un parametru destul de obscur și rar raportat în cazul leziunilor mamare maligne, cu toate acestea este un semn care certifică potențialul agresiv al tumorilor, deși este mai puțin frecvent observat în carcinomul mamar și, prin urmare, a fost mai puțin studiat. În aproximativ 15% din cazuri invazia perineurală a fost observată. Acest procent este cu mult mai mare decât cele vehiculate în literatura de specialitate care estimează acest parametru la 1-5% din totalitatea cazurilor. Un număr de două cazuri au prezentat de asemenea invazie perineurală care îngloba corpusculi pacinieni (Figura 4) sau ganglioni nervoși, aspect foarte rar întâlnit.

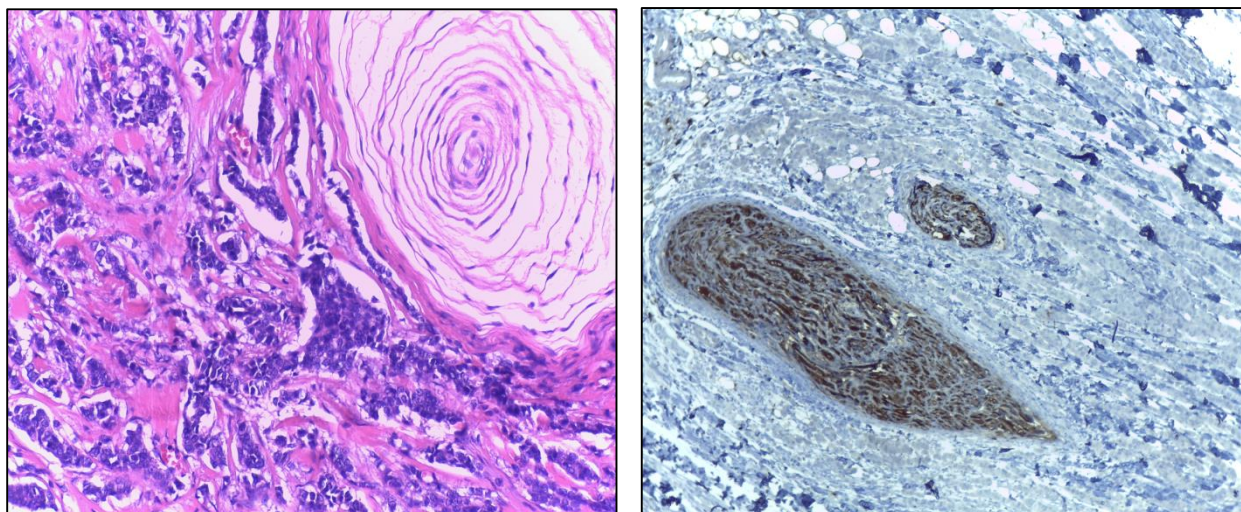


Figura 4 (stânga). Invazie perineurală a unui carcinom mamar NST G2 în jurul unui corpuscul Vater-Pacini, col. H.E. ob.20x. **Figura 5 (dreapta).** Invazie perineurală a unui carcinoma lobular

invaziv, se observă imunoexpresia pozitivă pentru s100 a filetelor nervoase, Col. IHC, DAB, ob. 10x.

Calcificările distrofice asociate proliferărilor tumorale mamare.

În studiul de față au fost evaluate calcificările asociate exclusiv leziunilor invazive sau a cazurilor de DCIS cu microinvazie documentată histopatologic și imunohistochimic. Microcalcificările distrofice au fost identificate în 23,4% din cazuri (n=55), 78% dintre ele au aparținut pacienților cu carcinoame mamare NST de grad 2 sau 3 (Figura 123). Dintre acestea doar 65% au avut calcificări în componenta tumorală invazivă, restul având microcalcificări distrofice exclusiv în componentele *in situ* asociate în special DCIS G3- comedo-type (Figura 124) și ocazional în alte leziuni (FEA - *flat epithelial atypia*).

Necroza tumorală.

Prezența necrozei tumorale a fost găsită în 19.6% dintre cazurile evaluate (n=46), iar în 75% dintre acestea prezența necrozei a fost raportată în descrierea macroscopică a leziunilor. În 68% din cazuri diametrul tumoral era mai mare sau egal cu 3.2 cm.

Analiza imunohistochimică a heterogenității leziunilor mamare maligne.

Heterogenitatea imunohistochimică a tumorilor mamare maligne afectează diagnosticul, prognosticul și răspunsul la terapie. Această heterogenitatea poate fi descurajantă atât din punct de vedere al cuantificării și raportării cât mai ales din perspectiva managerierii ulterioare a fiecărui caz în parte. Evaluarea imunohistochimică a cazurilor de leziuni mamare maligne a cuprins 4 biomarkeri imunohistochimici de bază: receptorii hormonali (ER și PR), Her2neu și Ki67. Pentru unele cazuri a fost necesară evaluarea suplimentară a p53 și a citokeratinelor bazale.

De asemenea pentru o serie de cazuri a fost folosit ca marker de proliferare Top2alpha. Imunohistochimia folosind 4 biomarkeri are importanță prognostică dar mai ales predictivă, cu rol major în stabilirea tratamentului adecvat ce poate include hormonoterapie sau chimioterapie, după caz. De asemenea, cei patru biomarkeri sunt extrem de utili pentru încadrarea tumorilor în clasele moleculare, folosind criteriile surogat imunohistochimice. Evaluarea și cuantificarea semicantitativă a expresiei biomarkerilor folosiți s-a făcut în conformitate cu recomandările ASCO-CAP în vigoare.

Fiind vorba este cuatificarea unor variabile continue, analiza statistică a impus calcularea indicatorilor tendinței centrale, medie, medianei, deviație standard precum și indicatorii de asimetrie și boltire folosiți pentru a determina forma distribuției și dacă acesta este o distribuție normală (Figura 6).

Statistics							
		Varsta	Diametru tumoral maxim în cm	ER%	PR%	Ki67	Top2 alfa
N	Valid	235	214	195	188	198	45
	Missing	0	21	40	47	37	190
Mean		59.93	2.8023	.5413	.5997	.2331	.2500
Median		61.00	2.1000	.7000	.7500	.1800	.2000
Std. Deviation		12.945	2.60374	.37672	.37475	.17677	.18809
Skewness		-.298	5.592	-.371	-.659	1.710	2.120
Std. Error of Skewness		.159	.166	.174	.177	.173	.354
Kurtosis		-.213	46.089	-1.456	-1.189	2.781	4.011
Std. Error of Kurtosis		.316	.331	.346	.353	.344	.695
Minimum		24	.40	.00	.00	.02	.05
Maximum		87	28.00	1.00	1.00	.90	.85
Percentiles	25	52.00	1.7000	.1000	.3000	.1000	.1500
	50	61.00	2.1000	.7000	.7500	.1800	.2000
	75	68.00	3.1000	.9000	.9000	.3000	.2600

Figura 6. Analiza principalilor indicatori statistici pentru parametrii imunohistochimici analizați

Evaluarea expresiei ER a fost făcută și din perspectiva omogenității expresiei la nivelul focarului (focarelor) tumorale, din cele 179 de cazuri cu expresie pozitivă pentru acest receptor, în 30,5% dintre cazuri expresia ER a fost heterogenă, existând zone în care fie expresia se atenua gradat (de obicei în zonele de necroză) sau devenea negativă abrupt. Acest fenomen a fost observat cu precădere în focarele tumorale mai agresive sau cu un grad-ing tumoral mai avansat. Heterogenitatea intratumorală a fost observată și în cazul tumorilor mamare mixte, aici pattern-ul expresiei sugerând clonalitatea diferită a fronturilor tumorale, inclusiv din punct de vedere imunohistchimic –Figura 7

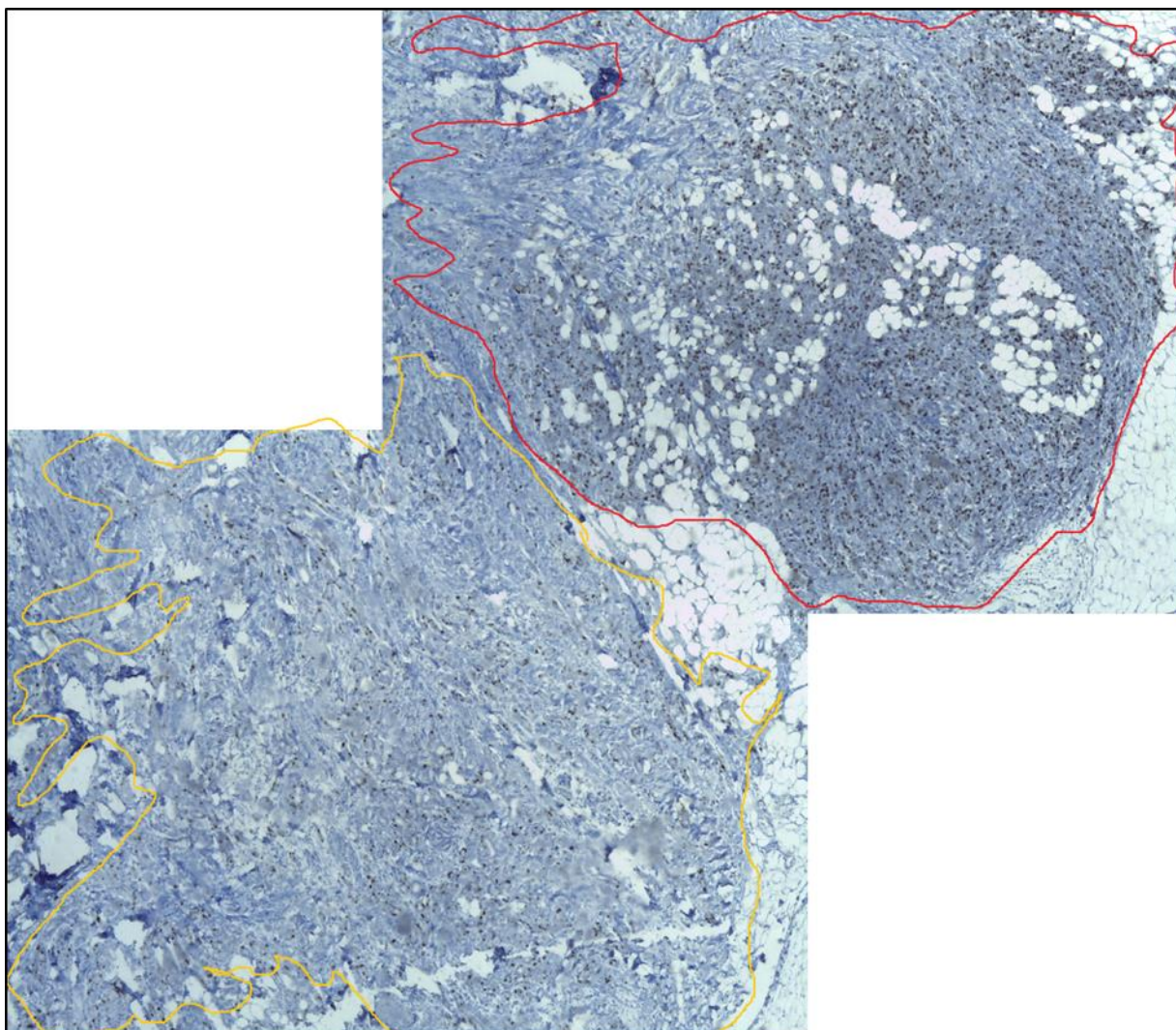


Figura 7. Tumora mamară mixtă NST-CLI cu expresie heterogenă, discordantă a ER, focarul tumoral NST (sus, delimitat cu roșu) prezintă imunoexpresie nucleară puternică pentru ER, iar focarul tumoral de CLI (jos, delimitat cu galben), deși pozitiv prezintă o expresie slabă pentru ER.col H.E., ob4x. cromogen DAB, ob 4x, imagine de ansamblu prelucrată folosind aplicația *stich images* a softului Leica Application Suite X versiunea 3.0.2

