

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI  
ȘCOALA DOCTORALĂ  
DOMENIUL MEDICINĂ

*Corelații morfopatologice, imunohistochimice, moleculare, fiziologice  
și clinice în cancerul mamar*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:  
PROF. UNIV. DR. MARIA SAJIN

Student-doctorand:  
DR. OANA-CRISTINA CIORNENCHI (VOINEA)

ANUL 2020

## CUPRINS

Introducere .....	Pag 9
<b>I. Partea generală .....</b>	<b>Pag 13</b>
<b>1. Glanda mamară – considerații histologice și fiziologice ale ontogenezei glandei mamare relevante în patologia tumorală a sânului .....</b>	<b>Pag14</b>
<b>2. Cancerul mamar – data epidemiologice și factori de risc .....</b>	<b>Pag 37</b>
<b>3. Criterii histologice și IHC de diagnosticare, clasificare și gradare a cancerului mamar. Circumstanțe particulare. Factori de prognostic si predicție .....</b>	<b>Pag 51</b>
<b>II. Partea Specială – Contribuții personale .....</b>	<b>Pag 73</b>
<b>4. Ipoteze de lucru și obiective generale .....</b>	<b>Pag 74</b>
<b>5. Metodologia generală a cercetării .....</b>	<b>Pag 77</b>
5.1. Criterii de selecție a pacienților incluși în studiu .....	Pag 77
5.2. Tehnica de laborator .....	Pag 81
5.2.1.1. Descrierea și orientarea pieselor chirurgicale .....	Pag 83
5.2.1.2. Prelucrarea și colorarea standard a preparatelor histopatologice .....	Pag 90
5.3. Protocolul de evaluare a preparatelor microscopice în colorație clasică și imunohistochimică .....	Pag 92
5.4. Elaborarea diagnosticului histopatologic final în conformitate cu prevederile OMS și gradării TNM și Elston-Ellis, utilizând inclusiv tehnici complementare imunohistochimice .....	Pag 99
5.5. Înregistrarea și analiza statistică a datelor .....	Pag 106
<b>6. Studiul 1. Caracteristici clinico-patologice în patologia tumorală mamară de tip benign și malign .....</b>	<b>Pag 108</b>
6.1. Descrierea numerică a lotului .....	Pag 108
6.3. Vârsta pacienților incluși în studiu .....	Pag 113
6.4. Distribuția pe sexe, mediul de proveniență a pacienților analizați .....	Pag 115
6.5. Caracteristicile TNM ale tumorilor examinate .....	Pag 118
6.6. Boala metastatică a pacienților examinați .....	Pag 126
6.7. Numărul zilelor de internare în primul lot .....	Pag 131
<b>7. Studiul 2. Caracteristici clinico-patologice în subtipurile surogat moleculare ale carcinomului mamar .....</b>	<b>Pag 137</b>
7.2. Leziunile coexistente în carcinoamele mamare .....	Pag 144

7.3. Caracteristici particulare ale lotului studiat .....	Pag 148
7.3.1. Integritatea tegumentului .....	Pag 148
7.3.2. Caracteristici histopatologice intrinseci ale carcinoamelor în funcție de subtipul molecular intrinsec .....	Pag 150
<b>8. Studiul 3. Caracteristici clinico-patologice în carcinomul mamar bilateral.....</b>	<b>Pag 162</b>
<b>9. Studiul 4. Caracteristici clinico-patologice în tumorile mamare ale bărbaților .....</b>	<b>Pag 173</b>
<b>10. Studiul 5. Caracteristici moleculare în carcinomul mamar - expresia PDL1, CD8, MSH1 și MSH2 .....</b>	<b>Pag 181</b>
10.1. Criterii de selecție a pacienților. Lot 5. ....	<b>Pag 181</b>
10.2. Testarea IHC a expresiei PDL1, CD8, MLH1 și MSH2 .....	Pag 185
10.3. Expresia MLH1 și MSH2 în eșantionul selectat .....	Pag 195
10.4. Utilizarea PDL1 și CD8 ca valori reprezentative într-un scor prognostic .....	Pag 197
<b>11. Discuții .....</b>	<b>Pag 202</b>
<b>12. Concluzii. Principalele rezultate obținute – contribuții personale .....</b>	<b>Pag 217</b>
<b>Bibliografie selectivă .....</b>	<b>Pag 222</b>

## Lista cu abrevieri și simboluri

ADH – hiperplazie ductală atipică  
AFIP – Armed Forces Institute of Pathology  
AJCC – American Joint Committee on Cancer  
ALH – hiperplazie lobulară atipică  
APP – Antecedente personale patologice  
AR – Androgen Receptor  
CAP – Colegiul American de Patologie  
CROMO - Cromogranina  
DCIS- carcinom ductal in situ  
ER – estrogen receptor  
HE – hematoxină-eozină  
HPF – high power field, 40X  
IHC – imunohistochimie  
IMC – indicele de masă corporală  
IPNT - invazia perineurală tumorală  
IRM – imagistica prin rezonanță magnetică  
LCIS - carcinom lobular in situ  
NGS – secvențiere de generație următoare (Next Generation Sequencing)  
NOS – Not otherwise specified  
PCT - Polichimioterapie  
PR – progesteron receptor  
SYN – sinaptofizina  
TILs – limfocitele infiltrative in tumora (tumor infiltrating limfocytes)  
TNM – tumora, noduli (adenopatici), metastaze  
SUUB – Spitalul Universitar de Urgență București

## Introducere

Cancerul mamar reprezintă o entitate patologică de permanentă actualitate în cercetarea medicală. Încă de la prima lui menționare istorică întâlnită într-un papyrus datat în 1600 î.Hr. (van Middendorp JJ, 2010), până în prezent, cancerul mamar ocupă un loc fruntaș atât es frecvența cât și în interesul cunoașterii medicale, descifrarea biologiei sale putând furniza și soluții terapeutice care să îi contracareze evoluția, aspect ce a generat interesul spre studiul doctoral intitulat

**CORELAȚII MORFOPATOLOGICE, IMUNOHISTOCHIMICE, MOLECULARE, FIZIOLOGICE ȘI CLINICE ÎN CANCERUL MAMAR** într-o perioadă în care noile terapii moleculare țintite reușesc să revoluționeze un important contingent al patologiilor oncologice, cancerul mamar fiind, la data demarării studiului, vitregit de aplicarea celor mai recente inovații terapeutice.

Lucrarea de față a fost catalizată de interesul asupra aspectelor oncogenetice, epidemiologice și prognostice, axându-se pe zonele unde în momentul prezent există un relativ vid de cunoaștere: carcinoamele mamare ale bărbaților și carcinoamele mamare bilaterale.

Un alt aspect importat al tezei îl constituie prognosticul acestora din perspectiva expresiei imunohistochimice a modulatorilor răspunsului imun al gazdei față de tumoră, respectiv PDL1, precum și a modificărilor genetice care reflectă instabilitatea microsatelitară, testând modul de pozitivare al MLH1, respectiv MSH2. Pentru toate aspectele dezvoltate pe parcursul tezei am ținut cont de caracteristicile histologice, imunohistochimice, precum și clinice, alocând spații distincte comorbidităților pacientelor înregistrate în studiu.

Teza de față este structurată în două părți: prima parte încearcă să facă un extemporaneu al cunoașterii din momentul prezent, având capitole dedicate anatomiei și histologiei glandei mamare în dinamică evolutivă, strâns corelate cu evoluția tehnicilor imagistice de diagnostic, precum și a abordărilor chirurgicale, iar cea de a doua, partea speciala, este dedicată unei secvențe descriptive ce urmărește leziunile mamare înregistrate în SUUB în decursul a 3 ani, iar o alta cu rol analitic, de descifrare a semnificației prognostice a expresiei tumorale pozitive pentru anume markeri imunohistochimici

Întrucât prognosticul reprezintă un cumul de șanse, în parte apreciat prin cunoașterea medicală actuală, concluzionăm că demersul nostru este o încurajare pentru studii ulterioare derulate pe eșantioane mai generoase, dar și un îndemn spre a conștientiza și a ne bucura de fiecare zi de sănătate!

## I. Partea generală

Glanda mamară, definitorie pentru clasa vertebratelor mamifere, este singurul organ capabil să sintetizeze și secrete lapte matern pentru dezvoltarea și apărarea imunologică pasivă optimă a nou-născutului (Medina, 1996) . Ciclul evolutiv al glandei mamare presupune modificări radicale în compoziție, arhitectură, histologie și funcționalitate, ceea ce denotă o plasticitate celulară remarcabilă, responsabilă în parte însă și de carcinogeneză la acest nivel (Javed, 2013), malignitățile glandei mamare ocupând, la nivel mondial, primul loc în patologia malignă a sexului feminin (Ferlay, 2012).

Magnitudinea importanței cunoașterii anatomiei glandei mamare este ușor de asimilat când privim glanda mamară din trei perspective diferite: funcțională, estetică și patologică.

În context socio-cultural, glanda mamara, percepută ca simbol al fertilității și implicit al feminității a fost reprezentată extensiv în variate ramuri ale artelor plastice. Evoluția abordării chirurgicale, în cazurile incipiente de cancer al sânului, a permis reconstrucția glandei mamare și implicit revoluționarea impactului cosmetic, definind **chirurgia onco-plastică**. Acest concept juxtapune chirurgia oncologică chirurgiei plastice în scopul optimizării rezultatului oncologic și cosmetic al pacientelor care își doresc preservarea sânului (Warrier, 2016).

Asocierea terapiei neoadjuvante chirurgiei tumorilor maligne mamare a crescut foarte mult numărul intervențiilor conservatoare ale sânului (Bear HD, 2006; Fisher, 1997) ,întrucât această schema de tratament a fost demonstrată a fi la fel de eficientă precum mastectomia însă termeni de interval liber de boală precum și supraviețuirea per ansamblu.

**Epidemiologia cancerului mamar:** În România anulului 2018, cancerul mamar era reprezentat în procent de 25.1% (9629 cazuri noi), ocupând locul întâi în clasamentul maladiilor oncologice ale femeilor. În 2017 s-au înregistrat 3484 decese, observând-se o ușoară creștere cu anul precedent când au fost contorizate 3457 de decese. În 2015 au fost raportate la nivel național 3495 decese prin cancerul mamar. (Site-ul CNSISP, 2018)

Cea mai recentă ediție, a Va din 2019 a ghidului de diagnostic histopatologic al tumorilor mamare elaborat de OMS, instrument utilizat universal atât pentru diagnosticul tumorilor cât și pentru a facilita relația bijectivă dintre cercetare și practica clinică, a fost rezultatul aprofundării înțelegerii mecanismelor fiziopatologice și expresia lor morfologică, imunohistochimică și fenotipică. Într-o măsură importantă impactul terapiilor contemporane asupra evoluției acestei

umbrelle patologice denumite „cancer mamar” a avut un rol însemnat în aducerea unui limbaj comun între diferite specialități ce manageriază pacientul oncologic care să aducă claritate și transparență pentru o conduită diagnostică, terapeutică și de urmărire cât mai eficiente.

Întrunirea experților în patologie mamară din St Gallen, 2011 (Goldhirsch, 2011) a propus clasificarea tumorilor în funcție de „subtipul surogat intrinsec”, conform expresiei genice definită prima dată în 2001 de către Sorlie (Sorlie, 2001). În prezent s-au implementat subtipurile moleculare surogat ce grupează carcinoamele moleculare în funcție de expresia hormonală, de prezența oncoproteinei HER-2/neu și a indexului mitotic cuantificat prin Ki67 în 2 mari clase: carcinoamele luminales (care exprimă ER, PR) și non-luminales (care nu exprimă receptori hormonal); subclassificate mai departe în luminal A (ER+, PR+, HER2-, Ki67<14%); Luminal B (ER+, PR+, HER2+, Ki 67 oricât și ER+, PR+. HER2neu-si Ki 67>14%), HER-2/neu supraexprimat (HER2neu+, ER, PR negativi, Ki 67 oricât) și triplu negative (nu exprimă nici unul din receptorii de mai sus) (Dai, 2015).

Relevanța prognostică rezidă în oportunitatea abordării terapeutice individualizate, astfel încât subtipul molecular Luminal A necesită doar terapie endocrină, Luminal B și HER-2/neu supraexprimat și triplu negative necesită adăugarea chimioterapiei, cu particularitatea că pentru exprimarea HER2 terapia include și un anticorp monoclonal anti HER2 (Lips, 2013).

**Carcinomul mamar bilateral:** Conform OMS, cancerul mamar bilateral sincron sau metacron este definit prin leziunea malignă primară dezvoltată în fiecare sân, sincron dacă intervalul de diagnostic al celor 2 entități este sub 3 luni și metacron dacă depășește acest termen (Hartman M, 2007).

În diferite raportări statistice frecvența acestui diagnostic variază între 1.4 până la 11.8% iar alte studii au calculat că riscul de a dezvolta un cancer mamar în sânul controlateral la femeile cu un cancer mamar deja diagnosticat este de 2 până la 6 ori mai mare comparativ cu riscul de a dezvolta un cancer mamar în populația generală.

Prognosticul carcinomului mamar bilateral este încă polemizat, neexistând un consens referitor la impactul asupra supraviețuirii acestor paciente comparativ cu cele care suferă de un carcinom unilateral, însă pentru carcinoamele sincrone este recunoscut comportamentul mai agresiv reflectat prin scăderea speranței de viață (Voinea O, 2018).

**Carcinomul mamar al bărbatului:** majoritar este hormonodependent, iar histopatologic, cea mai mare proporție este reprezentată de carcinoame derivate din structurile ductale ale sânului,

fiind majoritatea de tip comun (NST) și papilare, aspecte concordante cu histologia bărbaților deficitară în dezvoltarea lobulilor.

