

**VICTOR BABEȘ UNIVERSITY OF MEDICINE
AND PHARMACY TIMIȘOARA
FACULTY OF MEDICINE
DEPARTAMENT II – MICROSCOPIC
MORPHOLOGY / HISTOLOGY**

FLORONI ERWIN



TEZĂ DE DOCTORAT

rezumat

**MARKERI MOLECULARI CU ROL PREDICTIV PENTRU
RECURENȚA ȘI METASTAZAREA CANCERULUI
MAMAR**

Coordonator științific
PROFESSOR UNIV. DR. MARIUS RAICA

**Timișoara
2022**

CUPRINS

GENERAL PART	Error! Bookmark not defined.
I.BRIEF OF EPIDEMIOLOGY	4
2. THE DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC ROLE OF CONVENTIONAL HISTO-PATHOLOGICAL CLASSIFICATION	4
3. NATURAL EVOLUTION OF BREAST CANCER	5
4. MOLECULAR CLASSIFICATION: CHARACTERIZATION AND IMPACT ON THERAPY	5
5. ELEMENTS WITH A PREDICTIVE ROLE FOR LYMPH NODE METASTASES	6
THE ORIGINAL PART	Error! Bookmark not defined.
ii.1. MOTIVATION AND GOALS.....	6
ii.2. CASE SELECTION.....	6
ii.3. Primary processing of specimens and usual stains.....	8
ii.4. Evaluation of the degree of differentiation, G and the Nottingham prognostic score	8
ii.5. Immunohistochemical methods.....	8
ii.6. Methods of interpretation and quantification.....	8
ii.7. Microscopic image acquisition and analysis.....	9
ii.8. Statistical analysis	9
iii. RESULTS.....	9
iii.1. Reporting of histopathological results and grade of differentiation.....	9
iii.2. MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PRIMARY TUMORS.....	10
iii.3. COMPARISON BETWEEN THE MOLECULAR PROFILE OF THE PRIMARY TUMOR AND LYMPH NODE METASTASES	11
iii.4. Immunohistochemical expression of androgen hormone receptors in molecular types of breast carcinoma	12
iii.5. DIFFERENTIAL EXPRESSION OF MAMAGLOBIN A IN THE PRIMARY TUMOR AND LYMPHONICAL METASTASES	13
iii.6. THE PECULIARITIES OF THE MICROENVIRONMENT IN PRIMARY TUMORS OF THE BREAST.....	14
FINAL CONCLUSIONS AND ORIGINAL CONTRIBUTIONS	16
Bibliography.....	19

INTRODUCERE

Această teză de doctorat este o parte din interesul în cercetarea cancerului mamar al unui grup de cercetători din cadrul Disciplinei de Histologie din Timișoara și continuă ideile care s-au născut de-a lungul timpului în acest grup. De asemenea cu rezultatele obținute, sperăm că această muncă oferă perspective noi pentru viitorii doctoranzi.

Motivația alegerii acestei teme. Cancerul mamar este în prezent cea mai frecventă neoplazie a sexului feminin, asociată cu morbiditate și mortalitate crescută în toate țările care raportează această afecțiune în baza unui registru național de cancer. Numărul mare de cazuri a condus la inițierea numeroase studii clinice, imagistice, patologice și moleculare prin care s-a încercat cunoașterea aprofundată a evoluției naturale a acestei afecțiuni. În ultimele decade s-au făcut progrese remarcabile în domeniul diagnosticului precoce prin acțiuni de screening clinic și imagistic, au fost introduse metode terapeutice noi. În ciuda acestor eforturi nu s-a constatat o reducere proporțională a morbidității și a mortalității, cu cea mai mare probabilitate generată de heterogenitatea cancerului mamar.

Clasificarea convențională patologică sau moleculară oferă informații legate de prognosticul asupra posibilei dezvoltări a recidivelor locale și asupra predicției metastazelor ganglionare. Acest lucru se datorează cel mai probabil testării moleculare numai a tumorii primare în majoritatea cazurilor. Ipoteza de lucru de la care plecăm în cercetarea de față se referă tocmai la acest aspect și anume: profilul molecular al tumorii primare nu este neapărat identic cu cel al metastazelor corespunzătoare ganglionilor și al metastazelor la distanță. Acest aspect ar putea avea implicații majore asupra strategiei terapeutice adjuvante, atât convenționale, cât și bazate pe agenți biologici, precum anticorpii monoclonali.

Importanța actuală a cercetării. Evoluția naturală a cancerului mamar este complexă și s-a demonstrat că aproape fiecare tip molecular metastazează preferențial. De maximă importanță sunt metastazele limfonodale a căror prezență și profil molecular sunt decisive pentru strategia terapeutică. Deși toate publicațiile referitoare la acest subiect semnalează importanța metastazării pe cale limfatică, până în prezent nu este cunoscută modalitatea prin care primele celule tumorale pătrund în vasele limfatice. Așa cum se constată din datele de mai sus, există încă numeroase discuții, controverse și incertitudini referitoare la profilul molecular și rolul său definit în tratamentul pacientelor. În plus, deși există sisteme de gradare, de analiză genică și de profil molecular, încă nu dispunem de elemente predictive pentru existența metastazelor prin examinarea tumorii primare. Având în vedere consensul asupra clasificării moleculare de la Saint Gallen 2016, și importanța subiectului, în lucrarea de față ne-am propus să investigăm un panel extensiv de markeri moleculari pentru a aprecia dacă au sau nu impact prognostic asupra metastazării.

În lucrarea de față, am aplicat metode morfologice, histochimice și imunohistochimice la toate cazurile incluse în studiu. Considerăm reprezentativ numărul de cazuri incluse în studiul de față, asigurând reproductibilitatea rezultatelor. Au fost selectate metodele recomandate de diagnostic molecular recomandate de OMS, dar și câțiva markeri care în prezent sunt de valoare incertă. Toate procedurile au fost efectuate într-un sistem automat care a asigurat consistența în ceea ce privește incubarea cu anticorpii primari și a avut același timp de incubare pentru agentul de vizualizare. Aceste aspecte au fost importate în special pentru notarea rezultatelor, cu implicații directe în interpretarea și analiza punctajului. Pentru procesele de scoring au fost alese metodele verificate de colectivele internaționale de experți, precum

interpretările pentru receptorii hormonal și HER2. Aceste metode au fost aplicate retrospectiv la seriile de cazuri incluse în această teză, dar pot fi aplicate în uz curent pentru diagnosticele patologice și moleculare curente, la cazurile selectate în mod prospectiv. Marca originalității la capitolul materiale și metode iese în evidență la capitolul micromediul tumoral, unde datele din literatură de specialitate sunt slabe sau lipsesc astfel încât considerăm că unele metode de evaluat din acest capitol au o notă de originalitate.

Noi perspective și direcții dezvoltate prin acest studiu. Rezultatele obținute în prezenta cercetare relevă o serie de perspective asupra aplicării metodelor morfologice, histochemice și imunohistochemice în perfecționarea diagnosticului histopatologic, evaluarea prognosticului și eficacitatea terapiei. Prin rezultatele obținute în special în aplicarea clasificării moleculare și compararea cu profilul imunohistochimic al metastazelor ganglionare se poate spera la rafinarea și specializarea strategiei terapeutice. Prin rezultatele obținute în ceea ce privește exprimarea hormonilor androgeni și a mamoglobinei A, credem că s-au deschis noi posibilități terapeutice pentru cazurile hormonorezistente la terapia convențională. O mențiune suplimentară pentru elementele stromei tumorale, cunoscute sub denumirea de micromediu tumoral, care pe de o parte introduce noi elemente de prognostic și, pe de altă parte, identifică o serie de noi ținte terapeutice, cum ar fi mastocitele.

Poate că realizarea acestui studiu nu ar fi fost posibilă fără ajutorul colegilor din spitalele din Timișoara, Arad și Cluj, care au participat cu numeroase cazuri. Mulțumim conducerii Universității de Medicină și Farmacie Victor Babeș din Timișoara pentru cadrul creat pentru realizarea acestei lucrări și, în special, disciplinei de Histologie, unde s-au realizat preparatele imunohistochemice. Mulțumiri colegilor de la Spitalul Teodor Andrei din Lugoj, care și-au pus indirect amprenta asupra acestei cercetări. Sperăm ca prin rezultatele noastre să aducem date suplimentare la caracterizarea cancerului de sân, propunând câteva elemente cu rol predictiv pentru propagarea și dezvoltarea metastazelor ganglionare.

I. PARTEA GENERALĂ

I.1. SCURTĂ EPIDEMIOLOGIE

Incidența și mortalitatea prin cancer crește rapid în întreaga lume. Principalele motive reflectă în special două aspecte: creșterea semnificativă a populației globului și creșterea duratei medii de viață, la care se adaugă modificări calitativ-cantitative ale factorilor de risc consecutivi dezvoltării socio-economice [1]. Date clare privind incidența și mortalitatea cancerului de sân au fost publicate pentru multe regiuni ale globului, dar aceste aspecte sunt neclare sau chiar confuze pentru țările care nu au nici măcar un registru național al cancerului. Cancerul de sân este neoplazia cel mai frecvent diagnosticată și prima cauză de deces la femei din întreaga lume.

I.2. ROLUL DIAGNOSTIC ȘI PROGNOSTIC AL CLASIFICĂRII HISTOPATOLOGICE CONVENȚIONALE

Carcinomul mamar este cea mai frecventă tumoră malignă a sexului feminin și principala cauză de deces prin cancer, anual înregistrându-se în lume peste 1.000.000 de cazuri noi. Numai în SUA se înregistrează anual peste 100.000 de cazuri noi și peste 30.000 de decese specifice. Incidența carcinomului mamar este de 91.4‰ în America de Nord și Europa, intermediară în sudul Europei și America de Sud și redusă

În majoritatea țărilor africane și asiatice. Diagnosticarea unui mare număr de cazuri aflate în stadii timpurii de evoluție se datorează introducerii pe scară largă a mamografiei. Întrucâtva surprinzător, detecția precoce nu a modificat semnificativ rata mortalității, care nu s-a modificat semnificativ între 1970 și 1990.

Diagnosticul histopatologic al specimenelor de tumori mamare prelevate prin excizie sectorială, radicală, asociată sau nu cu limfodisecție, precum și prin puncție biopsie la unele cazuri, este capital pentru stabilirea diagnosticului de malignitate. Nu se aplică niciun tratament oncologic în absența confirmării histopatologice a malignității. Din acest punct de vedere, histopatologia convențională rămâne o investigație obligatorie la pacientele cu cancer mamar, în ciuda faptului că au apărut numeroase date de biologie moleculară, la care ne vom referi în capitolele care urmează. Diagnosticul histopatologic al tumorii primare și identificarea metastazelor mai ales limfonodale a dominat strategia terapeutică chirurgicală, radioterapia și chimioterapia, deja standardizate pentru această afecțiune neoplazică.

I.3. EVOLUȚIA NATURALĂ A CANCERULUI MAMAR

Progresia carcinoamelor mamare se realizează prin invazie directă, pe cale limfatică și sanguină. În unele cazuri, metastazele sunt deja prezente în momentul diagnosticului, iar altele devin manifeste clinic după luni, ani sau chiar decade de la terapia inițială.

Invazia locală poate fi observată în parenchimul mamar, mamelonar, piele, fascia pectorală sau alte structuri ale peretelui toracic. Invazia stromei mamare se poate produce prin extensie directă, prin vasele limfatice intra-mamare, și posibil, prin spațiile tisulare cunoscute sub numele de hiperplazie stromală pseudoangiomatoasă. Gradul invaziei locale este în general mai mare în carcinomul lobular invaziv și variantele sale, probabil datorită absenței cadherinei E din celulele tumorale. Frecvența invaziei microscopice în afara glan-dei mamare a fost studiată pe specimene de excizie locală, cu margini de siguranță de 2 cm. Dintre carcinoamele cu diametru sub 1 cm, 11% au prezentat carcinom invaziv rezidual și 22% au prezentat carcinom in situ rezidual. Importanța evaluării microscopice a invaziei locale este în prezent mai mare, deoarece a crescut semnificativ diversitatea procedurilor chirurgicale conservatorii [12, 13].

I.4. CLASIFICAREA MOLECULARĂ: CARACTERIZARE ȘI IMPACT ASUPRA TERAPIEI

În ciuda progreselor remarcabile în domeniul oncologiei, atât în diagnostic, cât și în terapie, cancerul de sân continuă să reprezinte cea mai frecventă neoplazie la femeie, împovărată cu o rată ridicată a mortalității. Numai în 2006, peste 200.000 de cazuri noi și peste 40.000 de decese specifice au fost raportate în Statele Unite. [18].

O îmbunătățire semnificativă s-a obținut în ultimele trei decade prin evaluarea unor markeri utili în farmacodiagnostic (receptorii hormonal, markerul de proliferare Ki67 și factorul de creștere epidermal, HER2). S-a observat că pacientele cu cancer mamar pot fi stratificate pe baza expresiei acestor markeri, așa cum s-a demonstrat prin analiză genică sau/și imunohistochimie/ s-au acumulat suficient de multe dovezi care demonstrează impactul direct al receptorilor hormonal și a HER2 asupra terapiei, fără corelație statistic semnificativă cu tipurile convenționale de carcinom mamar. Aceste diferențe sunt generate cu cea mai mare probabilitate de faptul că leziuni proliferative distincte molecular au fost grupate în tipuri clinice pe baza unor criterii

morfologice comune. Într-o încercare de a re-zolva această problemă, tumorile maligne mamare au fost clasificate pe baza expresiei pro-filului genic și ulterior, a expresiei imunohistochimice a citokeratinei 5 și 8/18, receptorilor hormonal, HER2 și EGFR. Această clasificare, care recunoaște tipurile luminal, bazal-like, HER-2 și neclasificabile, a avut impact imediat asupra strategiei terapeutice, observându-se că tipurile moleculare caracterizate răspund diferit la chimioterapia preoperatorie și la terapia adjuvantă postoperatorie.

I.5. ELEMENTE CU ROL PREDICTIV PENTRU METASTAZELE LIMFONODALE

Progresia carcinoamelor mamare se realizează prin invazie directă, pe cale limfatică și sanguină. În unele cazuri, metastazele sunt deja prezente în momentul diagnosticului, iar altele devin manifeste clinic după luni, ani sau chiar decade de la terapia inițială.