Evaluarea heterogenității spațiale a expresiei PR la nivelul focarului (focarelor) tumorale, a arătat că din cele 195 de cazuri cu expresie pozitivă pentru acest receptor, în 21,5% dintre cazuri expresia PR a fost heterogenă, existând zone în care expresia era atenuată sau absentă în focarele tumorale cu un grad-ing tumoral mai avansat- Figura 8 și 9. Discordanța expresiei imunohistochimice a PR dintre tumorile unifocale și metastazele lor a fost observată în 8 cazuri. La 6 dintre ele tumora index era PR+, iar metastazele complet negative pentru acest receptor, un

caz prezenta atenuarea expresiei PR+ la nivelul metastazei, iar un altul avea o expresie paradoxală pozitivă a PR pentru tumora index corespunzătoare care era complet negativă pentru acest receptor.

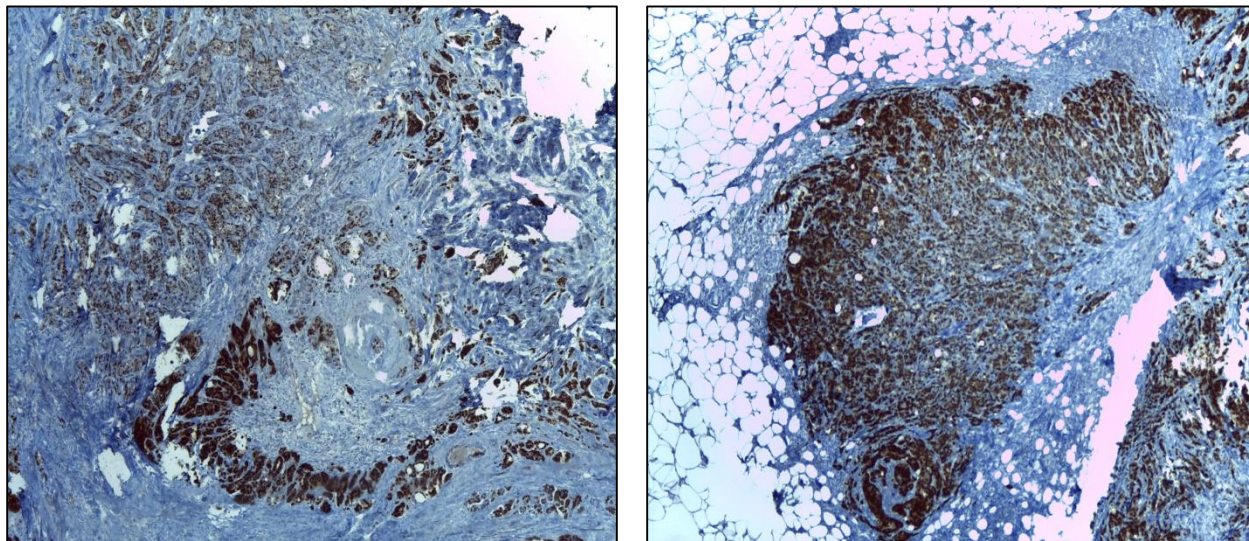


Figura 8 și 9. Heterogenitate intratumorală a expresiei PR. col. IHC, cromogen DAB, ob.4x

În studiul doctoral cuantificarea imunohistochimică a HER2/neu s-a realizat pentru 186 cazuri (79% din totalul eșantionului) conform recomandărilor ASCO/CAP, dintre care în 6.4% (n=12) s-a observat supraexpresia acesteia, concretizată imunohistochimic printr-o reacție intensă membranară completă - IHC 3+.

În studiul actual imunomarcajul p53 a fost evaluat în 78 de cazuri (33,2 % din totalul cazurilor incluse în studiu) iar dintre acestea 26 de cazuri (33,3%) au prezentat un scor mai mare de 9 după cheia de interpretare a scorului Remmele – Stegner, fiind considerate pozitive. S-a constatat că există o relație între supraexpresia p53 și gradul de diferențiere, 24 dintre cele 26 de cazuri fiind observate în cadrul unor tumori G2 și G3.

Cuantificarea Ki67 este problematică în sensul că nu există norme exacte de măsurare iar parerile experților sunt împărțite în ceea ce privește valoarea cut-off-ului pentru acest imunomarker. Prin urmare, am ținut cont de recomandările în vigoare care sugerează că pentru evaluarea Ki67 să fie analizate trei câmpuri microscopice cu obiectiv mare (40x), fiind vizate în special zonele de la periferia proliferării tumorale. Valoarea Ki67 a ținut cont și de zonele active

mitotic (hot-spots) cât și de zonele mai puțin proliferante în așa manieră încât valoarea finală este o medie a acestora. Indexul Ki67 a fost exprimat estimativ în procente, iar valoarea de 14% este considerată valoarea prag pentru diferențierea unui index Ki67 mare de unul mic. În mod asemănător a fost evaluată și imunoexpresia Top2alpha

Histograma de frecvență pentru Ki67 (%) și Top2alpha (%) la pacienții diagnosticați cu tumori mamare maligne, arată o distribuție normală (Gauss) în ambele cazuri, ușor asimetrică, cu subțiere la dreapta (right skewed distribution), având valoarea mediei 23- pentru Ki67 respectiv 25 pentru Top2alpha, valori mai mari ca valorile medianei 18 pentru Ki67 și respective 20 pentru Top2alpha (Figura10).

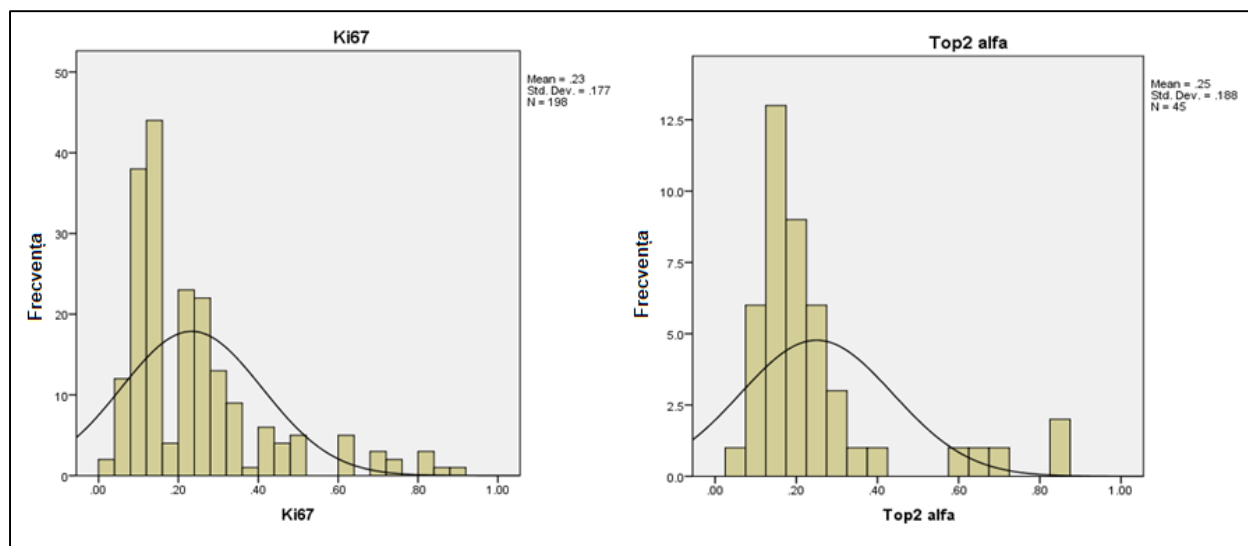


Figura 10. Histograma de frecvență pentru Ki67 (%) și Top2alpha (%) la pacienții diagnosticați cu tumori mamare maligne.

Indicii de proliferare bazați pe imunoexpresia celulelor pentru Ki67 și Topoizomeraza IIa s-au corelat foarte puternic unul cu celălalt ($r = 0,904$, $p < 0,0001$). Top2alpha a avut un model mai distinct, și mai puțin variabil de colorare nucleară, comparativ cu expresia Ki67, în acest sens Top2alpha ar putea reprezenta o alternativă sigură și fiabilă față de MIB-1 ca marker de proliferare. Distribuția scorurilor KI67 continue în funcție de categoriile altor variabile clinice și patologice a arătat diferențe semnificative în distribuția scorurilor automate KI67 în funcție de

gradul histologic de diferențiere tumorală, dimensiunea tumorii, statusul ER, statusul PR, expresia HER2 și p53, dar nu s-au găsit corelații semnificative între expresia Ki67 și statusul limfoganglionilor (pN) sau în funcție de stadializare.

Reprezentarea box-plot pentru Ki67 (%) în funcție de gradul de diferențiere histopatologic al tumorilor mamare maligne conturează o distribuție asimetrică pentru tumorile G1, cu linia medianei la mijlocul casetei și mustăți ușor asimetrice, cu o distribuție mai largă între a doua quartilă și valoarea maxima (Figura 11).