Din punct de vedere al mutațiilor genetice, studii limitate au sugerat că malignitățile glandei mamare masculine sunt p53-negative, p-21 pozitive, iar căile androgen-dependente sunt mai active comparativ cu cele din cancerul mamare. În cazurile ce asociază mutația BRCA1-BRCA2, cercetări pe serii limitate de cazuri au arătat similitudini în tiparele aberațiilor cromozomiale (Ruddy, 2013). Factorii de risc corelați statistic cu cancerul mamar al bărbatului sunt dezechilibrele hormonale de tipul hipertiroidismului, sindromului metabolic precum și disfuncțiilor testiculare înnăscute sau dobândite prin infecții, traumatisme sau iatrogen; Între ginecomastie și carcinom mamar la bărbat nu s-au găsit corelații semnificative statistic în studii derulate național (Oana Cristina V, 2018).

**Factori de prognostic și predicție în cancerul mamar:** Înțelegerea heterogenității biologice, moleculare și genetice a cancerului mamar aduce ca deziderat o abordare terapeutică personalizată, în scopul minimizării efectelor adverse și maximizării efectelor curative, necesită o stratificare cât mai precisă a riscului bazată nu doar pe predicții prognostice cât și pe factori biologici intrinseci tumorali (Clark, 1994). Aceasta reprezintă premisa care justifică elaborarea a numeroase scoruri prognostice printre care cele mai uzuale sunt reprezentate de Indexul Prognostic Nottingham, care se calculează în funcție de dimensiunea tumorii, statusul limfoganglionar și gradul de diferențiere tumorală; criteriile stabilite prin consensul de la St Gallen din 2009 și ghidurile NCCN (Rakha, 2014).

Alături de stadializarea bolii și statusul funcțional/patologic al pacientului, de importanță deosebită sunt expresia receptorilor hormonală, a oncoproteinelor și factorilor de proliferare, cu posibilitatea adăugării altor parametri cu impact asupra acurateții estimării prognostice cât și a optimizării managementului terapeutic. De utilitate încă limitată, fiind prohibitivi în special din punct de vedere economic, însă asimilate ghidurilor americane de diagnostic sunt testele genetice de tipul MammaPrint, Oncotype DX, Prosigna, etc care au demonstrat corelații semnificative statistic pentru predicția și prognosticul beneficiului adus de tratament în cancerul mamare diagnosticat în stadii precoce (Xin, 2017).

## **II. Partea Specială – Contribuții personale**

### **4. Ipoteze de lucru și obiective generale**

#### **. Motivația subiectului tratat în teza de doctorat și ipoteza de lucru**

Lucrarea de față își propune, printr-un studiu retrospectiv efectuat pe o durată de 3 ani a cazurilor de patologie mamară înregistrate în Departamentul de Anatomie Patologică al Spitalului Universitar de Urgență București, o evaluare exhaustivă a cazuisticii din perspectiva histopatologică complexă coroborată cu date imagistice și clinice.

În mod aparte am acordat o preocupare deosebită unor entități patologice rare, carcinomul mamar la bărbați și carcinoamele mamare bilaterale, față de care știința medicală actuală este încă perfectibilă.

De asemenea, ținând cont de progresele terapeutice spectaculoase înregistrate în ultimul an prin explorarea check-point inhibitors, recunoscute la nivel mondial prin acordarea premiului Nobel în 2018, am analizat expresia PD-L1 la nivelul unor carcinoame mamare selectate astfel încât să acopere o plajă de variabilitate clinică, histopatologică și imunohistochimică tot mai generoasă.

Un aspect particular al acestei teze îl face studierea expresiei proteinelor de reparare al ADN-ului a căror absență se încadrează în sindroame genetice particulare. Considerând că sindromul Lynch, caracterizat de pierderea acestor proteine, are o prevalență estimată la 0.4% și că acesta reprezintă explicația apariției cancerului de colon și endometrial la vârste tinere, însă nu este încă suficient caracterizat, am considerat oportună testarea acestor proteine și în cancerul mamar, pe același contingent heterogen pe care am testat expresia PDL1.

Rezultatele obținute sunt în mare parte congruente cu cele din literatura universală de specialitate, însă particularitățile acestei teze constau în paradigma pluriperspectivistă a cancerului mamar analizat într-un spital clinic universitar pe o perioadă de 3 ani, lot de studiu în care corelațiile histopatologice, anatomo-clinice precum și epidemiologice au particularitățile generate de aspecte atât demografice, cât și ale managementului medical local/național.

### **Scopul și obiectivele subiectului tezei de doctorat**

Scopul de ansamblu a fost realizarea unui instantaneu al intervalului 01.01.2015-31.12.2017 în ceea ce privește leziunile mamare prezentate și diagnosticate în -SUUB și identificarea unor scoruri prognostice ce se pot constitui în premise pentru îmbunătățirea calității vieții și supraviețuirii pacientelor cu maladii oncologice ale sânelui.

În scopul cercetării am utilizat informațiile clinice, imagistice precum și aspectul histopatologic al leziunilor excizate folosind mijloace ancilare de diagnostic histopatologic precum și tehnici de imunohistochimie completată, în rare cazuri, cu tehnici de hibridizare in situ.

Panelul de anticorpi utilizat a cuprins markeri hormonal de diagnostic și prognostic, ER, PR, expresia oncoproteinei HER-2/neu, indexul de proliferare evaluat prin Ki 67 precum și E-caderina, în cazuri selecționate în funcție de aspectul histopatologic. Acolo unde a fost necesar, pentru rafinarea diagnosticului am folosit și markeri imunohistochimici suplimentari de tipul pancitokeratinelor CK5/6, markerilor mioepiteliali p53, SMA, mamoglobina, markeri neuroendocrini – sinaptofizina, cromogranina, enolaza neuronal specifică precum și EGFR, CD117, etc. Pentru analiza carcinoamelor mamare ale bărbaților am suplimentat bateria standard cu AR, Prolactina, EGFR, PSA și EMA. Pentru scorul prognostic și evaluarea oportunității utilizării terapiilor ce acționează prin checkpoint inhibitors, am folosit PD-L1, CD8, iar pentru analiza defectelor de reparare ale ADN-ului am testat pozitivitatea MSH1 și MLH2. Toate datele au fost coroborate cu parametri macroscopici ai leziunilor, iar încadrarea lor în context clinico-imagistic s-a realizat folosind baza de date a spitalului.

\* **Principalele obiective urmărite au fost:**

- Stabilirea loturilor de studiu, a criteriilor de includere și a principalilor parametri selecționați spre a fi analizați.
- Includerea informațiilor selectate într-o bază de date care să faciliteze analize statistice.
- Evaluarea macroscopică a preparatelor examinate .
- Interpretarea histopatologică a leziunilor urmărite, diagnosticarea lor prin colorații uzuale, tehnici de imunohistochimie și/sau hibridizare in situ
- Analiza epidemiologică a leziunilor maligne mamare prezentate în SUUB într-un interval de timp de 3 ani.
- Integrarea cancerului mamar din perspectiva histopatologică într-un context mai extins al cunoașterii, coroborând aspectele macroscopice, histotipul, expresia imunohistochimică a

unor markeri cu prezentarea clinică și paraclinică a leziunilor, comorbiditățile asociate precum și costurile pe care le presupune abordarea terapeutică.

- Selecționarea cancerelor mamare la bărbați și analiza complexă histopatologică și imunohistochimică în vederea identificării unor factori prognostic și de risc.
- Analiza exhaustivă a cancerelor mamare bilaterale cu scopul de a identifica repere de diagnostic diferențial între carcinoamele primitiv-mamare și cele metastazate controlateral.
- Testarea aplicabilității celor mai noi progrese ale cunoașterii medicale, check-point inhibitors, în patologia mamară, identificând utilitatea prognostică evidențiată printr-un scor validat statistic pe eșantionul selectat.
- Elaborarea concluziilor.

## **5. Metodologia generală a cercetării**

Materiale și metode: Documentarea s-a realizat prin cărți și lucrări originale de specialitate precum și articole de actualitate. Am folosit cazuistica patologiilor mamare care au beneficiat de un tratament chirurgical în cadrul secțiilor de chirurgie generală, obstetrică ginecologie sau chirurgie toracică a aceluiași spital segregându-se 5 loturi:

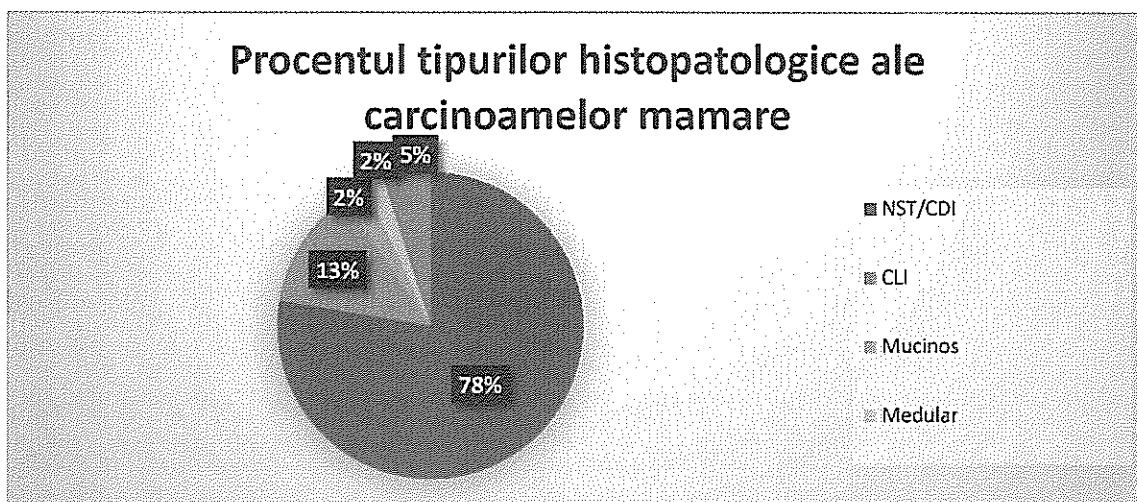
- LOTUL 1: a inclus leziunile pacientelor diagnosticate clinic și confirmate histopatologic drept maligne și benigne mamare
- LOTUL 2: a fost segregat din primul lot, alegând strict pacientele cu patologie mamară malignă
- LOTUL 3: a fost constituit din paciente cu leziuni mamare bilaterale - 6
- LOTUL 4: a fost alcătuit din selecția leziunilor mamare la sexul masculin, studiind particularitățile leziunilor maligne atât clinic, prin evaluarea comorbidităților, cât și histopatologic, utilizând un panel extins de markeri -17 pacienți.
- LOTUL 5: ales în mod analitic selecționat astfel încât să includă paciente cu o variabilitate importantă a parametrilor clinici și a expresiei histologice precum și moleculare a leziunilor maligne mamare, constituind astfel premisele unui scor prognostic ca și instrument de apreciere a severității evolutive a bolii, utilizând în acest scop expresia PD-L1 precum și MSH și MLH – 36 pacienți.

Pentru studierea acestora am folosit tehnici de laborator elementare completate de colorații suplimentare, imunohistochimie, iar datele au fost centralizate și analizate folosind instrumente statistice informatice actualizate.

## - 6. Studiul 1. Caracteristici clinico-patologice în patologia tumorală mamară de tip benign și malign

Primul lot a fost constituit din totalitatea pacientelor identificate conform registrului de recepționare a probelor histopatologice din cadrul departamentului de Anatomie Patologică al SUUB cu leziuni mamare explorate invaziv fie prin puncție biopsie, tumorectomie, sectorectomie sau mastectomie pe o perioadă de 3 ani.

Am analizat histotipurile decelate și am reprezentat grafic proporția lor (Grafic 6.1.7).



Grafic 6.1.7. Reprezentarea procentuală a entităților histopatologice maligne incluse în studiu.

### 6.3. Vârsta pacienților incluși în studiu

În ceea ce privește grupele de vârstă, se observă că cea mai mare frecvență a tumorilor maligne a fost înregistrată în intervalul 60-70 de ani, curba fiind de tip gaussian, panta stângă având o ascensionare abruptă începând cu 40 de ani. Datele obținute sunt concordante cu cele din literatura de specialitate (Bidoli E, 2019).

Vârsta medie înregistrată în lotul studiat este de 58.3 ani, 22 dintre paciente, reprezentând 7.1% din eșantionul selectat având la diagnostic vârsta mai mică de 35 de ani. Vârsta minimă a fost înregistrată la o pacientă de 15 ani, cu fibroadenom mamar juvenil, iar cea maximă de 89 de ani, la o pacientă cu un carcinom papilar G1, luminal A, diagnosticată în stadiul IA.

Media de vârstă a tumorilor maligne studiate a fost de 57.93 de ani, cu particularitatea că la pacientele tinere, cu vârstă mai mică de 35 de ani, se observă că leziunile diagnosticate au fost

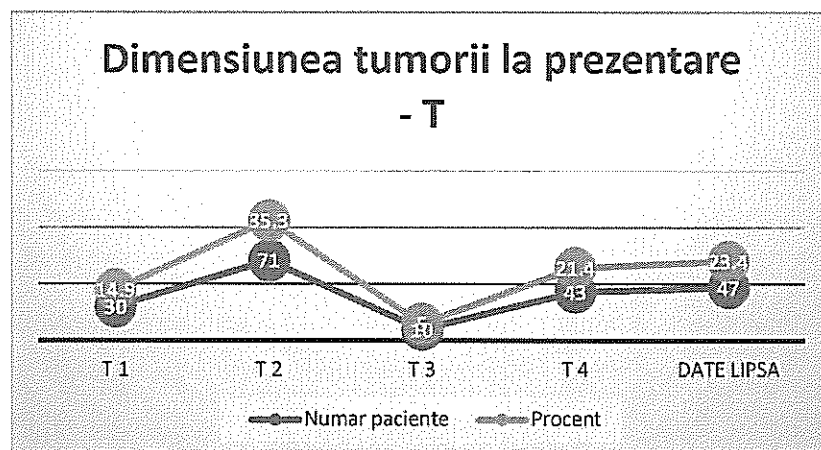
doar în jumătate din cazuri de tip carcinom ductal invaziv convențional CDI/NST. În restul cazurilor au fost diagnosticate subtipuri rare, respectiv medular și metaplastic.

