

Breast carcinoma: molecular concepts of structure and pathogenesis

V. Fulga

Department of Histology, Cytology and Embryology, Nicolae Testemitsanu State University of Medicine and Pharmacy
Chisinau, the Republic of Moldova

Corresponding author: vmfulga@usmf.md. Manuscript received November 18, 2014; accepted February 05, 2015

Abstract

Background: Several pathological and clinical factors are used to categorize patients with breast cancer in order to assess the prognosis and establish the appropriate treatment. These include patient age, lymph node status, tumor size, and some tumor histologic features, such as histologic type, histologic grade, lymphovascular invasion. Unfortunately, these data can't predict the potential effect of different treatment modalities, especially in breast tumours. In order to personalize the treatment, molecular profiles detecting becomes a necessity. The identification of tumour initiating cancer stem cells and the molecular subtypes seems to have predictive and prognostic information. This approach is based on expression patterns of intrinsic genes and results in breast cancer classification into subgroups with particular biological properties and response to treatment. The molecular subtypes have a different metastatic activity and correlates with tumour recurrence, response to systemic treatment and survival. In addition they are related to different risk factors and differ by geographic distribution. The aim of this article is to highlight modern concepts of breast cancer pathology having clinical implications and prognostic values.

Conclusions: In spite of multiple genetic researches, only 3 markers have a predictive power and commonly are used to define the therapeutic tactic. The estrogen and progesterone receptors are predictive markers for endocrine therapy and HER2 is a molecular target for trastuzumab and lapatinib. These markers are implemented in oncological practice in combination with other receptors, offered as diagnostical guides (as example StGallen) or included in multivariable algorithms aimed to adjust the personalised treatment (as Adjuvant! Online). The acquired results are scattered, due to morphological heterogeneity of breast carcinoma, different cellular sources, a quiet complicated molecular structure, and low number of markers approved for diagnostic. Although some schemes of treatment seem to be effective, it is not sufficient potential still to achieve a personalized treatment.

Key words: breast cancer, molecular subtypes, surrogate markers.

Carcinomul mamar: concepte moleculare de structură și patogenie

Introducere

Implementarea programelor de screening și profilaxie, precum și a noilor scheme de tratament s-a soldat cu reducerea mortalității în cancerul mamar. În pofida realizărilor genetice, rata înaltă a morbidității oricum plasează acest tip de cancer în topul afecțiunilor maligne. Explicația plauzibilă a acestui fenomen este absența unei descrieri detaliate a heterogenității biologice a carcinomului mamar, care ar lua în considerație alterațiile moleculare, compoziția celulară și sensibilitatea la tratament.

Dat fiind faptul că modelul histologic are utilizare prognostică limitată și este absolut lipsit de valoare predictivă, „portretul” molecular al tumorii devenise o necesitate stringentă a contemporaneității. Inițial, procedeele moleculare au evidențiat profilul genetic diferit, dar ulterior au demonstrat și neomogenitatea receptorilor expresați în cadrul aceluiași tip histologic. Primul „portret molecular” a fost realizat de Perou et al., care au analizat patternul expresiei genetice prin utilizarea ARN-ului a 65 de tumori de la 42 de pacienți [1]. În urma analizei subseturilor genetice caracteristice fiecărui pacient în parte, autorul a delimitat în raport cu profilul molecular al celulelor tumorale 4 grupuri distincte. În continuare, acestea au fost numite subtipuri moleculare intrinseci [1, 2].

Inițial, subtipurile moleculare au fost separate în grupuri, având la bază expresia receptorului la estrogen (ER):

1. ER negative, care a inclus subtipurile: a. Basal-like, b. ERBB2⁺ (sau HER2⁺), c. Normal-like.
2. ER pozitiv, grup numit și Luminal.

Descoperirea devenise și mai incitantă, când Sorlie et al. au evidențiat valoarea prognostică diferită a fiecărui subtip, iar subtipul Luminal a fost divizat în Luminal A și B [3, 4]. Grație patternului său molecular specific (ER, PR, HER2), subtipul Basal-like a fost supranumit și triplu-negativ. Actualmente însă, subtipul triplu-negativ are caracteristici de grup și include cel puțin 4 variante distincte: Basal-like (sau Core-basal), 5-NP (cu fenotip cinci negativ), Claudin-low și Apocrin-like [5, 6].

Meta-analiza vastă a expresiei genetice pe 2833 de cazuri de carcinom mamar a confirmat datele lui Perou et al. [1], inițiind astfel utilizarea în practica oncologică a semnăturilor genetice. La moment, sunt comercializate 2 teste genomice, Oncotype DX și MammaPrint. Ambele teste stau la baza triajelor clinice TAI-LORx (*Trial Assigning Individualized Options for Treatment*), MINDACT (*Microarray in Node-Negative Disease May Avoid Chemotherapy*) și RxPONDER (*Rx for Positive Node, endocrine Responsive Breast Cancer*).

Secvențierea genomului însă nu a primit o răspândire largă, motivul fiind eseele laborioase și costurile înalte pentru practica cotidiană. Astfel, s-au delimitat circa 50 de semnături genetice, capabile de a diagnostica subtipurile moleculare prin procedee de qRT-PCR (*quantitative real time PCR*). Rezultatele obținute în baza studiului acestor clustere genetice (numit și PAM50) s-au dovedit a avea un potențial predictiv net superior în cazul variabilelor clinice clasice precum dimensiunea tumorii, status-ul limfonodal, gradul histologic. Astfel, sensibilitatea la tratament a crescut la 94% în special pentru cazurile ER⁺/metastaze-negative [7]. Studiul genetic

al tumorilor mamare s-a dezvoltat în continuare, determinând apariția multiplelor teste și proceduri de laborator cu rol prognostic și predictiv, precum aCGH (*array-based comparative genomic hybridization*), MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization*), ca variantă a spectrometriei în masă și profilarea epigenetică, care are la bază modificarea histonelor și metilarea ADN-ului.

Deși expresia genică este considerată drept „etalon de aur” în definirea subclaselor moleculare, s-au propus scheme de clasificare, bazate pe utilizarea markerilor imunohistochemici, utilizați în practica cotidiană. Astfel, de comun acord, în delimitarea subclaselor sunt utilizați markerii receptorilor hormonal ER, PR, citokeratinele bazale (CK5/6) și Luminal (CK8/18), expresia receptorului HER2/neu și proteina Ki67 drept marker cantitativ al proliferării celulare [8].

Subtipurile moleculare

În comparație cu conceptul clasic histologic, realizările contemporane definesc carcinomul mamar drept un grup de entități nosologice, ce afectează același organ și își are originea în aceeași structură anatomică. Aceste entități pot fi deosebite după factorii de risc, prezentarea clinică, caracteristicile morfologice și sensibilitatea la terapie [9].