Invazia locală poate fi observată în parenchimul mamar, mamelonar, piele, fascia pectorală sau alte structuri ale peretelui toracic. Invazia stromei mamare se poate produce prin extensie directă, prin vasele limfatice intramamare, și posibil, prin spațiile tisulare cu-noscute sub numele de hiperplazie stromală pseudoangiomatoasă. Gradul invaziei locale este în general mai mare în carcinomul lobular invaziv și variantele sale, probabil datorită absenței cadherinei E din celulele tumorale. Frecvența invaziei microscopice în afara glan-dei mamare a fost studiată pe specimene de excizie locală, cu margini de siguranță de 2 cm. Dintre carcinoamele cu diametru sub 1 cm, 11% au prezentat carcinom invaziv rezidual și 22% au prezentat carcinom in situ rezidual. Importanța evaluării microscopice a invaziei locale este în prezent mai mare, deoarece a crescut semnificativ diversitatea procedurilor chirurgicale conservatorii [50].

Recurențele locale după mastectomie apar ca noduli superficiali în sau în vecinătatea cicatricei sau ca noduli subcutanați parasternali. Natura lor malignă trebuie documentată întotdeauna prin biopsie, deoarece astfel de noduli pot fi rezultatul unui granulom de corp străin sau a altui proces infecțios. Deși pacientele cu recurență locală au risc mai mare pentru metastaze la distanță, acest eveniment este parțial independent care apare în diferite momente ale evoluției bolii. Recurențele locale după mastectomie se dezvoltă adesea în aceeași arie mamară, ceea ce i-a determinat pe unii autori să recomande excizia în bloc a masei tumorale împreună cu sistemul ductal asociat [52].

PARTEA ORIGINALĂ

II.1. MOTIVAȚIE ȘI OBIECTIVE

Obiectivele științifice care se propun a fi rezolvate în cadrul cercetării. În cercetarea de față ne-am propus să rezolvăm mai multe obiective, pe care le considerăm a fi de importanță diagnostică și prognostică pentru deznodământul histopatologic al cancerului de sân. Aceste obiective sunt următoarele:

- Evaluarea morfologică și aprecierea gradului de diferențiere în toate cazurile incluse în studiul de față. Pentru studiu au fost selectate cazuri cu forme histopatologice frecvent observate și care reprezintă majoritatea absolută în toate laboratoarele de histopatologie. Pentru acuratețea raportării, au fost excluse cazurile cu forme particulare, leziuni incerte sau cu un profil particular atipic.

- Investigarea profilului imunohistochimic al cazurilor, conform recomandărilor Conferințelor din St Gallen, care include, pe lângă markerii convenționali (ER, PR, HER2, Ki67) și markeri suplimentari (EGFR, p53, Bcl-2, citokeratină). 5), care permit rafinarea clasificării în cinci tipuri moleculare majore de carcinom. În mod similar, a fost testată utilitatea markerilor încă incerti pentru clasificare, cum ar fi E-cadherina.
- Compararea profilului molecular al tumorii primare cu profilul metastazelor ganglionare corespunzătoare. Considerăm că din punct de vedere practic, această parte a tezei are cea mai mare valoare prin impactul asupra strategiei terapeutice.
- În cele mai multe cazuri, evaluarea imunohistochimică ia în considerare receptorii pentru hormonii estrogen și progesteron. Doar rar este investigată expresia receptorilor pentru hormonii androgeni, cel mai probabil pentru că nu au efect imediat asupra terapiei hormonale. Pe de altă parte, receptorii de androgeni pot reprezenta o țintă terapeutică atractivă în cazurile rezistente la terapia cu receptorii anti-estrogeni. Din acest motiv, unul dintre scopurile studiului a fost evaluarea imunohistochimică a receptorilor hormonilor androgeni și relația acestora cu forma și prognosticul histopatologic.
- În același context, ne-am propus să evaluăm expresia Mamaglobinei A, care s-a dovedit a avea o mare specificitate pentru țesutul mamar normal și patologic. Deși cunoscută de câteva decenii, mamaglobina A a fost investigată doar din punct de vedere diagnostic și nu mult din perspectiva caracterului ei predictiv în evoluția neoplaziei. Din acest motiv, unul dintre obiectivele lucrării a fost analiza imunohistochimică detaliată a expresiei acestui marker în cazurile incluse în studiu.
- Pe perioade lungi de timp, celulele tumorale au reprezentat principala și chiar singura țintă a cercetării și strategiei terapeutice în oncologie mamară. Practic, și astăzi, întreaga strategie terapeutică este îndreptată către celulele tumorale (ca excepție recentă amintim terapia antiangiogenică). Din aceste motive, în ultima parte a cercetării de față ne-am concentrat observațiile asupra stromei tumorale, și în special asupra unor componente care par să joace un rol important în progresia neoplaziei și chiar în procesul de metastazare. Din aceste puncte de vedere, observațiile noastre s-au concentrat în special asupra fibroblastelor CD34-pozitive, macrofagelor, mastocitelor și fibrelor elastice.

II.2. PACIENȚI, MATERIAL ȘI METODE

II.2. SELECȚIA CAZURILOR

În studiul de față au fost incluse 156 de paciente la care cancerul mamar a fost diagnosticat histopatologic. Criteriile de includere în studiu au fost următoarele: cunoașterea detaliată a stadierii, cunoașterea clasificării tumorii după sistemul TNM și existența speci-menelor de tumoră primară și a limfonodulilor axilari corespondenți. Cele 156 de blocuri la parafină au fost selecționate retrospectiv de la Spitalul Județean Timișoara (32 de cazuri), Spitalul Județean Arad (50 de cazuri), Institutul Oncologic Chișinău, Republica Moldova (46 de cazuri) și Institutul Oncologic Cluj Napoca (28 de cazuri). Toate speci-menele au fost re-incluzionate în sistem automat standardizat, atât pentru tumora primară, cât și pentru limfonodulii axilari cu sau fără metastaze. Pacientele au avut vârsta cuprinsă între 34 și 82 de ani. Au fost selectate cazurile diagnosticate cu carcinom mamar invaziv de tip ductal NST sau lobular, forme particulare (mucinos, medular, papilar) cu sau fără recurență locală, cu și fără metastaze limfonodale axilare.

II.3. PROCESAREA PRIMARĂ A SPECIMENELOR ȘI COLORAȚIILE UZUALE

Procesarea primară a materialului biologic a fost identică la toate speci­menele. Țe-suturile prelevate au fost fixate timp de 24-48 ore în formalină tamponată 10%, PH 7,2-7,4. Materialul a fost inclus în Paraplast High Melt (Leica Biosystems). Întru evitarea diver-gențelor posibile legate de procesarea materialului, tumora primară și metastaza limfonoda-lă au fost incluzionate în același bloc. Secțiunile seriate (realizate cu microtomul Shandon, HM355S Automatic Microtome, Thermo Scientific, USA) cu grosimea de 3-5 micrometri au fost etalate pe lame silanate (S3003, Dako, Denmark). Toate secțiunile au fost colorate inițial prin metoda clasică, cu hematoxină-eozină utilizând hematoxină Harris (HHS32, SigmaAldrich) și eozină CS701 (Dako, Denmark). În lotul cu patologii mamare s-a deter-minat tipul și gradul histologic al carcinomului, prezența metastazelor în noduri limfatici axilari ipsilaterali.

II.4. EVALUAREA GRADULUI DE DIFERENȚIERE, G ȘI SCORUL PROGNOSTIC NOTTINGHAM

Gradarea histopatologică am realizat-o folosind sistemul Scarff-Bloom-Richardson, recomandat de OMS (2003), care include (Ellis et al, 2003): A. Formarea structurilor tubulare (ca expresie a diferențierii glandulare): 1. în majoritatea tumorii (>75%)- 1 punct; 2. în 10-75% suprafață – 2 puncte; 3. mai puțin de 10% sau absent – 3 puncte. B. Pleomorfismul nuclear: 1. nucleii mici, cu variații minime de formă și mărime – 1 punct; 2. nucleii cu variație moderată de mărime și formă – 2 puncte; 3. nucleii cu variație marcată de mărime și formă – 3 puncte. C. Figuri mitotice (la obiectiv Plan Fluor 40x/0,75 WD-0,44) - media calculată la 10 câmpuri): 1. până la 5 mitoze pe câmp – 1 punct; 2. 6-10 mitoze – 2 puncte; 3. mai mult de 11 mitoze – 3 puncte.

Gradarea carcinomului (suma A+B+C): G1 (tumoră înalt diferențiată) – 3-5; G2 (tumoră cu grad mediu de diferențiere) – 6-7; G3 (tumoră slab diferențiată) – 8-9.

II.5. METODE IMUNOHISTOCHIMICE

Toate procedeele de deparafinare, demascare și vizualizare s-au efectuat automat, utilizând aparatul Leica Bond-Max (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), autmat de colo-rare: deparafinarea în 2 băi de Bond Dewax Solution (cod AR9222) a 5 minute fiecare, ur-mată de 3 băi în alcool de 100%, 90% și 70% de 2 minute fiecare, rehidratare timp de 5 mi-nute în apă distilată. Pentru blocarea activității peroxidazei endogene secțiunile au fost tra-tate timp de 5 minute cu Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution (S2023, Dako). Con-tracolorarea nucleilor s-a efectuat cu hematoxină Mayer, modificată după Lille (HMM500, ScyTek Laboratories, Inc.). Ulterior piesele histologice au fost deshidratate manual în solu-ții crescătoare de alcool etilic (70-100%), clarificate cu xilen și montate. Pentru montarea pieselor am folosit soluția Leica CV Mount (Leica Biosystems, cod 14046430011).

II.6. METODE DE INTERPRETARE ȘI CUANTIFICARE

Cuantificarea celulelor marcate cu ER, PR, AR și Ki67 s-a efectuat în baza metodei semiautomate propuse de Suci­u et al (2014) [66]. Această metodă constă în cuantificarea a cel puțin 10 câmpuri la obiectiv x40 cu cel mai înalt număr de celule tumorale marcate (sau cel puțin 1000 celule tumorale total), finalizată prin evaluarea

mediei în procente. Pentru a facilita evaluarea numerică, câmpurile tumorale alese au fost capturate JPEG, și inversate cu programul NIS-elements D2.30 (Nikon Instruments Europe BV). Cuantificarea s-a efectuat la microscopul Nikon Eclipse 80i, cu cameră video ajustată Nikon DS-Fi1 (Nikon Instruments Europe BV). Imaginile de ansamblu au fost obținute la stereomicroscopul AxioZoom.V16, obiectiv PlanNeoFluor Z1x/0,25, cu cameră video AxioCam MRc (Carl Zeiss, Germany).

Scorificarea expresiei anticorpilor. Evaluarea numerică a markerilor hormonal pentru ER, PR și AR s-a finalizat prin calcularea scorului Allred (Allred et al, 1998), care a inclus combinarea procentului de celule imunomarcate cu intensitatea colorării nucleare. Scorul Allred este o metodă semicantitativă de evaluare a expresiei receptorilor hormonal și s-a demonstrat a fi corelabilă cu prognosticul și răspunsul la terapia hormonală [68, 69].

II.7. ACHIZIȚIA ȘI ANALIZA IMAGINII MICROSCOPICE

Examinarea s-a efectuat cu ajutorul microscopului optic Nikon Eclipse600, imagini-le fiind preluate cu ajutorul camerei digitale Coolpix950. Analiza imaginii microscopice s-a efectuat cu programul LuciaNet (Nikon), pe imagini achiziționate JPEG, la calibrare x400.

II.8. ANALIZA STATISTICĂ

Testele statistice au fost realizate în programul SPSS 22.0 software pentru Windows 8 (SPSS Inc, Chicago, IL). O valoare $p < 0.05$ a fost considerată semnificativă. Raportarea finală s-a efectuat în termeni descriptivi pentru toate cazurile și statistici pentru subploturile definite mai sus. Variabilele continue au fost prezentate ca medie, iar variabilele categorice au fost prezentate numeric și procentual.

III. REZULTATE

III.1. RAPORTAREA REZULTATELOR HISTOPATOLOGICE ȘI A GRADULUI DE DIFERENȚIERE

Pentru diagnosticul histopatologic și stabilirea gradului de diferențiere am examinat secțiunile colorate cu metoda de rutină hematoxilină-eozină, efectuată conform protocolului precizat mai sus. Așa cum reiese din tabelul nr 1, majoritatea cazurilor din acest studiu au fost de tip carcinom ductal invaziv, caracterizat prin modificări arhitecturale și celulare majore. Nu au mai fost identificate lobulația și unitățile terminal lobulare ale țesutului mamar normal, fiind înlocuite de o proliferare neregulată, care la unele cazuri schițează încă formarea de glande, dar în majoritatea celulele proliferază sub formă de cordoane, trabeculi sau insule de diferite dimensiuni (fig.1a). În majoritatea cazurilor nu au mai fost identificate diferențe structurale între celulele lumenale și bazale, cu excepția leziunilor de carcinom ductal in situ. Celulele tumorale au prezentat aspecte foarte variate, cu modificări nucleare uneori severe, care sunt reflectate în aprecierea gradului de diferențiere (fig.1b). stroma tumorală a fost variabilă cantitativ, unele cazuri prezentând cantități reduse celular-fibrilare, dispuse printre insulele de celule tumorale (fig.1c), iar altele au prezentat cantități importante de stromă constituită în special din elemente fibrilare (fig.1d). Deși observațiile noastre se bazează pe criteriile generale de diagnostic histopatologic din cancerul mamar, ne-a atras atenția heterogenitatea atât morfologică, cât și arhitecturală, nu numai a poziției celulelor tumorale, ci și a micromediului tumoral. Forma histopatologică de carcinom nu s-a corelat statistic semnificativ cu niciunul

dintre factorii clinico-patologici de prognostic, inclusiv predicția metastazelor limfonodale ($p=0.24$).

Cu toate acestea, am identificat limfocite dispuse difuz în carcinoamele medulare. Acestea au fost caracterizate prin celule tumorale mari cu nuclei voluminoși și nucleoli proeminenți, cu o modificare majoră a raportului nucleocitoplasmatic și stromă tumorală redusă cantitativ. În 9 cazuri, diagnosticul a fost carcinom metaplazic (fig. 1e), unde principala caracteristică observată a fost tendința celulelor tumorale de a deveni fusiform, precum și cantitatea redusă de stromă în zona tumorii.

