

PROFILUL MOLECULAR AL CANCERULUI MAMAR: DE LA GENE LA TRĂSĂTURI MORFOLOGICE

Carmen Ionescu, Cornelia Amălinei, Raluca Balan,
Adriana Grigoraș, Irina-Draga Căruntu
Disciplina Histologie
Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr.T. Popa” Iași

THE MOLECULAR PROFILE OF BREAST CANCER: FROM GENES TO HISTOLOGICAL FEATURES (Abstract): During the last decade, one of the main directions in the breast cancer research was oriented to the genetic profile, focusing on a deeper understanding of the molecular background that sustains the biological features (such as histological grade and metastasis potential) as well as on a better identification of some specific patterns, correlated with prognosis and therapeutic responses. The definition of new subtypes, in accordance with the genetic expression confirms, at the molecular level, the already existing concept of clinical and histological heterogeneity for the breast cancer. Despite a large number of papers dedicated to this subject, there are still unclear issues in the characterization of the molecular subtypes and, most probably, the number of subtypes known today is not the final one. This review, based on the information available in the publication mainstream, aims to offer a synthesis of the most recent concepts implemented in the breast carcinoma diagnosis. The text highlights the following topics: (i) the histological structure of the normal mammary gland, compulsory for the implementation of the new taxonomy and the hypothesis regarding the origin of breast cancer; (ii) the role of Stanford group in defining the genetic signature of breast cancer; (iii) the development and characteristics of the genetic tests available for breast cancer investigation; (iv) the usage of immunohistochemistry, as an alternative solution for genetic tests; (v) the molecular subtypes in correlation with immunohistochemical markers and histological features.

KEY WORDS: BREAST CANCER, MOLECULAR CLASSIFICATION, GENETIC TESTS, HISTOLOGICAL CLASSIFICATION

Corespondență: Prof. dr. Irina-Draga Căruntu, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr.T. Popa” Iași, Disciplina Histologie, str. Universității, nr.16, e-mail: irina_caruntu@yahoo.com*.

Cancerul mamar (CM) este principala cauză de mortalitate la sexul feminin, fiind raportate, anual, peste 500000 de decese [1]. În ultimul deceniu, în abordarea diagnostică și terapeutică a CM au intervenit modificări majore, ca rezultat al aprofundării mecanismului patogenetic la nivel genic. Astfel, CM este considerat în prezent un ansamblu de boli heterogene, individualizate prin diferențe la nivel molecular, histopatologic și clinic, datorate în principal punctului inițial de origine, reprezentat de diferite linii celulare și/sau de celule stem existente în teritoriul glandei mamare [2].

Factorii clinici, histopatologici și moleculari larg acceptați ca având valoare de factori de prognostic includ: vârsta, gradul tumoral, mărimea tumorii, statusul limfoganglionilor, prezența metastazelor, tipul histologic, expresia receptorilor hormonali (receptorul estrogenic (RE) și receptorul progesteronic (RP)), expresia receptorului 2 al factorului de creștere epidermic (*eng. Epidermal Growth Factor Receptor* – EGFR/HER2/neu), invazia peritumorală vasculară [2].

* received date: 21.01.2011

accepted date: 24.03.2011

Clasificarea CM în raport de statusul receptorilor hormonală în două clase majore (tumori pozitive și, respectiv, negative) a avut un rol crucial în managementul terapeutic al pacientelor, prin terapia endocrină care a prelungit semnificativ supraviețuirea fără reluare de evoluție și supraviețuirea totală. Totuși, un procent important din cazurile cu receptori hormonală pozitivi nu răspund la tratamentul endocrin chiar din momentul inițierii acestuia (rezistența intrinsecă), sau dezvoltă rezistență în timp (rezistența dobândită). Cazurile care nu se încadrează în tiparul de răspuns terapeutic așteptat au condus, inevitabil, spre necesitatea identificării și validării unor alți markeri prognostici și predictivi, care pot facilita o abordare individualizată a tratamentului. Consecutiv, direcțiile de cercetare au fost orientate spre studierea expresiei genice corespunzătoare CM, profilul genic demonstrat stând la baza propunerii de introducere a unei clasificări moleculare [2], cu relevanță directă pentru stabilirea prognosticului și alegerea tratamentului.

Această prezentare urmărește să faciliteze accesul cititorului la noile teorii și concepte referitoare la CM, obligatorii pentru monitorizarea clinică și terapeutică a cazurilor.