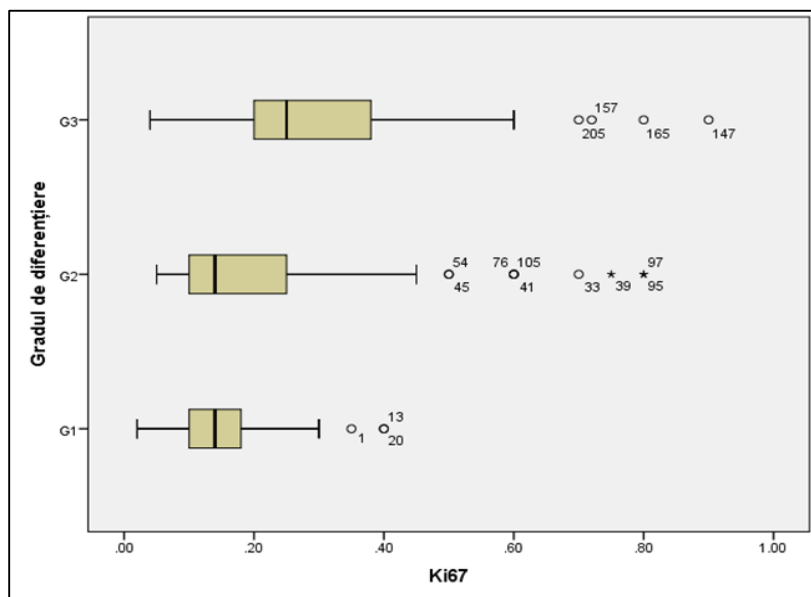


Figura 11. Reprezentare box-plot pentru Ki67 (%) în funcție de gradul de diferențiere histopatologic al tumorilor mamare maligne

Analiza statistică a evidențiat o frecvență mare a cazurilor cu imunofenotip luminal (luminal A și luminal B) - 81 % din totalitatea cazurilor, față de subtipurile non-luminale care au reprezentat 19% din total. Subtipul luminal A a predominat cu 49.2 % (n=92), urmat de subtipul Luminal B cu 32.1% (n=60) din cazuri. Cazurile cu supraexpresia Her2/neu au reprezentat 6.4% (n=12) din total, iar subtipul triplu negativ a fost observat în 12.3% (n=23) dintre cazuri.

CONTRIBUȚII PRIVIND ANALIZA HETEROGENITĂȚII INTERTUMORALE A CAZURILOR DE CARCINOM MAMAR MULTIPLU

Din lotul principal de 235 de cazuri s-a ales un lot secundar alcătuit din 37 de cazuri cu tumori mamare multiple maligne (multifocale + multicentrice), deoarece am considerat că aceste tumori sunt prototipul ideal pentru studiul heterogenității tumorale intra și interlezionale. Analiza acestui lot secundar s-a realizat cu scopul de a stabili impactul pe care l-ar putea reprezenta heterogenitatea histopatologică și imunohistochimică în încadrarea acestor tumorilor mamare în subtipuri moleculare surogat sau posibila reevaluare în vederea schimbării managementului terapeutic.

Multifocalitate sau multicentricitate tumorilor mamare maligne poate fi definită ca prezența concomitentă a două sau mai multe focare tumorale într-un singur cadran (caracter multifocal) sau în cadrul unor cadrane diferite ale aleluasi san (caracter multicentric). Definiția însă are multe interpretări, datorită caracterului foarte subiectiv în care este delimitat un cadran din punct de vedere anatomic și funcțional. Actualmente se preferă termenul de tumoră mamară multiplă, însă în prezentul studiu doctoral pentru ilustrarea adecvată a tabloului morfohistochimic au fost păstrați ocazional termenii de tumora multifocală și multicentrică.

Multifocalitatea este printre cele mai importante cauze ale heterogenității tumorilor mamare. În prezentul studiu doctoral am identificat 37 de cazuri de tumori mamare multiple: 6 cazuri de tumori mamare maligne multicentrice (2.8 %, n=6) și 31 de cazuri cu tumori multifocale (14.4%, n=31), reprezentând 17,7% din totalitatea cazurilor incluse în studiu.

Vârsta medie la prezentare a fost de 62,3 (intervalul 36-87 ani). 80% dintre pacienți aveau o masă palpabilă la nivelul sânului, iar restul pacienților au fost diagnosticați după examinarea mamografică. Lateralitatea leziunilor a fost următoarea: lateralitatea stângă a fost observată în 83,3% iar lateralitatea dreaptă în 16,6% din cazuri. 6 cazuri au avut tumori multicentrice (16.6%) iar celelalte cazuri au fost tumori multifocale. Cele 31 carcinoame invazive multifocale au avut tipul histologic următor: 27 au fost carcinom mamar NST, 2 au fost carcinoame lobulare invazive (Figura 12), 1 caz a fost carcinom mixt NST-CLI și ultimul caz inclus un carcinom mamar cu caracteristici medulare. Carcinoamele multicentrice au avut

următoarele histotipuri. 3 au fost CLI, 2 au fost carcinoame NST și un caz a fost de tip mixt NST-CLI.

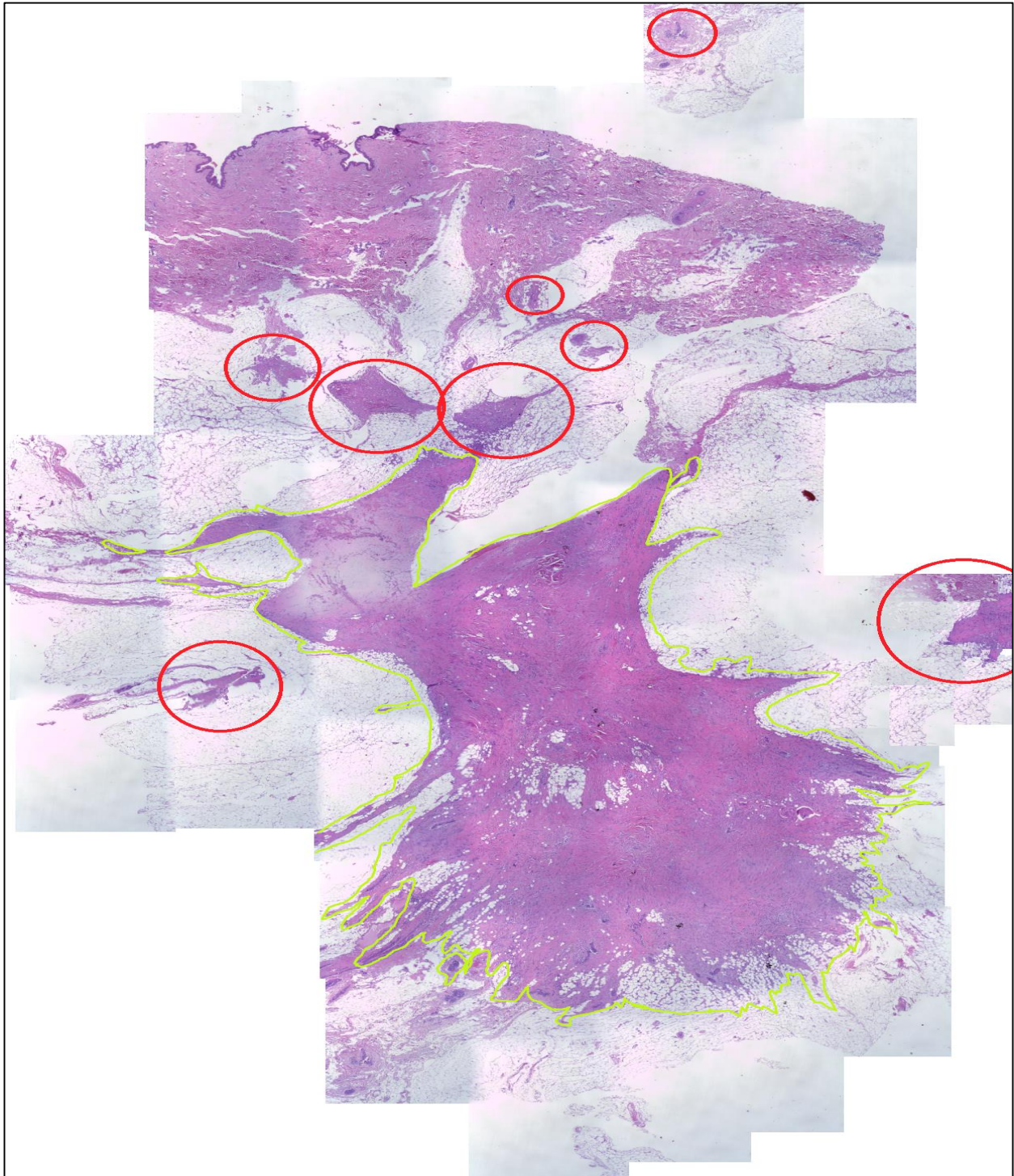


Figura 12. Carcinom mamar lobular invaziv multifocal, tumora index este delimitată cu verde deschis. 8 focarele tumorale secundare sunt delimitate cu cercuri roșii, col H.E, ob.4x.

Imagine de ansamblu prelucrată folosind aplicația *stich images* a softului Leica Application Suite X versiunea 3.0.2.

Pentru toate cazurile au fost evaluați următorii parametrii: tumora index (daca tumorile aveau aceeași dimensiune, tumora index a fost considerată cea cu gradul histologic cel mai mare, în cazul în care și gradele histologice coincid, a fost aleasă tumora cu indexul Ki67 cel mai mare, considerându-se în acest caz că acest marker oglindește cel mai bine agresivitatea tumorală), numărul focarelor tumorale, grad-ing-ul tumorii index și a focarelor tumorale, tipul histologic al tumorii index și al focarelor tumorale, încadrarea într-un subtip molecular pe baza criteriilor surrogat și prezența metastazelor (tipul histologic, gradul de diferențiere tumoral, tipul molecular). Datele obținute sunt redade în tabelul de mai jos. „Domenanța tumorală” a fost stabilită pe criterii morfologice și imunohistochimice și se referă la focarul tumoral cel mai agresiv, aceasta este redată în tabelul algoritmic cu roșu.