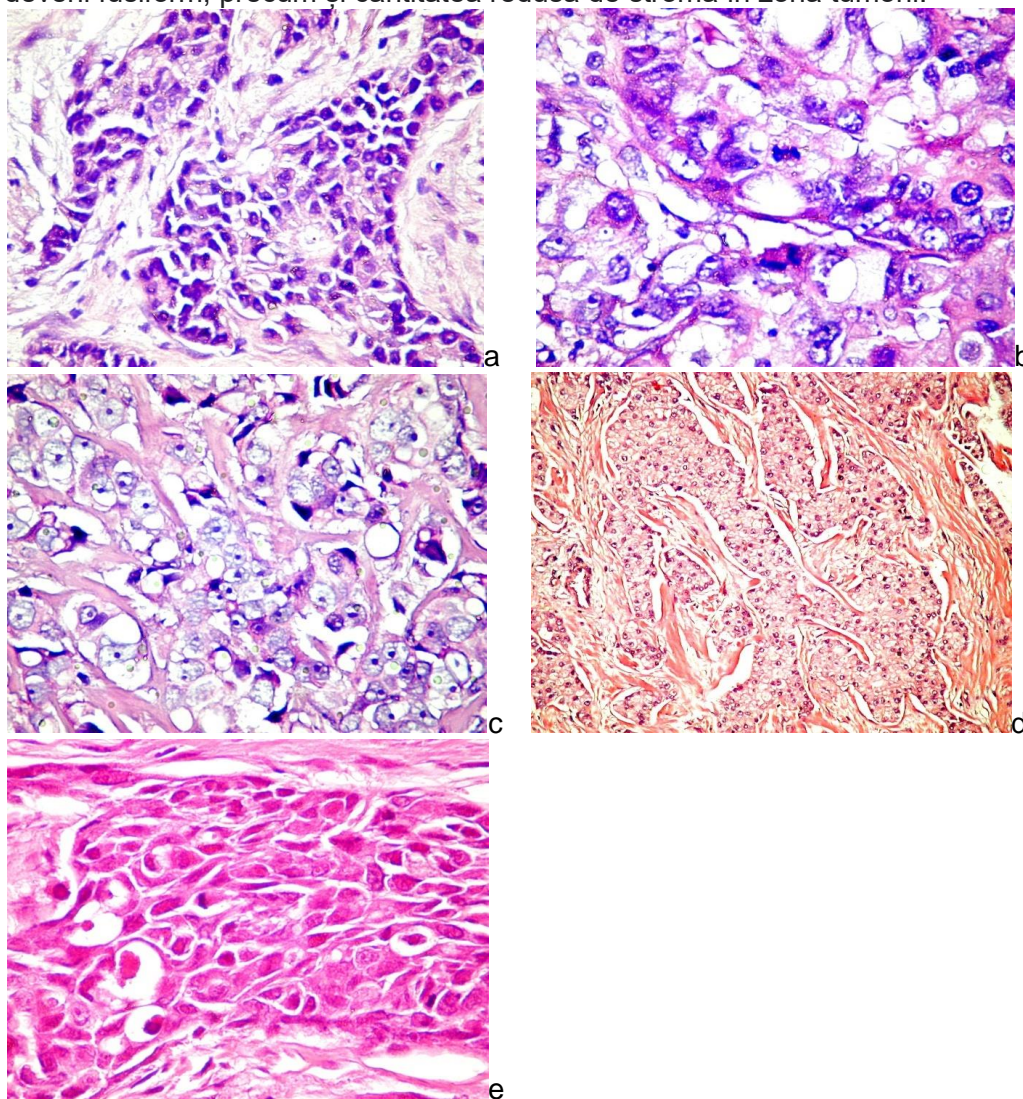


Fig.1. Arhitectură dezorganizată, celule tumorale dispuse în trabeculi ramificate și anasto-mozate. Carcinom ductal invaziv (a, x200). Carcinom metaplazic (b, x200). Carcinom ductal invaziv solid, cu celule dispuse în grupuri mici compacte și stromă relativ bine reprezentată (c, x200). Carcinom ductal invaziv cu stromă tumorală bogată (d, x100). Carcinom metapla-zic (e, x200). Colorație hematoxină-eozină

III.2. CARACTERIZAREA MOLECULARĂ A TUMORILOR PRIMARE

Analiza genică este metoda prin care au fost inițial caracterizate tipurile moleculare de carcinom mamar. Metoda este însă sofisticată din punct de vedere

tehnic, scumpă, și nu poate fi încă aplicată pe scară largă. Imunohistochimia s-a demonstrat a fi un bun surogat pentru analiza genică și numeroase studii pe serii mari de bolnave au demonstrat concordanță remarcabilă a rezultatelor celor două metode. Avantajele imunohistochimiei sunt în special legate de potențiala aplicare la toate bolnavele și de costul semnificativ mai mic al investigației. De aceea în prima etapă am realizat validarea calitativă a metodelor imuno-histochimice selecționate pentru clasificare moleculară, și verificarea acurateții prin studiul secțiunilor control intern și extern. Pentru realizarea acestui obiectiv, am testat toate cazurile incluse în studiul de față pentru expresia ER, PR, HER2, Ki67, EGFR, citokeratina 5, p53, Bcl2. Pe lângă markerii deveniți clasici în definirea tipurilor moleculare de cancer mamar, am adăugat și E-cadherina, controversată ca valoare din acest punct de vedere.

Am studiat în particular E-cadherina, care se exprimă cu atât mai intens cu cât tumora este mai bine diferențiată. Produsul final de reacție este intens colorat, cu intensificare semnificativă membranară (fig.8), cu variate modele de distribuție a produsului final de reacție. Controlul pozitiv a fost reprezentat de către epiderm, cu reacție membranară tipică, mai intensă la celulele din straturile profunde (fig.8a). Intensitatea reacției a fost variabilă în celulele tumorale de la slabă și heterogenă (fig.8b), până la intensă și omogenă (fig.8c). Nu am observat diferențe semnificative de expresie între tumorile primare și expresia E-cadherinei în metastazele limfonodale axilare corespondente (fig.8d).

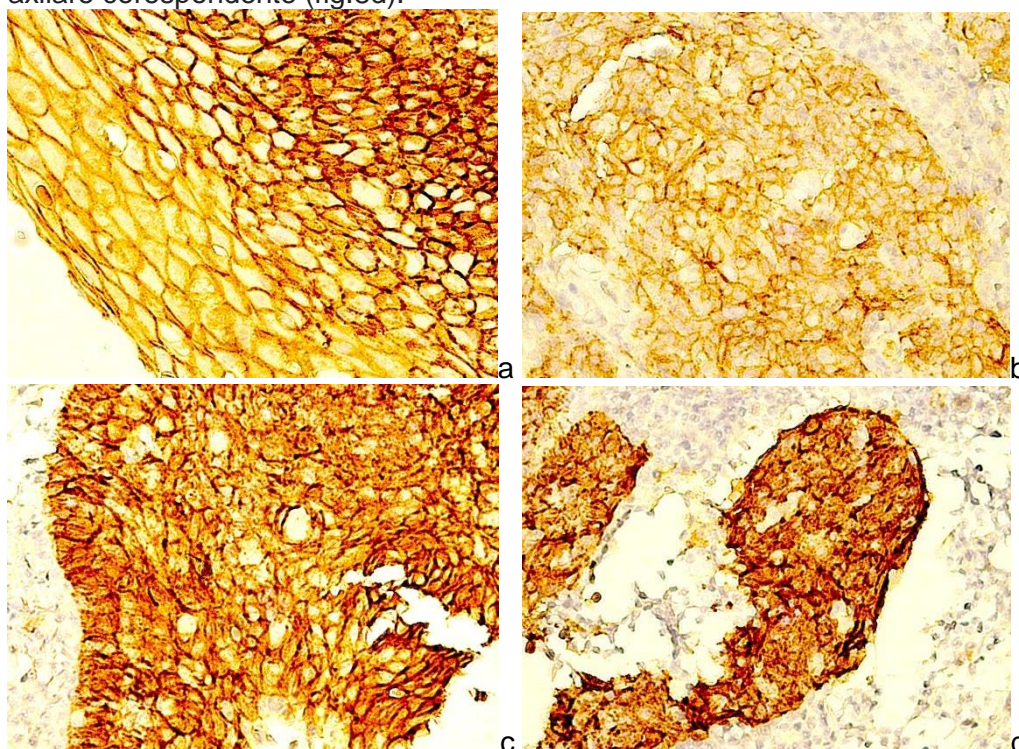


Fig. 8. Expresia E-Cadherinei în carcinomul mamar, modele de distribuție. Controlul pozitiv ex-tern, epiderm (a). Reacție pozitivă cu intensitate slabă și distribuție heterogenă a produsului final de reacție (b). Imunoreacție intens pozitivă cu distribuție omogenă (c). Metastază limfonodală cu toate celulele intens pozitive, la fel ca și în tumora primară din imagine pre-cedentă. Mărire originală x400.

III.3. COMPARAȚIA DINTRE PROFILUL MOLECULAR AL TUMORII PRIMARE ȘI A METASTAZELOR LIMFONODALE

Dintre cele 156 de cazuri incluse în studiul prezent, 80 au prezentat metastaze lim-fonodale (51.28%). Metastazele au fost prezent în majoritatea cazurilor în spațiul subcapsu-lar și mai rar au ocupat cea mai mare parte a parenchimului limfonodal. Am remarcat faptul că metastazele sunt prezent independent de statusul limfonodal din punct de vedere al orga-nizării țesutului limfoid (fig.9), așa încât am remarcat depozite de celule maligne chiar în limfonodulii atrofici. În multe dintre cazuri colorația hematoxilină-eozină este suficientă pentru detecția metastazelor, deși un procentaj semnificativ de specimene poate prezenta micrometastaze, care pot fi confirmate prin colorațiile imunohistochemice cu citokeratină sau/și mammaglobină A.

HER2 a fost pozitiv la 31 dintre cazuri. A fost forma cea mai stabilă pe materialul nostru, doar patru cazuri fiind discordante. Unul dintre ele a fost negativ în tumora primară și pozi-tiv cu +3 în metastaza limfonodală (fig.12).

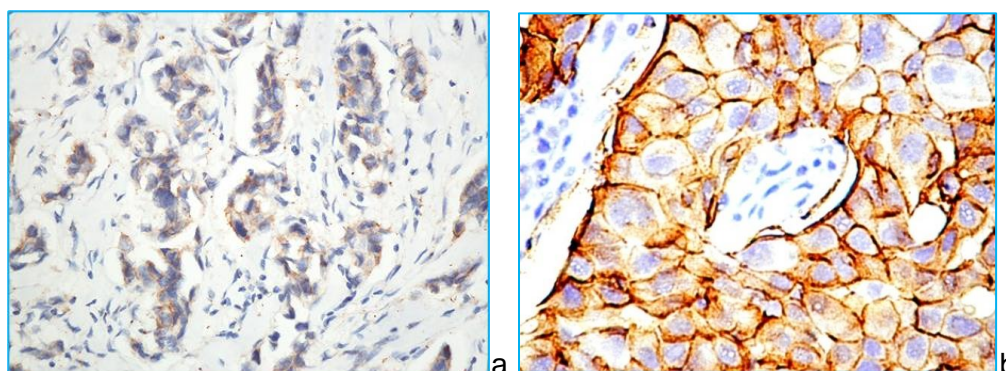


Fig. 12. Expresia HER2 negativă în tumora primară (a) și pozitivă în limfonodul (b).

Rezultatele noastre semnalează discrepante majore de profil molecular între tumora primară și metastaza ganglionilor corespunzătoare. În seria noastră de cazuri, nu au existat modificări semnificative în cazurile diagnosticate inițial ca HER2 și neclasificabile. După examinarea expresiei imunohistochemice a markerilor menționați, numărul carcinoamelor luminale A a scăzut cu 3%, iar al celor bazale cu 2%, în detrimentul creșterii cazurilor de tip Luminal B.

III.4. EXPRESIA IMUNOHISTOCHIMICĂ A RECEPTORILOR PENTRU HORMONII ANDROGENI ÎN TIPURILE MOLECULARE DE CARCINOM MAMAR

În carcinomul ductal in situ cu profil luminal (ER/PR pozitive) am găsit reacție inten-să în toate celulele tumorale și intensitatea reacției a fost mai apropiată de țesutul normal decât de aspectele observate în carcinomul invaziv. În carcinomul invaziv intensitatea imu-noreacției a fost de obicei mai slabă decât în țesutul mamar normal și distribuția produsului final de reacție a avut grad crescut de heterogenitate. În carcinomul ductal invaziv cazurile pozitive prezintă relativ constant peste 50% dintre celulele tumorale colorate la nivel nu-clear cu intensitate moderată și puternică (fig.19a) și în majoritatea cazurilor notate cu +2 și +3 conform sistemului de scorificare Allred. Carcinomul lobular invaziv a fost semnificativ mai heterogen, unele cazuri fiind notate cu +1 (fig.19b) și în majoritatea cazurilor cu +2 (fig.19c).