1. PROFILUL CELULAR ȘI MOLECULAR AL GLANDEI MAMARE NORMALE

Un scurt rapel asupra histoarhitectoniei glandei mamare, cu detaliere a caracteristicilor moleculare ale celulelor constituente, este absolut necesar pentru înțelegerea terminologiei utilizate în clasificarea moleculară a CM și a ipotezelor legate de linia celulară de origine în carcinogeneză. În acest context, este important să subliniem că raportarea la originea subtipurilor moleculare se face în raport de diferențierea liniilor celulare [3,4], fenotipul unui subtip molecular reflectând fenotipul celulei de origine [5].

Glanda mamară are o histoarhitectonie de tip tubulo-alveolar compus, fiind formată din lobi separați de țesut conjunctiv dens și țesut adipos. În fiecare lob, componenta secretorie alveolară se continuă cu un sistem de ducte intralobulare care, prin confluare, formează ductele interlobulare și, respectiv, canalele galactofore, cu deschidere proprie, printr-un sinus lactifer, la nivelul mamelonului.

Alveolele (elementele secretorii) și ductele sunt structuri tubulare tapetate de un epiteliu bistratificat: stratul intern, continuu, format din celule epiteliale care delimitează lumenul (denumite și celule luminale) și stratul extern, uneori discontinuu, format din celule mioepiteliale în contact cu membrana bazală (denumite și celule bazale). Această organizare este menținută prin caracterul polarizat al celulelor luminale, prin joncțiunile inter-celulare și cele stabilite cu membrana bazală, precum și prin participarea micromediului extern, care intervine prin dezvoltarea de forțe mecanice și transmiterea de semnale celulare [6]. Sub raportul markerilor moleculari, celulele epiteliale luminale exprimă citokeratine (CK) tip 8, 18 și 19, iar celule mioepiteliale exprimă CK de tip 5/6, 14 și 17. Diferențierea prin citokeratine nu este însă absolut general valabilă, existând posibilitatea ca celulele luminale să prezinte citokeratine considerate caracteristice pentru celulele mioepiteliale, alături de alți markeri specifici ca vimentina, actina mușchiului neted, TP63, CD10 și proteina S-100 [7].

În a doua jumătate a ciclului ovarian, sub influența progesteronului, în ductulii terminali celulele epiteliale proliferază, apare o activitate secretorie incipientă și, consecutiv, lumenul se lărgesc; în țesutul conjunctiv intralobular se acumulează fluid și glicozaminoglicani, determinând o ușoară mărire în volum.

Procesul poate fi amplificat în cazul fertilizării sau se revine la structura inițială, în absența fertilizării și a prăbușirii nivelelor de progesteron.

În sarcină și lactație, glanda mamară își modifică semnificativ dimensiunile datorită dezvoltării alveolelor, ca un proces de înmugurire din capetele terminale ale ductelor terminale, lobulii crescând și țesutul adipos dintre lobuli diminuând, în încercarea de a compensa mărirea lobulilor.

Existența celulelor stem la nivelul glandei mamare a fost demonstrată prin studii experimentale umane și murine. Capacitatea de a iniția noi linii celulare (epiteliale luminală și mioepiteliale) poate explica variațiile histoarhitectonice și histofiziologice ale glandei mamare în raport cu vârsta. Deși incomplet definit, profilul imunohistochimic pentru celulele stem mamare include citokeratine 19/14, EpCAM, CD49f și SSSEA-4 [8].

Cu referire strictă la carcinogeneza mamară, a fost formulată ipoteza conform căreia rolul de promotor revine unei populații de celule tumorale cu caracteristici de celule stem, numite „celule stem canceroase” [9,10]. Fiecare dintre cele cinci subtipuri moleculare de CM (luminal A, luminal B, HER2, bazal-like, normal-like) poate avea la origine celule stem/precursoare diferite [11], care reflectă diferite stadii de diferențiere a celulelor epiteliale mamare, explicând astfel heterogenitatea morfologică și moleculară a CM [12-16].