În dendrograma subtipurilor propuse de Perou et al., se disting 2 clase majore de tumori: ER⁺ și ER⁻. Tumorile ER pozitive includ subtipurile Luminal A și B, iar cele ER negative – HER2⁺, Basal-like, Normal-like [1].

Exprimarea receptorilor estrogenici (în special a) pe suprafața celulelor, pe parcursul diferențierii, celula stem – celula matură s-a dovedit a fi importantă fiindcă estrogenul reprezintă principalul agent stimulator al proliferării. Celulele stem la șoarece sunt considerate drept ER negative, pe când la oameni, receptorii ER au fost determinați deja la stadiul de precursori comitați [10]. Aceste populații sunt caracterizate drept populații longevive, cu activitate mitotică obișnuit diminuată. Există presupunerea precum că aceste celule, la rândul lor, au funcția de control a diferențierii celulelor mamare luminală și mioepiteliale, influențând prin factori paracrini cum ar fi amfiredulina.

Importanța grupării după spectrul hormonal este dictată de necesitățile clinice. Astfel, pacientele în premenopauză, cu carcinom ER pozitiv beneficiază de tratament hormonal, bazat pe tamoxifen timp de cel puțin 5 ani, dacă tumora este sensibilă. În postmenopauză, este indicat de elecție tot tamoxifenul, iar după 5 ani se administrează letrozolul. Dezvoltarea rezistenței la tratament în cazurile ER pozitive constituie o indicație pentru utilizarea chimioterapiei.

Pentru pacientele cu tumori hormon-independente (adică cu ER, PR negativi), de elecție este considerată chimioterapia. La femeile tinere sub 35 de ani, cu subtipul triplu-negativ, tumora este mai sensibilă la terapia neoadjuvantă cu antraciline și taxani [11]. Chimioterapia adjuvantă s-a dovedit a fi mai eficientă în cazurile ER⁻, unde absența recurențelor în decurs de 5 ani a fost determinată la femeile în premenopauză în 13,2% carcinoame ER⁻ și în 7,6% tumori ER⁺. La femeile în postmenopauză, efectul chimioterapiei este mai mic, cu predilecție acționând tot în cazurile ER⁻ (9,6%)

față de ER⁺ (4,9%). Studiile adiacente au subliniat că această rată de distribuție între cazurile ER⁺ și ER⁻ nu corelează cu agentul chimioterapeutic, iar la utilizarea preoperatorie (sau terapia neoadjuvantă) efectul citotoxic este de circa 4 ori mai eficient în cazurile ER⁻. Mortalitatea la femeile cu carcinom ER⁺ este constantă de-a lungul timpului, iar în grupul ER⁻, unde inițial este înaltă, după 7-10 ani diminuează la valori mai mici decât în primul grup [12].

Subtipurile moleculare utilizate în practica oncologică

Pentru utilizare în practica cotidiană sunt propuse și examinate detaliat 4 subtipuri: Luminal A, Luminal B/Ki67^{inalt}, Luminal B/HER2⁺, Basal-like [8]. Deși Parker et al. consideră că subtipurile evidențiate în baza markerilor ER, PR, HER2, Ki67 nu corespund întocmai subtipurilor intrinseci evaluate genetic, utilizarea tehnicilor imunohistochemice are o justificare economică și practică [7]. O comparație recentă a rezultatelor triajului ATAC (*Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination*), care utilizează în studiul comparativ eseele genetice OncotypeDxTM și rezultatele obținute în urma aplicării markerilor imunohistochemici (ER, PR, HER2 și Ki67) au demonstrat o perfectă coincidență.

Luminal A

Este cel mai frecvent subtip, determinat în circa 40% cazuri [13]. Acest subtip poate fi caracterizat imunohistochemic drept ER și/sau PR pozitiv, HER2 negativ, cu un indice de proliferare scăzut, determinat în urmă evaluării numerice a markerului Ki67. Valoarea < 14% servește drept barieră de delimitare a valorilor înalte/diminuate pentru Ki67, iar gradul histologic 3 nu este considerat echivalentul lui Ki67 > 14% [8, 14]. Această valoare (< 14%) a fost propusă fiindcă corelează cel mai bine cu definiția subtipului Luminal A din punct de vedere al expresiei genice. Similar și pentru valoarea numerică a celulelor PR pozitive, tumoarea fiind considerată PR⁺ dacă mai mult de 20% din celulele exprimează receptorul dat [8, 15]. Această delimitare a baremurilor însă este în contradicție cu recomandările ASCO (*American Society of Clinical Oncology*), conform căreia tumoarea este considerată ER⁺, PR⁺ dacă cel puțin 1% din celulele tumorale exprimă markerul receptorilor hormonal ER și PR [16]. În unele studii de profil, mai pot fi întâlniți markeri cu expresie pozitivă, dar improprie acestui subtip. Astfel, în 8% cazuri acest subtip s-a asociat și cu receptorii pozitivi, caracteristici de fapt subtipului Basal-like, cum ar fi CK5/6 și EGFR, rezultate care au influențat negativ prognosticul pacientelor [12]. În plus, expresia acestor markeri în testele imunohistochemice necesită utilizarea aplicațiilor genetice în scopul delimitării subtipului Basal-like de Luminal A.

Tratamentul de elecție, propus pentru subtipul Luminal A, are la bază terapia endocrină. Indicații pentru asocierea citostaticelor de comun acord sunt considerate gradul histologic 3 al tumorii și metastaze, determinate în 4 și mai mulți nozi limfatici. Vârsta sub 35 de ani este considerată drept indicație la chimioterapie de 50% dintre oncologi [8]. La femeile în postmenopauză, cu risc sporit de recurențe, sunt indicați inhibitorii de aromatază și tamoxifenul. Subtipul Luminal A, de rând cu Luminal B/HER2⁺, are cea mai înaltă

rată de 5 ani supraviețuire – 75% [13]. În pofida schemelor de tratament bine definite, subtipul Luminal A, deopotrivă cu Luminal B, are cel mai înalt grad de metastazare limfonodală [17].

Luminal B

Este considerat un subtip ER pozitiv, la care ceilalți parametri imunohistochimici (PR, Ki67, HER2) nu corespund definiției de Luminal A [8]. Rata acestui subtip în clasificarea moleculară atinge circa 20%. Actualmente, acest subtip este subdivizat în:

1. Luminal B/HER2⁻, care corespunde definiției clasice, propusă de Perou et al., precum ER⁺, HER2⁻ [1]. În plus, este necesar cel puțin unul din următorii parametri: Ki67 egal sau mai mare de 14%, PR negativ sau mai mic de 20%. Tratamentul propus include terapia hormonală și citostatice, preferențial antraciline.

2. Luminal B/HER2⁺ are definiția imunohistochimică ER pozitiv, HER2⁺ (numit și Luminal B/HER2⁻, supraexpresat sau amplificat), la orice valoare pentru Ki67 și PR. Tratamentul recomandat este mai frecvent combinat, indicând citostatice+tratament anti-HER2+terapie endocrină [8]. Prognosticul în acest subtip este mai rezervat, în comparație cu primele două, fiind apropiat statistic cu subtipul HER2⁺.