#### 6.4. Distribuția pe sexe și mediul de proveniență a pacienților analizați

Distribuția pe sexe arată o disproporție previzibilă, având în vedere că tumorile mamare reprezintă principala cauză de morbi-mortalitate oncologică la femei, la bărbați fiind mult mai rar întâlnite. Totuși, analiza grupului studiat relevă date ușor discordante cu literatura de specialitate, care raportează tumorile mamare întâlnite la bărbați în procente mai mici de 1% (Yalaza, 2016). Considerând numărul total de leziuni analizate, benigne și maligne, bărbații ocupă un procent de 5%. Dacă ne uităm strict la leziuni mamare maligne, aceștia ocupă în continuare un loc fruntaș pentru media europeană, având un procent de 3% (7 cazuri).

#### 6.5. Caracteristicile TNM ale tumorilor examinate

În ceea ce privește caracteristicile TNM ale tumorilor la prezentare, sunt redată în graficul de mai jos (grafic 6.5.1). Acestea constituie un semnal de alarmă referitor la necesitatea imperioasă a introducerii unui program de screening național al cancerului mamar, observând că proporția pacientelor cu T4 este net superioară celor cu T1.



Grafic 6.5.1. Dimensiunea tumorilor la prezentare

Din totalul de paciente cu leziuni maligne incluse în studiu, 57 paciente, adică 28.4% dintre cele studiate, au avut leziuni maligne limitate la nivelul sânului, fără ca boala să disemineze în ganglionii de drenaj. Un număr de 29 (14.4%) dintre ele însă au avut invazie tumorală, iar aceasta a fost cuantificată în stadiul N1 pentru cele cu micrometastaze precum și pentru cele care au avut metastaze în 1-3 ganglioni fie axilari fie mamar intern, în funcție de topografia tumorii.

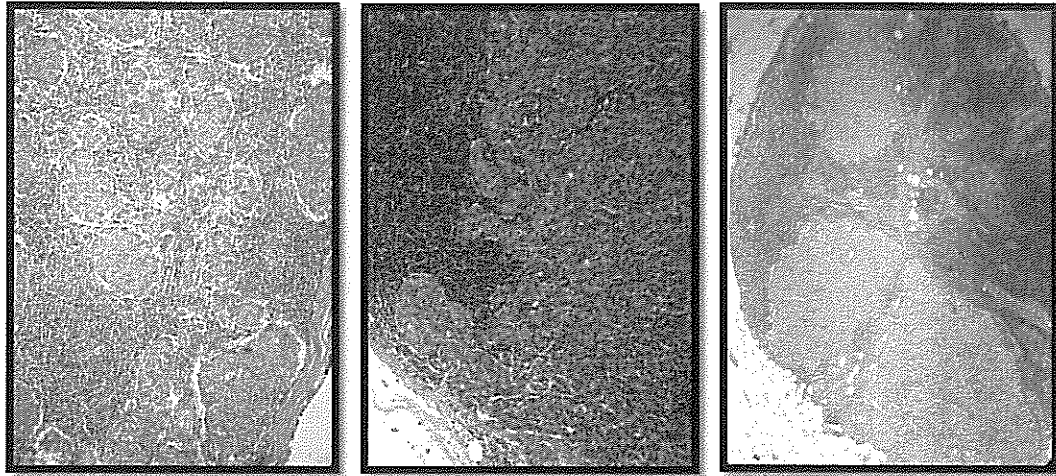


Figura 6.5.1. b. HE, 10X, invazie limfoganglionară de NST; c. HE, 10 X. Invazie limfoganglionară de NST/CDI. d. HE, lupa microscopică – limfoganglion ocupat de metastază de carcinom mamar cu depășirea capsulei ganglionare.

### 6.6. Boala metastatică a pacienților examinați

În lotul studiat am schițat o caracterizare a bolii metastatice din punct de vedere histologic, încercând să surprindem particularități, dacă există, condiționate prin biologia bolii, în absența unui tratament prealabil.

Dintre acestea, 37 de paciente, reprezentând una din 5 femei, s-au prezentat în stadiul IV. Considerând procentul îngrijorător, am găsit oportun să ne oprim atenția asupra lor.

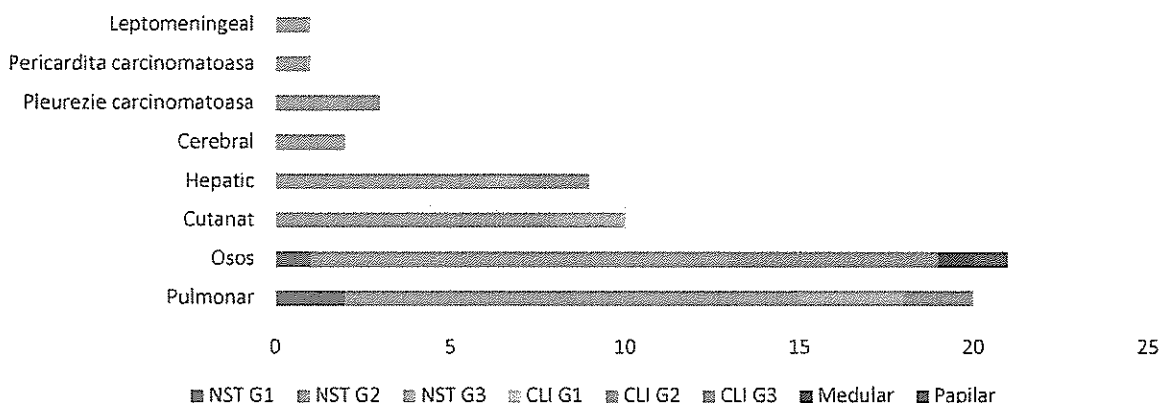
<i>Stadiul tumoral raportat la numărul de cazuri studiate de la care studiazarea a fost posibilă</i>			
<i>Stadiu Tumoral</i>	Număr cazuri	% valid	% din totalul leziunilor studiate
<i>Stadiul I</i>	31	16.54	10
<i>Stadiul II</i>	63	32.84	20.32
<i>Stadiul III</i>	59	30.72	19.03
<i>Stadiul IV</i>	37	19.7	11.9
<i>Total</i>	192	100% din 192	61.25% din 310

Tabel 6.6.1. Stadiul tumoral al pacientelor înregistrate în studiu

Astfel, din cele 37 de cazuri care la prima prezentare sufereau deja de determinări secundare la distanță, 2 paciente cu NST/CDI bine diferențiat, Luminal B, fără receptori pentru

HER2neu s-au prezentat cu metastaze pulmonare și osoase. Dintre cazurile studiate, niciun carcinom lobular invaziv bine diferențiat nu a fost găsit în stadiul de boală metastatică.

### Localizarea metastazelor în raport cu subtipurile moleculare



Grafic 6.6.2. Evidențierea localizării metastazelor în raport cu histotipul în cazuistica studiată

Localizările viscerale, conform graficului, au fost cele mai numeroase la nivel hepatic (Fig 6.6.16) și pulmonar. Cele mai rare topografii întâlnite au fost la nivel leptomeningeal și pericardic. Determinările cerebrale s-au întâlnit în două dintre cazurile de NST/CDI G2 (Fig. 6.6.15.).

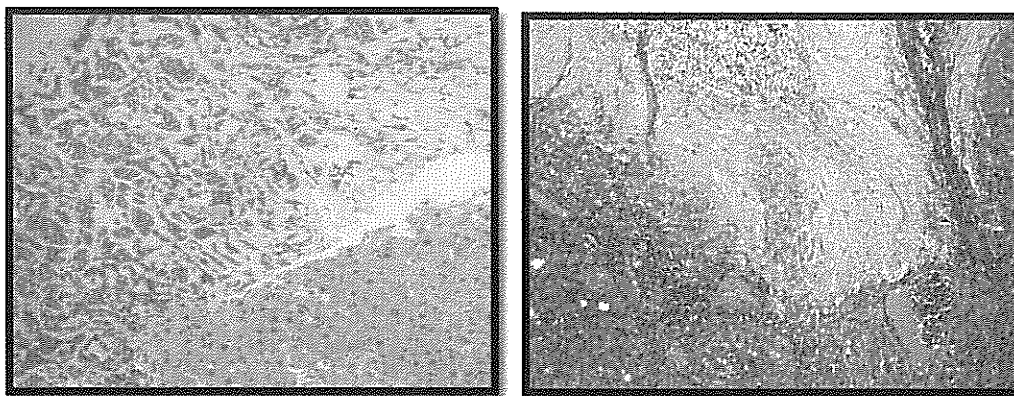


Figura 6.6.3. HE, 10X. Metastaza hepatica de carcinom NST/CDI; 6.6.4. HE 4X metastază cerebeloasă de CLI G3

Remarcabil este ca tumorile triplu negative au fost descoperite cu metastaze osoase, cele viscerale nefiind inaparente la momentul diagnosticului inițial, iar cel HER2+ , indiferent că au avut criteriile de încadrare în subtipul molecular Luminal B sau au fost doar HER2 pozitive, fără să exprime receptori hormonali, au avut de la prezentare determinări secundare viscerale, preponderent pulmonare și hepatice.

## 7. Studiul 2. Lotul 2. Analiza caracteristicilor subtipurilor surogat molecular

Al doilea lot a avut ca obiect de studiu patologia malignă întâlnită între cazurile selecționate și segregarea ei în funcție de subtipul molecular intrinsec.

Am analizat frecvența lor în funcție de vârstă, mod de prezentare, subtipul histologic tributar fiecărei categorii, a tuturor leziunilor decelate. Am verificat corelații între subtipul molecular și nucleolii tumorali, diferențiere apocrină, DCIS sau LCIS asociat, precum și micromediul tumoral cuantificat prin TILs, forma marginilor tumorale și necroza geografică, acolo unde a fost prezentă, urmărind și invazia perineurală și embolii tumorale decelați la examenul histopatologic.

Numărul cazurilor de carcinom mamar care au beneficiat de teste imunohistochimice efectuate în Departamentul de Anatomie Patologică al SUUB au fost 165. Dintre acestea, 51 de cazuri au fost Luminal A, 84 de cazuri Luminal B (61 fără să exprime oncoproteina HER-2/neu, restul de 23 cu pozitivitate pentru aceasta), 2 cazuri de carcinom mamar HER2/neu supraexprimat și 28 de cazuri triplu negative. Pentru fiecare subtip molecular intrinsec, cel mai frecvent tip histologic a fost carcinomul ductal invaziv/NST.

Media de vârstă a pacienților și media numărului de zile de internare în funcție de subtipul molecular					
	Subtip molecular				
	A	B HER 2-	B HER 2+	HER 2 Supraexprimat	Triplu Negative
	Media	Media	Media	Media	Media
<b>Vârsta Pacientului</b>	63	62	62	52	63
<b>Număr zile de internare</b>	11	11	15	12	9

Tabel 7.1.3. Vârsta medii și numărului mediu de zile de internare în funcție de subtipul molecular intrinsec.

### 7.3. Caracteristici particulare ale lotului studiat.

Celula neoplazică, prin comportamentul ei biologic, are caracteristici funcționale perturbate, cuantificabile morfologic. Necesitățile metabolice sunt crescute, rata accelerată de multiplicare a acestora având expresie morfologică observabilă în microscopie optică.

Modificările cele mai accentuate sunt decelabile la nivelul nucleului. Acesta se mărește în dimensiune, devenind supraunitar, cromatina se fragmentează, iar nucleolii, responsabili de biosinteza proteinelor ribozonale, vor suferi modificări numerice și conformaționale, hipertrofia

acestora fiind expresia unui comportament tumoral agresiv (Montanaro, 2008). Aceștia au relevanță prognostică în tumorile renale (scorul Fuhrman), în aprecierea gradului de malignitate a unui feocromocitom, dar și în carcinoamele scuamoase din sfera ORL (Hanemann, 2011).

Considerând aceste aspect, am verificat dacă există o corelație semnificativă statistic între nucleolii proeminenți și subtipul molecular intrinsec. Testul Chi-pătrat a generat un p de 0.339, ceea ce a arătat că nu apare o relație de interdependență între cele două variabile.

Un alt factor ce ține de biologia intrinsecă a tumorilor o reprezintă necroza tumorală. Mecanismele prin care aceasta e generată sunt multiple, cele mai importante constând în hipoxie și ischemie secundară ratei de proliferare a populației tumorale într-un mediu ce nu poate asigura neoangiogeneza adecvată, precum și factori inflamatori generați prin hipoxie, de tipul HIF1alfa, CA IX sau GLUT 1 (Tomes L, 2003). Contrar literaturii, nu am găsit corelații semnificative statistic, decelând această modificare atât în rândul tumorilor Luminal A, cât și în cele triplu negative.