2. SEMNĂTURA GENETICĂ A CANCERULUI MAMAR – ROLUL GRUPULUI STANFORD

În ansamblul cercetărilor asupra expresiei genice a CM, anul 2000 reprezintă momentul de referință prin rezultatele grupului de la Stanford, condus de Perou [17]. Folosind teste genetice pentru analiza ADN-ului complementar (ADNc) corespunzător unui număr de 8102 gene umane, în 65 de fragmente tisulare provenind de la 42 de paciente diagnosticate cu CS, autorii au demonstrat că diversitatea fenotipică a tumorilor de sân este asociată, în corespondență directă, cu o diversitate a expresiei genice. Din cele 8102 gene a fost selectat un subset de 456 gene care reflectă proprietățile tumorale intrinseci, acesta fiind denumit subsetul de gene „intrinseci”. Modelul expresiei genice a condus spre definirea a două subgrupe principale, în separarea cărora un rol major, de factor discriminant, a revenit RE. Identificarea unui profil genic diferit pentru subgrupa RE pozitivă (RE+) și subgrupa RE negativă (RE-) accentuează ideea conform căreia CM RE+ și CM RE- sunt două entități patologice diferite, chiar dacă trăsăturile histopatologice sunt identice [6,18]. Autorii au propus introducerea a 4 subtipuri moleculare diferite: RE+ subtip luminal, RE- subtip Erb-B2 pozitiv, RE- subtip bazal-like, RE- subtip neclasificabil (normal-like). Ulterior, utilizând instrumente bioinformatic complexe de tip grupare ierarhică, autorii au diferențiat subtipurile luminal A și luminal B [5]. Extrem de important, expresia subtipurilor genice este concordantă între tumorile primare și leziunile ulterioare metastatice apărute ani mai târziu [19].

Aceste 5 subtipuri moleculare au fost confirmate în seturi de date independente, care au demonstrat că profilul molecular poate fi corelat cu evenimentele și trăsăturile biologice specifice carcinogenezei, și anume: potențialul metastatic [20-22] sau gradul histologic [23], și poate identifica expresiile favorabile sau nefavorabile asociate prognosticului [20-23] și răspunsului la terapie [24].

Concret, subtipurile sunt asociate cu diferențe în rezultatul clinic apărut, apreciat ca supraviețuire fără evenimente recurente (*eng. Recurrence-Free Survival – RFS*) și supraviețuirea generală (*eng. Overall Survival – OS*): subtipul luminal A are perioada cea mai mare de supraviețuire, subtipurile basal-like și HER2+ au perioada cea mai scurtă, iar subtipul luminal B are o perioadă intermediară de supraviețuire.

3. TESTE GENETICE PENTRU CANCERULUI MAMAR: CONCEPERE, CARACTERISTICI

MammaPrint (70-gene assay) și **Oncotype DX** (21-gene RS assay) sunt în prezent cele mai utilizate teste de stabilire a profilului genic, în Europa și în SUA.

3.1. MammaPrint - The 70-Gene Assay (Testul celor 70 gene)

MammaPrint a fost primul test care a primit, în SUA, aprobarea Food și Drug Administration (FDA), fiind încadrat în Clasificarea FDA a testelor noi de diagnostic, ca test prognostic pentru femeile sub 60 de ani cu CM RE+ sau RE–, fără afectare limfoganglionară. MammaPrint, conceput în cadrul Netherlands Cancer Institute, include 70 de gene. Profilul genic identificat, inclus într-o analiză multivariată, are valoare de predictor independent puternic pentru supraviețuirea liberă de boală la distanță (*eng. distant disease-free survival – DDFS*) și supraviețuirea generală, fiind aplicat și pentru aprecierea beneficiului chimioterapiei în asociere cu terapia hormonală [25,26]. Testul este validat prin studii realizate în parteneriat, cu implicarea Translational Breast International Group (TRANSBIG) și a numeroase centre de cercetare europene [27,28]. Testul utilizează ARNm proaspăt, necesitând mostre congelate de țesut tumoral proaspăt sau țesuturi păstrate în soluții care asigură conservarea ARN-ului – fapt care determină o serie de probleme tehnice, limitând introducerea lui pe scală largă.

3.2. The 76-Gene Assay (Testul celor 76 gene)

Un alt test genetic include un număr de 76 de gene (60 de gene pentru pacienții cu tumori RE+ și 16 gene pentru pacienții cu tumori RE–), referate drept “semnătură genică” [22]. Aplicarea testului a indicat o sensibilitate de 93% și o specificitate de 48% în predicția dezvoltării metastazelor, la 5 ani. Conform rezultatelor raportate, profilul determinat prin investigația celor 76 de gene poate fi considerat un factor de prognostic puternic pentru CM instalat atât în premenopauză, cât și în postmenopauză, și pentru tumorile mici (1-2 cm) [29]. Limite ale testului sunt însă acceptate pentru tumorile RE–, numărul analizat fiind prea mic pentru rezultate valide. Testul necesită de asemenea extracte ARNm proaspete sau congelate, similar cu MammaPrint.