Nr.pacienți	Nr.focare	Dimensiuni (mm)	Grad	Histotip	Subtip molecular	Metastază		
						Grad	Histotip	Subtip molecular
1	2	10/10	1/1	D/D	LuA/LuA			
2	2	12/5	1/2	D/D	LuA/LuA			
3	2	11/3	1/2	D/D	LuA/LuA			
4	2	11/4	2/2	D/D	LuA/LuA			
5	2	12/5	2/2	D/D	LuA/LuA			
6	2	12/10	2/2	D/D	LuB/LuA			
7	2	12/11	2/2	D/D	TN/TN			
8	2	15/15	2/2	Mx	LuA/LuA			
9	2	16/2	2/3	D/L	LuA/LuB	3	D	LuA
10	2	18/18	2/3	D/D	LuA/LuB	3	D	
11	3	20/10/3	2/2/2	D/D/L	LuA/ LuA/ LuA	2	D	LuA
12	3	20/11/3	2/2/2	D/D/D	LuA/LuB/ LuA			
13	3	20/11/2	2/2/2	D/D/D	LuB/LuB/LuB			

14	3	21/5/5	2/2/2	D/D/D	LuB/LuA/LuA			
15	3	26/4/3	3/3/3	D/D/D	LuA/LuA/LuA	3	D	LuA
16	4	17/5/5/3	2/2/2/2	D/D/D...	LuA/LuA/LuA...			
17	4	18/6/6/4	2/2/2/2	D/D/D	TN/TN/TN/TN...	3	D	LuB
18	4	23/11/5/5	2/2/2/2	Mx	LuA/LuA/LuA...	2	D	LuB
19	4	26/4/4/2	3/3/3/3	D/D/D/D	LuA/LuA/LuA...	2	D	LuA
20	5	36/12/4/4/3	3/3/3/3/3	M/M/...	TN/TN/TN/TN...	3	M	TN
21	6	22/11/6/6/4/1	2/2/2/2/2/2	L/L/L...	LuA/LuA/LuA...			
22	7	20/11/7/4/4/2/1	2/2/2/2/2/2/2	D/D/D...	LuA/LuA/LuA...	2	D	LuA
23	7	20/12/7/4/5/2/1	2/3/2/2/2/2/1	D/D/D...	LuA/LuA/LuA...			
24	7	21/11/7/4/4/2/1	2/3/3/2/2/2/2	D/D	LuB/LuA/LuA/...			
25	7	26/18/7/4/4/2/1	2/3/3/3/3/2/2	D/L/L...	LuA/LuA/LuA...	3	L	LuA
26	8	18/10/3/2/2/1/1/1...	2/2/2/2/2/2/2...	L/L/L...	HER/HER/HER...	2	L	HER
27	8	23/11/5/4/2/1/1/1...	2/2/2/3/2/1/1...	D/D/D...	LuA/LuA/LuA...			
28	8	28/12/4/3/3/1/1/1..	2/2/2/2/1/1/1...	D/D/D...	LuA/LuA/LuA...	2	D	LuB
29	8	30/10/3/2/2/1/1/1...	3/3/3/3/3/3/3...	D/D/D...	TN/TN/TN/TN...	3	D	TN
30	9	25/14/3/2/1/1/1/1..	2/2/2/2/1/1/1...	D/D/D...	LuB/LuB/LuB...			
31	9	38/10/6/2/2/1/1/1...	3/3/3/3/3/3/3...	L/L/L...	LuA/LuA/LuA...	3	L	LuA
32	10	26/15/4/4/2/2/1/1...	2/2/2/1/1/1/1...	D/D/D...	LuA/LuB/LuA...	2	D	LuB
33	10	27/10/5/5/2/1/1/1...	2/2/2/2/2/2/2...	D/D/D...	LuA/LuB/LuA...	3	D	TN
34	11	10/10/5/2/2/1/1/1...	3/2/2/2/2/2/2...	D/D/D...	TN/TN/TN/TN...	3	D	TN
35	11	18/12/3/3/2/1/1/1...	2/2/2/2/2/2/2...	D/D/D...	LuB/LuB/LuB...			
36	11	32/18/4/4/2/1/1/1...	2/2/2/2/2/2/2...	L/L/L...	LuA/LuA/LuA...	2	L	LuA
37	11	35/10/3/2/2/1/1/1...	3/3/3/3/3/3/3...	L/L/L...	LuA/LuA/LuA...	3	L	LuA

Tabel 1. Principalii parametri evaluați pentru caracterizarea heterogenității intertumorală a carcinoamelor mamare multiple. **Legendă:** D- carcinom mamar NST (ductal), L- carcinom mamar lobular invaziv, Mx- carcinoma mamar mixt NST-CLI, M- carcinoma mamar cu caracteristici medulare, LuA- subtip molecular luminal A, LuB- subtip molecular luminal B, TN- subtip molecular triplu negativ, HER- subtip molecular cu supraexpresia Her2/neu, [...] de la finalul fiecărei categorii semnaleză că ultima variabilă adăugată se continuă (ex. focare tumorale secundare). Culoarea gri din celulele corespunzătoare „Nr.pacienți” denotă caracterul multicentric al tumorilor, restul fiind multifocale. Cu roșu sunt evidențiate focarele tumorale considerate dominante.

În seria de 37 de tumori mamare maligne analizate, numărul de focare tumorale luate în considerare a variat de la 2 la 11. Mai mult de 54% din cazuri au avut sub 5 focare tumorale.

Marimea tumorii index a variat de la 10mm la 3.8 cm, cu o medie de 2.4 mm, mai mică decât diametrul mediu măsurat pentru toate tumorile incluse în studiu (cu o valoare de de 2.8cm). Acest lucru poate fi explicat prin faptul că tumorile multifocale au șanse mai mari să fie descoperite clinic sau în urma unei mamografii.

Diametrul leziunilor secundare a variat foarte mult, pentru tumorile cu 2-4 focare tumorale, acestea având un diametru apropiat de cel al tumorii index, dar pentru majoritatea cazurilor diametrul focarelor tumorale a fost sub 5 mm. Au existat și cazuri în care tumora index era greu de stabilit, din cauza dimensiunilor apropiate dintre focarele tumorale. Pentru aceste cazuri stadializarea a fost problematică, deoarece criteriile AJCC recomandă măsurarea celui mai mare diametru tumoral, dar astfel o tumoră cu 2 focare tumorale de dimensiuni identice (cazul nr 8 din tabel) ar fi încadrată în categoria pT1, deși are o încărcătură tumorală dublă. Pentru aceste tipuri particulare, standardele internaționale nu au ajuns la un consens, deși există studii care sugerează sumarea diametrelor tumorale (lucru nerecomandat de AJCC) sau estimarea riscului și încadrarea ulterioară într-o altă clasă prognostică în funcție de „încărcătura tumorală” [28,29].

În studiul de față au fost evaluată „dominanța” tumorală, pe baza criteriilor combinate morfologice (dimensiune maximă, histotip), dar mai ales pe baza criteriilor imunohistochimice folosind 4 markeri. Acolo unde grade-ing-ul a coincis între tumora index și focarele tumorale, evaluarea s-a făcut în funcție de expresia IHC a Ki67, iar acolo unde tumorile aveau indici proliferativi asemănători, tumora cu rangul cel mai mare a fost cea care demonstra o pierdere cel puțin focală a receptorilor hormonali sau Her2.neu. În 6 cazuri (16.2% din total) tumora dominantă nu a coincis cu tumora index.

Gradul de diferențiere tumorală a variat între tumora index și focarele secundare în 9 cazuri, identificându-se focare tumorale cu un grad-ing mai mare decât tumora index în 8 cazuri, datele sugerând că nu tumora index este „dominantă” din perspectiva agresivității, acest lucru fiind coroborat și cu grad-ing-ului cazurilor care au prezentat metastaze limfoganglionare, în care grad-ing-ul era mai mare ca al tumorii index și identic cu cel puțin al unuia din focarele tumorale secundare identificate. Au fost notate și cazuri în care tumora primară era gradată ca slab

diferențiată, iar focarele tumorale și/sau metastazele (dacă existau) aveau un grad-ing moderat sau bine diferențiat, sugerând o diferențiere paradoxală.

În ceea ce privește histotipul tumoral, acesta a variat foarte puțin, majoritatea tumorilor index demonstrând o concordanță cu histotipul focarelor tumorale secundare, rezultatele obținute fiind asemănătoare cu cele ale lui Pekar G. și colab. [30,31]. În două cazuri în care tumora index a fost un carcinom NST au fost observate și focare tumorale cu fenotip de carcinom lobular invaziv, ambele cazuri prezentând metastaze ganglionare de carcinom NST.