Interfața dintre tumoră și gazdă comportă două aspecte pe care le-am urmărit, cuantificat și comparat. Acestea sunt reprezentate de marginile tumorale, în raport cu modul de invazie al țesutului îndemn de către celule neoplazice, și de răspunsul imun de apărare al gazdei, ce se poate evalua, în colorație HE, prin elementele limfocitare asociate tumorii. Am observat că majoritatea carcinoamelor studiate au avut margini infiltrative, aspect concordant adesea atât cu aspectul macroscopic, cât și imagistic al acestora. Acest mod de infiltrare al gazdei a fost regăsit în toate categoriile luminale și non-luminale. Marginile expansive, deși numeric mult mai puțin reprezentate, au fost întâlnite în subtipurile moleculare non-luminale, cu precădere triplu negative.

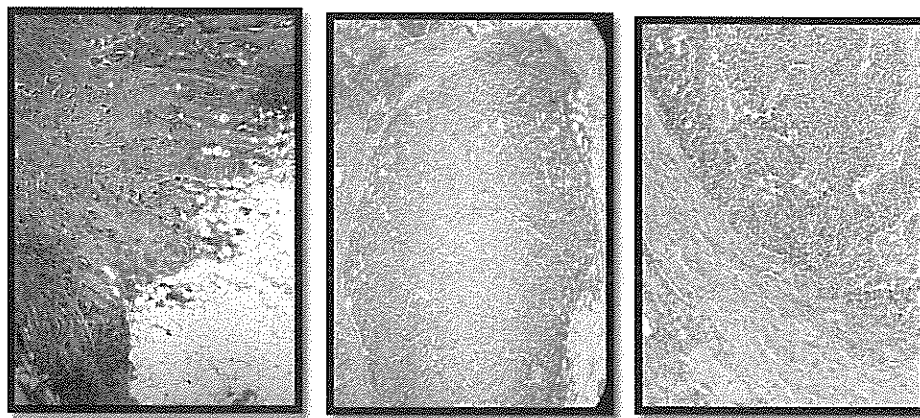


Figura 7.3.2.5. a. HE 4X. Margini infiltrative în carcinom ductal invaziv/NST G2 ; b. Margini expansive în carcinom ductal invaziv/NST G2; c. HE 10X. Margini tumorale expansive în carcinom medular triplu negativ.

Corelarea statistică a subtipului molecular intrinsec cu aspectul frontului de invazie tumorală a fost semnificativă statistic, în sensul în care carcinoamele non-luminale se corelează mai bine cu modelul expansiv de invazie, comparativ cu cele luminale, care au preponderent un model infiltrativ de ocupare al țesutului gazdă. Rezultatul testului Chi-pătrat a generat un p de 0.05.

Am aplicat aceeași direcție de studiu și pentru infiltratul inflamator peritumoral și intratumoral, invazia perineurală sau embolii tumorali, însă nici despre aceste aspecte nu am găsit o relevanță conform calculului statistic.

Infiltrarea limfocitară a eșantionului tumoral, expresie a reactivității gazdei împotriva celulei neoplazice, este de un interes în continuă expansiune, considerând progresele terapeutice care folosesc molecule ce mediază și modulează răspunsul imun. Despre importanța și semnificația lor prognostică în cancerul mamar nu există un consens, însă în cadrul mai multor studii s-a observat că prezența lor în carcinoamele hormonopozitive se corelează cu un răspuns suboptimal la tratament, contrar cu ceea ce se întâmplă în cazul carcinoamelor non-luminale (Kurozumi, 2019).

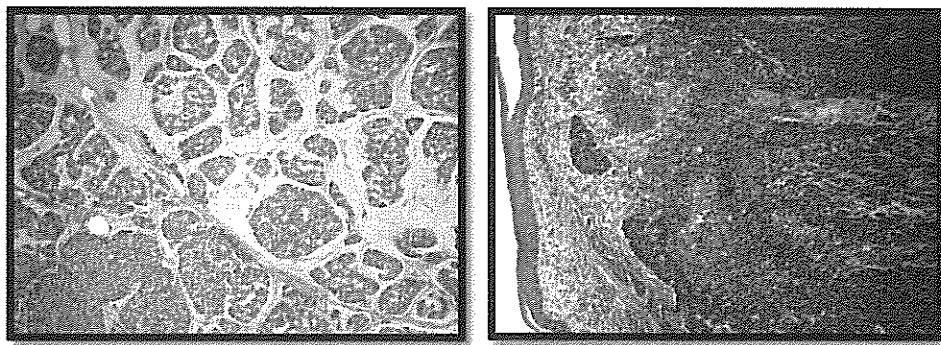


Figura 7.3.2.9.a. HE, 20X. Carcinom mucinos Luminal A cu 0-10% TILs intratumorale; 48.b.HE 10X. Carcinom medular triplu negativ cu 40% TILs.

Am cuantificat în cadrul unui scor prezența limfocitelor tumorale pentru fiecare caz în parte studiat, din 10 în 10 procente, și am observat că majoritatea tumorilor au exprimat aceste elemente în procent mic, sub 10%. Expresii de peste de 50% s-au înregistrat doar în carcinoame triplu negative. Studiile de corelație însă nu au găsit valori semnificative statistic pentru cele două variabile, respectiv răspunsul imun și subtipul molecular; astfel reiese că acesta e un factor independent a cărui valoare prognostică poate fi apreciată strict în studii prospective, care să poată observa și răspunsul terapeutic al gazdei, în dinamică.

### 8. Studiul 3. Caracteristici clinico-patologice în carcinomul mamar bilateral

Lotul trei a avut ca subiect de interes leziunile mamare maligne bilaterale și a evidențiat particularitățile fiecărei paciente în parte. Deși studiul și-a dorit să ofere niște răspunsuri, în privința acestui contingent a reușit să genereze mai multe semne de întrebare privitoare la diagnosticul diferențial de precizie între tumorile mamare bilaterale și cele metastazate controlateral, precum și la importanța modificărilor induse în sânul controlateral prin tratamentul neoadjuvant în tumorile mamare.

Prima leziune diagnosticată	Leziunea diagnosticată în sânul controlateral
<b>Vârsta la diagnostic</b>	
66	67
54	61
60	62
84	84
48	48
50	50
<b>Stadiul tumoral în momentul diagnosticului</b>	
IV	IV
0	IIA
IV	IV
IIIB	biopsie
IIB	IA
Ia	Ia
<b>Gradul și histotipul</b>	
NST G2	NST G2
DCIS	Adenoscuamos
NST G1	NST G3
NST G2	NST G2
NST G2	NST G1
NST G1	NST G1

Tabel 8.1. Histotipul stadiul și vârsta la diagnostic a leziunilor mamare în cazurile de bilateralitate

În lucrare am analizat cazul a 6 paciente ce s-au prezentat cu tumori mamare bilaterale, fie sincrone, fie metacrone. Am observat particularitățile fiecărui caz atât din punct de vedere histologic, cât și clinic.

Vârsta medie a pacienților a fost de 60 de ani, iar intervalele de timp între cele 2 tumori au variat de la 6 ani până la sincronicitatea tumorilor. Am redat într-un tabel exemplificativ stadiul tumoral, histotipul și gradul de diferențiere al tumorilor fiecărei paciente.

După ce am expus fiecare caz în parte, am observat că analiza leziunilor bilaterale nu aduce rezultate cu valoare prognostică, însă ridică niște întrebări al căror răspuns poate fi obținut printr-un studiu observațional retrospectiv și prospectiv întins pe mai mulți ani care să cuprindă o cazuistică mai extinsă astfel încât să poată furniza informații cu valoare statistică. Cele mai importante, însă modeste, prin dimensiunea eșantionului, pe care le putem extrage din acest studiu sunt de tip observațional.

1. Observând profilul similar histologic și imunohistochimic în majoritatea cazurilor, putem concluziona că factorul generator al neoplaziei este determinat de predispoziția genetică individuală.

2. Diagnosticul diferențial între o tumoră primitivă și determinarea ei secundară am realizat-o în majoritatea cazurilor clinic, considerând stadiul tumoral de diagnostic (lipsa metastazelor viscerale a făcut puțin probabilă diseminarea controlaterală, deși tumorile aveau aceleași caracteristici morfologice și imunohistochimice), însă acest lucru, în absența întregului context patologic, ar fi fost imposibil de realizat.

3. Multifocalitatea carcinoamelor (întâlnită în 2 din cele 6 cazuri) nu se corelează cu un profil histologic sau imunohistochimic mai agresiv (ambele paciente au avut carcinoame ductale invazive de tip obișnuit încadrate imunohistochimic în subtipul molecular Luminal A).

## **9. Studiul 4. Caracteristici clinico-patologice în tumorile mamare ale bărbaților**

Lotul 4 de studiu a urmărit contingentul de bărbați care au fost diagnosticați cu leziuni mamare din spectrul lezional malign cât și benign. Scopul acestei analize a fost acela de a observa particularitățile clinice, imunohistochimice și moleculare ale acestor pacienți.

Adiacent markerilor epiteliali și hormonalți uzuali am testat și prezența anticorpilor pentru androgen dar am avut grijă și la diagnosticul diferențial cu alte malignități ale bărbatului (markeri prostatici) pentru a exclude leziuni secundare migrate la acest nivel.

**9.1. Ginecomastia** -, leziune a bărbatului ce apare la toate vârstele, însă cu precădere la cele tinere și în copilărie este o leziune caracterizată de hiperplazia ductelor și a stromei din jur.

Am identificat 10 cazuri de ginecomastie dintre care unul a avut localizare bilaterala, la un pacient in vârstă de 21 de ani, cu o medie de 39.4 ani, extremele fiind decelate pentru 83, respectiv 21 de ani.

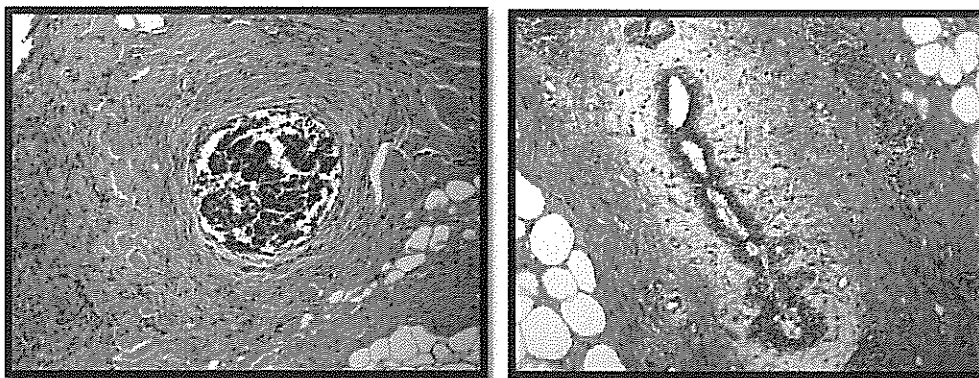


Figura 9.1.2. a. HE 20X papilom intraductal în context de ginecomastie; b. HE 20X, ginecomastie floridă – detaliu al ductelor ce prezintă hiperplazie cu modificări celulare columnare și sunt înconjurare de o stromă desmoplazica și infiltrat inflamator predominant limfocitar dispus difuz.

## 9.2. Patologia mamară malignă a bărbaților

Carcinoamele mamare ale bărbatului sunt entități patologice rar întâlnite, ele reprezentând mai puțin de 1% din totalitatea malignităților la sexul masculin (Yalaza, M.,2016). Recomandările terapeutice sunt derivate din studiile conduse pe cancerul mamare la femei iar investigațiile imagistice adresate diagnosticării cancerului mamar la bărbați urmează, de asemenea, protocoalele aplicate în rândul sexului feminin. Deși au fost doar 6 pacienți și în total 7 tumori, aceștia au permis asamblarea unei scurte cercetări pe care am extins-o prin adăugarea unor markeri imunohistochimici particulari (Tabel 9.2.1). Dintre aceștia cei mai importanți sunt receptorii pentru androgen (AR), EGFR și PSA.

Profilul imunohistochimic si vârsta pacienților cu neoplazii mamare									
Tip histologic	ER	PR	HER2	Ki67%	AR	EGFR	Subtip molecular	Stadiu de boala	Vârsta
CDI/NST G1	60	70	negativ	25	80	negativ	B	IIIB	69
CDI/NST G1	80	70	negativ	20	100	negativ	B	IIA	65
CDI/NST G2	90	80	negativ	60	80	negativ	B	IIIC	56
CDI/NST G2	90	90	negativ	80	90	negativ	B	IIIB	77
CDI/NST G2	98	80	negativ	40	100	negativ	B	IIB	35
CDI/NST G3 cu arii papilare si mucinoase	80	negativ	negativ	40%	5%	negativ	B	IV	40

Tabel 9.2.1. Leziunile maligne ale bărbaților în lotul studiat, trăsăturile lor imunohistochimice, stadiul de boala și vârsta pacienților

Vârsta medie a pacienților diagnosticați cu neoplazii maligne mamare este de 57 de ani, cel mai în vârstă pacient având 77 de ani și cel mai tânăr 35. Trei din cei 6 pacienți, adică 50%, au avut infiltrarea tumorală a tegumentului.



Figura 9.2.3. HE. A. 4X. Carcinom ductal invaziv/NST; b. HE, 10X. arie papilară adiacentă zonei de CDI/NST; c. HE, 10X. arie mucinoasă adiacentă zonei de CDI/NST.