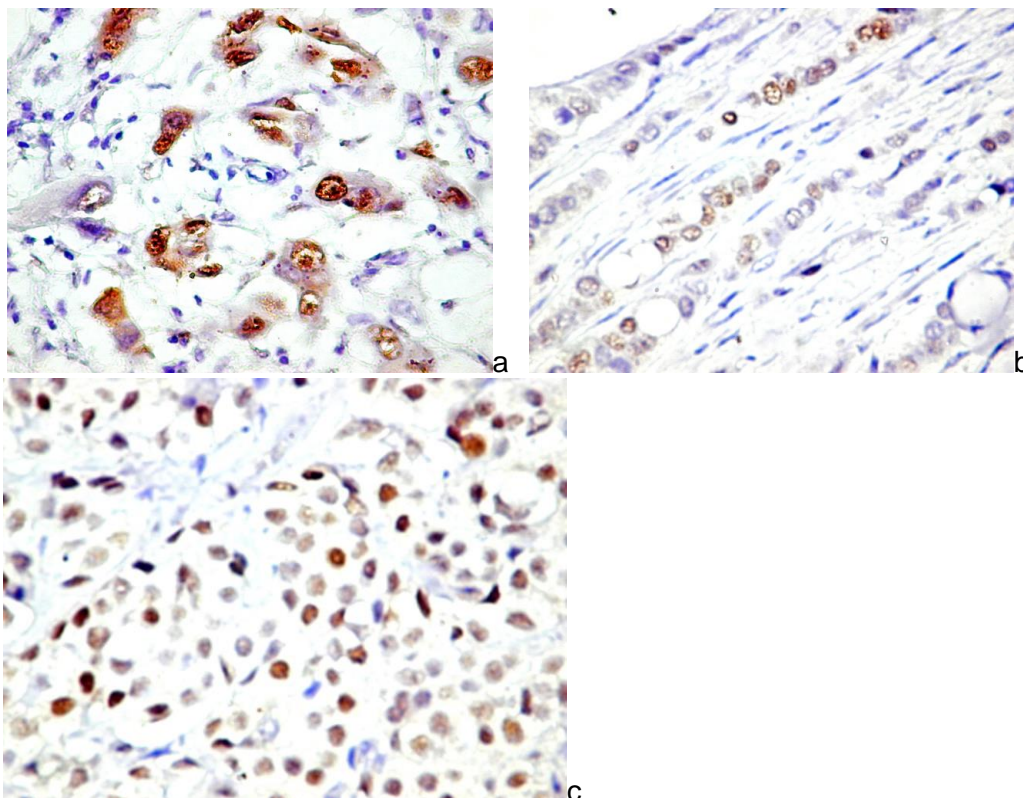


Fig. 19. Expresie intensă pentru AR în carcinomul ductal invaziv de grad înalt (a). Carcinom lobu-lar invaziv cu reacție slabă (b) și moderată (c). Mărire a-c, x400.

Global, am identificat expresie imunohistochimică pentru AR la 92 (74.19%) dintre cele 124 de cazuri de cancer mamar incluse în această parte a studiului. Am găsit diferențe semnificative din punct de vedere al reacției pozitive între tipurile patologice de carcinom mamar cu valorile cele mai mari pentru carcinomul ductal invaziv și cel medular, așa cum se observă din Tabelul 28. Incidența reacției pozitive scade odată cu creșterea gradului de diferențiere. Am găsit tumori AR-pozitive la 21 (91.30%) dintre cele 23 de cazuri cu G1, la 65 (80.24%) dintre cele 81 specimene cu G2, și la 6 (30%) dintre cele 20 de cazuri cu G3. Notăm scăderea marcată a expresiei AR la carcinoamele nediferențiate.

III.5. EXPRESIA DIFERENȚIALĂ A MAMAGLOBINEI A ÎN TUMORA PRIMARĂ ȘI METASTAZELE LIMFONICE

Raportare histopatologică. În 41 de cazuri am diagnosticat carcinom ductal invaziv, carcinom lobular în 3 cazuri, carcinom papilar în 2 cazuri și carcinom mucinos într-un caz. Patru cazuri au fost bine diferențiate, G1, 27 moderat diferențiate (G2) și 16 au fost slab diferențiate (G3). Carcinomul ductal in situ a fost identificat în asociere cu carcinomul ductal invaziv în 25 de cazuri, hiperplazia ductală atipică în 4 cazuri și metaplazia apocrină în două cazuri. Țesutul mamar normal adiacent tumorii maligne a fost prezent în 34 dintre speciemenle noastre.

Expresia mamaglobinei. Produsul final de reacție pentru mamaglobina A a fost colorat intens, cu un model de distribuție granulară citoplasmatică și limitat la celulele epiteliale. Țesutul mamar normal adiacent tumorii a fost pozitiv pentru mamaglobină în toate cele 34 de cazuri. Dar, în medie, mai puțin de 50% din celulele epiteliale au fost

colorate (fig. 21a). Ocazional, unele unități ductal-lobulare terminale au prezentat o reacție omogenă pozitivă. Cu excepția țesutului mamar, doar glandele sudoripare ale pielii au prezentat o reacție pozitivă. În ambele cazuri, metaplazia apocrină a prezentat toate celulele intens colorate (fig. 21b). Trei dintre cele patru leziuni atipice de hiperplazie ductală au fost, de asemenea, pozitive.

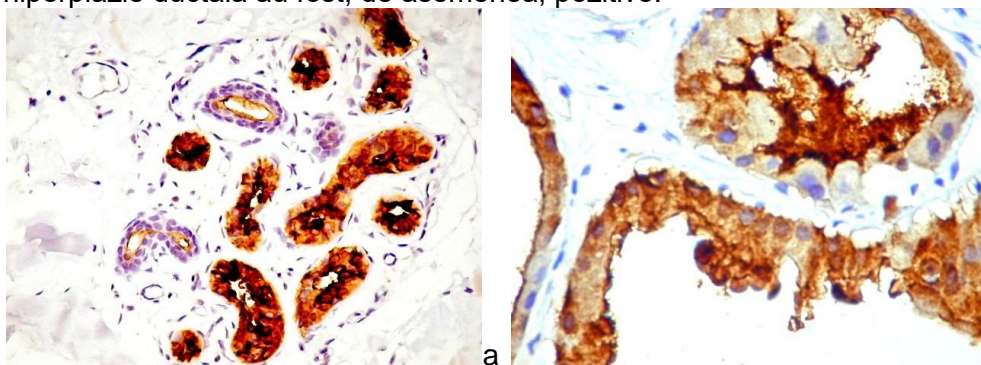


Fig. 21. Țesut mamar normal. Unitate terminală ducto-lobulară cu reacție pozitivă eterogenă (a, x100). Metaplazie apocrină cu celule epiteliale colorate uniform (b, x400). Imunoreacția pentru mamaglobina A.

Carcinomul ductal in situ (DCIS) a fost identificat în asociere cu carcinomul ductal invaziv în 25 de cazuri și a exprimat mamaglobina în 22 de cazuri (88%). De obicei, numărul de celule pozitive în DCIS a fost mai mare decât în carcinomul invaziv adiacent. Am identificat două modele de distribuție a produsului final de reacție: difuz, cu toate celulele tumorale pozitive (fig. 22a) și eterogene cu zone pozitive și negative în aceeași glandă (fig. 22b).

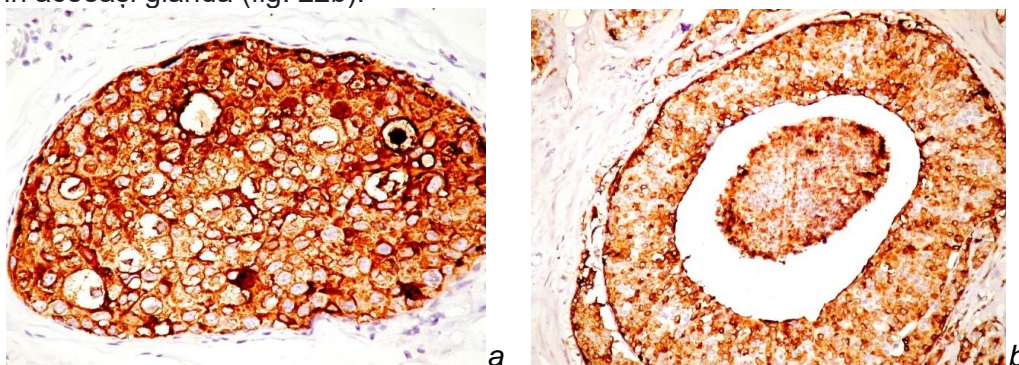


Fig. 22. DCIS, model de distribuție difuz (a) și eterogen (b). Anti-mamaglobină, x400.

III.6. PARTICULARITĂȚILE MICROMEDIULUI ÎN TUMORILE MAMARE PRIMARE

Fibrele elastice au fost identificate în țesutul mamar normal din vecinătatea tumorii la toate cazurile. Au fost dispuse izolat sau în grupe mici, fără a forma fascicule groase. În cazul tumorilor maligne reacțiile pentru fibrele elastice au semnalat o mare heterogenitate de distribuție (fig.27a). Astfel, la unele cazuri de carcinom in situ, fibrele elastice au format un strat fin continuu în jurul leziunii maligne (fig.27b). La multe cazuri am identificat fibre elastice în vecinătatea frontului de proliferare și invazie (fig.27c). În funcție de dispoziția și densitatea fibrelor elastice am scorificat elastoza asociată țesutului mamar malign de la 0 la +3, conform definițiilor de mai sus (fig.27 d, e, f).

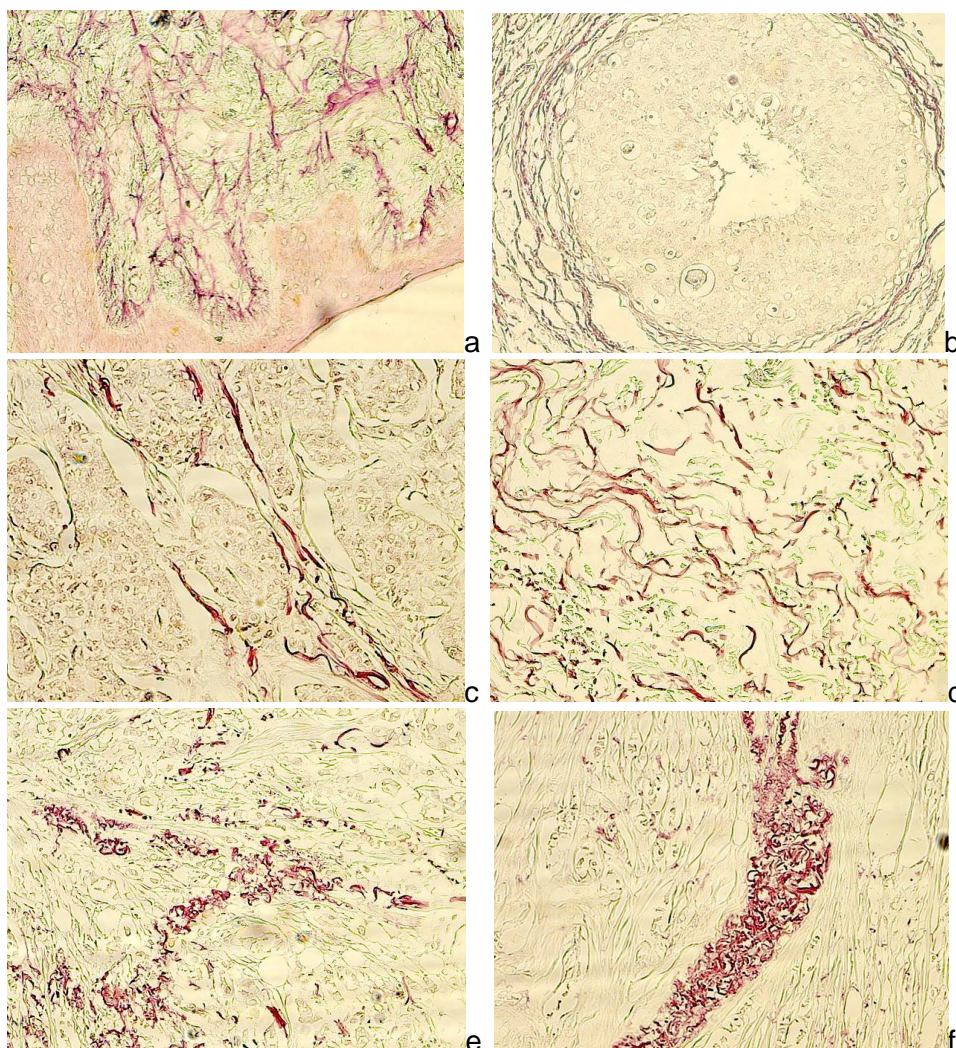


Fig. 27. Rețea fină de fibre elastice în dermul papilar limitrof tumorii mamare (a, x200). Carcinom ductal in situ, prezentând fibre elastice fine pe contur (b, x200). Elastoză notată cu +1 (c, x200). Elastoză notată cu +2 (d și e, x200). Elastoză notată cu +3 (f, x200). Colorație cu orceină, varianta Unna-Taenzer.

Un aspect particular, pe lângă dispoziția fibrelor elastice, a fost prezența unui material amorf, localizat numai în imediata vecinătate a celulelor maligne și pe care nu l-am observat în țesutul mamar normal limitrof (fig.28a). Acest material se află în directă continuitate cu fibrele elastice dispuse sub formă de fascicule groase (fig.28b). Acest aspect nu l-am observat la cazurile notate cu +2 (fig.28c), dar este relativ frecvent observat în jurul ductelor și glandelor maligne (fig. 28 d, e, f). Nu am găsit semnalată în literatură prezența acestui material identificat la ambele colorații pentru fibrele elastice și nici nu cunoaștem semnificația sa. Putem doar presupune că este vorba despre precursori fibrilari secretați posibil de către celulele tumorale, dar care nu agregă sub formă de fibre, posibil printr-un defect de sinteză al elastinei.