3.3. The HOXB13:IL17BR Assay (Testul HOXB13:IL17BR)

Conceput la Massachusetts General Hospital [30], testul HOXB13:IL17BR, rezultat din raportul expresiei a două gene, anume gena homeobox HOXB13 și receptorul IL 17B (IL17BR), are valoare predictivă pentru supraviețuirea liberă de boală (DFS). Genele HOX controlează morfogeneza și, de asemenea, au rol în menținerea specificității țesutului [31] HOXB13 poate interacționa cu receptorul RE și, consecutiv, superexpresia sa poate contribui la rezistența la tamoxifen. Rolul IL17BR în CM este mai puțin clar stabilit, dar gena IL17BR, localizată pe 3p21, este frecvent pierdută. O explicație pentru corelația între IL17BR și prognostic este că expresia scăzută a genei se corelează cu pierderea genelor supresoare tumorale localizate pe crs. 3p21. Valoarea prognostică a raportului HOXB13:IL17BR a fost validată în mai multe trialuri clinice [32,33]. Testul HOXB13:IL17BR (H/I) utilizează fragmente tisulare fixate în formol și incluse la parafină, fiind comercial disponibil în SUA.

3.4. Oncotype DX - The 21-Gene RT-PCR Assay (Testul celor 21 gene)

Deși profilele genice obținute prin testele ADN (de exemplu The 70-gene assay) au valoare prognostică, aplicabilitatea lor în practica curentă este mult limitată deoarece tehnica necesită țesut proaspăt congelat. Pentru a depăși aceste impedimente, a fost dezvoltat Oncotype DX (The 21-Gene RT-PCR Assay), bazat pe o metodă RT-PCR care permite cuantificarea expresiei genice în secțiuni de țesut tumoral fixat, inclus în parafină [34]. Utilizarea acestei metode a condus la selectarea unui panel format din 5 gene de referință (ACTB – beta-actina, GAPDH, RPLPO, GUS, TFRC) și 16 gene în relație transformarea malignă (gene de proliferare: Ki-67, STK15, survivină, CCNB1 - ciclina B1, MYBL2; gene de invazie: MMP11 – stromolisina 3, CTSL2 – catepsina L2; gene HER2: GRB7, HER2; gene pentru estrogen: RE, RP, BCL2, SCUBE2; alte gene: GSTM1, CD68, BAG1) [35-37]. Aceste gene, introduse într-un algoritm, au permis calcularea unui scor de recurență (*eng. The 21-recurrence score*) aplicabil pentru fiecare caz în parte. Rezultatele aplicării testului au indicat absența beneficiilor terapeutice post-chimioterapie adjuvantă numai în cazul pacienții pentru care Oncotype DX a apreciat risc minim de recidivă, 94,95% din pacienții cu CM RE+, cu sau fără implicare limfoganglionară având răspuns pozitiv la chimioterapie [38,39] Testul și algoritmul au fost validate printr-un trial multicentric [35] și patru studii publice [40]. Totuși, un inconvenient major în aprecierea calității acestui test este datorat faptului că nu a fost realizată o comparație între prognosticul de recurență apreciat prin profilul genetic și prognosticul de recurență apreciat prin metode convenționale, în cadrul aceleiași populații.

Oncotype DX a fost introdus în practica clinică fără a necesita aprobarea FDA, iar utilizarea lui extrem de largă este explicată în principal prin faptul că poate fi practicat pe material biologic arhivat (țesut prelevat, fixat în formol și inclus în parafină). Testul a fost inclus în 2007 în ghidul de markeri tumorali al American Society of Clinical Oncology (ASCO), ca element de referință pentru predicția riscului de recurență și indicator pentru chimioterapie la pacientele cu CM RE+, fără afectare limfoganglionară, tratate anterior cu terapie adjuvantă. Punctele slabe ale acestui test rezultă din limitarea la grupul de paciente RE+ și din lipsa datelor certe asupra grupului cu risc intermediar.

3.5. Testele genetice – între beneficiile și limitele rezultatelor

Compararea potențialului prognostic al testelor genice [41] a relevat rate ridicate de concordanță (cu excepția HOXB13:IL17BR), deși nu există o suprapunere a paneelelor genice specifice fiecărui test. Acest fapt sugerează că toate testele genice identifică caracteristici biologice comune care sunt predictive pentru evoluția pacienților.