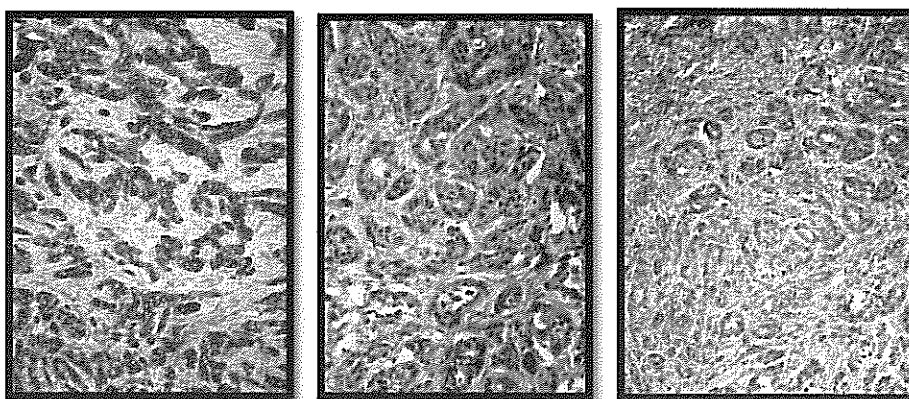


Figura 9.2.4. Carcinom mamar NST/CDI asociat unei componente mucinoase si papilare. Detaliu din componenta NST/CDI. A. ECAD, pozitivă difuz 10X; B.AR, 20X, pozitiv 5%; C. HER2/Neu 10X negativ.

În toate cazurile de carcinom mamar al bărbatului receptorul pentru androgen a fost intens exprimat, cu procente între 80 și 100% în 5 din 6 cazuri, singura excepție fiind cazul diagnosticat în stadiu metastatic, ce a exprimat în doar 5 din 100 de celule tumorale acest marker.

Niciuna din piesele examinate nu a exprimat pozitivitate pentru EGFR sau PSA.

În concluzie, deși eșantionul prezentat este restrâns, fiind surprins tangențial în studiu, putem observa că în cazuistica noastră cancerul masculin este mai frecvent decât în literatura de specialitate, reprezentând 3,48% din totalul cancerelor mamare, comparativ cu sub 1% raportat de majoritatea studiilor epidemiologice pentru Europa de Est.

## 10. Studiul 5. Caracteristici moleculare în carcinomul mamar - expresia PDL1, CD8, MSH1 și MSH2

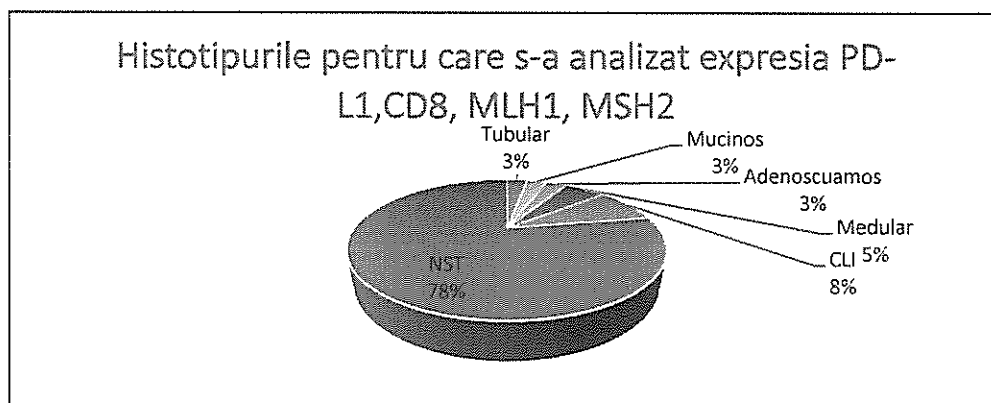
### 10.1. Criterii de selecție a pacienților. Lot 5.

Al patrulea contingent studiat a fost selectat din rândul tuturor pacienților primului lot, alegând o plajă cât mai heterogenă. Intenția a fost de a observa, pe o paletă cât mai largă de histotipuri, stadii de boală și vârste cărora le sunt recunoscute, conform literaturii de specialitate, cu un anumit prognostic global de boală, corelarea expresiei receptorilor pentru PDL1, CD8, MLH1 și MSH2.

La fiecare tumoră în parte am revăzut lamele în colorația HE, selectând dintre ele pe cele cu contingentul tumoral cel mai reprezentativ spre a testa cei 4 markeri. Doi dintre ei, respectiv MLH1 și MSH2 sunt expresia instabilității microsatelitare, ceea ce deosebește un teren genetic ce nu reușește să repare ADN-ul în replicări imperfecte.

Aceste defecte în repararea ADN-ului sunt caracteristice sindromului Lynch, autozomal dominant, cu o frecvență aparent în creștere în rândul populației tinere, a cărei evoluție este grevată de o frecvență crescută de apariție a cancerelor digestive (cu precădere în segmentul colonului), aparatului genital (endometru, ovare), uroteliale, cutanate, ale SNC, etc, acesta nefiind considerat însă un factor predispozant pentru carcinoamele mamare (Dowty JG, 2013).

Astfel, lotul de studiu a cuprins un număr de 36 de paciente și 37 de leziuni mamare (una dintre ele a avut leziuni maligne bilaterale) înregistrând vârste cuprinse între 29 și 84 de ani, cu leziuni cu grad de diferențiere de la G1 la G3, cu o plajă de histotipuri extinsă între CDI/NST (predominant), CLI, tubular, metaplastic adenoscuamos, mucinos și medular



Grafic 10.1.3. Plajă de histotipuri analizate

Diversitatea parametrilor selecționați a fost evaluată statistic folosind SPSS. Vârsta medie a pacienților analizați este 62.42 ani, cu un interval de variație de 62.42+/- 13.08. Coeficientul de variație de 21% sugerează o eterogenitate mare a grupului.

Pe probele acestor paciente selectate conform criteriilor de mai sus am analizat infiltratul inflamator peri- și intra-lezional iar imunohistochimic am analizat expresia receptorilor PD-L1, CD8, MLH1 și MSH2.

Pentru aprecierea expresiei PD-L1 am analizat 2 arii distincte: 1. Intratumoral, între celulele stromale ale carcinomului analizat și 2. În infiltratul inflamator peritumoral. Am apreciat numărul și intensitatea pozitivării, pentru a ușura analiza statistică, folosind un scor de la 0 la 5 unde 0 înseamnă negativ și 5 este maximum pozitivității înregistrat în lotul studiat.

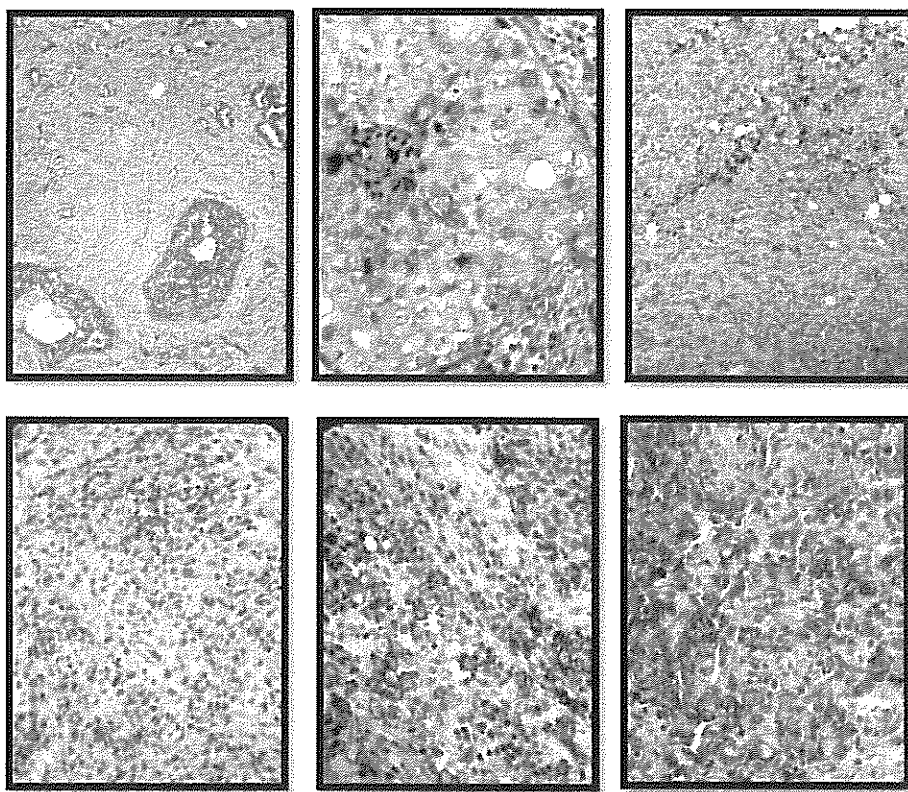


Figura 10.2.1. Scorificarea pozitivității PDL1 de la 0 (stânga sus) la 5 (dreapta jos) în celulele tumorale.

Pentru testarea instabilității microsatelitare am folosit perechea MLH1-MSH2. Aceasta a avut control pozitiv în celulele epiteliale indemne și pozitivitatea lor a fost raportată în procente, unde 100% reprezintă normalitatea țesutului indemn.

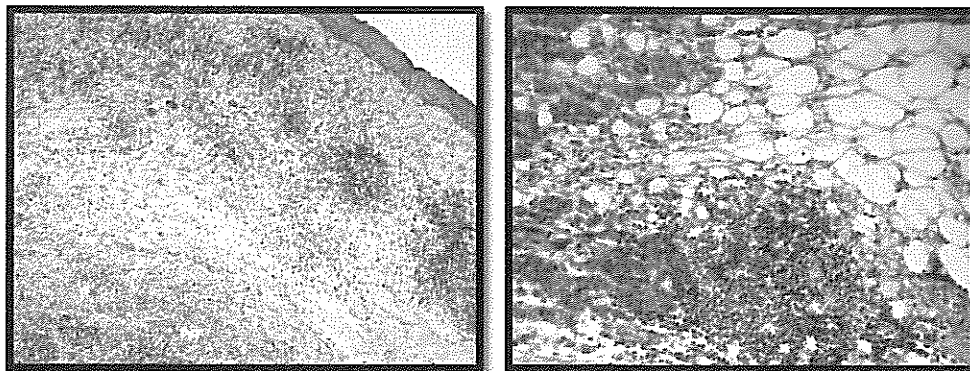


Figura 10.2.11. PDL1 în infiltratul inflamator peritumoral. A. 4X, în carcinom ductal invaziv triplu negativ, scor 3; B. 20X, în carcinom ductal invaziv luminal B HER-2/neu +.

Pentru a testa corelarea între celulele sistemului imunitar ce ar putea fi eficientizate prin blocarea terapeutică a PDL1, am imunomarcate preparatele pe care am făcut analiză cu anticorp anti-CD8, evaluând rezultatele obținute conform metodei de mai sus. Ulterior scorificării am testat dacă există o asocieră între expresia CD8 și PDL1 atât în celule tumorale cât și în infiltratul inflamator.

SCOR de pozitivitate		PDL1 în tumora						Total
		0	1	2	3	4	5	
CD8 Epitelial	0	8	3	2	0	0	1	14
	1	11	1	2	0	1	0	15
	2	1	0	0	2	0	0	3
	3	0	0	0	2	0	1	3
Total		20	4	4	4	1	2	35

Tabelul 10.2.14. Gradul de pozitivare al PDL1 și CD8 în țesutul tumoral.

Pentru a testa corelația dintre cei doi parametri am folosit testul de independență Chi-Patrat precum și coeficienți de asocieră Pearson și Spearman. Rezultatul acestora demonstrează că există o corelație semnificativă statistic, existând o relație de directă proporționalitate între expresia CD8 și PDL1 în țesutul tumoral, rezultat obținut în urma calculului coeficientului de asocieră R, acesta având o valoare de 0,448 (Pearson's R = 0,448) pentru un  $p < 0.05$  ceea ce înseamnă că valorile aprecierii expresiei CD8 în epiteliul tumoral cresc o dată cu valorile scorului PDL1 de expresie intratumorală.

### 10.3. Expresia MLH1 și MSH2 în eșantionul selectat

Întrucât tumorile non-luminale au numeroase mutații genetice, adiții sau deleții precum și un genom cu o mare instabilitate, cunoscut fiind că evoluția lor de cele mai multe ori e galopantă,

caracterizata de o metastazare precoce si implicit o morbiditate si mortalitate crescute, am testat si anticorpi caracteristici instabilității microsatelitare în tot contingentul studiat. Deși am testat doar una din cele doua perechi de anticorpi MLH1-MSH2, fata MLH6-PMS6, folosind pentru control intern țesutul epitelial indemn întâlnit pe lama, am observat ca exista diferențe în exprimarea lor. S-a observat o mai mare variație a expresiei MSH2. Redam mai jos gradul acestora de pozitivare.

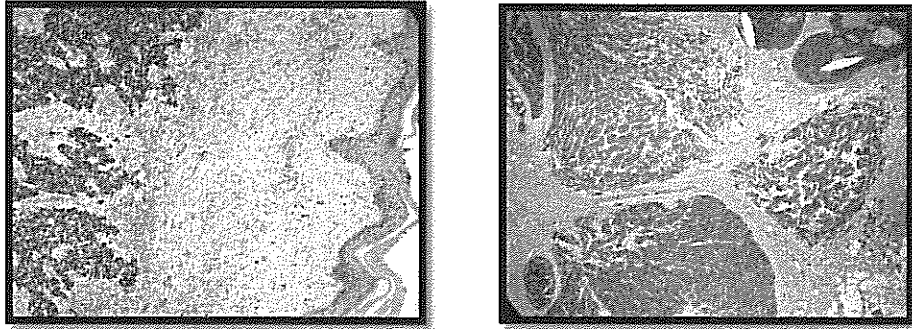


Fig 10.3.1. Expresia MLH1 a. 10X, în carcinom mamar ductal invaziv luminal B și control pozitiv în celulele bazale ale tegumentului supraiacent; b. 4X, în carcinom ductal invaziv și componenta in situ.