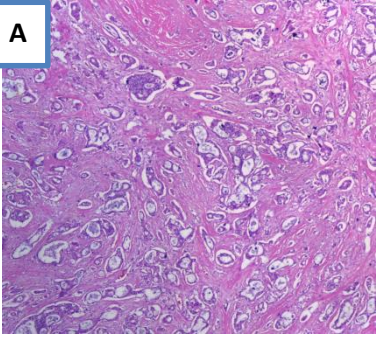
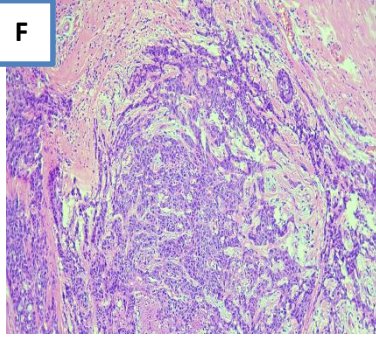
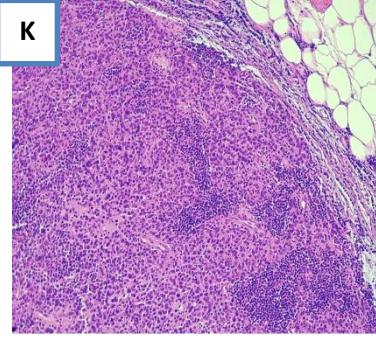
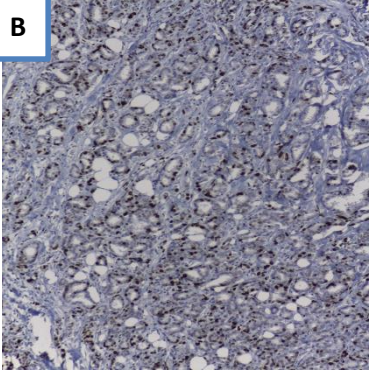
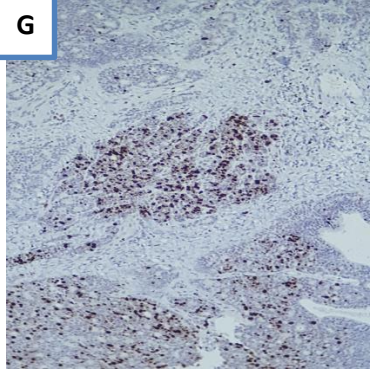
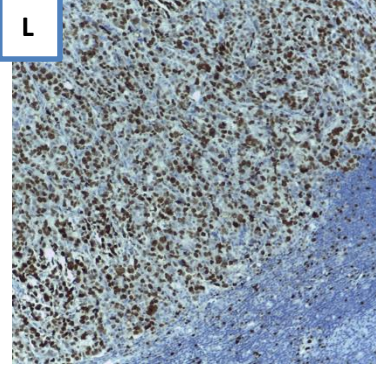
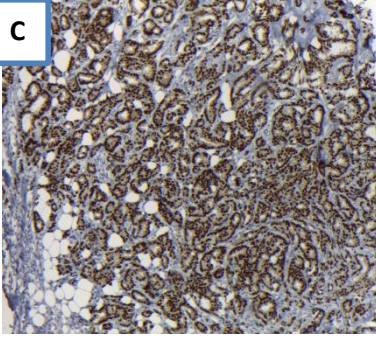
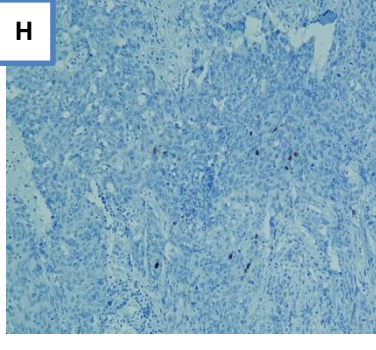
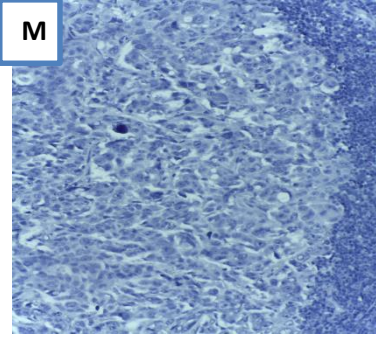
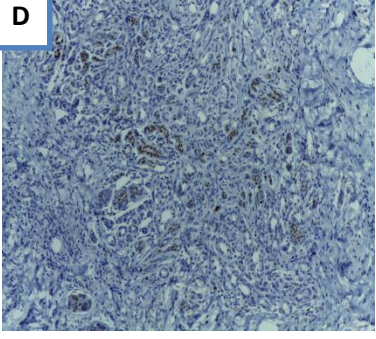
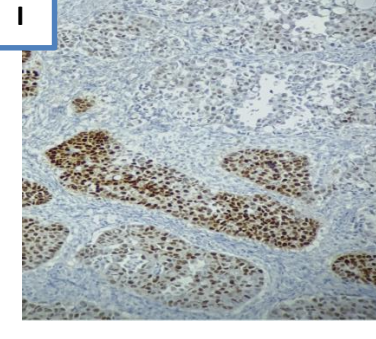
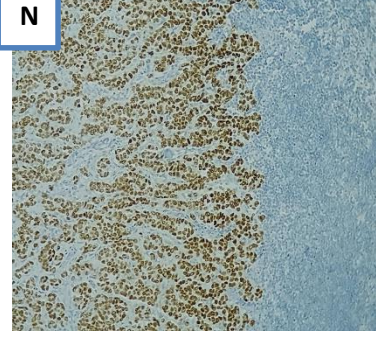
Încadrarea după criteriile moleculare surogat s-a făcut utilizând criteriile St. Gallen și a arătat o predominanță a cazurilor luminal A, 25 de cazuri fiind încadrate în această categorie. Dintre acestea în 5 cazuri s-au observat discordanțe imunohistochimice între tumora index și cel puțin un focar tumoral, care aveau caractere imunohistochimice diferite ce a impus încadrarea lor în categoria luminal B. Acest lucru s-a făcut deoarece focarele demonstrau heterogenitate extremă a expresiei ER sau PR, în sensul pierderii imunoreactivității acestor imunomarkeri. Dintre cele 5 cazuri, unul prezenta metastază limfoganglionară cu fenotip asemănător cu focarului tumoral secundar reîncadrat (luminal B). După această observație am ajuns la concluzia că focarul secundar era dominant imunohistochimic, având caractere histologice și imunohistochimice distincte.

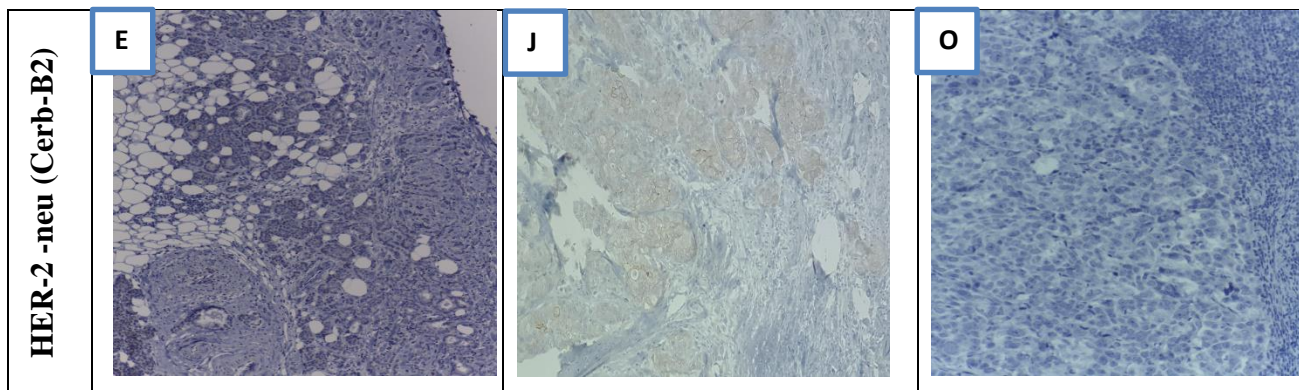
Felul în care acest lucru ar avea impact asupra tratamentului este necunoscut, deoarece rezultatul nu ar fi schimbat semnificativ opțiunile terapeutice. De asemenea, a fost observat un caz cu discordanță a subtipurilor moleculare privind tumora index- focare secundare (Index- luminal A, focar secundar- luminal B) ce prezenta metastază limfoganglionară cu fenotip triplu negativ.

Într-o manieră asemănătoare a fost identificat un caz în care tumora era concordantă cu focarele ei tumorale secundare, fiind triplu negativ, dar în care fenotipul metastazei era ușor diferit, exprimând slab imunomarkerii hormonal. Alte 4 cazuri de tumori mamare multiple triplu negative au fost identificate, dar fără discordanțe imunohistochimice între tumora index și/sau metastazele lor.

Din totalul cazurilor analizate, 7 tumori mamare multiple au fost încadrate în subtipul luminal B, dar nici unul nu a prezentat metastaze limfoganglionare. Un singur caz de tumora multiplă cu supraexpresie Her2/neu a fost identificată în lotul studiat, aceasta neavând discordanțe

între tumora index, focarele secundare și metastazele limfoganglionare. Câteva exemple elocvente sunt redată în microfotografiile sistematizate în tabelul următor (Tabel 2).

	Tumora Index	Focar tumoral secundar	Metastază
H&E			
Ki-67/Mib1			
PR			
ER			



Tabel 30. Microfotografiile sugestive pentru heterogenitatea imunohistochimică a unui caz de tumoră mamă malignă inclus în studiu. Un exemplu al unui caz de carcinom mamar multiplu multiplu NST (multifocal) care prezintă neconcordanțe morfologice (în gradare) și imunohistochimice între tumora index, focarul tumoral secundar și metastaza limfoganglionară. **Figurile A-E** (tumora index), Carcinom mamar NST G1 cu un index de proliferare Ki67 estimat sub 20%, PR+ în mai mult de 95% din celulele tumorale, cu expresie ER scăzută (aprox. 20%), și scor 0 pentru imunoexpresia Her2/neu. **Figurile F-J.** Același caz, focar tumoral secundar adițional de carcinom mamar NST, cu grad de diferențiere G3 și profil imunohistochimic discordat: index Ki67 crescut (aprox. 60%) cu prezența de hot-spots, expresie scăzută a PR (aprox. 3% din celulele tumorale) și pierderea focală a imunoexpresiei pentru ER (dar pozitivă în aprox 50% din celulele tumorale), Her2/neu scor 1 (negativ). **Figurile K-O:** Același caz, metastaza limfoganglionară cu invazie carcinomatoasă de carcinom NST G3, cu imunoexpresie crescută pentru Ki67 (aprox. 80%), PR negativ, ER pozitiv în aprox 95 % din celulele tumorale și Her2/neu negativ (scor 0).

Făcând abstracție de încadrarea tumorilor în subtipurile moleculare pe baza criteriilor surogat, am observat următoarele discordanțe imunohistochimice dintre focarele tumorale:

- statusul ER a fost discordant în 11 cazuri (29.8%), dintre care în 4 cazuri tumora index era negativă pentru acest marker, iar cel puțin un focar tumoral avea expresie pentru acest receptor; în alte 7 cazuri (18.9%), cel puțin un focar tumoral era negativ tumora index fiind pozitivă
- statusul PR a fost discordant în 12 cazuri (32.4%), dintre care în 5 cazuri tumora index era negativă pentru acest marker, iar cel puțin un focar tumoral avea expresie pentru acest receptor; în alte 8 cazuri, cel puțin un focar tumoral era negativă, tumora index fiind pozitivă.
- statusul Her2/neu nu a variat decât în ceea ce privește scorul. 2 cazuri au avut status Her2 negativ și cel puțin un alt focar tumoral cu scor 1 sau 2, neschimbând esențial încadrarea imunohistochimică. Un sigur caz de tumora multifocală Her2

pozitivă a fost observat în lotul studiat, iar nu s-au evidențiat heterogenități de expresiei al acestui marker între tumora index și focarele ei secundare.

- statusul Ki67 a variat cel mai mult în lotul studiat și a fost discordant în 17 cazuri (45.9%), dintre care în 5 cazuri tumora index era negativă pentru acest marker, iar cel puțin un focar tumoral avea expresie pentru acest receptor; în alte 8 cazuri, cel puțin un focar tumoral era negativă, tumora index fiind pozitivă.

După analiza histopatologică folosind algoritmul propus, bazat pe determinarea dominației tumorale combinată cu încadrarea într-un subtip molecular pe criterii IHC surogat, am constatat că în cel puțin 9 cazuri din cele 37 astfel analizate, datele suplimentare obținute ar fi schimbat cel puțin virtual decizia terapeutică privind alegerea schemei de tratament adecvate.