Aplicarea testelor de analiză genică a confirmat conceptul de heterogenicitate moleculară în CM. Deși numărul de studii dedicate cercetării aprofundate a profilului molecular al CM este în creștere, literatura de specialitate semnalează însă existența a multiple probleme, încă nerezolvate, referitoare la subtipurile moleculare. Cel mai probabil, numărul de subtipuri / clase moleculare incluse în clasificare nu este definitiv [6]. Existența diferențelor în tentativele de definire certă a subtipurilor moleculare poate fi explicată prin faptul că în procesarea datelor obținute prin investigația genetică se utilizează metodele statistice bazate, cel mai frecvent, pe grupări ierarhice nesupravegheate, care subclasifică tumorile în funcție de o serie de profiluri de expresie similare [42].

Chiar dacă scopul principal al metodei este descoperirea unor noi clase moleculare, se înregistrează limite inerente – în principal datorită faptului că grupurile de eșantioane nu sunt stabilite absolut aleatoriu, ci există un grad de subiectivitate care pornește de la utilizarea datelor patologice și clinice.

Cu toate că în seriile de CM analizate cele 3 clase majore – subtipul luminal, subtipul HER+ și subtipul bazal – sunt întotdeauna identificate, gradul de variabilitate legat de numărul de cazuri și de gene studiate face ca până la 20% din tumorile bazale să poată fi atribuite clasei luminale [43].

De asemenea, este recunoscut faptul că există foarte puține date asupra reproductibilității biologice a testelor genice, potențialului de contaminare al tumorilor mici invazive prin țesutul mamar normal, modului în care o biopsie practică anterior poate modifica expresia genică, sau asupra utilității testelor în CM în stadii avansate, inclusiv metastatice [44].

Toate aceste probleme constituie potențiale direcții de cercetare și, în consecință, pentru a putea introduce criteriile de diferențiere fiabile, sunt necesare serii mari de grupuri de control analizate omogen, astfel încât să poată fi dezvoltată o metodă certă de definire a unui subtip tumoral, inclusiv prin atribuirea unui eșantion individual reprezentativ [6].

4. TEHNICA IMUNOHISTOCHIMICĂ ȘI MARKERII SUROGAT – O POSIBILĂ SOLUȚIE ALTERNATIVĂ PENTRU TESTELE GENETICE (ANALIZA GENICĂ)

Deși există sisteme de microarray care includ numai genele „cheie” (MammaPrint, Oncotype DX, PAM50) și care permit studiul profilului genic, prețul acestora împiedică – cel puțin momentan – generalizarea utilizării lor pentru stadializarea clinică. Din acest motiv s-au căutat soluții care să reproducă analiza expresiei genice și categoriile de clasificare.

Imunohistochimia oferă posibilitatea de identificare a unor caracteristici moleculare tumorale care au valoarea de markeri alternativi, „surogat”, în corespondență cu profilul genic. Pe de o parte, tehnica permite încadrarea în cele 5 subtipuri majore definite conform clasificării moleculare. Pe de altă parte însă, sunt semnalate neconcordanțe în raport de tiparul strict al clasificării – de exemplu prin existența tumorilor HER2+ care sunt RE+ [19], sau a unor subtipuri luminal B și luminal C care sunt ER– [6].

Aceste constatări, datorate nivelului înalt de heterogenitate al CM, unamin recunoscut, determină o limitare intrinsecă și specifică în utilizarea tehnicii imunohistochimice [2].

Markerii imunohistochimici „surogat” nu permit deocamdată o clasificare perfect suprapusă peste clasificarea bazată pe semnătura genetică, poate și datorită faptului că aceasta din urmă nu este complet structurată (în baza limitelor prezentate anterior), absenței consensului în interpretarea fiecărui subtip molecular și variațiilor de metodologie imunohistochimică între laboratoare.

Cu toate acestea, definirea subtipurilor moleculare și corelațiile existente cu markerii imunohistochimici operaționali deschid perspectivele pentru o predicție a prognosticului și o decizie de tratament individualizat, la momentul diagnosticului primar.

5. SUBTIPURI ÎN CLASIFICAREA MOLECULARĂ: CARACTERIZARE, CORELAȚII CU MARKERII IMUNOHISTOCHEMICE ȘI CLASIFICAREA HISTOLOGICĂ

Subtipurile de CM, introduse prin clasificarea moleculară, diferă de entitățile definite clasic [45,46] pe baza caracteristicilor arhitecturale, patologice, precum și a profilului imunohistochimic.