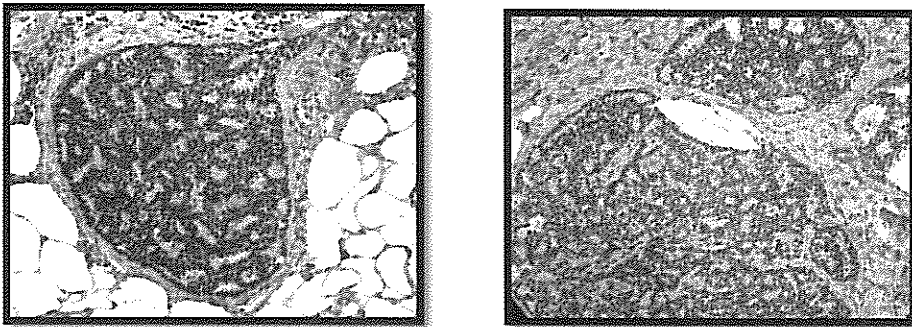


Figura 10.3.2. Expresia MLH 1 în componenta in situ din 2 carcinoame invazive distincte. A. 20X, MLH1 pozitiv 100%; B. 20X, MLH1 pozitiv 20%

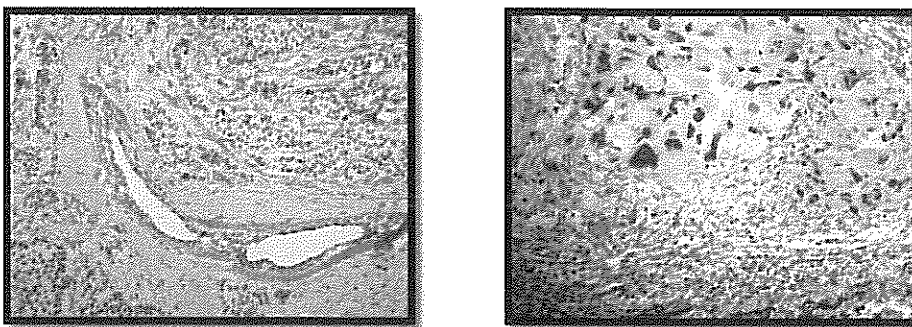


Figura 10.3.5. Expresia MSH2 A.20X; în celule de carcinom ductal invaziv luminal A, pozitivitate 50%; B.40X, in celule de carcinom ductal invaziv triplu negativ

#### 10.4. Utilizarea PDL1 si CD8 ca valori reprezentative intr-un scor prognostic

Considerând corelațiile statistice între expresia markerilor testați, fenotipul tumoral, stadiul la prezentare și vârsta pacientelor, am încercat întocmirea unui scor prognostic de agresivitate.

În sprijinul acestei inițiative am notat, pentru facilitarea calculului și a verificării reproductibilității următoarele variabile, dând o valoare fiecăreia dintre ele. Valoarea acestora a fost stabilită în urma unor studii statice de corelație între mai multe variabile și implicarea lor prognostică, sintetizându-se aceste 4 criterii: histotipul și gradul de diferențiere, invazia țesutului supraiacent, invazia limfoganglionară, subtipul molecular intrinsec și vârsta.

- Pentru **histotip**, în acord cu literatura de specialitate referitoare la prognosticul lor în raport cu supraviețuirea, cu intervalul liber de boală și răspunsul la tratament, am acordat următoarele valori, ținând cont și de gradul de diferențiere.

0- CDI/NST, CLI, carcinom mucinos, carcinom tubular, carcinom adenoscuamos de grad scăzut

1- CDI/NST, CLI, mucinos de grad 2

2- Carcinom medular, metaplastic, CLI, CDI/NST de grad 3

- În ceea ce privește **invazia țesutului cutanat supraiacent** precum și a **metastazelor** la distanță, am atribuit următoarele valori:

0 – pentru tumorile neexprimate la suprafață, fără invazie tegumentară sau emboli tumorali în vasele dermice

1 – pentru tumorile ce au efracție în tegumentul supraiacent

2 – pentru tumorile cu metastaze la distanță

- Pentru **invazia limfoganglionară** am acordat următoarele scoruri:

0 – fără invazie limfoganglionară

1 – invazie limfoganglionară prezentă

- În raport cu **vârsta**, considerând că atunci când apar la tinere carcinoamele mamare sunt mai galopante în evoluție, am acordat următoarele valori intervalelor de etate la care leziunea a fost diagnosticată:

0 – peste 70 de ani

1- 50-70 de ani

2- 30-50 de ani

3- Sub 30 de ani

- Am mai acordat un set de valori în funcție de **subtipul molecular intrinsec**:

0 - luminal A

1- Luminal B HER2 negativ

2- Luminal B HER2 pozitiv

3- Triplu negativ/her2 supraexprimat.

- Scorul prognostic ce face obiectul central al acestui studiu este obținut prin însumarea valorii corespunzătoare fiecărei variabile. Rezultatul obținut va fi încadrat în 3 categorii după cum urmează:

Scor minim – 0-2- prognostic bun

Scor intermediar 3-6 – prognostic borderline

Scor maxim- peste 6 – prognostic infaust

Aceste scoruri prognostice s-au corelat cu expresia PDL1 în epiteliul tumoral și implicit cu CD8

Din exemplificările de mai sus precum și din corelațiile variabilelor implicate în întocmirea acestui scor prognostic extragem următoarele concluzii:

1. PDL1 este exprimat în celulele tumorale precum și în infiltratul inflamator peritumoral, iar prezența lui poate fi motivul pentru care ceck-point inhibitors ar putea constitui o terapie de succes în cazul carcinoamelor recunoscute drept agresive.

2. PDL1 se corelează cu fenotipul imunohistochimic al tumorilor și implicit cu încadrarea lor în subtipuri moleculare intrinseci

3. PDL1 este cu atât mai intens exprimat cu cât scorul prognostic are o valoare mai mare

4. În cazul în care nu sunt disponibile variabilele înregistrate în studiu, testarea PDL1 în tumora ar putea constitui factor de prognostic negativ, considerând directă și proporționalitatea cu scorul obținut în urma corelațiilor statistice.

## 11. Discuții, contribuții personale și concluzii

În România cancerul mamar ocupă primul loc în incidența patologiilor maligne ale sexului feminin, reprezentând 25,1% din totalul bolilor oncologice ale femeilor. Mortalitatea prin această malignitate înregistrează valori ce o situează pe locul 5 în rândul celor mai frecvent întâlnite cancere, fiind surclasată de neoplazii pulmonare, colorectale, gastrice și hepatice (GLOBOCAN 2018).

Această poziție în clasamentul mortalității se datorează mai multor factori. Pe de o parte, segmentul de diagnostic a evoluat în ultima vreme, fiind disponibile tehnici imagistice de înaltă rezoluție, cu o bună acuratețe încă din stadii precoce de boală. Introducerea unui limbaj comun prin scorul BIRADS și a protocoalelor de urmărire și diagnostic precis în cazurile incerte între benignitate și malignitate a permis o adresare mai specifică și mai promptă în cazurile de dubiu diagnostic (Badu-Peprah A, 2018).

O altă direcție în care gestionarea patologiei mamare maligne a primit îmbunătățiri considerabile constă în rafinarea tehnicilor chirurgicale ce au ca țintă o rezecție cu viză terapeutică, prezervând însă cât mai mult țesut mamar în vederea unei eventuale reconstrucții ulterioare (Ades F, 2017). Întreg palierul terapeutic neoadjuvant cunoaște o perpetuă optimizare, cercetarea în acest registru fiind într-o permanentă dinamică. Acest lucru este posibil pe de o parte prin avansul tehnologic de sinteză al unor molecule farmacologic active, cât mai ales prin adâncirea cunoașterii asupra biologiei intrinseci a bolii. Expresia acestui interes crescut față de un diagnostic de o cât mai mare acuratețe, în detalii cât mai precise care să poată permite un tratament optimizat, cât mai specializat, este observată în toate domeniile histopatologiei prin creșterea numărului de detalii cuprins într-un rezultat histopatologic și cu precădere în cazul cancerelor mamare, unde există o abordare complexă, direct proporțională cu numărul de cazuri afectate de această maladie.

Acest interes sporit pentru caracterizarea în detalii cât mai fine a bolii oncologice mamare îl observăm, la nivel global, printr-o facilitare a accesului la testarea genetică a mutațiilor BRCA1, BRCA2 (Toland AE, 2018), recunoscute pentru asocierea cu un risc crescut de a dezvolta un cancer de sân sau ovarian pe parcursul vieții.

De asemenea, pentru stadii precoce ale bolii, în cazurile cel mai frecvent diagnosticate în programe de screening prin mamografii la femei asimptomatice au devenit deja utilizate pe scară

largă teste ce analizează oportunitatea și tipul tratamentului neoadjuvant, așa cum este instrumentul Oncotype Dx (Rizki H, 2020).

Considerând această avalanșă informațională cu impact funcțional remarcabil asupra diagnosticului și implicit a cancerului de sân, prin studiul prezent am intenționat să aducem o perspectivă histopatologică complexă asupra patologiei mamare diagnosticate și tratate în Spitalului Universitar de Urgență București printr-un studiu retrospectiv al cazurilor de patologie mamară înregistrate în Departamentul de Anatomie Patologică efectuat pe o durată de 3 ani.

Cancerul mamar reprezintă o umbrelă pentru o serie de entități patologice distincte, atât prin aspectul histopatologic obținut în colorație clasică HE, prin amprenta hormonală și moleculară evidențiată prin markeri IHC, cât și prin substratul genetic al lor.

Ne-am concentrat atenția nu doar asupra cancerului mamar în sine, ci și a mediului acestuia de apariție, pornind de la o scală macroscopică, clinică, ce include contextul patologic al pacientului și comorbiditățile sale până la una de ordin microscopic. Aceasta a presupus analiza micro-mediului patologic intra- și peritumoral, evidențiat prin fenomene biologice cuantificabile în colorație standard HE de tipul necrozei, inflamației asociate, invaziei diferitelor structuri (corpusculi Pacini, emboli tumorali, invazie perineurală), raportului tumoră-gazdă prin evaluarea frontului de invazie tumorală, cât și alte detalii observabile prin marcaje speciale, așa cum sunt limfocitele CD8 imunomarcate prin tehnici de IHC, testarea stabilității satelitare prin imunomarcarea cu MLH1, MSH2, precum și a răspunsului celular tumoral la stimuli apoptotici imunitari testați prin verificarea check-point-inhibitors evaluat prin imunomarcajul cu anticorpi anti PDL1.

Primul lot analizat a cuprins pacienți cu patologie mamară benignă și malignă și a inclus 310 pacienți. Pe acest eșantion am analizat date epidemiologice, demografice și am făcut un rezumat al subtipurilor histologice întâlnite. Am observat lateralitatea leziunilor și am făcut corelații între modul de abordare chirurgicală și aspecte clinice și histopatologice. Pentru cazurile particulare (extremele de vârstă cu patologie malignă în fiecare an studiat) am inserat în teză detalii însoțite de imagini referitoare la histotip, profil imunohistochimic, precum și aspecte clinice.

Același lot de studiu a fost utilizat pentru a face considerații referitoare la boala metastatică. Aceasta este una din etapele în care tratamente inovative pot face diferența între o evoluție fulminantă și una de durată mai îndelungată, acesta fiind lotul de recrutare pentru studii clinice. Ne-am îndreptat atenția spre acest contingent, încercând să analizăm frecvența și localizarea lor în

raport cu histotipul, precum și profilul imunohistochimic. Predominanța osoasă a fost secundată de determinări secundare viscerale. Nu am găsit încă niște corelații valide statistice cu privire la ceea ce favorizează metastazarea într-un anumit loc. Au fost incluși 310 pacienți, dintre care 103 au prezentat leziuni benigne, iar 201 leziuni maligne. În 22 de cazuri cele două tipuri de leziuni au coexistat, indiferent de histotipul celor 2 entități.

Între patologiile maligne s-a remarcat o majoritate, concordantă cu literatura de specialitate, a carcinoamelor mamare ductale invazive, a carcinoamelor de tip NST (Makki J, 2015), în diferite grade de diferențiere, cele mai multe fiind moderat diferențiate. Au urmat la o distanță procentuală considerabilă (65 de procente diferență de frecvență) carcinoamele de tip lobular invaziv și am înregistrat și 31 de subtipuri distincte.

Vârsta medie a pacientelor cu leziuni mamare a fost 58.3 ani, dintre care cele maligne, selecționate distinct, au avut o vârstă medie de 57.93 ani. În Statele Unite vârsta medie a cancerului mamar este de 62 de ani, iar pentru rasa neagră pragul scade la 60 de ani, comparativ cu cea albă, unde aceasta este de 63 de ani (Howlander N, 2020).

**Al doilea lot** a avut ca obiect de studiu patologia malignă întâlnită între cazurile selecționate și segregarea ei în funcție de subtipul molecular intrinsec. Numărul cazurilor de carcinom mamar care au beneficiat de teste imunohistochimice efectuate în Departamentul de Anatomie Patologică al SUUB au fost 165. Dintre acestea, 51 de cazuri au fost Luminal A, 84 de cazuri Luminal B (61 fără să exprime oncoproteina HER-2/neu, restul de 23 cu pozitivitate pentru aceasta), 2 cazuri de carcinom mamar HER2/neu supraexprimat și 28 de cazuri triplu negative. Pentru fiecare subtip molecular intrinsec, cel mai frecvent tip histologic a fost carcinomul ductal invaziv/NST.

Am analizat frecvența lor în funcție de vârstă, mod de prezentare, subtipul histologic tributar fiecărei categorii, a tuturor leziunilor decelate. Am verificat corelații între subtipul molecular și nucleolii tumorali, diferențiere apocrină, DCIS sau LCIS asociat, precum și micromediul tumoral cuantificat prin TILs, forma marginilor tumorale și necroza geografică, acolo unde a fost prezentă, urmărind și invazia perineurală și embolii tumorale decelați la examenul histopatologic. Singura variabilă cu semnificație statistică a fost reprezentată de marginile tumorale, aspectul infiltrativ al invaziei gazdei fiind corelat cu un prognostic superior situațiilor în care marginile sunt expansive, aspect diferit de cel întâlnit la carcinoame cu histogeneza diferită (carcinom renal cu celule clare, carcinom colorectal, etc).