HER2 pozitiv

HER2/neu este o protooncogenă care codifică sinteza unei proteine de 185 kDa, membră a familiei de receptori transmembranari tirozin-kinazici. Fiind activată, această enzimă dimerizează și pe diferite căi de semnalizare inhibă apoptoza, astfel stimulând proliferarea celulară. În 1987, Slamon a determinat că amplificarea acestei gene corelează cu diminuarea ratei de supraviețuire.

Subtipul HER2⁺ (sinonim HER2 supraexpresat sau ErbB2) este determinat în 10-15% cazuri. Este caracterizat prin expresia în abundență a receptorului HER2, care în 80% cazuri este asociată cu amplificarea genei HER2 (HER2 amplicon pe cromozomul 17q12). Tipic pentru acest subtip este și mutația genei Tp53 [18]. În restul cazurilor (20%), expresia pozitivă a HER2 este frecvent asociată cu receptorii ER și PR pozitivi, fapt ce califică tumorile date drept Luminal B/HER2⁺. Subtipul HER2⁺ se caracterizează prin comportament clinic agresiv, cu recurențe frecvente și prognostic nefavorabil. Determinarea celulelor tumorale HER2⁺, este privită drept o indicație contemporană pentru utilizarea herceptinei (sau trastuzumab), indiferent dacă carcinomul este ER⁺ sau ER⁻ și de preferat în combinație cu citostaticele [8]. Rata pacienților cu 5 ani supraviețuire este de 50% [13].

Basal-like

Este unul din cele mai studiate subtipuri, numit „Basal-like” datorită sursei sale – celulelor neoplazice care din abundență expresează gene/receptori, uzual determinate în condiții de normă în celulele mamare bazale și mioepiteliale: citokeratinele de molecularitate înaltă (CK5/6, 14, 17), P-cadherina, caveolinele 1 și 2, nestina, receptorul EGFR (factorul epidermal de creștere), CD44 [19]. Important este faptul că în procesul de tumorogeneză, acest subtip poate achiziționa markeri atipici. Impropiu, dar uneori acest sub-

tip exprimă caracteristici proprii epiteliului Luminal, cum ar fi citokeratinele 8/18 și cKit-ul (CD117), ultimul fiind frecvent întâlnit și în alte subtipuri ER negative [20]. Paradoxal, dar în 6-29% cazuri acest subtip este și ER, PR pozitiv, iar în 9-13% poate fi chiar și HER2⁺ [2, 6]. Aceste date au servit drept bază pentru a conchide că subtipul Basal-like are drept origine nu numai celula stem bipotentă, dar și predecesorii Luminali [9, 21]. Asocierea markerilor Luminali și bazali constituie cauza apariției în literatura de specialitate a subtipului Luminobasal [22].

Pentru confirmarea diagnosticului de subtip Basal-like este recomandat, de rând cu receptorii hormonal și HER2, să fie utilizați CK5/6 și EGFR, caracteristic determinați drept pozitivi la acest subtip [6]. Metoda dată (*five marker method* sau *Core basal group*) are o sensibilitate de 76% și 100% specificitate. Însă, conform lui Badve et al., în 18-40% cazuri, carcinomul Basal-like definit după profilul genetic nu are un fenotip histochimic caracteristic acestui tip și invers, 8-29% din carcinoamele Bazal-like, definite ca markeri surogat imunohistochimici nu coincid cu profilul genetic caracteristic acestui subtip [21].

Definiția imunohistochimică a acestui subtip a evaluat pe parcursul timpului după cum urmează:

1. Inițial a fost definit la absența expresiei ER, PR și HER2 [1, 2].

2. Apoi a fost adăugată expresia uneia sau mai multor citokeratine bazale (CK 5/6, CK14, CK17). Pragul limită pentru a considera tumora CK5 pozitivă a fost > 1% de celule pozitiv marcate. De menționat că anticorpii CK5 este mai sensibil, în comparație cu CK5/6 în determinarea citokeratinelor bazale.

3. Ulterior, absența expresiei ER și HER2 a evaluat în concordanță cu expresia pozitivă a CK5/6 și/sau EGFR. De menționat că EGFR pozitiv s-a determinat în 54% cazuri în concordanță cu CK5/6 pozitiv și în 11% cazuri – cu CK5/6 negativ. Prezența acestui marker (EGFR) este asociată cu prognostic rezervat, indiferent de status-ul limfonodal.

4. La moment, este definit în cazul absenței expresiei ER, PR și HER2 în concordanță cu expresia pozitivă CK5/6 și/sau EGFR.

5. Definiția subtipului Basal-like, propusă pentru utilizarea în practica oncologică, este ER și PR negativ, HER2 absent [8].

Carcinoamele Basal-like, în marea majoritate histologic, sunt ductal invazive de tip NST (*no special type*), de asemenea, uneori prezentând particularități proprii tipurilor medulare, metaplastice, secretorii, mioepiteliale sau carcinomului cistic adenoid. Recent, s-a constatat că, rareori, în carcinomul lobular invaziv și celule tumorale pot expresa citokeratina CK5/6. Subtipul Basal-like, deseori, se caracterizează printr-un grad histologic G3 (în 91% cazuri), un indice mitotic înalt, zone centrale de necroză, infiltrate limfocitare pronunțate, arii metaplastice. Conform frecvenței, acest subtip prevalează la femeile tinere de origine africană și hispanică și este asociat cu factori de risc bine definiți [10]. Particularitățile morfologice și imunohistochimice ale acest-

tui subtip sunt foarte asemănătoare cu tumorile derivate din culturi celulare cu mutații BRCA1 și p53. Tratamentul este bazat pe chimioterapie. Subtipul Basal-like este diagnosticat în 15-20% cazuri. Rata maximă a recurențelor se înregistrează la 3 ani, rata de 5 ani supraviețuire este de 68%, iar 65% din paciente nu dezvoltă metastaze în decursul acestor 5 ani.

Subtipurile moleculare în stadiul de cercetare Triplu negativ

Profilul imunohistochimic de la prima definire nu s-a schimbat, fiind caracterizat drept ER⁻, PR⁻ și HER2 negativ [1-3]. Inițial, acest subtip a fost considerat drept sinonim al Basal-like. Prin utilizarea markerilor adiționali, acest subtip este structurat actualmente în Basal-like, Cinci-negativ (sau fenotip 5-NP) și Claudin-low. O serie de subtipuri, derivate din Triplu-negativ sunt în stadiul de descifrare genetică: *Basal-like1*, *Basal-like2*, *Immunomodulator*, *Mezenchimal*, *Mezenchimal stem-like*, *Luminal-androgen receptor* [23]. Conform autorilor, fiecărui subtip îi este caracteristic un anumit set de gene. Astfel, Basal-like1 și 2, exprimă genele frecvent implicate în sinteza factorilor de creștere. Subtipul Immunomodulator are la bază kitul genetic, caracteristic celulelor imune, iar Mezenchimal și Mezenchimal stem-like, genele responsabile de motilitatea și diferențierea celulară. Diferențierea ultimelor 2 subtipuri utilizează expresia diminuată a genelor proliferative în Mezenchimal stem-like. Subtipul Luminal-androgen receptor este caracterizat de supraexpresia receptorilor ER, PR, de rând cu genele responsabile de status-ul AR (androgen receptor). Unele clasificări și recomandări practice contemporane mai utilizează și termenul de Triplu-negativ ca sinonim al Basal-like [8]. Tipic triplu-negativ, cu caracteristici histologice și genetice deosebite, este considerat carcinomul cistic adenoid.