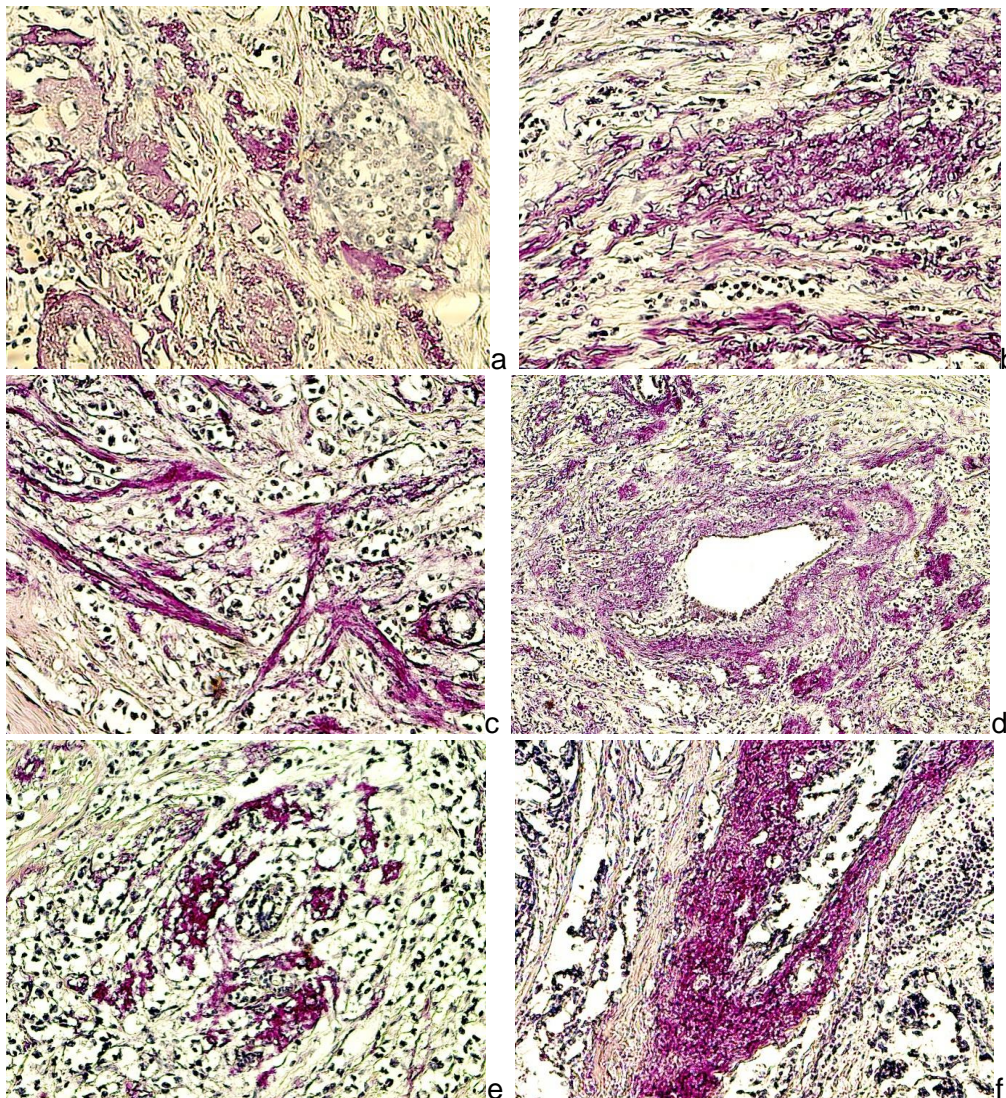


Fig. 28. Material amorf în imediata vecinătate a celulelor tumorale (a). continuitatea cu fascicule groase de fibre elastice (b), Elastoză notată cu +2 (c) Material amorf în jurul unui duct (d). Detaliu cu material amorf în jurul unei glande maligne (e). Elastoză grad +3 (f). Colorație Weigert elastica. X200.

Conform scorului definit mai sus, dintre cele 156 de cazuri incluse în studiu, au prezentat elastoză 39 (25%). Dintre acestea, 11 cazuri au fost notate cu +1, 14 cazuri cu +2 și 14 cazuri cu +3. Datele referitoare la elastoză nu s-au corelat nici cu vârsta bolnavelor și nici cu statusul menopauzal. Nu am observat corelație statistic semnificativă cu forma histopatologică, dar elastoză se corelează cu grad de diferențiere redus ($p < 0.0024$). Deși un număr semnificativ de cazuri cu elastoză nu au fost asociate cu metastaze limfonodale, nu am obținut corelație semnificativă, și aparent, elastoză nu este un predictor util pentru metastazele limfonodale.

CONCLUZII FINALE ȘI CONTRIBUȚII ORIGINALE

Cancerul mamar este cea mai frecventă neoplazie a sexului feminin, așa cum am arătat în partea generală. Trecerea rapidă la stadiul molecular al diagnosticului de neoplazie a avut un impact major nu numai asupra prognosticului, ci și asupra strategiei terapeutice. Neoplazia mamară se bucură de un mare interes din acest punct de vedere și este prima tumoră umană clasificată pe bază moleculară, cu aplicabilitate practică.

În lucrarea de față am investigat 156 de cazuri selecționate conform criteriilor de la material și metode. Deși speciemenle au provenit din mai multe centre diferite, morfologic și molecular nu am constatat diferențe între cele patru serii, așa încât am considerat lotul ca fiind omogen. Majoritatea cazurilor de carcinom mamar au fost de tip ductal invaziv, fără alte specificații. Din datele noastre, forma histopatologică nu este un predictor util pentru metastazele limfonodale. Majoritatea cazurilor au fost moderat diferențiate, G2. Am obținut corelație pozitivă statistic semnificativă doar pentru G3, care se pare că este un factor predictiv util pentru metastazele limfonodale.

Metastazele ganglionare au fost identificate în 80 din cele 156 de cazuri (51,27%), fiind caracterizate prin celule tumorale prezente în sinusul subcapsular sau înlocuind parțial sau complet țesutul limfoid. Subliniem posibilitatea apariției metastazelor în ganglionii limfatici atrofici, aspect nementionat în literatura de specialitate. Este o observație originală, iar pe acest subiect nu a fost publicat niciun articol până în prezent. Considerăm obligatorie examinarea ganglionilor atrofici, în aceleași condiții, chiar dacă micromediul ganglionar alterat nu permite încă explicarea acestui proces. Această observație ridică noi probleme în geneza adenopatiei maligne, cel mai probabil implicând celulele reticulare ale stromei, profund neglijate din acest punct de vedere până în prezent. Cu excepția diagnosticului tumorii primare și a metastazelor ganglionare, examenul histopatologic convențional aduce puține informații utile pentru prognosticul și stabilirea strategiei terapeutice în cancerul de sân.

Pe baza rezultatelor obținute, considerăm obligatorie clasificarea moleculară extinsă, bazată pe un spectru de anticorpi utili care include ER, PR, HER2, Ki67, CK5, EGFR și p53. Alte citokeratine, E-cadherina și Bcl-2 nu adaugă valoare clasificării diagnosticului molecular. Performanța Ki67 este obligatorie pentru diferențierea tipurilor luminal și eventual monitorizarea chimioterapiei postoperatorii. Datele noastre sprijină utilizarea panoului extins de anticorpi pentru definirea tipului molecular de cancer de sân. Cazurile de tip Luminal A au reprezentat 46,79%, Luminal B 17,94%, HER2 19,87%, bazal-like 10,25% și neclasificabile 5,12%. Tipul molecular de carcinom mamar nu se corelează semnificativ statistic cu predicția metastazelor ganglionare, iar tipul bazal a prezentat metastaze ganglionare, precum și celelalte tipuri. E- și P-caderinele sunt exprimate diferențial în formele moleculare de cancer de sân, iar rezultatele noastre nu susțin introducerea acestor markeri în panoul actual de diagnostic și clasificare moleculară. Pe de altă parte, E și P-caderinele sunt utile pentru a demonstra tranziția epitelial-mezenchimală. În prezent, clasificarea moleculară nu o înlocuiește, ci o completează pe cea morfologică convențională.

Rezultatele noastre indică discrepanțe majore de profil molecular între tumora primară și metastaza ganglionilor limfatici corespunzătoare, care reprezintă aproape 20% din cazuri. În seria noastră de cazuri, nu au apărut modificări semnificative de interconversie în cazurile inițial diagnosticate ca HER2 și neclasificabile. După examinarea expresiei imunohistochemice a markerilor menționați, numărul carcinoamelor luminal A a scăzut cu 3%, iar al celor bazale cu 2%, în detrimentul

creșterii cazurilor de tip Luminal B. Creșterea capacității metastatice a celulelor tumorale induce modificări majore ale profilului molecular. Datele noastre sprijină examinarea moleculară sincronă a tumorii primare și a ganglionilor limfatici sau a metastazelor la distanță, rezultatul având un impact major asupra strategiei terapeutice. Pe baza datelor din literatura de specialitate, considerăm acest studiu ca fiind original, fiind primul din țara prezentat pe acest subiect. Ca prioritate, este primul studiu care investighează acest aspect pe baza panoului extins utilizat pentru clasificarea moleculară.

În acest studiu, am demonstrat că receptorii de androgeni sunt exprimați în 74,19% din toate cazurile de cancer de sân. Am găsit o corelație semnificativă statistic între expresia AR, tipul histopatologic al tumorii, gradul de diferențiere și starea ganglionilor limfatici. Dintre tumorile AR pozitive, 52,17% dintre cazuri coexprimă ER și 59,78% coexprimă PR, dar fără o corelație semnificativă. Nu am identificat nicio corelație semnificativă între expresia AR, metastazele la distanță și supraexpresia HER2, ci doar o corelație inversă cu profilul molecular al cancerului de sân triplu negativ. Cu toate acestea, rezultatele noastre pledează pentru evaluarea unui model experimental de medicație anti-androgenă în cazurile rezistente la terapia hormonală convențională.

Elastoza asociată cu cancerul de sân a fost observată în 25% din cazuri, aspect confirmat de două metode de colorare. Propunem un sistem original de notare a elastozei și descriem pentru prima dată un material amorf cu afinitate orceină similară cu elastina, de origine necunoscută și de semnificație incertă. Elastoza s-a corelat cu un grad redus de diferențiere, dar nu și cu ceilalți parametri de prognostic clinico-patologic. În aceste condiții, elastoza nu a fost un factor predictiv pentru metastazele ganglionare.

Densitatea mastocitelor din zonele tumorale și peritumorale nu se corelează cu profilul molecular al carcinoamelor mamare incluse în studiul de față. În schimb, densitatea mastocitelor din zona tumorală, dar nu peritumorală, se corelează semnificativ statistic cu metastazele ganglionare, independent de tipul molecular. În aceste condiții, credem că densitatea mastocitelor din zona tumorii este un predictor util pentru metastazele ganglionare. Deși prezența mastocitelor în micromediul tumorii mamare este bine cunoscută de mulți ani, datele noastre evidențiază pentru prima dată rolul mastocitelor triptaze pozitive în predicția metastazelor ganglionare.

În studiul nostru, macrofagele identificate cu CD68 și fibrocitele CD34 pozitive asociate tumorii nu au valoare predictivă pentru metastazele ganglionilor limfatici. Considerăm că implicarea acestor celule în fenomenul de metastază a fost supraestimată în trecut.

Mamaglobina A este exprimată în 74,19% din tumorile mamare primare și în 58,06% din metastazele ganglionare corespunzătoare. Prin reacția cu mamaglobina se identifică ușor micrometastazele ganglionare, invazia limfovaculară și peri-nervoasă din carcinomul ductal invaziv. Expresia imunohistochimică a mamaglobinei A se corelează cu gradul de diferențiere, cu metastaze ganglionare, dar nu și cu ceilalți parametri de prognostic clinico-patologic. Caracterul negativ al expresiei este un potențial indicator al metastazelor ganglionare, intensitatea reacției scăzând proporțional cu creșterea gradului de diferențiere. Datele noastre susțin că expresia mamaglobinei definește un subgrup de pacienți cu un prognostic mai bun și este o metodă utilă pentru diagnosticarea metastazelor ganglionare.

Rezumând datele de mai sus, raportăm diferențe semnificative de profil molecular între tumora primară și metastazele ganglionilor limfatici, asocierea AR cu

tumorile care exprimă predominant ER, reacția negativă pentru mamaglobină și numărul mare de mastocite care au valoare predictivă pentru limfă. metastaze ganglionare. Profilul molecular al tumorii primare nu este neapărat același cu profilul metastazelor ganglionare și am găsit discordanțe în aproape 20% din cazuri. Această constatare ar putea avea o importanță majoră în strategia terapeutică a pacienților cu cancer mamar.

BIBLIOGRAPHY

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.
3. <https://www.uicc.org/what-we-do/thematic-areas-work/breast-cancer>
4. Canadian Cancer Society, <https://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/breast/statistics/?region=on>
5. 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; 98(19):10869-10874.
6. Usman A, Ilyasu Y, Atanda AT. Molecular subtyping of carcinoma of the female breast in a tertiary teaching hospital in Northern Nigeria. *Ann Trop Pathol* 2019;10:20-26
7. Fletcher CDM. Diagnostic histopathology of tumors. Churchill Livingstone, Third Edition, 2007, Vol 1, p. 919-939.
8. Raica M. Citologie clinică. Editura Mirton, Timișoara, 1998.
9. Mills S. Histology for pathologists. Wolters Kluwer, Fifth Edition, 2019, p.
10. Dabbs D. Diagnostic immunohistochemistry. Churchill Livingstone, Second Edition, 2006, p. 699-733.
11. Goldblum J, Lamps L, McKeeney J, Myers J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, Elsevier, 11th Edition, 2017.
12. Cance WG, Harris JE, Iacocca MV, Roche E, Yang X, Chang J, Simkins S, Xu L. Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin Cancer Res.* 2000;6(6):2417-23.
13. Lotz M, Wang HH, Cance W, Matthews J, Pories S. Epidermal growth factor stimulation can substitute for c-Src overexpression in promoting breast carcinoma invasion. *J Surg Res.* 2003;109(2):123-129.
14. Thomas C, Karagounis IV, Srivastava RK, Vrettos N, Nikolos F, Francois N, Huang M, Gong S, Long Q, Kumar S, Koumenis C, Krishnamurthy S, Ueno NT, Chakrabarti R, Maity A. Estrogen receptor beta-mediated inhibition of actin-based cell migration suppresses metastasis of inflammatory breast cancer. *Cancer Res.* 2021: canres. 2743.2020.
15. Mark B Fisher 1, Andrew J Weise, Issac J Powell. Breast carcinoma metastatic to the bladder and renal pelvis requiring fulguration. *Clin Breast Cancer*, 2005;6(2):173-174.
16. Kalli S, Semine A, Cohen S, Naber SP, Makim SS, Bahl M. American Joint committee on cancer's staging system for breast cancer, Eighth Edition: What the radiologist needs to know. *Radiographics.* 2018;38(7):1921-1933.
17. <https://www.breastcancer.org/symptoms/diagnosis/staging>
18. Morris SR, Carey LA. Molecular profiling in breast cancer. *Rev Endocr Metab Disord*, 2007, 8: 185-198.
19. Moll R, Krepler R, Frank WW. Complex cytokeratin polypeptide patterns observed in certain human carcinomas. *Differentiation*, 1983, 23: 256-269.