**Lotul trei** a avut ca subiect de interes leziunile mamare maligne bilaterale și a evidențiat particularitățile fiecărei paciente în parte. Deși studiul și-a dorit să ofere niște răspunsuri, în privința acestui contingent a reușit să genereze mai multe semne de întrebare privitoare la diagnosticul diferențial de precizie între tumorile mamare bilaterale și cele metastazate controlateral, precum și la importanța modificărilor induse în sânul controlateral prin tratamentul neoadjuvant în tumorile mamare.

În lucrare am analizat cazul a 6 paciente ce s-au prezentat cu tumori mamare bilaterale, fie sincrone, fie metacrone. Am observat particularitățile fiecărui caz atât din punct de vedere histologic, cât și clinic.

**Al patrulea lot** a studiat tumorile mamare ale bărbatului. Am abordat succint problema ginecomastiei, întrucât aceasta este o patologie relativ frecvent întâlnită, despre a cărei etiopatogenie, fiziopatologie și prognostic nu sunt multe de polemizat.

Ne-am oprit atenția asupra carcinoamelor mamare ale bărbatului. Acestea sunt entități patologice rare, iar studiile ce abordează această problemă sunt suficient de puține pentru ca tratamentul să nu difere între cele două sexe, schemele terapeutice fiind desprinse din ghidul de tratament al femeilor.

Am observat că toate tumorile au fost de tip ductal invaziv/NST, una dintre acestea având și arii papilare și mucinoase. Toate tumorile au fost încadrate în subtipurile molecular Luminal B, fiind hormonopozitive, Her-2/neu negative și cu un index de proliferare cuantificat prin Ki-67 variabil între 25 și 80%.

**Cel din urmă lot** are ca scop întocmirea unui scor prognostic.

Acesta a fost alcătuit din pacienți selectați din loturile anterior prezentate, cu intenția ca polimorfismul patologic să fie cât mai vast atât din punct de vedere clinic, cât și biologic. Am avut în vedere în acest sens histotipurile tumorale și profilul imunohistochimic, precum și caracteristici clinice, epidemiologice și demografice ale pacienților.

Am testat în acest contingent expresia PDL1, CD8 precum și MLH1, MSH2, ca expresie a instabilității microsatelitare, marcă a sindromului Lynch. Alegerea PDL1 și CD 8 a fost inițiată pentru faptul că anticorpi monoclonali cu acest target au revoluționat prognosticul pacienților cu stadii avansate de boală, crescând speranța de viață în mod semnificativ pentru un număr important de tumori – melanom, carcinom scuamos ORL, carcinom pulmonar fără celule mici sau carcinom renal (Gong, 2018).

Un alt motiv a fost acela al înțelegerii rolului acestei proteine în modularea răspunsului imun prin silențierea lui în fața celulelor tumorale (Pardoll, 2012; Tumei, 2014), paradigmă din care se poate constitui un factor prognostic. Pentru aprecierea pozitivității lui am întocmit un scor de exprimare a sa, între 0 și 5, cu exemplificarea modului de cuantificare expus în grafic separat, folosind fotografiile ale lamelor evaluate pentru acest studiu. Pentru CD8, imunomarcaj pentru limfocitele T, esențiale în elaborarea unui răspuns imun, am folosit aceeași metodă de evaluare, restrângând însă plaja până la 3, întrucât nu am întâlnit nicio tumoră care să depășească acest prag. Instabilitatea microsatelitară a fost investigată ca posibilitate de expresie în cancere mamare întrucât, pe de o parte, cancerele agresive exprimă o instabilitate cromozomială importantă, iar pe de altă parte, aceasta este definitivă pentru sindromul Lynch.

Deși acesta nu este caracterizat în mod specific de cancere mamare, se pare că în evoluția sa apare și o posibilitate crescută față de populația generală de a dezvolta neoplazii maligne la acest nivel (Nikitin AG, 2020). În loturile studiate am observat că expresia PDL1 se corelează cu subtipul molecular, aceasta fiind mai intensă pentru carcinoamele non-luminale și de grad scăzut.-

O altă semnificație statistică o reprezintă corelarea acestei proteine cu vârsta și stadiul tumoral.

Corelând expresia PDL1 la nivel tisular tumoral, CD8 și MLH1, respectiv MSH6, am observat că există concordanță atât cu gradul tumoral, cât și cu stadiul și vârsta.

Făcând aceste observații, am încercat întocmirea unui scor prognostic, în care expresia MH a PDL1 s-a corelat cu o agresivitate mai importantă a cancerelor comparativ cu cele silențioase din aceasta perspectivă.

În alcătuirea scorului prognostic au fost coroborate variabile ce țin de gazdă, precum și de histologia și expresia imunofenotipică a tumorilor mamare. În acest sens am stabilit niște corelații cu semnificație statistică testată prin metode statistice de calcul.

Rezultatele studiului ce constituie subiectul acestei teze sunt, în majoritatea lor, similare cu cele din literatura de specialitate.

Ceea ce aduce însă particular acest studiu este reprezentat de evaluarea patologiei mamare într-un centru clinic universitar de urgență în perioada 2015-2017, precum și de paradigma pluriperspectivistă ce a căutat să evalueze atât aspecte ce țin de boală (detalii histopatologice și imunohistochimice), cât și de gazda bolii (date clinice ale pacienților, precum și contextul lor patologic de ansamblu).

### 11.1. Concluzii

- Am obținut un extemporaneu al tipurilor și subtipurilor tumorale la ambele sexe, le-am încadrat în context epidemiologic și demografic.

- Tipuri diferite de prelevare. Predominanța la nivelul sânului drept a mastectomiilor fără evidare ganglionară și a reexciziilor.

- Boala metastatică – metastazele osoase – localizarea cea mai frecventă; metastazele viscerale – mai frecvente în carcinoamele Luminal B, HER-2/neu pozitive.

- Numărul zilelor de internare a fost mai mic pentru vârste < 60 de ani, acesta crescând odată cu etatea pacienților.

- Numărul de patologii conexe (carcinomatoză leptomeningeală, traumatism toracic cu volet costal, secțiune medulară la nivel lombar și hemotorax bilateral) a împiedicat o stratificare a numărului de zile de internare, ca element predictiv de severitate a bolii oncologice.

- Calcificările din leziunile benigne ce însoțesc un cancer mamar.

- Nucleolii, necroza tumorală – nu se corelează cu subtipurile moleculare.

- Infiltratul inflamator asociat tumorii poate fi factor de prognostic independent de subtipul molecular, datele studiului negăsind corelații semnificative statistic între cele două variabile.

- Tumorile mamare bilaterale au frecvent același histotip, demonstrând o predispoziție genetică individuală de a le dezvolta.

- A doua tumoră mamară la aceeași pacientă are de cele mai multe ori un grad histologic superior primeia, exceptând cazurile în care pacienta a primit concomitent sau la un interval scurt de timp PCT pentru prima leziune.

- Carcinomul mamar al bărbatului, în lotul studiat, apare cu o frecvență mai mare decât în statisticile internaționale.

- Carcinoamele mamare ale bărbatului incluse în studiu au fost de tip ductal invaziv, unul dintre ele prezentând arii de carcinom mucinos și papilar.

- Plașa de vârstă la care acestea au fost diagnosticate este vastă, variind între 35 și 77 ani, cu o medie de 58 ani.

- Expresia AR a fost prezentă în toate cazurile studiate de carcinoame mamare la bărbați și s-a observat o relație de directă proporționalitate cu receptorii hormonali clasic testați pentru tumorile mamare.

## 11.2. Principalele rezultate obținute – contribuții personale

Primul lot de studiu a avut un scop preponderent descriptiv al leziunilor decelate în interval de 3 ani la nivelul glandei mamare ce au necesitat un gest terapeutic chirurgical și care au beneficiat de un diagnostic histopatologic elaborat în Departamentul de Anatomie Patologică al Spitalului Universitar de Urgență București.

Astfel am cuantificat mai mulți parametri epidemiologici, histopatologici și clinici. Cele mai multe cazuri au fost înregistrate în anul 2017, observând-se o tendință de progresie numerică a cazurilor de patologie mamară adresată acestui spital în cei 3 ani studiați. În ceea ce privește leziunile mamare, cele maligne au avut o frecvență mai mare decât cele benigne, în 22 de cazuri acestea coexistând.

Demografic, au predominat pacientele provenite din mediul urban. Vârsta medie, dar și extremele în care s-au decelat leziuni maligne au fost detaliate în grafice și imagini reprezentative pentru situațiile în care particularități remarcabile au fost identificate.

Analiza a cuprins și o stratificare a principalelor subtipuri histologice decelate și distribuția lor în funcție de grupele de vârstă.

Am analizat tipul de intervenții chirurgicale și corelarea lor cu stadiul de boală, precum și histotipul.

Am observat că biopsiile au fost principalele surse de diagnostic, urmate de mastectomia cu limfadenectomie, gest diagnostic cu impact terapeutic în conformitate cu recomandările ghidurilor de conduită oncologică.

Lateralitatea tumorilor decelate nu a avut diferențe semnificative la prezentare, însă am găsit, fără o explicație fiziopatologică sau concordanță cu literatura de specialitate, că recidivele operate au fost mai frecvent diagnosticate la nivelul glandei mamare drepte.

În rândul leziunilor maligne au predominat carcinoamele de tip ductal invaziv/NST în diferite grade de diferențiere, secundate de carcinoamele lobulare invazive.

Dintre tipurile speciale întâlnite am prezentat secvențial, atunci când am redat extremele de vârstă întâlnite în cei 3 ani studiați.

Referitor la aspecte histologice ale leziunilor maligne studiate, am analizat dimensiunile și forma lor de prezentare, histotipul și profilul imunohistochimic, precum și detalii microscopice decelate cu semnificație prognostică incertă, de tipul invaziei perineurale, embolilor tumorali,

infiltrării corpusculilor Pacini, necrozei geografice, infiltratului inflamator intratumoral, diferențierii apocrine, formei frontului de invazie în țesutul gazdă sau efracției tegumentare.

Pentru leziunile care la prezentare erau în stadiul metastatic am analizat determinările secundare ca frecvență și topografie în corelație cu histotipul, vârstă și comorbiditățile pacientelor.

Fără să găsim corelații semnificative statistice, pentru ceea ce domeniul cercetării de mult încearcă să afle, respectiv determinantul unei leziuni secundare de a se cantona într-un anumit organ, am observat că sistemul osos a predominat în topografia organelor afectate, secundat la mică distanță de plămân și ficat.

În al doilea lot de studiu, ce a avut ca obiect strict leziunile mamare maligne, din perspectiva subtipurilor moleculare intrinseci am studiat corelațiile acestora cu diferiți parametri clinici sau histologici.

Am analizat în funcție de subtipurile moleculare intrinseci media de vârstă, stadiul de boală, leziunile benigne asociate, precum și caracteristici histologice ale comportamentului tumoral, apreciate prin cuantificarea nucleolilor proeminenți, necrozei geografice, marginilor tumorale, infiltrării cu elemente inflamatorii, emboli tumorali, precum și a infiltrării perineurale.

Dintre toate aprecierile statistice, rezultatul cel mai surprinzător a fost obținut pentru modelul de infiltrare tumorală a țesutului indemn, acesta fiind de tip expansiv pentru subtipurile recunoscute ca având un prognostic infaust (non-luminale) și de tip infiltrativ pentru tipurile luminale.

Comparativ cu patologiiile cu histogeneză diferită (cum ar fi carcinomul de colon), acest rezultat arată contrar, însă este oarecum explicabil prin faptul că de cele mai multe ori carcinoamele non-luminale triplu negative au trăsături bazaloide, ceea ce justifică într-o anumită măsură forma frontului lor de invazie.

Al treilea lot a fost dedicat pacientelor cu leziuni maligne mamare bilaterale. Acest studiu rezervat pentru un contingent de doar 6 paciente, deși nu a reușit să aducă vreo concluzie cu impact prognostic sau terapeutic semnificativ, a ridicat semne de întrebare față de care literatura de specialitate încă nu a găsit un consens.

Dilemele ce se pot constitui în ipoteze de cercetare pe studii mai ample, ce să includă un număr mai mare de pacienți, sunt în principal referitoare la diagnosticul diferențial între un carcinom mamar sincron/metacron și unul secundar, metastazat bilateral. Un alt punct de reper pentru studii ulterioare constă în trăsăturile ce se pot desprinde din prima leziune ca fiind factor de

risc pentru o a doua malignitate în sânul controlateral, indiferent că acestea țin de gazdă, de biologia intrinsecă a bolii sau de interacțiunea între cancer și gazdă.

O altă paradigmă ce nu este analizată concludiv de studii de specialitate este reprezentată de impactul pe care îl are tratamentul neoadjuvant asupra evoluției unei leziuni în sânul controlateral dezvoltată la un interval variabil de timp.

Este cunoscut faptul că unul din principalele efecte adverse ale chimioterapicelor este dezvoltarea unei noi neoplazii. În cazul cancerului mamar, acestea pot fi trigger sau factor citoreductiv și de scădere a gradului de diferențiere tumorală, considerând că în aprecierea acestuia prin scorul Nottingham Ellis numărul mitozelor este considerabil redus prin efectul lor asupra fusului de diviziune pe care majoritatea claselor îl inhiba, însă într-un grad variabil după o ecuație încă nestabilă.