Normal-like

Profilul molecular al acestui subtip include semnaturi genetice proprii fibroadenomului și mostrelor de glandă mamară în normă, țesutului adipos și matricei extracelulare, expresând în abundență laminina și integrina alpha 7 [24]. Expresia histologică frecventă este celularitatea diminuată (< 50%). Tumorile acestui subgrup nu sunt încă bine definite, existând suspiciunea că sunt, de fapt, un artefact de colectare și contaminare masivă a tumorii cu țesut normal [7]. Conform lui Perou și Sorlie et al. [1-3], acesta se referă la carcinoamele ER negative, există însă și rezultate contradictorii, evidențiind tumorile date în grupul predominant ER-pozitiv [7, 25]. Înregistrat în 10-15% cazuri, acest subtip exprimă CD36, alcool dehidrogenaza tip 2, glicerol-3-fosfat dehidrogenaza, lipoprotein lipaza A, vimentina, TWIST1 [2]. Ultimii 2 markeri, vimentina, TWIST1, precum și fenotipul frecvent întâlnit CD24⁻/CD44⁺ sugerează sursa sa bazală (stem). În pofida acestei surse nediferențiate, subtipul Normal-like, de rând cu Luminal A, este asociat cu un prognostic favorabil [25]. Rata de 5 ani supraviețuire – 94%.

Molecular apocrin

A fost denumit grație expresiei apocrine a celulelor în preparatele histologice: citoplasmă eozinofilă cu granulație

fină, nucleu și nucleoli relativ mari. Frecvent, aceste tumori au un caracter agresiv în evoluție, un grad histologic G3, prezintă invazie limfovaculară și metastaze timpurii. Diagnosticul este afirmativ în cazul când celulele apocrine constituie cel puțin 90%. Rata acestor tumori constituie circa 4%, iar riscul de îmbolnăvire crește odată cu vârsta. Prezența fenotipului histologic specific însă nu este asigurat și de un profil imunohistochimic particular. Astfel, în studiul efectuat de Lehmann-Che et al., tabloul histologic specific a fost determinat în doar 7% cazuri, diagnosticate ca molecular apocrine [26]. Acest subtip este asemănător după profil cu HER2⁺, însă specific îi este supraexpresia receptorului androgenic (AR). De menționat, că AR⁺ este determinat în circa 70% carcinoame mamare, deseori asociindu-se cu receptorii ER și PR pozitivi. Însă, conform datelor relatate de Celis et al., una din caracteristicile moleculare specifice acestui subtip este receptorul estrogenic negativ [27]. În tumorile hormon-independente, acest receptor este determinat în circa 30%, creând dificultăți de diagnostic diferențial cu subtipurile Basal-like și HER2⁺ [28]. Activarea genomului pe secvența AR este cauza rezistenței la hormonoterapie în cazurile ER⁺, iar supraexpresia adiacentă a HER2 în 50% cazuri, servește rațional drept indicație pentru utilizarea în tratament a trastuzumabului. În comparație cu subtipul molecular apocrin, subtipul Basal-like este exclus datorită absenței în 100% cazuri a expresiei AR, HER2 și GCDFP1. După Niemeier et al., pentru a diagnostica acest subtip, este suficientă una din combinațiile de markeri: ER(-)/PR(-)/HER2(+)/AR(+) sau ER(-)/PR(-)/HER2(-)/AR(+) [29]. Însă Lehmann-Che et al. consideră că confirmarea acestui subtip în baza determinării imunohistochimice a markerului AR nu este suficientă, din cauza expresiei acestuia în doar 58% cazuri de subtipuri molecular apocrin, justificate și prin teste genetice [26]. Aceste date corelează cu rezultatele anterioare. Collins et al. au determinat supraexpresia AR în 70% carcinoame mamare, iar Loibl (2011) susține că majoritatea sunt tumori Luminale cu grad histologic diminuat [11, 30].

Conform autorilor, profilul imunohistochimic al acestor tumori trebuie completat cu markeri suplimentari și poate fi caracterizat drept ER⁻ (în 93% cazuri), PR⁻ (97%), AR⁺ (58%), FOXA1⁺ (90%) (*Forkhead box protein A1*), HER2⁺ (67%), GCDFP1⁺ (57%), EGFR (70%) CK5/6⁻ (89%), CK17⁻ (95%) [26]. Specificitatea markerului FOXA1 (factor ce facilitează recrutarea ER și AR) este limitată din cauza expresiei pozitive a acestuia și în 30% – de carcinom Basal-like. Nu este strict specific nici markerul GCDFP15 (produs ce rezultă în urma acțiunii AR asupra genei *PIP-prolactin induced protein*), determinat pozitiv în ambele grupuri de carcinom mamar, hormon-dependent și independent. Recent, Lehmann et al. au descris un nou subtip *Luminal androgen receptor pozitiv* în componența grupului Triplu-negativ [23]. Caracteristica imunofenotipică a acestuia însă este identică cu a subtipului molecular apocrin. Aceasta indică că subtipul dat încă nu este clar definit ca entitate nosologică, iar aplicarea în practică este prea timpurie.

Subtipul *Interferon-rich*

Acest subtip face parte din grupul Triplu-negativ, caracterizat în plus și prin supraexpresia genelor reglate de interferon, cum ar fi STAT1. Are un prognostic relativ mai bun, în comparație cu subtipurile Basal-like și HER2⁺ [31].