20. Gusterson BA, Ross TD, Heath VJ, Stein T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2005, 7: 143-148.
21. Foulkes WD. BRCA 1 functions as a breast stem cell regulator. *J Med Genet*, 2004, 41: 1-5.
22. Murad TM, Scharpelli DG. The ultrastructure of medullary and scirrhous mammary duct carcinoma. *Am J Pathol*, 1967, 50: 335-360.
23. Perou CM, Sorlie T, Elsen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406: 747-752, 2000.
24. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 5367-5374.
25. Carey LA, Perou CM, Livasy CA et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina breast cancer study. *JAMA*, 2006, 295: 2492-2502.
26. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Lee AHS, Ellis IO. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology*, 2007, 50: 434-438.
27. Bidard FC, Conforti R, Boulet T, Michiels S, Delaloge S, Andre F. Does triple-negative phenotype accurately identify basal-like tumour? An immunohistochemical analysis based on 143 'triple-negative' breast cancers. *Ann Oncol*, 2007, 18: 1285-1286.
28. Faratian D, Bartlett J. Predictive markers in breast cancer – the future. *Histopathology*, 2008, 52: 91-98.
29. Livasy CA, Karaca G, Nanda R et al – Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*, 2006, 19: 264-271.
30. Reis-Filho JS, Tutt ANJ. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*, 2008, 52: 108-118.
31. Hicks DG, Short SM, Prescott NL et al. Breast cancers with brain metastases are more likely to be estrogen receptor negative, express the basal CK5/6, and overexpress HER2 or EGFR. *Am J Surg Pathol*, 2006, 30: 1097-1104.
32. Tischkowitz M, Brunet JS, Begin LR, Huntsman DG, Cheang MCU, Akslen LA, Nielsen TO, Foulkes WD. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer*, 2007, 7: 134-145.
33. Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K, Jones C, Gillett CE, Hanby A, Easton D, Lakhani SR. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Res*, 2007, 9, R4 (doi: 10.1188/bcr1636).
34. Sorlie T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha RR, Borresen-Dale AL. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analysis across three different platforms. *BMC Genomics*, 2006, 7: 127-142.
35. Millikan RC, Newman B, Tse CK et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res treat*, 2007, doi: 10.1007/s10549-007-9632-6.
36. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *PNAS*, 2003, 100: 8418-8423.
37. Laasko M, Tanner M, Nilsson J et al. Basolateral carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2006, 12: 4185-4191.
38. Nielsen TO, Leung SCY, Rimm DL, Dodson A, Acs B, Badve S, Denkert C, Ellis MJ, Fineberg S, Flowers M, Kreipe HH, Laenkholm AV, Pan H, Penault-Llorca FM, Polley MY, Salgado R, Smith IE, Sugie T, Bartlett JMS, McShane LM, Dowsett M, Hayes DF. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst*. 2020:djaa201.
39. Tan DSP, Marchio C, Jones RL, Savage K, Smith IE, Dowsett M, Reis-Filho JS. Triple negative breast cancer: molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. *Breast Cancer Res Treat*, 2007, doi: 10.1007/s10549-007-9756-8.
40. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR et al. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*, 2007, 109: 25-32.

41. Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho JS, Ellis IO. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer. *Histopathology*, 2008, 52: 67-81.
42. Doane AS, Danso M, Lal P et al. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptomal program and response to androgen. *Oncogene*, 2006, 25: 3994-4008.
43. Conforti R, Boulet T, Tomasic G, Taranchon E, Arriagada R, Spielmann M, Ducourtieux M, Soria JC, Tursz T, Delaloge S, Michiels S, Andre F. Breast cancer molecular subclassification and estrogen receptor expression to predict efficacy of adjuvant anthracyclines-based chemotherapy: a biomarker study from two randomized trials. *Ann Oncol*, 2007, doi 10.1093/annonc/mdm209.
44. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, Martiat P, Fox SB, Harris AL, Liu ET. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *PNAS*, 2003, 100: 10393-10398.
45. Brenton JD, Carey LA, Ashour AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol*, 29: 7350-7360, 2005.
46. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 5678-5685.
47. Sotiriou C, Powels TJ, Dowsett M et al. Gene expression profiles derived from fine needle aspiration correlate with response to systemic chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2002, 4: R3.
48. Harris LN, Broadwater G, Lin NU et al. Molecular subtypes of breast cancer in relation to paclitaxel response and outcomes in women with metastatic disease: results from CALGB 9342. *Breast Cancer Res*, 2006; 8: R66 (doi: 10/1186/bcr1822).
49. Miller KD, Burstein HJ, Elias A et al. Phase II study of SU1248, a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor (TKI), in patients with previously treated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 2005 (suppl, A563).
50. Thomas M, Kelly ED, Abraham J, Kruse M. Invasive lobular breast cancer: A review of pathogenesis, diagnosis, management, and future directions of early stage disease. *Semin Oncol*. 2019;46(2):121-132.
51. Narod SA, Sopik V. Is invasion a necessary step for metastases in breast cancer? *Breast Cancer Res Treat*. 2018;169(1):9-23.
52. Wapnir IL, Khan A. Current Strategies for the Management of Locoregional Breast Cancer Recurrence. *Oncology (Williston Park)*. 2019;33(1):19-25.
53. Galimberti V, Cole BF, Viale G, Veronesi P, Vicini E, Intra M, Mazzarol G, Massarut S, Zgajnar J, Taffurelli M, Littlejohn D, Knauer M, Tondini C, Di Leo A, Colleoni M, Regan MM, Coates AS, Gelber RD, Goldhirsch A; International Breast Cancer Study Group Trial 23-01. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with breast cancer and sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): 10-year follow-up of a randomised, controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018;19(10):1385-1393.
54. Buschhaus JM, Humphries BA, Eckley SS, Robison TH, Cutter AC, Rajendran S, Haley HR, Bevoor AS, Luker KE, Luker GD. Targeting disseminated estrogen-receptor-positive breast cancer cells in bone marrow. *Oncogene*. 2020;39(34):5649-5662.
55. Barbieri E, Anghelone APC, Gentile D, La Raja C, Bottini A, Tinterri C, Metastases from Occult Breast Cancer: A Case Report of Carcinoma of Unknown Primary Syndrome. *Case Rep Oncol*. 2020 ;13(3):1158-1163.
56. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, Jeong JH, Wolmark N. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med*. 2002;347(16):1233-1241.
57. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med*. 2001;7(2):192-198.
58. Giuliano AE, Ballman KV, McCall L, Beitsch PD, Brennan MB, Kelemen PR, Ollila DW, Hansen NM, Whitworth PW, Blumencranz PW, Leitch AM, Saha S, Hunt KK, Morrow M. Effect of Axillary Dissection vs No Axillary Dissection on 10-Year Overall Survival Among Women With Invasive Breast Cancer and

- Sentinel Node Metastasis: The ACOSOG Z0011 (Alliance) Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2017;318(10):918-926.
59. Lee GE, Mayer EL, Partridge A. Prognosis of pregnancy-associated breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;163(3):417-421.
 60. Chen JM, Li Y, Xu J, Gong L, Wang LW, Liu WL, Liu J. Computer-aided prognosis on breast cancer with hematoxylin and eosin histopathology images: A review. *Tumour Biol*. 2017;39(3):1010428317694.
 61. Christgen M, Länger F, Kreipe H. Histological grading of breast cancer. *Pathologe*. 2016;37(4):328-336.
 62. Krishnapriya S, Malipatil B, Surekha S, Sundersingh S, Sridevi V, Ananthi B, Selvaluxmy G, Ganesan TS. Microvessel Density (MVD) in Locally Advanced Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019;20(5):1537-1545.
 63. Fulga V, Rudico L, Balica AR, Cimpean AM, Saptefrati L, Margan MM, Raica M. Differential expression of e-cadherin in primary breast cancer and corresponding lymph node metastases. *Anticancer Res*. 2015;35(2):759-765.
 64. Ellis P. et al. WHO Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs, 2003, Lyon Press, Lyon.
 65. Lee AH S, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index for Invasive Carcinoma of the Breast. *Pathology & Oncology Research*. 2008, 14 (2): 113–115.
 66. Suci C, Muresan A, Cornea R, Suci O, Dema A, Raica M. Semi-automated evaluation of Ki-67 index in invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncol Lett*. 2014;7(1):107-114.
 67. Allred DC, JM Harvey, M Berardo, GM Clark. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*. 1998, 11, 2: 155-168.
 68. Allred DC, Bustamante MA, Daniel CO, Gaskill HV, Cruz AB Jr. Immunocytochemical analysis of estrogen receptors in human breast carcinomas. Evaluation of 130 cases and review of the literature regarding concordance with biochemical assay and clinical relevance. *Arch Surg*. 1990;125(1):107-113.
 69. Dixon JM, Cameron DA, Arthur LM, Axelrod DM, Renshaw L, Thomas JS, Turnbull A, Young O, Loman CA, Jakubowski D, Baehner FL, Singh B. Accurate Estrogen Receptor Quantification in Patients with Negative and Low-Positive Estrogen-Receptor-Expressing Breast Tumors: Sub-Analyses of Data from Two Clinical Studies. *Adv Ther*. 2019;36(4):828-841.
 70. Qureshi HS, Linden MD, Divine G, Raju UB. E-Cadherin Status in Breast Cancer Correlates With Histologic Type but Does Not Correlate With Established Prognostic Parameters. *Am J Clin Pathol*. 2006, 25, 3, 377-385.
 71. Callagy GM, PD Pharoah, SE Pinder, FD Hsu, TO Nielsen, J Ragaz, IO Ellis, D Huntsman, C Caldas. Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index. *Clin Cancer Res*, 2006, 12, 8, 2468–2475.
 72. Yamashita H, M Nishio, T Toyama, H Sugiura, Z Zhang, S Kobayashi, H Iwase. Coexistence of HER2 over-expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2004, 6, 1, R24-30.
 73. Azoulay S, M Laé, P Fréneaux, S Merle, A Al Ghuzlan, C Chnecker, C Rosty, J Klijanienko, B Sigal-Zafrani, R Salmon, A Fourquet, X Sastre-Garau, A Vincent-Salomon. KIT is highly expressed in adenoid cystic carcinoma of the breast, a basal-like carcinoma associated with a favorable outcome. *Mod Pathol*. 2005, 18, 219, 12: 1623-1631.
 74. Solanki M, Visscher D. Pathology of breast cancer in the last half century. *Hum Pathol*. 2020; 95:137-148.
 75. Provenzano E, Bossuyt V, Viale G, Cameron D, Badve S, Denkert C, MacGrogan G, Penault-Llorca F, Boughey J, Curigliano G, Dixon JM, Esserman L, Fastner G, Kuehn T, Peintinger F, von Minckwitz G, White J, Yang W, Symmans WF; Residual Disease Characterization Working Group of the Breast International Group-North American Breast Cancer Group Collaboration. Standardization of pathologic evaluation and reporting of postneoadjuvant specimens in clinical trials of breast cancer: recommendations from an international working group. *Mod Pathol*. 2015;28(9):1185-1201.

76. Goldblum JR, Lamps LW, McKenney JK, Myers JL. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Elsevier, 2017.
77. Fletcher CDM. Diagnostic histopathology of tumors. Elsevier, 2020.
78. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol*. 2020 Jan;27(1):27-35.
79. Ahn SG, Kim SJ, Kim C, Jeong J. Molecular Classification of Triple-Negative Breast Cancer. *J Breast Cancer*. 2016;19(3):223-230.
80. Lehmann B D, Jovanović B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, Moses HL, Sanders ME, Pietenpol JA. Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PloS one*, 2016, 11(6), e0157368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157368>
81. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, Díez M, Viladot M, Arance A, Muñoz M. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*. 2015 Nov;24 Suppl 2:S26-35.
82. Burstein HJ, Curigliano G, Loibl S, Dubsy P, Gnant M, Poortmans P, Colleoni M, Denkert C, Piccart-Gebhart M, Regan M, Senn HJ, Winer EP, Thurlimann B; Members of the St. Gallen International Consensus Panel on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2019. Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019. *Ann Oncol*. 2019;30(10):1541-1557.
83. Balic M, Thomssen C, Würlstein R, Gnant M, Harbeck N. St. Gallen/Vienna 2019: A Brief Summary of the Consensus Discussion on the Optimal Primary Breast Cancer Treatment. *Breast Care (Basel)*. 2019;14(2):103-110.
84. Yang WL, Li T, Zhang Y. Cadherin signaling in cancer: its functions and role as a therapeutic target. *Front Oncol*. 2019; 9: 989.
85. Goodwin M, Yap AS. Classical cadherin adhesion molecules: coordinating cell adhesion, signaling and the cytoskeleton. *J Mol Histol*. 2004, 35:839–844. 10.1007/s10735-004-1833-2.
86. Albergaria A, Ribeiro AS, Vieira AF, Sousa B, Nobre AR, Seruca R, Schmitt F, Paredes J. P-cadherin role in normal breast development and cancer. *Int J Dev Biol*. 2011;55(7-9):811-822.
87. Zhang CC, Yan Z, Zhang Q, Kuszpit K, Zasadny K, Qiu M, Painter CL, Wong A, Kraynov E, Arango ME, Mehta PP, Popoff I, Casperson GF, Los G, Bender S, Anderes K, Christensen JG, VanArsdale T. PF-03732010: a fully human monoclonal antibody against P-cadherin with antitumor and antimetastatic activity. *Clin Cancer Res*. 2010;16(21):5177-5188.
88. Younis LK, El Sakka H, Haque I. The Prognostic Value of E-cadherin Expression in Breast Cancer. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2007;1(1):43-51.
89. Corso G, Bonanni B, Veronesi P. Tumor inactivation of E-cadherin: a new tool for breast cancer treatment? *Ann Transl Med*. 2018;6 (Suppl 1):S6. doi: 10.21037/atm.2018.08.45.
90. Vieira AF, Paredes J. P-cadherin and the journey to cancer metastasis. *Mol Cancer*. 2015;14:178.
91. Ribeiro AS, Sousa B, Carreto L, Mendes N, Nobre AR, Ricardo S, Albergaria A, Cameselle-Teijeiro JF, Gerhard R, Söderberg O, Seruca R, Santos MA, Schmitt F, Paredes J. P-cadherin functional role is dependent on E-cadherin cellular context: a proof of concept using the breast cancer model. *J Pathol*. 2013;229(5):705-718. doi: 10.1002/path.4143.
92. Ribeiro AS, Nobre AR, Mendes N, Almeida J, Vieira AF, Sousa B, Carvalho FA, Monteiro J, Polónia A, Fonseca M, Sanches JM, Santos NC, Seruca R, Paredes J. SRC inhibition prevents P-cadherin mediated signaling and function in basal-like breast cancer cells. *Cell Commun Signal*. 2018;16(1):75.
93. Giuliano AE, Han SH. Local and regional control in breast cancer: role of sentinel node biopsy. *Adv Surg*. 2011;45:101-116.
94. Galimberti V, Monti S, Mastropasqua MG. DCIS and LCIS are confusing and outdated terms. They should be abandoned in favor of ductal intraepithelial neoplasia (DIN) and lobular intraepithelial neoplasia (LIN). *Breast*. 2013 Aug;22(4):431-435.