Al patrulea lot și-a oprit atenția asupra bărbaților cu leziuni mamare, atât benigne, cât și maligne. Rezultatele obținute în urma studierii acestei patologii au fost concordante cu literatura de specialitate; pentru ginecomastie, patologie exclusiv a bărbaților, am găsit o plajă largă de vârstă fără o uniformitate privind prezentarea clinică, comorbiditățile sau leziunile histologice asociate.

Pentru carcinomul mamar, acesta a fost exclusiv de tip CDI/NST, cu grade diferite de diferențiere ce a fost diagnosticat, în jumătate dintre cazuri, în stadii avansate de boală în care efracția tegumentară era deja prezentă. Cazurile decelate confirmă ipoteza conform căreia cancerul mamar la bărbat este o entitate patologică rar întâlnită, implicit greu recunoscută, ce este de multe ori diagnosticată în stadii tardive de boală.

Ne-am oprit atenția asupra acestui contingent special, care în cazuistica noastră este reprezentat într-un procent mai mare (3%) decât situația europeană (sub 1% din totalitatea cancerelor mamare), întrucât chiturile de diagnostic și tratament pentru subiecții masculini sunt desprinse din cele adresate femeilor, fiind lipsite de specificitate despre a cărei necesitate nu există în prezent un consens.

Studiul de față a mai testat pe această populație markeri imunohistochimici suplimentari celor utilizați uzual, respectiv AR, EGFR și PSA, în scopul unei mai bune caracterizări hormonale, a decelării unor posibile indicii de tratament personalizat și pentru a exclude o metastază de adenocarcinom cu incidență mare la bărbat, respectiv adenocarcinomul de prostată.

Dintre toți pacienții testați, niciunul nu a pozitivat receptorii pentru PSA. Același a fost situația și pentru EGFR, drept dovadă că terapiile anti EGFR nu sunt o opțiune, cel puțin nu în

lotul studiat de noi. Diferită însă a fost situația pentru AR, acesta fiind pozitiv în toate carcinoamele testate, însă aparent dependent de expresia ER, întrucât acolo unde cei din urmă au fost slab exprimați și AR a fost decelat în procente mai mici.

Cel din urmă lot, al 5-lea, a fost extras din cele anterior studiate astfel încât polimorfismul histopatologic, imunohistochimic și clinic să fie cât mai mare.

Am verificat toate variațiile cu motoare statistice astfel încât plaja de patologii acoperită de studiu să fie cât mai variată. Pe aceasta am verificat expresia PDL1 și CD8 pentru a testa statusul check-point inhibitorilor în tumoră, a abundenței de CD8 intra- și peritumoral. Inițial scopul a fost de a verifica oportunitatea noilor imunoterapii țintite, pentru care în 2018 s-a câștigat premiul Nobel în medicină. Am testat și una din perechile definatorii pentru instabilitate microsatelitară, respectiv MLH1 și MSH2.

Motivul a fost pe de o parte acela de a observa dacă acest tip de defect de reparare al ADN-ului este regăsit între cancerele mamare, iar pe de altă parte faptul că pentru cancerul de colon MSI high se pare că terapia cu imunoterapie anti PDL1 are eficiență mai mare.

Rezultatele au fost oarecum previzibile, scorurile cele mai mari de pozitivare fiind întâlnite în carcinoame moderat sau slab diferențiate, predominând cele de tip ductal invaziv, secundate de carcinomul medular, ce au o expresie slabă sau absentă a receptorilor hormonal. Un alt mod în care am folosit acești markeri, ceea ce sintetizează și originalitatea acestei teze, a fost în întocmirea unui scor prognostic.

Am selectat o serie de parametri clinici și histologici despre care se cunoaște că au o semnificație prognostică, i-am cuantificat, după care, prin suma lor, am ajuns la niște scale prognostice. Acestea s-au corelat semnificativ statistic cu expresia PDL1, ceea ce arată că:

1. Prognosticul unui carcinom mamar este invers proporțional cu expresia PDL1.
2. Pentru carcinoamele mamare cu un prognostic rezervat terapiile ce țintesc PDL-PDL1 pot constitui o soluție terapeutică validă.
3. Expresia PDL1 în tumoră poate fi orientativă în estimarea prognosticului, în absența altor date clinice și paraclinice.

## Bibliografie

(selectivă)

1. Acs G, Esposito NN, Rakosy Z, Laronga C, Zhang PJ (2010) Invasive ductal carcinomas of the breast showing partial reversed cell polarity are associated with lymphatic tumor spread and may represent part of a spectrum of invasive micropapillary carcinoma. *Am J Surg Pathol* 34: 1637–1646.
2. Ades F, Tryfonidis K, Zardavas D. The past and future of breast cancer treatment-from the papyrus to individualised treatment approaches. *Ecancermedalscience*. 2017 Jun 8;11:746. doi: 10.3332/ecancer.2017.746. PMID: 28690677; PMCID: PMC5481194.
3. Badu-Peprah A, Adu-Sarkodie Y. Accuracy of clinical diagnosis, mammography and ultrasonography in preoperative assessment of breast cancer. *Ghana Med J*. 2018 Sep;52(3):133-139. doi: 10.4314/gmj.v52i3.5. PMID: 30602798; PMCID: PMC6303551.
4. Bear HD, Anderson S, Smith RE et al. Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-27. *Journal of Clinical Oncology* 24(13), 2019-2027 (2006)
5. CNSISP: <https://cnsisp.insp.gov.ro/wp-content/uploads/2019/07/BI-CAUZE-DECES-2018.pdf>; . Site-ul CNSISP: <https://cnsisp.insp.gov.ro/wp-content/uploads/2018/03/BI-Cauze-Deces-an-2016.pdf>.
6. Clark GM (1994) Do we really need prognostic factors for breast cancer? *Breast Cancer Res Treat* 30(2): 117–126
7. Dai X, Li T, Bai Z, et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res*. 2015;5(10):2929-43. Published 2015 Sep 15.
8. Dowty JG, Win AK, Buchanan DD, et al. Cancer risks for MLH1 and MSH2 mutation carriers. *Hum Mutat*. 2013;34(3):490-7.
9. 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 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 12/May/2018.
10. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ, Panel members. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011 Aug; 22(8):1736-47.
11. Gong J, Chehrazi-Raffle A, Reddi S, Salgia R. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):8. Published 2018 Jan 23. doi:10.1186/s40425-018-0316-z
12. Hanemann JA, Miyazawa M, Souza MS. Histologic grading and nucleolar organizer regions in oral squamous cell carcinomas. *J Appl Oral Sci*. 2011;19(3):280-285. doi:10.1590/s1678-77572011000300018
13. Hartman M, Czene K, Reilly M, et al. Incidence and prognosis of synchronous and metachronous bilateral breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2007;25:4210-4216
14. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. (editors). *Cancer Statistics Review, 1975-2017*. Table 1.11: Median age of cancer patients at diagnosis, 2013-2017, by primary cancer site, race and sex. National Cancer Institute. Bethesda, MD. Accessed on April 27, 2020. [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2017/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/), 2020.
15. Javed A Lteif A. Development of human breast. 2013. *Seminars in Plastic Surgery*; 27:5-12.
16. Kurozumi S, Matsumoto H, Kurosumi M, et al. Prognostic significance of tumour-infiltrating lymphocytes for oestrogen receptor-negative breast cancer without lymph node metastasis. *Oncol Lett*. 2019;17(3):2647-2656. doi:10.3892/ol.2019.9938
17. Lips EH, Mulder L, de Ronde JJ, et al. Breast cancer subtyping by immunohistochemistry and histological grade outperforms breast cancer intrinsic subtypes in predicting neoadjuvant chemotherapy response. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;140(1):63-71.
18. Makki J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin Med Insights Pathol*. 2015;8:23-31. Published 2015 Dec 21. doi:10.4137/CPath.S31563
19. Medina D. The mammary gland: A unique organ for the study of development and tumorigenesis. 1996 *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1:5–19.
20. Montanaro, L., Treré, D., & Derenzini, M. (2008). Nucleolus, ribosomes, and cancer. *The American journal of pathology*, 173(2), 301–310. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070752>

21. Nikitin AG, Chudakova DA, Enikeev RF, et al. Lynch Syndrome Germline Mutations in Breast Cancer: Next Generation Sequencing Case-Control Study of 1,263 Participants. *Front Oncol.* 2020;10:666. Published 2020 May 29.
22. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12:252–64.
23. Rakha EA, D Soria, A R Green, C Lemetre, D G Powe, C C Nolan, J M Garibaldi, G Ball, I O Ellis. Nottingham Prognostic Index Plus (NPI<sub>+</sub>): a modern clinical decision making tool in breast cancer. *British Journal of Cancer* (2014) 110, 1688–1697 | doi: 10.1038/bjc.2014.120
24. Rizki H, Hillyar C, Abbassi O, Miles-Dua S. The Utility of Oncotype DX for Adjuvant Chemotherapy Treatment Decisions in Estrogen Receptor-positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-negative, Node-negative Breast Cancer. *Cureus.* 2020;12(3):e7269. Published 2020 Mar 14. doi:10.7759/cureus.7269
25. Ruddy KJ, E. P. Winer, Male breast cancer: risk factors, biology, diagnosis, treatment, and survivorship, *Annals of Oncology*, Volume 24, Issue 6, June 2013, Pages 1434–1443, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt025>
26. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 11; 98(19):10869-74.
27. Toland AE, Forman A, Couch FJ, Culver JO, Eccles DM, Foulkes WD, Hogervorst FBL, Houdayer C, Levy-Lahad E, Monteiro AN, Neuhausen SL, Plon SE, Sharan SK, Spurdle AB, Szabo C, Brody LC; BIC Steering Committee. Clinical testing of BRCA1 and BRCA2: a worldwide snapshot of technological practices. *NPJ Genom Med.* 2018 Feb 15;3:7. doi: 10.1038/s41525-018-0046-7. PMID: 29479477; PMCID: PMC5814433.
28. Tomes, L., Emberley, E., Niu, Y. et al. Necrosis and Hypoxia in Invasive Breast Carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 81, 61–69 (2003). <https://doi.org/10.1023/A:1025476722493>
29. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature.* 2014;515:568–71
30. van Middendorp JJ, Sanchez GM, BurrIDGE AL. The Edwin Smith papyrus: a clinical reappraisal of the oldest known document on spinal injuries. *Eur Spine J.* 2010;19(11):1815–1823. doi: 10.1007/s00586-010-1523-6.
31. Voinea OC, Birceanu Corobea A, Daniel I, Nica AE, Sajin M. Bilateral breast carcinoma – a study of patients admitted in a university emergency hospital. *Arch Balk Med Union* 2018; 53(3):336-342. DOI 10.31688/ABMU.2018.53.3.04
32. Voinea OC, Monica Mihaela C, Daniel I, et al. Histology of Male Breast Lesions. Series of Cases and Literature Review. *Maedica (Buchar).* 2018;13(3):196–201. doi:10.26574/maedica.2018.13.3.196
33. Warriar S, Tapia G, Goltsman, Beith J. An update in breast cancer screening and management. 2016. *Women's Health*, 12(2), 229-239.
34. Xin L, Liu YH, Martin TA, Jiang WG. The Era of Multigene Panels Comes? The Clinical Utility of Oncotype DX and MammaPrint. *World J Oncol.* 2017;8(2):34–40. doi:10.14740/wjon1019w
35. Yalaza M, İnan A, Bozer M. Male Breast Cancer. *J Breast Health.* 2016;12(1):1-8. Published 2016 Jan 1. doi:10.5152/tjbh.2015.2711

## Lista lucrărilor științifice publicate

1. Oana Cristina Voinea, Monica Mihaela Cîrstoiu, Daniel Ion, Maria Sajin, Adrian Vasile Dumitru, Oana Maria Pătrașcu, Dan-Corneliu Jinga, Adriana Elena Nica. Histology of Male Breast Lesions. Series of Cases and Literature Review. *Maedica (Buchar)*. 2018 Sep;13(3):196-201. doi: 10.26574/maedica.2018.13.3.196. PMID: 30568739; PMCID: PMC6290180.

- <https://www.maedica.ro/histology-of-male-breast-lesions-series-of-cases-and-literature-review/>

2. Voinea Oana Cristina, Adelina Birceanu Corobea, Daniel Ion, Adriana Elena Nica and Maria Sajin. Bilateral breast carcinoma – a study of patients admitted in a university emergency hospital. (2018) Sep; 53(3):336-342. <https://doi.org/10.31688/ABMU.2018.53.3.04>.

- <https://umbalk.org/bilateral-breast-carcinoma-a-study-of-patients-admitted-in-a-university-emergency-hospital/>

## Lucrări prezentate la manifestări științifice:

### *Prezentare orală*

Voinea, O. C.; Dumitru, A.; Georgescu, T.; Sajin, M. Male breast carcinoma in a Romanian series of cases. 31<sup>st</sup> European Congress of Pathology, Nice, France, 7-11 Sept 2019.

## Contracte de cercetare și studiu

- Cercetarea a beneficiat de sprijinul PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0833 contract nr. 68 PCCDI/2018-PROIECT 1 cu titlul „Diagnostic, tratament și factori predictivi în cancerul de sân” (ONCOGIN)
- Parțial lucrarea a fost finanțată prin contractul de studii doctorale RESEARCH 62 – „Doctorat in context european”, contract POSDRU/187/1.5/S/156069/
- Bursa ESP Giordano Fellowship – IRCC Candiolo, Italia, 05-08. 2017, având ca obiect aprofundarea și completarea cunoștințelor referitoare la patologia mamară într-un centru de excelență oncologică dedicat, sub îndrumarea Prof Dr. Anna Sapino.