Subtipul *Claudin-low*

Herschkowitz et al. au comparat profilul genetic al carcinomului mamar uman cu tumorile derivate la șoareci genetic modificate [5]. Astfel a fost determinat un subtip intrinsec nou, căruia îi este caracteristică expresia diminuată a Claudin-genelor, obișnuit necesare la definirea joncțiunilor celulare strânse. Nivelul expresiei genelor răspunzătoare de proliferare este slab pronunțat, poziționând acest subtip între Basal-like, HER2⁺, Luminal B, pe de o parte, și Luminal A, Normal-like, pe de altă parte. Aceasta a sugerat clasificarea tumorii date în categoria de "slow cycling tumors" (tumori cu ciclul celular încetinit) [6]. De menționat că majoritatea tumorilor corespondente la șoareci erau cu deficiențe genetice BRCA1 și p53. Acestui subtip încă de la descoperire i s-au atribuit particularități transcriptomice, caracteristice unui cancer derivat din celulele stem [5]. Actualmente, profilul molecular este definit ca ER⁻, PR⁻, HER2⁻, CDH1^{low/-}, CLDN^{low/-}, CK8/18⁻, CK5/6⁻, E-cadherin⁻, frecvent CD44⁺. Important este faptul că în 15-25% cazuri, acest subtip este și ER, PR pozitiv [6]. Componentul infiltrativ limfocitar bine dezvoltat este susținut de prezența în abundență a markerelor, proprii B și T limfocitelor, precum ar fi CD4 și CD79a. De rând cu claudina, un component necesar joncțiunilor intercelulare, acest subtip pierde și E-cadherina. Aceste caracteristici genetice ar induce presupunerea că subtipul Claudin-low corespunde din punct de vedere histologic carcinomului lobular invaziv. Morfologic însă, patternul este mai frecvent ductal invaziv, metaplastic și medular, însoțit de infiltrate limfocitare abundente, grad histologic G3 [6].

Conform lui Perou et al., subtipurile intrinseci reflectă celulele mamare oprite în diferențierea sa epitelială la un anumit stadiu [32]. Astfel, conform autorului, subtipul Claudin-low reprezintă cea mai primară tumoră, celulele căreia manifestă cea mai mare similaritate cu celulele stem mamare. În favoarea acestei presupunerii, pledează faptul că subtipul Claudin-low, de rând cu cel Normal-like, expresează în abundență aldehid dehidrogenaza 1 (ALDH1), caracteristică celulelor stem mamare normale și canceroase [33]. Datele experimentale susțin că acest tip de carcinom conține în abundență și celule stem CD44^{high}/CD24^{low/-}. Analizând genomul acestor celule, s-a determinat semnătura genetică responsabilă de inițierea creșterii tumorale, care prin surprindere conține multiple gene proprii celulelor mezenchimale, precum ZEB2 și TWIST1. Expresia ultimei (TWIST1) în abundență este considerată drept cauza represiei E-cadherinei [32]. Sursa sa precoce de origine (celula stem) este un impediment în diagnosticul diferențial al acestui subtip cu tumorile stromale.

Acest carcinom este diagnosticat în 12-14% cazuri [15]. Ignorarea acestuia în practica cotidiană pledează în favoarea diagnosticării subtipului Basal-like. Prognosticul pentru

acest subtip este mai nefavorabil în comparație cu Luminal A sau are aceleași valori ca și în cazurile Luminal B, HER2 și Basal-like. Tratamentul este limitat la chimioterapie. Datele preliminare privind sensibilitatea la terapia adjuvantă plasează acest subtip intermediar, între Basal-like și subtipurile Luminale.

Subtipul cu Fenotip 5-negativ (5-NP)

Profilul molecular al acestui subtip include expresia negativă a 5 markeri: ER, PR, HER2, CK5/6 și EGFR. O supra-viețuire de 5 ani ating 50% dintre paciente [13]. În pofida faptului că acest subtip a fost reprezentat în majoritate de tumori cu grad G2, autorul susține că prognosticul în cazul 5-NP este mai rezervat decât pentru subtipul Basal-like. Aceasta însă este în contradicție cu rezultatele publicate anterior [12]. Cel mai probabil, în viitor, la utilizarea markerilor adiționali, acest subtip va fi clasificat în subtipuri adiționale din care cauză este numit adițional „neclasificat”, nume inițial atribuit și subtipului Normal-like.

Clasificarea carcinomului mamar în subtipuri moleculare Luminal A, Luminal B/HER2⁺, Luminal B/HER2⁻ și Basal-like are și neajunsuri, care îi limitează utilizarea clinică:

- din toate subtipurile propuse, la moment doar diagnosticul de Basal-like (*Core-basal*) are o valoare predictivă;
- metodele utilizate de diverse grupuri de cercetare în delimitarea subtipurilor nu sunt ajustate, standardizate, prezentând divergențe în modelarea cercetărilor și taxonomie. Astfel, 25% din tumorile ER⁺ în clinică sunt reevaluate și catalogate drept non-Luminale în urma procedurilor genetice [7];
- un șir de profiluri moleculare sunt încă în stadiul de cercetare, altele, cum ar fi Normal-like – pe cale de a fi excluse;
- cu toate că diferențierea carcinomului întrunește multiple stadii, clasificarea carcinomului mamar după profilul hormonal este bimodală (ER^{+/-}) și nu reflectă toate subtipurile posibile;
- pragul de definire a tumorii drept pozitivă/negativă, în funcție de numărul celulelor ER, PR imunomarcate, variază în limite largi (1-20%). Aceasta permite comutarea subtipului din grupul ER⁺ în ER⁻, astfel schimbând ușor subtipul și esențial prognosticul și tratamentul;
- subtipurile nu sunt stabile. Fiecare subtip este bine definit imunohistochimic, însă de rând cu calitățile clasice, sunt și excepții nu tocmai în favoarea dezvoltării nosologiei a subtipurilor moleculare.

O altă clasificare a subtipurilor moleculare a fost prezentată de Blows et al. (fig. 1) [12]. Astfel, carcinomul mamar identic viziunii clasice a lui Perou et al. este divizat în baza expresiei receptorilor ER și PR, în Luminal (*hormone-dependent*, ER⁺, PR⁺) și non-Luminal (*hormone-independent*, ER⁻, PR⁻) [1]. La următoarea etapă, ambele subgrupuri sunt cercetate la expresia receptorului HER2, evidențiind cazurile pozitive și negative. La etapa a 3, sunt evaluați receptorii CK5/6 și EGFR, divizând cazurile în basal-pozitive și basal-negative. Conform acestei viziuni, se deosebesc 8 subtipuri de carcinom:

1. Luminal/HER2⁻/Basal corespunde subtipului Luminal A. În cercetarea dată, acest subtip a constituit 92% din totalitatea cazurilor subgrupului Luminal/HER2⁻.

2. Luminal/HER2⁻/Basal⁺ – acest subtip include tumorile care, de rând cu hormon-receptorii, prezintă și unul din receptorii proprii celulelor bazale. Aici, se încadrează perfect cele 6-29% excepții ale subtipului Basal-like clasic prezentate mai sus [2, 15]. În alt studiu, frecvența acestui subgrup a constituit 8% [12].

3. Luminal/HER2⁺/Basal⁻ – descrierea imunofenotipică HER2⁺ corespunde subtipului Luminal B/HER2⁺ clasic.

4. Luminal/HER2⁺/Basal⁺ – acest subtip prezintă receptori din toată linia de diferențiere mamară.

5. Non-Luminal/HER2⁺/Basal⁻ – echivalent după descriere cu subtipul clasic HER2⁺. Conform autorului, constituie 6% din cazuri.