95. Falck A-K, Fernö M, Bendahl P-O, Rydén L. St Gallen molecular subtypes in primary breast cancer and matched lymph node metastases – aspects on distribution and prognosis for patients with luminal A tumors: results from a prospective randomized trial. *BMC Cancer*, 2013, 13: 558.
96. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011; 5(1):5-23.
97. Adamczyk A, Niemiec J, Ambicka A, Malecki K, Wysocki WH, Mitus J, Rys J. Expression of ER/PR/HER2, basal markers and adhesion molecules in primary breast cancer and in lymph node metastases: a comparative immunohistochemical study. *Pol J Pathol*, 2012, 63: 228-234.
98. Buglioni S, Di Filippo F, Terrenato I, Casini B, Gallo E, Marandino F, Maini CL, Pasqualoni R, Botti C, Di Filippo S, Pescarmona E, Mottolese M. Quantitative molecular analysis of sentinel lymph node may be predictive of axillary node status in breast cancer classified by molecular subtypes. *Plos One*, 2013, 8: e58823.
99. Calvo J, Sanchez-Cid L, Munoz M, Lozano JJ, Thomson TM, Fernandez PL. Infrequent loss of luminal differentiation in ductal breast cancer metastasis. *Plos One*, 2013, 8: e78097.
100. Dieci MV, Barbieri E, Piacentini F, Ficarra G, Netti S, Dominici M, Conte PF, Guarneri V. Discordance in receptor status between primary and recurrent breast cancer has a prognostic impact: a single-institution analysis. *Ann Oncol*, 2013, 24: 101-108.
101. Fulga V, Rudico L, Balica AR, Cimpean AM, Saptefrati L, Margan MM, Raica M. Differential expression of E-cadherin in primary breast cancer and corresponding lymph node metastases. *Anticancer Res*, 2015, 35: 759-765.
102. Gong Y, Han EY, Guo M, Pusztai L, Sneige N. Stability of estrogen receptor status in breast carcinoma. *Cancer*, 2011, 705-713.
103. Knox AJ, Scaling AI, Pinto MP, Bliesner BS, Haughian JM, Abdel-Hafiz HA, Horwitz KB. Modeling luminal breast cancer heterogeneity: combination therapy to suppress a hormone receptor-negative, cytokeratin 5-positive subpopulation in luminal disease. *Breast Cancer Res*, 2014, 16: 418.
104. Falck A-K, Fernö M, Bendahl P-O, Rydén L. Does analysis of biomarkers in tumor cells in lymph node metastases give additional prognostic information in primary breast cancer? *World J Surg*, 2010, 34: 1434-1441.
105. Falck A-K, Bendahl P-O, Ingvar C, Isola J, Jonsson P-E, Lövgren K, Rennstam K, Fernö M, Rydén L. Analysis of and prognostic information from disseminated tumour cells in bone marrow in primary breast cancer: a prospective observational study. *BMC Cancer*, 2012, 12: 403.
106. Falck A-K, Bendahl P-O, Chenil G, Olsson H, Fernö M, Rydén L. Biomarker expression and St Gallen molecular subtype classification in primary tumours, synchronous lymph node metastases and asynchronous relapses in primary breast cancer patients with 10 years' follow-up. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 140: 93-104.
107. Ieni A, Barresi V, Caltabiano R, Cascone AM, Del Sordo R, Cabibi D, Zeppa P, Lanzafame S, Sidoni A, Franco V, Tuccari G. Discordance rate of HER2 status in primary breast carcinomas versus synchronous axillary lymph node metastases: a multicenter retrospective investigation. *OncolTargets Therapy*, 2014, 7: 1267-1272.
108. García-Becerra R, Santos N, Díaz L and Camacho J. Mechanisms of resistance to endocrine therapy in breast cancer: Focus on signaling pathways, miRNAs and genetically based resistance. *Int J Mol Sci* 14: 108-145, 2012.
109. Montel V, Huang TY, Mose E, Pestonjamas K and Tarin D. Expression profiling of primary tumors and matched lymphatic and lung metastases in a xenogeneic breast cancer model. *Am J Pathol* 166: 1565-1579, 2005.
110. Montel V, Mose ES and Tarin D: Tumor–stromal interactions reciprocally modulate gene expression patterns during carcinogenesis and metastasis. *Int J Cancer* 119: 251-263, 2006.
111. Suzuki M, Tarin D. Gene expression profiling of human lymph node metastases and matched primary breast carcinomas: Clinical implications. *Mol Oncol* 2007, 1: 172-180.

112. Sawaki M, Idota A, Ichikawa M, Gondo N, Horio A, Kondo N, Hattori M, Fujita T, Yatabe Y, Iwata H. Impact of intrinsic subtype on predicting axillary lymph node metastasis in breast cancer. *Oncol Lett*, 2014, 8: 1707-1712.
113. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol AJ. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*, 2011, 121: 2750-2767.
114. Lindström LS, Karlsson L, Wilking UM, Johansson U, Hartman J, Lidbrink EK, Hatschek T, Skong L, Bergh J. Clinically used breast cancer markers such as estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 are unstable throughout tumor progression. *J Clin Oncol*, 2012, 30: 2601-2608.
115. Santinelli A, Pisa E, Stramazzotti D, Fabris G. HER-2 status discrepancy between primary breast cancer and metastatic sites. Impact on target therapy. *Int J Cancer*, 2008, 122: 999-1004.
116. Niikura N, Liu J, Hayashi N, Mittendorf EA, Gong Y, Palla SI, Tokada Y, Gonzales-Angulo AM, Hortobagyi GN, Ueno NT. Loss of human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) expression in metastatic sites of HER2-overexpressing primary breast tumors. *J Clin Oncol*, 2012, 30: 593-599.
117. Liedtke C, Broglio K, Moulder S, Hsu L, Kau S-W, Symmans WF, Albarracin C, Meric-Bernstam F, Woodward W, Theriault RL, Kiesel L, Hortobagyi GN, Pusztai L, Gonzales-Angulo AM. Prognostic impact of discordance between triple-receptor measurements in primary and recurrent breast cancer. *J Oncol*, 2009, 20: 1953-1958.
118. **Floroni E, Ceausu AR, Popovici RA, Raica M, The molecular profile of breast cancer: primary tumour versus corresponding lymph node metastases. *Rom J Morphol Embryol*, 2022.**
119. Bertucci F, Finetti P, Rougemont J, Charafe-Jauffret E, Cervera N, Tarpin C, Nguyen C, Xerri L, Houlgatte R, Jacquemier J, Viens P and Birnbaum D – Gene expression profiling identifies molecular subtypes of inflammatory breast cancer. *Cancer Res*, 2005, 65: 2170-2178.
120. Bild AH, Parker JS, Gustafson AM, Acharya CR, Hoadley KA, Anders C, Marcom PK, Carey LA, Potti A, Nevins JR, Perou CM – An integration of complementary strategies for gene-expression analysis to reveal novel therapeutic opportunities for breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2009, 11: R55 (doi: 10.1186/bcr2344).
121. Kwan ML, Kushi LH, Weltzien E, Maring B, Kutner SE, Fulton RS, Lee MM, Ambrosone CB, Caan BJ – Epidemiology of breast cancer subtypes in two prospective cohort studies of breast cancer survivors. *Breast Cancer Res*, 2009, 11: R31 (doi:10.1186/ncr2261).
122. Diaz-Chico N, German Rodriguez F, Gonzalez A, Ramirez R, Bilbao C, Cabrera de Leon A, Agurre Jaime A, Chirino R, Navarro D, Diaz-Chico JC – Androgens and androgen receptors in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007, 105: 1-15.
123. Sasano M, Suzuki T, Miki Y, Moriya T – Intracrinology of estrogens and androgens in breast carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2008, 108: 181-185.
124. Hanley K, Wang J, Bourne P, Yang Q, Gao AC, Lyman G, Tang P – Lack of expression of androgen receptor may play a critical role in transformation from in situ to invasive basal subtype of high-grade ductal carcinoma of the breast. *Hum Pathol*, 2008, 39: 386-392.
125. Safarpour D, Tavassoli FA. A targetable androgen receptor-positive breast cancer subtype hidden among the triple-negative cancers. *Arch Pathol Lab Med*. 2015; 139(5):612-617.
126. Nahleh Z – Androgen receptor as a target for the treatment of hormone receptor-negative breast cancer: an uncharted territory. *Future Oncol*, 2008, 4: 15-21.
127. Berrino F, Micheli A. Serum hormone levels after menopause and subsequent breast cancer. *J. Natl Cancer Inst*. 1996; 88: 291-296.
128. Zeleniuch-Jacquotte A, Shore RE, Koenig KL, Akhmedkhanov A, Afanasyeva Y, Kato I, Kim My, Rinaldi S, Kaaks R, Toniolo P. Postmenopausal levels of oestrogen, androgen, and SHBG and breast cancer: long-term results of a prospective study. *Br J Cancer* 2004; 90:153-159.

129. Thomas HV, Key TJ, Allen DS, Moor JW, Dowsett M., Fentiman IS, Wang DY. A prospective study of endogenous serum hormone concentrations and breast cancer risk in postmenopausal women on the island of Guernsey. *Br J Cancer* 1997; 76:401-405.
130. Hackenberg R and Schultz KD. Androgen receptor mediated growth control of breast cancer and endometrial cancer modulated by antiandrogen- and androgen-like steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996; 56:113-117.
131. Birrell SN, Hall RE, Tilley WD. Role of androgen receptor in human breast cancer. *J Mammary Gland Neoplasia* 1998; 3:95-103.
132. Ortmann J, Prifti S, Bohlmann MK, Rehberger-Schneider S, Strowitzki T, Rabe T. Testosterone and 5 α -dihydrotestosterone inhibit in vitro growth of human breast cancer cell lines. *Gynecol Endocrinol* 2002; 16: 113-120.
133. Azzam DG, Tay JW, Greeve MA, Harvey JM, Bentel JM – ERK/MAPK regulation of the androgen responsiveness of breast cancer cells. *Adv Exp Med Biol*, 2008, 617: 429-435.
134. Kahn SM, Li YH, Hryb DJ, Nakhla AM, Romas NA, Cheong J, Rosner W – Sex hormone-binding globulin influences gene expression of LNCaP and MCF-7 cells in response to androgen and estrogen treatment. *Adv Exp Med Biol*, 2008, 617: 557-564.
135. Cops EJ, Bianco-Miotto T, Moore NL, Clarke CL, Birrell SN, Butler LM, Tilley WD – Antiproliferative actions of the synthetic androgen, mibolerone, in breast cancer cells are mediated by both androgen and progesterone receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2008, 110: 236-243.
136. Elebro K, Bendahl PO, Jernström H, Borgquist S. Androgen receptor expression and breast cancer mortality in a population-based prospective cohort. *Breast Cancer Res Treat.* 2017 Oct;165(3):645-657.
137. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19:403-410.
138. Ellis LM, Wittliff L, Bryant MS. Correlation of estrogen, progesterone and androgen receptors in breast cancer. *Am J Surg* 1989;157:577–581.
139. Isola JJ. Immunohistochemical demonstration of androgen receptor in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *J Pathol* 1993;170:31–35.
140. Kimura N, Mizokami A, Oonuma T, Sasano H, and Nagura H. Immunocytochemical localization of androgen receptor with polyclonal antibody in paraffin-embedded human tissues. *J Histochem Cytochem.* 1993; 41:671-678.
141. Basile D, Cinausero M, Iacono D, Pelizzari G, Bonotto M, Vitale MG, Gerratana L, Puglisi F. Androgen receptor in estrogen receptor positive breast cancer: Beyond expression. *Cancer Treat Rev.* 2017;61:15-22.
142. Bieche I, Parfait B, Tozlu S, Lidereau R, Vidaud M. Quantitation of androgen receptor gene expression in sporadic breast tumors by real-time RT-PCR: evidence that MYC is an AR-regulated gene. *Carcinogenesis* 2001;22:1521-1526.
143. Kuenen-Boumeester V, Van Der Kwast TH, Claassen CC, Look MP, Liem GS, Klijn JGM, and Henzen-Logmans SC. The clinical significance of androgen receptors in breast cancer and their relation to histological and cell biological parameters. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 1560-1565.
144. Bayer-Garner IB, Smoller B. Androgen receptors: a marker of increase sensitivity for identifying breast cancer in skin metastasis of unknown primary site. *Mod Pathol* 2000; 13:119-122.
145. de Kruijff IE, Sieuwerts AM, Onstenk W, Jager A, Hamberg P, de Jongh FE, Smid M, Kraan J, Timmermans MA, Martens JWM, Sleijfer S. Androgen receptor expression in circulating tumor cells of patients with metastatic breast cancer. *Int J Cancer.* 2019;145(4):1083-1089.
146. Agoff SN, Swanson PE, Linden H. Androgen receptor expression in estrogen receptor-negative breast cancer. Immunohistochemical, clinical and prognostic associations. *Am J Clin Pathol* 2003; 120:725–731.
147. Moinfar F, Okcu M, Tsybrovskyy O, Regitnig P, Lax SF, Weybora Ratschek M, Tavassoli FA, Denk H. Androgen receptors frequently are expressed in breast carcinomas: potential relevance to new therapeutic strategie. *Cancer* 2003; 98:703-711.