DISCUȚII ȘI CONSIDERAȚII FINALE

Introducerea de noi parametrii imunohistochemici cu rol prognostic și predictiv în studiul tumorilor mamare maligne este sigură și și-a dovedit utilitatea atât pentru diagnosticarea tumorală, dar mai ales pentru stratificarea corectă a pacienților care pot beneficia de anumiți agenți terapeutici.

În ultima perioadă termenul de „medicină de precizie” este tot mai frecvent vehiculat ca urmare a abordării inovative personalizate a tratamentului. Abordul diagnostic trebuie să țină pasul cu acest concept și ca urmare există dorința de integrare a metodelor noi de diagnostic în practica curentă. Imunohistochemia, folosită deja la scară largă, îndeplinește acest deziderat, cel puțin din perspectiva costurilor relativ reduse, comparativ cu metodele ce deservește genetica moleculară. Ca atare, se încearcă o taxonomie cât mai exactă a leziunilor mamare folosind tehnici integrate imunohistochemice, completate de tehnici moleculare, acolo unde cazul o impune.

În prima instanță, heterogenitatea tumorală intra și interlezională poate fi descurajantă, mai ales în contextual în care pentru unele aspecte nu există ghiduri de interpretare sau studii să valideze rezultatele. Acest aspect de repercutează în pleiada de informații uneori contradictorii pe marginea aceleași patologii.

Analiza statistică a arătat legături semnifitive între dimensiunea tumorii și gradul de diferențiere tumorală ($r_s=0.335$, $p<0.05$, $n=202$), date conforme cu multiple studii disponibile care promovează gradul histologic ca fiind unul dintre cei mai buni factori de prognostic pentru patologia mamară care se corelează cu diametrul tumoral. Totuși aceste date nu sunt suficiente pentru a include gradul tumoral în sistemul de stajalizare pTNM. Această decizie este promovată (încă) de AJCC pentru că pentru tumorile mici (pT1 și 2) nu există suficiente dovezi care să ateste ca diametrul tumoral se corelează cu sistemul de grading Nottingham [32]. Studiul de față a găsit suficiente dovezi care permit o asociere între grad-ing-ul tumorilor mamare și dimensiunea lor, inclusiv pentru cele sub 2 cm, rezultate comparabile cu raportări similare [33, 34, 35].

Din perspectiva neomogenității gradării tumorale, studiul a ridicat și problema discrepanței de grade-ing între tumora primară și metastazele ei. Această discordanță sugerează că mecanismele biologice ale procesului de propagare și metastazare sunt mai complexe decât se credea inițial și ar impune fie o adnotare a sistemului inițial de grad-ing, fie o gradare separată a focarelor discordante pentru o evaluare completă și corectă. Maniera în care această discordanță ar putea avea impact asupra tratamentului sau asupra prognosticului este greu de estimat. Această observație se pare ca nu ar avea relevanță prognostică din moment ce există studii care indică faptul că gradarea leziunilor metastatice are o valoare limitată la cancerul de sân avansat sau metastatic (stadiile III și VI), iar gradin-ul acestor leziuni nu este de așteptat să schimbe deciziile de tratament și, prin urmare, nu trebuie să fie luată în considerare în aceste cazuri.

În studiul doctoral am abordat metode validate pentru a stratifica cazurile în funcție de profilul imunohistochimic folosind markeri de proliferare bine-cunoscuți precum Ki67, dar am încercat și o abordare concomitentă din perspectiva unor markeri alternativi (Top2alpha), încă puțin cunoscuți sau utilizați în practica medicală. Indicii de proliferare bazați pe imunoexpresia celulelor pentru Ki67 și Topoizomeraza II α s-au corelat foarte puternic unul cu celălalt ($r = 0,904$, $p < 0,0001$), așa cum arată și alte studii similare [36].

Top2alpha a avut un model mai distinct, și mai puțin variabil de colorare nucleară, comparativ cu expresia Ki67, în acest sens Top2alpha ar putea reprezenta o alternativă sigură și fiabilă față de MIB-1 ca marker de proliferare. Utilitatea rezidă și în faptul ca imunoexpresia acestui marker se pare că se corelează și cu răspunsul bun la tratamentul cu doxorubicină, un

motiv în plus să fie mai des inclus în panellurile imunohistochimice adresate leziunilor glandei mamare. De asemenea, se pare că coamplificarea dintre Top2alpha și Her2/neu ar putea stratifica și mult unii pacienți (considerați cu risc mare de recurență) în vederea tratamentului cu antracicline [36].

De asemenea au fost folosiți alți markeri, cu valoare prognostică și predictivă, precum Her2/neu și imunomarkerii hormonali ER și PR. O serie de alți markeri au întregit tabloul fenotipic al tumorilor acolo pentru un diagnostic histopatologic precis. Ulterior a fost realizată încadrarea în subtipurile surogat molecular pe baza criteriilor imunohistochimice obținute, ținând cont de recomandările St Gallen.

Analiza statistică dintre gradul de expresie al ER și focalitatea leziunilor nu a demonstrat o asociere semnificativ statistică (Testul Chi pătrat; χ^2 (df 2) = 4,2; p = 0,122), dar imunoexpresia pozitivă a ER a fost corelată cu diametrul maxim tumoral de sub 2.3 cm care au cumulat 68,2% din cazuri. Expresia PR a fost puternic asociată cu vârsta, gradul tumorii, expresia ER, starea HER2 negativă. Analiza corelativă a imunoexpresiei receptorilor hormonali a demonstrat rolul predictiv al acestora și și-a dovedit utilitatea pentru stratificarea imunohistochimică a cazurilor, similar cu alte studii [37, 38, 39].

Față de studiile realizate de Badowska-Kozakiewicz și colab [38] și cele realizate de Stonelake și colab. [40], în cazul studiului doctoral nu s-au găsit asocieri semnificative între expresia PR și statusul pN, dimensiunea tumorii și invazia limfovaculară. Rezultatele discordante pot fi explicate prin faptul ca un număr mare de paciente au fost diagnosticate în stadii avansate de boală și cu tumori cu diametru de peste 2.8 cm, iar expresia receptorului progesteronic se pare că scade proporțional cu progresia bolii, după cum este sugerat de Branković-Magić și colab. [41] sau de Allemani și colab. [42].

Imunomarcajul p53 a fost evaluat în 78 de cazuri iar dintre acestea 26 de cazuri (33,3%) au prezentat un scor mai mare de 9 după cheia de interpretare a scorului Remmele – Stegner, fiind considerate pozitive. S-a constatat că există o relație între supraexpresia p53 și gradul de diferențiere, 24 dintre cele 26 de cazuri fiind observate în cadrul unor tumori G2 și G3, majoritatea cazurilor, unifocale sau multiple, făcând parte din subtipul molecular triplu negativ,

date similare fiind obținute și de studiul lui Munirah și colab [43] care a demonstrat un imunomarcaj pozitiv pentru p53 în 93,8% dintre tumorile triplu negative.

Tumorile mamare multiple sunt prototipul ideal pentru studiul heterogenității tumorale intra și interlezionale. Analiza acestui lot secundar s-a realizat cu scopul de a stabili impactul pe care l-ar putea reprezenta heterogenitatea histopatologică și imunohistochimică în încadrarea acestor tumorilor mamare în subtipuri moleculare surogat sau posibila reevaluare în vederea schimbării managementului terapeutic cu atât mai mult cu cât multifocalitatea nu este inclusă printre factorii de prognostic în ghidurile internaționale privind cancerul de sân.

Multifocalitatea în cancerul mamar este un fenomen frecvent, a cărui prevalență poate varia între 6-77% [44, 45]. Pentru a clasifica cancerul mamar, stadializarea TNM a fost considerată standardul de aur. În tumorile multiple categoria pT este însă evaluată ținând cont de diametrul tumoral cel mai mare, indiferent de numărul focarelor invazive, ceea ce poate duce la o subestimare a riscului de recurență și la o estimare greșită a supraviețuirii globale. Caracterul multiplu pe care îl poate avea o tumoră este un parametru acceptat de sistemul TNM și AJCC și este menționat prin utilizarea sufixului (m) [5].

Recomandările în vigoare postulează că dacă se detectează mai mult de un focar invaziv, focarele secundare nu vor fi incluse în estimarea mărimii tumorii, iar volumul total a tumorii nu ar avea influență asupra protocolului care este selectat pentru tratament [46], deși multe studii anterioare au demonstrat că tumorile mamare multiple au un risc semnificativ mai mare de a metastaza, de a recidiva și au un prognostic mult mai sumbru comparativ cu tumorile unifocale [29, 47-49]. Date asemănătoare au fost obținute și în studiul de față, deși evaluarea prognostică s-a făcut pe criterii morfologice și nu a fost urmărită evoluția pacientelor după diagnostic. 18 din cele 37 de cazuri au prezentat metastaze în momentul diagnosticului, iar prezența lor se pare ca este influențată de numărul de focare tumorale invazive, majoritatea pacientelor cu boală metastatică având mai mult de 4 focare tumorale (incluzând tumora index).

O problemă ridicată de studiul doctoral, atunci când au fost evaluate tumorile mamare multiple, a fost stadializarea corectă a unor tumori sincrone multiple cu același diametru tumoral. Regulile rigide ale stadializării carcinoamelor mamare impuse de AJCC și OMS fac ca pentru respectivele cazuri să fie luat în considerare diametrul unui singur focar tumor. În studiu am

propus o evaluare alternativă care să țină cont de „rangul tumoral” și anume de proliferarea tumorală care se dovedește cea mai agresivă.

Caracterizarea imunohistochimică a tumorilor multifocale a demonstrat prezența heterogenității de expresie a receptorilor hormonal și a markerilor de proliferare, ceea ce a făcut ca pentru 7 cazuri focarele tumorale secundare să fie reclasificate. Acest lucru are, cel puțin virtual, impact terapeutic, în sensul schimbării schemei de tratament. Mai mult decât atât evaluarea imunohistochimică a metastazelor a arătat ca există discordanțe imunohistochimice și la acest nivel între tumora primară, focarele secundare și metastazele lor.

În studiul carcinoamelor mamare multiple ipsilaterale, focarele tumorale au avut discordanță histopatologică între ele în privința histotipului în 2 din cele 37 (5,4%) de cazuri; discordanța gradului de diferențiere tumorală a fost observată în 14 cazuri (37,8%); fenotipul tumoral a fost diferit între focarele tumorale în 8 cazuri (21.6%) iar 11 din cele 37 de cazuri au prezentat discordanțe între cel puțin un parametru investigat (histotip, grad de diferențiere, subtip molecular, fenotipul metastazei).