6. Non-Luminal/HER2⁺/Basal⁺ – acest subtip este constituit din celule cu receptori caracteristici pentru subtipurile *Core-basal* și HER2⁺ pozitive. Aici se încadrează și cele 9-13% cazuri inexplicabile de Sorlie et al. pentru subtipul Basal-like, asociate cu receptorul HER2 pozitiv [2].

7. Non-Luminal/HER2⁻/Basal⁺ este echivalentul subtipului Basal-like, expresând doar CK5/6 și EGFR. Din totalul (16%) cazurilor grupului Non-Luminal-HER2⁻ (sinonim Triplu-negativ în varianta clasică), acesta constituie 58%, iar din lotul total de studiu – 9%.

8. Non-Luminal/HER2⁻/Basal⁻ corespunde subtipului 5-NP (toți cinci markeri sunt negativi). În subgrupul Non-Luminal-HER2⁻ acesta constituie 42%, iar din cohorta totală – 7%.

Originea carcinomului mamar

Un șir de autori presupun că clasificarea histologică a carcinomului reflectă, în special, diferențierea tumorală și nu histogeneza. Adepții divizării moleculare a carcinomului

mamar subliniază impactul histogenetic al noii clasificări. Sorlie et al. au sugerat că subtipurile luminal și bazale de carcinom derivă corespunzător din celulele mamare luminal și bazale [2]. Astfel s-a delimitat o nouă direcție de studiu, axată pe determinarea sursei de dezvoltare a carcinomului mamar [34]. Deși ipoteza privind existența celulelor stem canceroase mamare există de mai mult timp, izolarea și caracterizarea acestora a fost posibilă relativ recent. Teoria dată (*cancer stem cell theory*) declară că în tumoare există un grup mic de celule responsabile pentru inițierea și proliferarea tumorii, în rest tot componentul celular al tumorii are un potențial tumorigen diminuat. Altfel spus, doar o mică populație celulară din carcinomul mamar are capacitatea de a se auto-reînnoi și reconstitui din totalitatea celulară a tumorii primare.

Originea celulară a celulelor canceroase mamare nu este încă bine determinată, fiind propuse 2 ipoteze. Prima susține că heterogenitatea carcinomului mamar este rezultatul diferitor tipuri de oncogene, activate în celula stem mamară. Astfel, activarea oncogenei X va rezulta cu subtipul basal, a oncogenei Y – cu subtipul ErbB2, a oncogenei Z – cu subtipul Claudin-low, a genei tumor suppressor X – cu Luminal A, a genei tumor suppressor Y – cu Luminal B. A 2-a teorie presupune dezvoltarea celulelor tumorale din progenitorii celulari pe parcursul diferențierii. Celula mamară stem este presupusa sursă pentru subtipul Basal și Claudin-low, iar celula progenitoare luminal-comitată poate dezvolta subtipurile luminal și ErbB2. Celula progenitoare mioepitelial-comitată ar putea să dezvolte varianta Claudin-low.

Corelând rezultatele analizelor genetice, transcriptomice s-au determinat un șir de particularități comune pentru carcinoamele ductal invazive de tip NST cu grad histologic G1, carcinomul lobular invaziv, tubular, cribriform și tubulo-lobular:

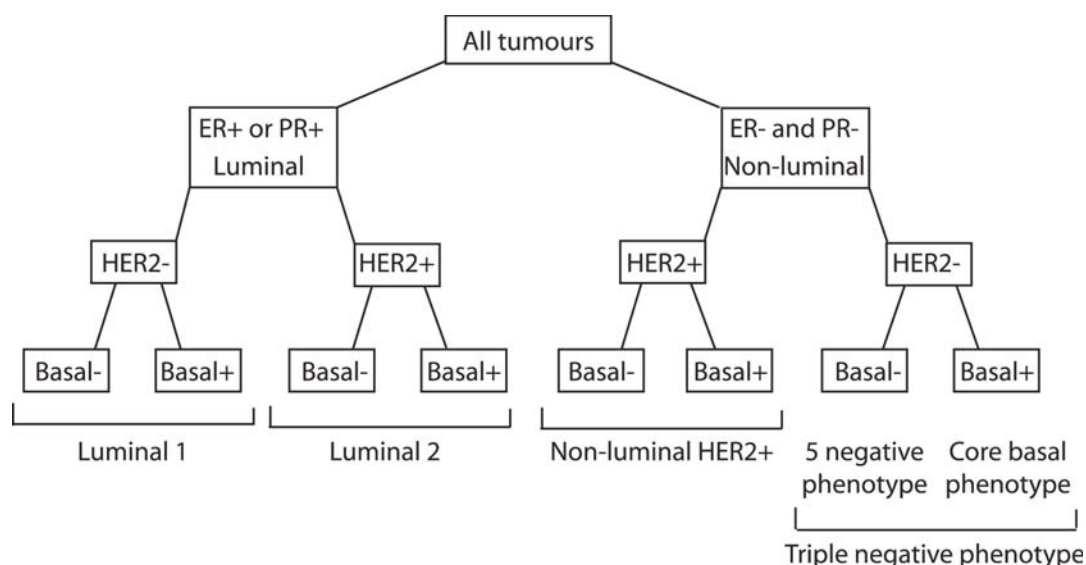


Fig. 1. Clasificarea subtipurilor moleculare după Blows et al. (2010).

Această viziune a subtipurilor moleculare privește procesul de diferențiere a epitelului mamar ca unul dinamic, iar procesul de carcinogeneză poate surveni la oricare din ele. Un neajuns al acestei clasificări este absența estimării ratei de proliferare a celulelor tumorale, apreciată în clasificarea primară cu markerul Ki67.

1. Au aceeași prezentare clinică, în pofida descrierii histologice diferite.

2. Au același grup de leziuni preinvazive (hiperplazii atipice, carcinoame *in situ*).

3. Imunofenotip similar: obișnuit sunt ER și PR pozitive, nu expresează HER2.

4. Au același pattern al aberațiilor genetice: deleții la 16q, cuplate cu surplusuri 1q și 16p, grație translocațiilor cromozomiale dezechilibrate.

Aceste date au servit drept bază pentru a susține că formele histologice sus-numite au la origine același grup de progenitori, astfel delimitând "low grade breast neoplasia family" (familia neoplaziei mamare cu grad diminuat) [35].

O altă ipoteză ține de transformarea malignă a celulei stem mamare normale (MaSC). Existența MaSC a fost presupusă și ulterior dovedită în multiple cercetări [36]. Inițial s-a izolat o clasă de celule cu pattern CD44^{high}/CD24^{low/-}, capabile de a genera tumori la implantarea a cel puțin 200 de celule la șoareci imunocompromiși. Această activitate tumorigenă se păstra și după multiple pasaje. Din contra, celulele canceroase la care absentează semnătura CD44^{high}/CD24^{low/-} nu erau capabile de a genera tumori la orice populație numerică. Balic et al. au determinat celule cu astfel de fenotip în măduva osoasă a pacienților cu cancer mamar, sugerând că combinația CD44^{high}/CD24^{low/-} este un marker al activității metastatice sporite [37]. Numeric această populație constituie 0,6-5% din totalul celulelor tumorale și este caracterizată printr-o rată sporită de proliferare, înaltă motilitate celulară.