148. Gonzalez LO, Corte MD, Vazquez J, Junquera S, Sanchez R, Alvarez AC, Rodriguez JC, Lamelas ML, Vizoso FJ. Androgen receptor expresion in breast cancer: relationship with clinicopathological characteristics of the tumors, prognosis, and expression of metalloproteases and their inhibitors. *BMC Cancer*. 2008;8:149.
149. Leal C, Henrique R, Monteiro P, Lopes C, Bento MJ, De Sousa CP, Lopes P, Olson S, Silva MD, Page DL. Apocrine ductal carcinoma in situ of the breast: histologic classification and expression of biologic markers. *Hum Pathol* 2001; 32:487-493.
150. Selim A, El-Ayat G and Wells CA. Androgen receptor expression in ductal carcinoma in situ of the breast: relation to oestrogen and progesterone receptors. *J Clin Pathol* 2002; 55:14-16.
151. Raica M, Jung I, Cimpean AM, Suciu C, Muresan A – From conventional pathologic diagnosis to the molecular classification of breast carcinoma: are we ready for the change? *Rom J Morphol Embryol*, 2009, 50: 5-13.
152. Schippinger W, Regitnig P, Dandachi N, Wernecke KD, Bauernhofer T, Samonigg H, Moinfar F. Evaluation of the prognostic significance of androgen receptor expression in metastatic breast cancer. *Virchows Arch*. 2006;449(1):24-30.
153. Liu YN, Liu Y, Lee HJ, Hsu YH, Chen JH. Activated androgen receptor downregulates E-cadherin gene expression and promotes tumor metastasis. *Mol Cell Biol*. 2008;28(23):7096-7108.
154. Kono M, Fujii T, Lim B, Karuturi MS, Tripathy D, Ueno NT. Androgen Receptor Function and Androgen Receptor-Targeted Therapies in Breast Cancer: A Review. *JAMA Oncol*. 2017;3(9):1266-1273.
155. Gucalp A, Traina TA. Targeting the androgen receptor in triple-negative breast cancer. *Curr Probl Cancer*. 2016;40(2-4):141-150.
156. Vasiliou SK, Diamandis EP. Androgen receptor: A promising therapeutic target in breast cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2019 May;56(3):200-223.
157. Watson MA, Fleming TP. Isolation of differentially expressed sequence tags from human breast cancer. *Cancer Res*, 54: 4598-4602, 1994.
158. Watson MA, Fleming TP. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Res*, 56: 860-865, 1996.
159. Zehentner BK, Carter D. Mammaglobin: a candidate diagnostic marker for breast carcinoma. *Clin Biochem*, 37: 249-257, 2004.
160. Feng R, Liu X, Guo Z, Li J. Purification and characterization of 66-kDa glycoprotein from human breast carcinoma. *Cancer Sci*, 98: 1344-1349, 2007.
161. Watson MA, Dinzis S, Darrow CM, Voss LE, DiPersio J, Jensen R, Fleming TP. Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer. *Cancer Res*, 59: 3028-3031, 1999.
162. Branagan G, Hughes D, Jeffrez M, Crane-Robinson C, Perry PM. Detection of micrometastases in lymph nodes from patients with breast cancer. *Br J Surg*, 89: 86-89, 2002.
163. Brown NM, Stenzel TT, Friedman PN, Henslee J, Huper G, Marks JR – Evaluation of expression based markers for the detection of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 97: 41-47, 2006.
164. Ni J, Kalff-Suske M, Gentz R, Schageman J, Beato M, Klug J. All human genes of the uteroglobin family are localized on chromosome 11q12.2 and form a dense cluster. *Ann NY Acad Sci*, 923: 25-42, 2000.
165. Watson MA, Darrow CM, Zimonjic DB, Popescu NC, Fleming TP – Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to chromosome 11q13. *Oncogene*, 16: 817-824, 1998.
166. **Floroni E, Suciu CS, Ceausu AR, Raica M. Mammaglobin A Immunohistochemical Expression in Molecular Types of Breast Cancer. *Res Clin Med*, 2021, V, 3: 4-9.**
167. Bhargava R, Beriwal S, Dabbs DJ – Mammaglobin vs GCDFFP-15: an immunohistologic validation survey for sensitivity and specificity. *Am J Clin Pathol*, 127: 103-113, 2007.
168. O'Brien NA, Maguire TM, O'Donovan N, Lynch N, Hill ADK, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ – Mammaglobin A: a promising marker for breast cancer. *Clin Chem*, 48: 1362-1364, 2002.

169. Fritzsche FR, Thomas A, Winzer KJ, Beyer B, Dankof A, Bellach J, Dahl E, Dietel M, Kristiansen G. Co-expression and prognostic value of gross cystic fluid protein 15 and mammaglobin in primary breast cancer. *Histol Histopathol*, 22: 1221-1230, 2007.
170. Span PN, Waanders E, Manders P, Heuvel JJ, Foekens JA, Watson MA, Beex LV, Sweep FC – Mammaglobin is associated with low-grade, steroid receptor-positive breast tumors from postmenopausal patients, and has independent prognostic value for relapse-free survival time. *J Clin Oncol*, 22: 691-698, 2004.
171. Roncella S, Ferro P, Bacigalupo B, Dessanti P, Giannico A, Gorji N, Moroni M, Tozzini S, Pensa F, Gianquinto D, Fais F, Pronzato P, Fedeli F – Relationship between human mammaglobin mRNA expression in breast carcinoma tissue and clinico-pathologic features of the tumors. *J Exp Clin Cancer Res*, 25: 65-72, 2006.
172. Nunez-Villar MJ, Martinez-Arribas F, Pollan M, Lucas AR, Sanchez J, Tejerina A, Schneider J – Elevated mammaglobin (h-MAM) expression in breast cancer is associated with clinical and biological features defining a less aggressive tumour phenotype. *Breast Cancer Res*, 5: 65-70, 2003.
173. O'Brien NA, O'Donovan N, Ryan B, Hill ADK, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ. Mammaglobin a in breast cancer: existence of multiple molecular forms. *Int J Cancer*, 114: 623-627, 2005.
174. Zafrakas M, Petschke B, Donner A, Kristiansen F, Kristiansen G, Knuchel R, Dahl E – Expression analysis of mammaglobin A (SCGB2A2) and lipophilin B (SCGB1D2) in more than 300 human tumors and matching normal tissues reveals their co-expression in gynecological malignancies. *BMC Cancer*, 6: 88-101, 2006.
175. Sjodin A, Guo D, Hofer PA, Henriksson R, Hedman H – Mammaglobin in normal human sweat glands and human sweat gland tumors. *J Invest Dermatol*, 121: 428-429, 2003.
176. Tassi RA, Bignotti E, Rossi E, Falchetti M, Donzelli C, Calza S, Ravaggi A, Bandiera E, Pecorelli S, Santin AD – Overexpression of mammaglobin B in epithelial ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol*, 105: 578-585, 2007.
177. Min CJ, Tafral L, Verbanac KM – Identification of superior markers for polymerase chain reaction detection of breast cancer metastases in sentinel lymph nodes. *Cancer Res*, 58: 4561-4584, 1998.
178. Viehl CT, Frey DM, Phommaly C, Chen T, Fleming TP, Gillanders WE, Eberlein TJ, Goedegebuure PS. Generation of mammaglobin-A specific CD4 T cells and identification of candidate CD4 epitopes for breast cancer vaccine strategies. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, 109(2):305-314.
179. Han JH, Kang Y, Shin HC, Kim HS, Kang YM, Kim YB, Oh SY – Mammaglobin expression in lymph nodes is an important marker of metastatic breast carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*, 127: 1330-1334, 2003.
180. Helmi O, Elshishiny F, Mamdouh W. Targeted doxorubicin delivery and release within breast cancer environment using PEGylated chitosan nanoparticles labeled with monoclonal antibodies. *Int J Biol Macromol*, 2021, 184:325-338.
181. Liu Z, Yang X, Duan C, Li J, Tong R, Fan Y, Feng J, Cao R, Zhong W, Feng X, Zhang H, Cai L. Identification and characterization of mammaglobin-A epitope in heterogeneous breast cancers for enhancing tumor-targeting therapy. *Signal Transduct Target Ther*, 2020;5(1):82.
182. Ghasemi-Dehkordi P, Doosti A, Jami MS. The concurrent effects of azurin and Mammaglobin-A genes in inhibition of breast cancer progression and immune system stimulation in cancerous BALB/c mice. *Biotech*. 2019, 9(7):271.
183. Azzopardi JG, Laurini RN. Elastosis in breast cancer. *Cancer*, 1974;33(1):174-183.
184. Gădăleanu V, Galatâr N, Nestor D. Elastosis in breast carcinoma. *Morphol Embryol (Bucur)*, 1981;27(4):347-351.
185. Raica M. Correlation between Scharf-Bloom index and stromal modifications in the breast cancer. *Folia Morphol (Warsz)*, 1988;47(1-4):173-178.
186. Vermeulen MA, van Deurzen CHM, van Leeuwen-Stok AE, van Diest PJ. Elastosis in ERalpha-positive male breast cancer. *Virchows Arch*. 2020. doi: 10.1007/s00428-020-02920-7.

187. Salesse S, Odoul L, Chazée L, Garbar C, Duca L, Martiny L, Mahmoudi R, Debelle L. Elastin molecular aging promotes MDA-MB-231 breast cancer cell invasiveness. *FEBS Open Bio*. 2018;8(9):1395-1404.
188. Simu G, Csaba G. Mast cells in tumour-bearing patients. *Acta Morphol Acad Sci Hung*. 1972;20(3):327-338.
189. Xiang M, Gu Y, Zhao F, Lu H, Chen S, Yin L. Mast cell tryptase promotes breast cancer migration and invasion. *Oncol Rep*. 2010;23(3):615-619.
190. Choi J, Gyamfi J, Jang H, Koo JS. The role of tumor-associated macrophage in breast cancer biology. *Histol Histopathol*. 2018;33(2):133-145.
191. Schoppmann SF, Fenzl A, Nagy K, Unger S, Bayer G, Geleff S, Gnant M, Horvat R, Jakesz R, Birner P. VEGF-C expressing tumor-associated macrophages in lymph node positive breast cancer: impact on lymphangiogenesis and survival. *Surgery*. 2006;139(6):839-846.
192. Evans R, Flores-Borja F, Nassiri S, Miranda E, Lawler K, Grigoriadis A, Monypenny J, Gillet C, Owen J, Gordon P, Male V, Cheung A, Noor F, Barber P, Marlow R, Francesch-Domenech E, Fruhwirth G, Squadrito M, Vojnovic B, Tutt A, Festy F, De Palma M, Ng T. Integrin-mediated macrophage adhesion promotes lymphovascular dissemination in breast cancer. *Cell Rep*. 2019;27(7):1967-1978.
193. Fernández-Nogueira P, Mancino M, Fuster G, López-Plana A, Jauregui P, Almendro V, Enreig E, Menéndez S, Rojo F, Noguera-Castells A, Bill A, Gaither LA, Serrano L, Recalde-Percaz L, Moragas N, Alonso R, Ametller E, Rovira A, Lluch A, Albanell J, Gascon P, Bragado P. Tumor-associated fibroblasts promote HER2-targeted therapy resistance through FGFR2 activation. *Clin Cancer Res*. 2020;26(6):1432-1448.
194. Salesse S, Odoul L, Chazée L, Garbar C, Duca L, Martiny L, Mahmoudi R, Debelle L. Elastin molecular aging promotes MDA-MB-231 breast cancer cell invasiveness. *FEBS Open Bio*. 2018 Aug 2;8(9):1395-1404.
195. Devy J, Duca L, Cantarelli B, Joseph-Pietras D, Scandolera A, Rusciani A, Parent L, Thevenard J, Pasco SB, Tarpin M et al. (2010) Elastin-derived peptides enhance melanoma growth in vivo by upregulating the activation of Mcol-A (MMP-1) collagenase. *Br J Cancer* 103, 1562–1570.
196. Kadar A, Tökés A-M, Kulka J, Robert L: Extracellular matrix components in breast carcinomas. *Semin Cancer Biol* 2002, 12:243–257.
197. Chen Y, Klingen TA, Wik E, Aas H, Vigeland E, Liestøl K, Garred Ø, Mæhlen J, Akslen LA, Lømo J. Breast cancer stromal elastosis is associated with mammography screening detection, low Ki67 expression and favourable prognosis in a population-based study. *Diagn Pathol*. 2014; 9:230.
198. **Floroni E, Ceausu AR, Raica M. Elastosis of the tumor microenvironment as prognostic factor in breast carcinoma. *Res Clin Med*, 2021, vol; 5, 2: 11=16.**
199. Aponte-López A, Fuentes-Pananá EM, Cortes-Muñoz D, Muñoz-Cruz S. Mast cell, the neglected member of the tumor microenvironment: role in breast cancer. *J Immunol Res*. 2018:2584243. doi: 10.1155/2018/2584243.
200. Majorini MT, Cancila V, Rigoni A, Botti L, Dugo M, Triulzi T, De Cecco L, Fontanella E, Jachetti E, Tagliabue E, Chiodoni C, Tripodo C, Colombo MP, Lecis D. Infiltrating Mast Cell-Mediated Stimulation of Estrogen Receptor Activity in Breast Cancer Cells Promotes the Luminal Phenotype. *Cancer Res*. 2020;80(11):2311-2324.
201. Okano M, Oshi M, Butash AL, Katsuta E, Tachibana K, Saito K, Okayama H, Peng X, Yan L, Kono K, Ohtake T, Takabe K. Triple-Negative Breast Cancer with High Levels of Annexin A1 Expression Is Associated with Mast Cell Infiltration, Inflammation, and Angiogenesis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(17):4197. doi: 10.3390/ijms20174197.
202. Reddy SM, Reuben A, Barua S, Jiang H, Zhang S, Wang L, Gopalakrishnan V, Hudgens CW, Tetzlaff MT, Reuben JM, Tsujikawa T, Coussens LM, Wani K, He Y, Villareal L, Wood A, Rao A, Woodward WA, Ueno NT, Krishnamurthy S, Wargo JA, Mittendorf EA. Poor response to neoadjuvant chemotherapy correlates with mast cell infiltration in inflammatory breast cancer. *Cancer Immunol Res*. 2019; 7(6):1025-1035.

203. Floroni E, Ceausu RA, Cosoroaba RM, Niculescu Tapos IC, Popovici RA, Gaje NP, Raica M. **Mast cell density in the primary tumor predicts lymph node metastases in patients with breast cancer. Rom J Morphol, 2022, 1:**
204. Barth PJ, Ebrahimsade S, Ramaswamy A, Moll R. CD34+ fibrocytes in invasive ductal carcinoma, ductal carcinoma in situ, and benign breast lesions. *Virchows Arch.* 2002;440(3):298-303.
205. Westhoff CC, Jank P, Jacke CO, Albert US, Ebrahimsade S, Barth PJ, Moll R. Prognostic relevance of the loss of stromal CD34 positive fibroblasts in invasive lobular carcinoma of the breast. *Virchows Arch.* 2020; 477(5):717