Sunt foarte puține studii care tratează într-o manieră asemănătoare caracterizarea heterogenității tumorale. Studiile lui Garimella și colab. [50] nu au observat sau raportat diferențe de expresie a statusului receptorului estrogenic într-o serie de cazuri ce a cuprins 18 piese de mastectomie cu tumori mamare multiple, dar într-un mod asemănător cu prezentul studiu doctoral a raportat ca două cazuri au expresie imunohistochimică diferită a PR.

Buggi și colab. [51] a raportat mismatch al expresiei ER la 5 pacienți (4.4%) în același timp constatând ca statusul PR varia la 18 pacienți (15.9%), raportând discordanțe de grad de diferențiere la 21 pacienți (18.6%), diferențe de imunoexpresie a Ki-67 la 17 pacienți (15%), și discordanțe IHC ale scorului pentru Her2 la 11 pacienți (9.7%). Autorii au concluzionat ca aceste diferențe ar fi influențat terapia adjuvantă primită de pacienți în cazul în care focarele tumorale suplimentare ar fi fost evaluate înainte de luarea deciziilor terapeutice.

Într-o serie de 91 de cazuri de carcinoame mamare multiple, Boros și colab. [21] au observat discordanțe imunohistochimice în 12% dintre focarele tumorale, iar discordanțe privind gradarea tumorală în 10% din cazurile analizate.

Choi și colab. [52] au raportat diferențe semnificative de expresie a ER în 2 cazuri din 65 de pacienți cu tumori mamare multiple (3%). Autorii au găsit de asemenea diferențe de imunoexpresie a PR la 7 pacienți (11%); discordanțe ale expresie Her2 la 4 pacienți (6%) și diferențe de încadrare moleculară la 5 pacienți (8%). Datele studiului de față privind heterogenitatea ER, PR, a clasificării subtipurii molecular pe baza criteriilor surogat, sunt congruente cu datele literaturii de specialitate. Cu toate acestea, în studiul doctoral am observat heterogenitate fenotipică de expresie a ER și PR există și la pacienții care aveau focare tumorale identice din punct de vedere al clasificării moleculare, în privința tipului histologic și al grad-ului tumoral. Această constatare indică faptul că subclasificarea moleculară pe baza criteriilor surogat IHC, poate fi o limitare a analizei heterogenității.

Desmedt și colab. [53] a dus un astfel de studiu mai departe, trecând de bariera imunohistochimică, încercând să coroboreze datele obținute cu teste de genetică moleculară. Autorul a observat o heterogenitate genetică extremă a diverselor focare tumorale analizând o serie de doar 5 cazuri, acest lucru sugerează că o abordare combinată cu tehnici genetice, deși costisitoare, este superioară.

Consecințele heterogenității intertumorale pentru luarea deciziilor terapeutice și, astfel, estimarea prognosticului și supraviețuirii pacienților sunt rareori abordate în literatură. Câteva studii au ajuns la concluzia că este rațional să urmărim abordarea actuală de evaluare a parametrilor morfologici prognostici și predictivi luând în calcul un singur focar tumoral. Această concluzie se bazează pe observațiile conform cărora marea majoritate a carcinoamelor multifocale/multicentrice sunt omogene histopatologic și imunohistochimic în ceea ce privește fenotipul tumoral și că evaluarea a mai mult de 1 focar tumoral ar putea avea consecințe terapeutice doar într-o minoritate de cancere fenotipic heterogene, multifocale. O altă opțiune este de a analiza cât mai multe foare tumorale posibil, dar acest lucru poate fi consumator de timp și foarte costisitor.

Conform rezultatelor obținute, sistemul actual de stadializare al tumorilor mamare multiple este departe de a reprezintă un *gold standard*, mai ales în era medicinei de precizie. În acest caz sistemul pTNM ar trebuie fie să includă un sistem de scoring pe baza unor criterii imunohistochimice cu rol prognostic-predictiv pentru a selecta focarul tumoral cel mai agresiv sau să ia în considerare volumul tumoral total (*tumor burden*). Momentan și cel puțin din punct

de vedere teoretic, evaluarea imunohistochimică care să determine focarul dominant, cel mai agresiv, pare a fi o metodă oportună, însă mai greu de aplicat în practica medicală curentă.

CONCLUZII

Algoritmul propriu pentru determinarea „dominanței” tumorale a avut la bază criteriilor combinate morfologice (dimensiune maximă, histotip), dar a inclus criterii imunohistochimice folosind 4 markeri. Acolo unde grade-ing-ul a coincis între tumora index și focarele tumorale, evaluarea s-a făcut în funcție de expresia IHC a Ki67, iar acolo unde tumorile aveau indici proliferativi asemănători, tumora cu rangul cel mai mare a fost cea care demonstrează o pierdere cel puțin focală a receptorilor hormonal sau Her2/neu. În 6 cazuri de tumoră mamară malignă, tumora dominantă nu a coincis cu tumora index. Heterogenitatea imunohistochimică a fost documentată în 11 cazuri.

Rezultatele studiului doctoral pun în discuție practica curentă de caracterizare a mai mult de 1 focar tumoral numai dacă focarele suplimentare diferă în funcție de histotip și / sau gradul de diferențiere tumorală, deoarece acest lucru este valabil doar pentru o mică proporție din tumorile multiple fenotipic heterogene.

Caracterizarea imunohistochimică a până la 11 focare tumorale sincrone invazive (ca în studiul actual) poate fi suficientă pentru identificarea cazurilor cu risc mare de metastazare, recidivă și poate stratifica mai eficient prognosticul bolii. Mai mult, caracterizarea concomitentă a metastazelor poate furniza informații suplimentare valoroase la acești pacienți.

Observând frecvența mult mai mare a discordanțelor imunohistochimice ale tumorilor mamare multiple, este imperios necesară efectuarea de studii suplimentare care să includă pacienți cu o astfel de patologie pentru a ajunge la un consens privind nomenclatura, stadializarea și nu în ultimul rând stratificarea riscului de recurență.

Raportarea suplimentară a heterogenității intra și interlezionale a cancerului mamar va conduce, cel mai probabil la o perfecționare a taxonomiei leziunilor mamare maligne cu îmbunătățirea consecutivă a răspunsului terapeutic.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013. disponibil la: <http://globocan.iarc.fr>
2. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*. 2013 Mar 1;132(5):1133-45. doi: 10.1002/ijc.27711. Epub 2012
3. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, EUCAN quick investigation, Estimated incidence, mortality & prevalence for breast cancer in 2012, disponibil la <http://eco.iarc.fr/eucan/CancerOne.aspx?Cancer=46&Gender=2#ref>
4. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res*. 2014 Jun 1;74(11):2913-21. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0155
5. Lakhani S, Ellis I, Schnitt S, et al. *WHO Classification of Tumours of the Breast* 4th edition. 2012; Lyon: IARC Press; pp 8-11, 13-35, 39-75, 95-108, 135, 141-147, 156, 161-66, 171-190. ISBN-13 9789283224334
6. Sinn H-P, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care*. 2013; 8(2):149-154. doi:10.1159/000350774.
7. Soerjomataram I, Louwman MWJ, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JWW. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2008; 107(3):309-330. doi:10.1007/s10549-007-9556-1.
8. Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, et al. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011; 29:4273–4278.
9. Vos CB, Cleton-Jansen AM, Berx G, de Leeuw WJ, ter Haar NT, van Roy F, Cornelisse CJ, Peterse JL, van de Vijver MJ. E-cadherin inactivation in lobular carcinoma in situ of

- the breast: an early event in tumorigenesis. *Br J Cancer*. 1997; 76:1131–3. doi: 10.1038/bjc.1997.523.
10. Rakha EA, Patel A, Powe DG, Benhasouna A, Green AR, Lambros MB, Reis-Filho JS, Ellis IO. Clinical and biological significance of E-cadherin protein expression in invasive lobular carcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol*. 2010; 34:1472–9. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181f01916
 11. Martelotto LG, Ng C KY, Piscuoglio S, Weigelt B, Reis-Filho JS. Breast cancer intra-tumor heterogeneity, *Breast Cancer Research* 2014; 16:R48 pp2-11
 12. Marusyk A, Almendro V, Polyak K: Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* 2012; 12:323–334
 13. Pestrin M, Bessi S, Galardi F, Truglia M, Biggeri A, Biagioni C, Cappadona S, Biganzoli L, Giannini A, Di Leo A: Correlation of HER2 status between primary tumors and corresponding circulating tumor cells in advanced breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 118:523–530
 14. **Dumitru A**, Georgescu TA, Tampa M, Georgescu SR, Matei C, Oancea R, Lăzăroiu A, Costache M, Sajin M. Insight into the histopathological and immunohistochemical heterogeneity of multiple breast carcinomas. *Medicine in Evolution*, Volume XXIII, Nr. 2, 2017; Timișoara, Romania, pp. 118-128, ISSN 2065-376X
 15. **Dumitru A**, Sajin M, Costache M, Georgescu SR, Matei C, Georgescu TA, Sârbu MI, Lăzăroiu AM, Luchian B, Tampa M. Multicentric unilateral invasive ductal and lobular breast carcinoma - A case report and review of literature. *Medicine in Evolution Volume XXI*, No. 3, 2015; pp 439-45, Timișoara, Romania, ISSN 2065-376X
 16. Seol H, Lee HJ, Choi Y, Lee HE, Kim YJ, Kim JH, Kang E, Kim S-W, Park SY: Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance. *Mod Pathol* 2012; 25:938–948.
 17. Cottu PH, Asselah J, Lae M, Pierga JY, Diéras V, Mignot L, Sigal-Zafrani B, Vincent-Salomon A: Intratumoral heterogeneity of HER2/neu expression and its consequences for the management of advanced breast cancer. *Ann Oncol* 2008; 19:595–597.
 18. Teer JK. An improved understanding of cancer genomics through massively parallel sequencing. *Translational cancer research*. 2014; 3(3):243-259. doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2014.05.05.