Semnătura genetică a celulelor cu astfel de fenotip a corelat surprinzător atât cu rata totală de supraviețuire, cât și cu perioada de absență a recurențelor. Astfel, s-a presupus că cuantificarea celulelor stem mamare canceroase ar avea o valoare prognostică [25]. Izolarea cantitativă prin citometrie de flux a celulelor stem mamare a fost posibilă odată cu descoperirea rolului enzimei intracelulare aldehyd dehidrogenaza 1 (ALDH1) drept marker al celulelor stem. Ginestier et al. susțin că celulele stem ALDH1⁺ și fenotip CD44^{high}/CD24^{low/-} posedă un potențial tumorigen crescut [38]. Determinarea celulelor ALDH1⁺ s-a dovedit a fi de importanță practică, tumorile cu astfel de pattern fiind asociate cu grad histologic 3 și prognostic nefavorabil. Mai mult, subtipurile bazale care au un fenotip triplu-negativ, conțin un număr net superior de celule stem mamare canceroase comparativ cu alte subtipuri [28]. Recent, Neumeister et al. au determinat că coexpresia ALDH1, CD44 și a citokeratinelor pledează pentru un prognostic nefavorabil [39]. Tumorile ALDH1⁺ sunt relativ rezistente la chimioterapia secvențială cu paclitaxel și epirubicină. Mai mult, populația numerică a acestor celule chiar crește după terapia neoadjuvantă.

Drept marker prospectiv al MaSC poate fi considerat și CD49f, nivelul sporit al căruia în carcinomul mamar corelează cu rata de supraviețuire redusă. Utilizând doi markeri de suprafață, EpCAM și CD49f, Lim et al. au determinat 3 populații celulare derivate ale MaSC în glanda mamară normală [36]:

1. MaSC/celule bipotente, cu fenotip CD49f^{high}/EpCAM⁻.

2. Celule progenitoare Luminal-comitate, caracterizate conform markerilor CD49f⁺/EpCAM⁺.

3. Celule mature ER⁺/Luminale cu fenotip CD49f⁺/EpCAM⁺.

Autorii au demonstrat că celulele progenitoare luminal-comitate sunt foarte asemănătoare după profilul genetic cu tumorile mamare Basal-like. Mai mult, această subpopulație a prezentat o expansiune aberantă a mutațiilor BRCA1, prezența cărora prezintă un risc sporit (80%) de dezvoltare a neoplasmului. După Prat et al., comparând ierarhia de dezvoltare a epitelului glandular mamar cu subtipurile carcinomului, cel mai aproape de MaSC/bipotente este Claudin-low [6]. Utilizând dubla imunofluorescență cu pan-keratină, drept marker epitelial și vimentina în calitate de marker mezenchimal, s-a determinat o colorare dublă a celulelor tumorale în 85% din subtipurile Claudin-low și Basal-like. Aceasta a permis autorilor să susțină că celulele canceroase din subtipurile menționate sunt de natură epitelială și posedă proprietăți mezenchimale reziduale.

Celula progenitoare luminal-comitată este presupusă sursă de dezvoltare pentru Basal-like și HER2⁺, subtipurile Luminale având drept sursă celulele mature ER⁺/Luminale. Mai puțin este cunoscut în această ierarhie despre celulele mioepiteliale. Visvader et al. susțin că precursorul mioepiteliocitului derivă din celula MaSC/bipotentă înainte ca aceasta să devină luminal-comitată, fără a evidenția careva corelații cu subtipul Claudin-low [34].

După Creighton et al. dezvoltarea diverselor subtipuri moleculare este posibilă pe 2 căi [40]:

A. Modelul „evoluției liniare” – mutațiile genetice secvențiale pot conduce la dediferențierea treptată a celulei luminal până la subtipul Basal-like.

B. Modelul „căilor distincte de progresie” – o celulă luminală normală este convertită într-un subtip anumit datorită unei mutații specifice (fig. 2).

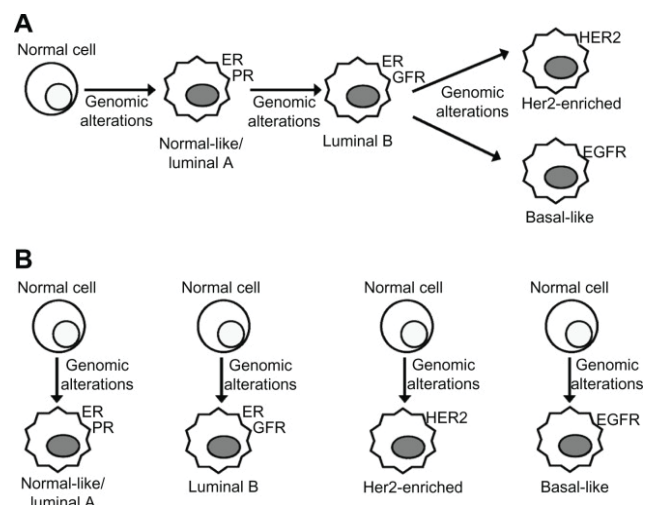


Fig. 2. Căile de dezvoltare a subtipurilor moleculare după Creighton CJ (2012).

Aberații genetice și subtipurile moleculare

Tumorogeneza este un proces multistadial, care include diferite alterații genetice, calitative și cantitative, precum și alterări epigenetice, cum ar fi metilarea ADN-ului și modificarea proteinelor histone. Studiile în domeniu caracterizează carcinomul mamar ca foarte heterogen la nivel de genom, iar cercetările bazate pe hibridizarea genomului au demonstrat diferențe genetice între subtipurile moleculare din același grup. Depleția la cromozomul 16q este considerată drept eveniment precoce în gradul histologic G1. Astfel, s-a demonstrat absența brațului lung al cromozomului 16 în 65% carcinoame ductal invazive cu grad histologic G1, ER⁺ și în 16% – cu grad G3, ER⁻. Acest pattern al depleției a stat la baza concluziei, că majoritatea tumorilor G1 nu progresaază pe parcursul evoluției bolii în G3, fiindcă aceasta necesită restabilirea materialului genetic pierdut. Depleția dată este specifică în totalitate carcinomului lobular infiltrativ și ductal invaziv G1. Un surplus de material genomic la nivelul cromozomului 6 (6p21-p25) a fost citat drept caracteristic tumorilor ER⁻ și subtipurii Basal-like. Faptul că profilul genetic presupune și un anumit subtip molecular este demonstrat de Sorlie et al, punând în evidență mutațiile BRCA1 mai frecvent în tipul Basal-like, iar BRCA2 în cele Luminale [3].