19. Martelotto LG, Ng C KY, Piscuoglio S, Weigelt B, Reis-Filho JS. Breast cancer intra-tumor heterogeneity, *Breast Cancer Research* 2014; 16:R48 pp2-11.
20. Buggi F, Curcio A, Falcini F, Folli S. Multicentric/Multifocal Breast Cancer: Overview, Biology, and Therapy in H. Schatten (ed.), *Cell and Molecular Biology of Breast Cancer*, Springer Science+Business Media New York 2013; cap 2, pp 29-42
21. Boros M, Marian C, Moldovan C, Stolnicu S. Morphological heterogeneity of the simultaneous ipsilateral invasive tumor foci in breast carcinoma: a retrospective study of 418 cases of carcinomas. *Pathology-Research and Practice* 2008; (10), 604-609
22. Wu JM, Fackler MJ, Halushka MK, et al. Heterogeneity of Breast Cancer Metastases: Comparison of Therapeutic Target Expression and Promoter Methylation Between Primary Tumors and Their Multifocal Metastases. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008; 14(7):1938-1946. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4082
23. **Dumitru A**, Georgescu TA, Tampa M, Georgescu SR, Matei C, Oancea R, Lăzăroiu A, Costache M, Sajin M. Insight into the histopathological and immunohistochemical heterogeneity of multiple breast carcinomas. *Medicine in Evolution*, Volume XXIII, Nr. 2, 2017; Timișoara, Romania, pp. 118-128, ISSN 2065-376X
24. Katz A, Strom E, Buchholtz T, et al. The influence of pathologic tumor characteristics on loco regional recurrence rates following mastectomy. *Int J Paediatr Oncol Biol Phys* 2001; 50:735-42
25. Gnant M, Harbeck N, Thomssen C. St. Gallen/Vienna 2017: A Brief Summary of the Consensus Discussion about Escalation and De-Escalation of Primary Breast Cancer Treatment Breast Care 2017;12:102-107, disponibil la <https://doi.org/10.1159/000475698>
26. Edge SB, Compton CC. The American joint committee on cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010; 17: 1471-4.
27. Lester SC, Bose S, Chen YY, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast (College of American Pathologists). *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133:1515-38
28. Kelemen G, Farkas V, Debrah J, Ormandi K, Voros A, Kaizer L, Varga Z, Lazar G, Kahan Z. The relationship of multifocality and tumor burden with various tumor

- characteristics and survival in early breast cancer, *Neoplasma*. 2012;59 (5):566-73. doi: 10.4149/neo_2012_073
29. Coombs N J, Boyages J. Multifocal and Multicentric Breast Cancer: Does Each Focus Matter? *Journal of Clinical. Oncology*, 2005 23:30, 7497-7502
30. Gyula Pekar, Hanna Davies, Agnes P Lukacs, Lars Forsberg, Dan Hellberg, Jan Dumanski, Tibor Tot, Biobanking multifocal breast carcinomas: sample adequacy with regard to histology and DNA content, *Histopathology*, 2016, 68, 3, 411
31. Pekar G, Gere M. Tarjan M, Hellberg D, Tot T. Molecular phenotype of the foci in multifocal invasive breast carcinomas: Intertumoral heterogeneity is related to shorter survival and may influence the choice of therapy. *Cancer*. Volume 120, Issue 1, 1 January 2014, pp.26–34.
32. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, Borgen PI, Clark G, Edge SB, Hayes DF, Hughes LL, Hutter RV, Morrow M, Page DL, Recht A, Theriault RL, Thor A, Weaver DL, Wieand HS, Greene FL. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20:3628–3636. doi: 10.1200/JCO.2002.02.026
33. Frkovic-Grazio S and Bracko M: Long term prognostic value of Nottingham histological grade and its components in early (pT1N0M0) breast carcinoma. *J Clin Pathol* 2002; 55: 88-92
34. Saimura M, Fukutomi T, Tsuda H, Sato H, Miyamoto K, Akashi-Tanaka S, Nanasawa T. Prognosis of a series of 763 consecutive node-negative invasive breast cancer patients without adjuvant therapy: analysis of clinicopathological prognostic factor. *J Surg Oncol*. 1999;71:101–105
35. Hanrahan EO, Valero V, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN. Prognosis and management of patients with node-negative invasive breast carcinoma that is 1 cm or smaller in size (stage 1; T1a,bN0M0): a review of the literature. *J Clin Oncol*. 2006;24:2113–2122. doi:
36. Lynch B J, Guinee D G, Holden J A. Human DNA topoisomerase II-alpha: a new marker of cell proliferation in invasive breast cancer. *Hum Pathol*. 1997 Oct;28(10):1180-8
37. Tanner M, Isola J, Wiklund T, Erikstein B, Kellokumpu-Lehtinen P, Malmström P, Wilking N, Nilsson J, Bergh J. Topoisomerase IIalpha gene amplification predicts

- favorable treatment response to tailored and dose-escalated anthracycline-based adjuvant chemotherapy in HER-2/neu-amplified breast cancer: Scandinavian Breast Group Trial 9401. *J Clin Oncol*. 2006 Jun 1;24(16): 2428-36. Epub 2006 May 8.
38. Badowska-Kozakiewicz AM, Patera J, Sobol M, Przybylski J. The role of oestrogen and progesterone receptors in breast cancer – immunohistochemical evaluation of oestrogen and progesterone receptor expression in invasive breast cancer in women. *Contemporary Oncology*. 2015;19(3):220-225. doi:10.5114/wo.2015.51826.
39. Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Morales AR. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *Am J Clin Pathol*. 2005;123:21–7
40. Stonelake PS, Baker PG, Gillespie WM, et al. Steroid receptor, pS2 and cathepsin D in early clinically node-negative breast cancer. *Eur J Cancer*. 1994;30A:5–11
41. Branković-Magić M, Janković R, Nesković-Konstantinović Z, Nikolić-Vukosavljević D. Progesterone receptor status of breast cancer metastases. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011;128:55–60.
42. Allemani C, Sant M, Berrino F, et al. Prognostic value of morphology and hormone receptor status in breast cancer – a population-based study. *Br J Cancer*. 2004;91:1263–8
43. Munirah MA, Siti-Aishah MA, Reena MZ, Sharifah NA, et al. Identification of different subtypes of breast cancer using tissue microarray. *RJME* 2011, 52(2):669–677
44. Katz A, Strom EA, Buchholz TA, Theriault R, Singletary SE, McNeese MD. The influence of pathologic tumor characteristics on loco regional recurrence rates following mastectomy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 50: 735-742.
45. Yerushalmi R, Kennecke H, Woods R, Olivotto IA, Speers C, Gelmon KA. Does multicentric/multifocal breast cancer differ from unifocal breast cancer? An analysis of survival and contralateral breast cancer incidence. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 117: 365-370
46. Joergensen LE, Gunnarsdottir KA, Lanng C, Moeller S, Rasmussen BB. Multifocality as a prognostic factor in breast cancer patients registered in Danish Breast Cancer Cooperative Group (DBCG) 1996-2001. *Breast* 2008; 17: 587- 591.

47. Andea AA, Wallis T, Newman LA, Bouwman D, Dey J, Visscher DW. Pathologic analysis of tumor size and lymph node status in multifocal/multicentric breast carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 1383-1390.
48. Fish EB, Chapman JA, Link MA. Assessment of tumor size for multifocal primary breast cancer. *Ann Surg Oncol* 1998; 5: 442- 446
49. Egan RL. Multicentric breast carcinomas: Clinical-radiographic-pathologic whole organ studies and 10-year survival. *Cancer* 1982; 49: 1123-30
50. Garimella V, Long ED, O'Kane SL, et al. Oestrogen and progesterone status of individual foci in multifocal invasive ductal cancer. *Acta Oncol.* 2007;46:204–207.
51. Buggi F, Folli S, Curcio A, et al. Multicentric/multifocal breast cancer with a single histotype: is the biological characterization of all individual foci justified? *Ann Oncol.* 2012;23:2042–2046
52. Choi Y, Kim EJ, Seol H, et al. The hormone receptor, human epidermal growth factor receptor 2, and molecular subtype status of individual tumor foci in multifocal/multicentric invasive ductal carcinoma of breast. *Hum Pathol.* 2012;43:48–55.
53. Desmedt C, Nik-Zainal S, Fumagalli D, et al. Characterization of different foci of multifocal breast cancer using genomic, transcriptomic and epigenomic data [abstract]. Abstracts: Thirty-Fifth Annual CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium; December 4–8, 2012; San Antonio, TX. *Cancer Res.* 2012;72(24 suppl). Abstract nr S60–2.

LISTA SELECTIVĂ A LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE ELABORATE ȘI PUBLICATE PE TEMA TEZEI DOCTORALE¹

1. **Dumitru A**, Sajin M, Costache M, Georgescu SR, Matei C, Georgescu TA, Sârbu MI, Lăzăroiu AM, Luchian B, Tampa M. Multicentric unilateral invasive ductal and lobular breast carcinoma - A case report and review of literature. *Medicine in Evolution Volume XXI*, No. 3, 2015; pp 439-45, Timișoara, Romania, ISSN 2065-376X. http://medicineinevolution.umft.ro/2015/med_in_evol_3_2015.pdf
2. **Dumitru A**, Georgescu TA, Tampa M, Georgescu SR, Matei C, Oancea R, Lăzăroiu A, Costache M, Sajin M. Insight into the histopathological and immunohistochemical heterogeneity of multiple breast carcinomas. *Medicine in Evolution*, Volume XXIII, Nr. 2, 2017; Timișoara, Romania, pp. 118-128, ISSN 2065-376X. http://medicineinevolution.umft.ro/2017/rev_2_2017.pdf
3. NO Zărnescu, A Ilieșiu, A Procop, M Tampa, C Matei, M Sajin, M Costache, **A Dumitru**, AM Lăzăroiu. A Challenging Case of Primary Breast Hodgkin's lymphoma. *MAEDICA – a Journal of Clinical Medicine*, 2015; 10(1): 44-47, ISSN: 1841-9038. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4496765/>
4. **A Dumitru**, A Procop, A Ilieșiu, M Tampa, L Mitrache, M Costache, M Sajin, A Lăzăroiu, M Cîrstoiu. Mucinous breast cancer: A review study of 5 year experience from a hospital-based series of cases. *MAEDICA – a Journal of Clinical Medicine*, 2015; 10(1): 14-18, ISSN: 1841-9038. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4496759/>
5. A. Birceanu Corobea, **A. Dumitru**, M. Sajin, R. Poenaru, A. Puscasu, Dragos Chirita, A. Evsei. Diffuse Large B Cell Lymphoma in a Male Breast. A Rare Case Report. *Chirurgia*, 112 (4), 2017, pp 477-481. Online ISSN: 1842 – 368X, ISSN: 1221-9118. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28862126>

¹ Lista completă a publicațiilor științifice elaborate de autor poate fi consultată în Anexa 1, atașată tezei de doctorat „Aspecte morfologice și corelații imunohistochimice privind heterogenitatea leziunilor mamare maligne”, Editura Carol Davila, București, 2017, pp. 229-242.