Lim et al. însă contestă, susținând că mutațiile BRCA1 sunt mai curând specifice celulelor progenitoare comitate, decât celulelor bazale stem [36]. După Prat et al., mutațiile BRCA1 sunt cel mai frecvent înregistrate în subtipul Basal-like (67%), posibile în 22% de Claudin-low, și rareori întâlnite (5,5%) în subtipurile HER2⁺ și Normal-like (5,5%) [6].

Mutațiile TP53 sunt frecvent întâlnite în grupul ER⁻, în special în 90% subtipurile Triplu- negative și în 50% din subtipurile Molecular-apocrin [26].

Concluzii

Managementul pacientelor cu carcinom mamar este încă ghidat de particularitățile clinicopatologice și markerii histopatologici. În pofida multiplelor cercetări în domeniul geneticii, doar 3 markeri au influență predictivă și sunt de comun acord utilizați în definirea tacticii terapeutice. Receptorii la ER (estrogen) și PR (progesteron) sunt markeri predictivi în terapia endocrină, iar markerul HER2 (factorul uman de creștere epidermală 2) drept țintă moleculară pentru trastuzumab și lapatinib. Acești markeri sunt implementați în practica oncologică în combinație cu alți receptori în calitate de ghiduri diagnostice (drept exemplu StGallen), fie sunt incluși în algoritme multivariabile necesare în ajustarea tratamentului personalizat (precum Adjuvant!Online). Rezultatele obținute în urma acestor implementări sunt contradictorii, grație heterogenității morfologice a carcinomului mamar, a surselor celulare variate, a structurii moleculare prea complicată, și numărului mic de markeri aprobați pentru diagnostic în practica oncologică. Deși unele scheme de tratament par a fi efective, nu există încă un potențial suficient pentru realizarea unei terapii personalizate.

Mulțumiri

Această lucrare a fost susținută de grantul 13.820.09.08/RoF de Cooperare bilaterală România-Moldova a Academiei de Științe a Moldovei.

Referințe bibliografice

1. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406:747-52.
2. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:10869-74.
3. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:8418-23.
4. Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol*. 2010;23(suppl 2):S60-S64.
5. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*. 2007;8:76.
6. Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12:68.
7. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;27:1160-7.
8. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013;24(9):2206-23.
9. Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6:718-730.
10. Clarke CA, Keegan TH, Yang J, et al. Age-specific incidence of breast cancer subtypes: understanding the black-white crossover. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104:1094-1101. <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djs264>
11. Loibl S, Müller BM, von Minckwitz G, et al. Androgen receptor expression in primary breast cancer and its predictive and prognostic value in patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;130:477-487.
12. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med*. 2010;7(5):e1000279.
13. Engström MJ, Opdahl S, Hagen AI, et al. Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;140(3):463-73.
14. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101:736-750.
15. Prat A, Cheang MC, Martin M, et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31:203-209.
16. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134:907-922.
17. Zhou W, He Z, Xue J, et al. Molecular subtype classification is a determinant of non-sentinel lymph node metastasis in breast cancer patients with positive sentinel lymph nodes. *PLoS One*. 2012;7(4):e35881.
18. Varna M, Bousquet G, Plassa LF, et al. TP53 status and response to treatment in breast cancers. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:284584.
19. Klingbeil P, Natrajan R, Everitt G, et al. CD44 is overexpressed in basal-like breast cancers but is not a driver of 11p13 amplification. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;120:95-109.
20. Westbury CB, Reis-Filho JS, Dexter T, et al. Genome-wide transcriptomic profiling of microdissected human breast tissue reveals differential expression of KIT (c-Kit, CD117) and oestrogen receptor-alpha (ERalpha) in response to therapeutic radiation. *J Pathol*. 2009;219:131-140.

21. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol.* 2011;24(2):157-67.
22. Joensuu K, Leidenius M, Kero M, et al. ER, PR, HER2, Ki-67 and CK5 in early and Late Relapsing Breast cancer-Reduced CK5 expression in Metastases Breast Cancer. *Breast Cancer (Auckl).* 2013;7:23-34.
23. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011;121:2750-2767.
24. Peppercorn J, Perou CM, Carey LA. Molecular subtypes in breast cancer evaluation and management: divide and conquer. *Cancer Invest.* 2008;26:1-10.
25. Liu Z, Zhang XS, Zhang S. Breast tumor subgroups reveal diverse clinical prognostic power. *Sci Rep.* 2014;4:4002.
26. Lehmann-Che J, Hamy AS, Porcher R, et al. Molecular apocrine breast cancers are aggressive estrogen receptor negative tumors overexpressing either HER2 or GCDFP15. *Breast Cancer Res.* 2013;15(3):R37.
27. Celis JE, Cabezón T, Moreira JM, et al. Molecular characterization of apocrine carcinoma of the breast: validation of an apocrine protein signature in a well-defined cohort. *Mol Oncol.* 2009;3:220-237.
28. Park SY, Lee HE, Li H, et al. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16:876-87.
29. Niemeier LA, Dabbs DJ, Beriwal S, et al. Androgen receptor in breast cancer: expression in estrogen receptor-positive tumors and in estrogen receptor-negative tumors with apocrine differentiation. *Mod Pathol.* 2010;23:205-212. <http://breast-cancer-research.com/pubmed/19898421>
30. Collins LC, Cole KS, Marotti JD, et al. Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. *Mod Pathol.* 2011;24:924-931. <http://breast-cancer-research.com/pubmed/21552212>
31. Teschendorff AE, Miremadi A, Pinder SE, et al. An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. *Genome Biol.* 2007;8(8):R157.
32. Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist.* 2011;16(Suppl 1):61-70.
33. Resetskova E, Reis-Filho JS, Jain RK, et al. Prognostic impact of ALDH1 in breast cancer: a story of stem cells and tumor microenvironment. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;123:97-108.
34. Visvader JE. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev.* 2009;23:2563-77.
35. Abdel-Fatah TM, Powe DG, Hodi Z, et al. Morphologic and molecular evolutionary pathways of low nuclear grade invasive breast cancers and their putative precursor lesions: further evidence to support the concept of low nuclear grade breast neoplasia family. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(4):513-523.
36. Lim E, Vaillant F, Wu D, et al. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med.* 2009;15:907-913.
37. Balic M, Lin H, Young L, et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res.* 2006;12:5615-5621.
38. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* 2007;1:555-67.
39. Neumeister V, Agarwal S, Bordeaux J, et al. In situ identification of putative cancer stem cells by multiplexing ALDH1, CD44 and cytokeratin identifies breast cancer patients with poor prognosis. *Am J Pathol.* 2010;176:2131-8.
40. Creighton CJ. The molecular profile of luminal B breast cancer. *BioLogics.* 2012;6:289-97.