5.1. Tumorile RE pozitive

Subtipul RE+ menține expresia unor gene tipice celulelor epiteliale luminale, anume genele pentru citokeratine cu greutate moleculară mică (8/18) [5,11,47-49], și genele legate de activarea/supraexpresia ER [6]. Cu referire strictă la CM ereditar, sunt prezente mutații ale genei BRCA2 [6].

În această clasă au fost încadrate inițial două subtipuri diferite, denumite subtip luminal A și subtip luminal B, iar recent a fost identificat un al treilea subtip – luminal C.

Sub raportul originii, subtipul de cancer luminal este asociat celulelor luminale. Studiile axate pe implicarea celulelor stem mamare și a etapelor de diferențiere a acestora în carcinogeneză oferă însă informații suplimentare. Mai precis, subtipul luminal A apare ca urmare a unei anomalii genetice produse într-un precursor bine diferențiat [13,14] sau la nivelul unei celule luminale bine diferențiate, RE+ [15]. Pentru subtipul luminal B există mai multe ipoteze. Acesta se dezvoltă fie pornind de la un precursor RE+ mai primitiv, ceea ce explică expresia mai redusă a RE și prognosticul mai rezervat, comparativ cu subtipul luminal A [15], fie dintr-o celulă stem RE- sau celule progenitor programate [50].

Subtipul luminal A

CM subtip luminal A are un nivel foarte înalt de expresie a genelor RE activate și a genelor asociate estrogenului (ESR1, GATA3, NAT1, FOXA1) și un nivel scăzut de expresie a genelor implicate în proliferare [2]. Prin studii de hibridizare genomică comparativă (*eng. Comparative Genomic Hybridisation - CGH*), s-a demonstrat că este corelat cu o instabilitate genomică scăzută, prezentând o amplificare redusă a genelor definite [50,51].

Spre deosebire de subtipul luminal B, nu exprimă HER2/neu și este caracterizat prin grad histologic scăzut, rată de proliferare redusă și prognostic bun, fiind considerat un tip de CM mai puțin agresiv [11].

Profilul imunohistochimic al acestui subtip este RE+/RP+/Her2-.

Subtipul luminal B

CM subtip luminal B exprimă suplimentar o serie de gene legate de proliferare și de ciclul celular [2]. Prima secvență a mecanismului patogenetic constă în modificare genetică prin amplificare la nivelul 8p11-p12, 8q21-q24 sau 20q13, urmată de proliferare și diferențiere [52]. Pe măsura creșterii potențialului de proliferare, celulele acumulează noi amplificări, precum și pierderea heterozigozității (*eng. Loss of Heterozigosity - LOH*) în regiunile 1p și 16q. Consecutiv, subtipul luminal B este corelat cu instabilitate genomică crescută [52].

Acest subtip prezintă grad histologic înalt, rată de proliferare înaltă și un prognostic semnificativ mai rezervat decât tumorile luminale tip A [5,11,47-49,53]. Subtipul luminal B este Her2/neu+ și deține, surprinzător, câteva caracteristici de expresie similare tumorilor RE- (de exemplu creșterea frecvenței mutațiilor TP53) [2].

Profilul imunohistochimic al acestui subtip este RE+/RP+/Her2+.

Subtipul luminal A versus subtipul luminal B

Prin raportare la clasificarea histologică a CM, subtipul luminal (A și B) are corespondență în majoritatea carcinoamelor ductale infiltrative bine diferențiate (grad 1), uneori și forme moderat diferențiate (grad 2) și nediferențiate (grad 3) – care exprimă RE și/sau RP, precum și în carcinoamele lobulare infiltrative, carcinoamele tubulare, cribriforme, coloide. Deoarece carcinoamele ductale invazive incluse în subtipul luminal A sunt extrem de diferite sub raportul gradului tumoral (de la 1 la 3), al nivelului de expresie al receptorilor hormonal și al ratei de proliferare, se consideră că acest subtip molecular trebuie, în perspectivă, subclasificat [3].

Diferențe între cele două subtipuri luminale sugerează că prognosticul în CM RE+ nu este determinat numai de prezența RE, ci și de alți factori – de exemplu factorii de proliferare (indexul Ki-67 este redus pentru subtipul A, crescut pentru subtipul B [54], pierderea heterozigozității în poziția RB1, frecventă în subtipul luminal B, extrem de rară în subtipul A [55].

Subtipul luminal C

Noul subtip identificat, extrem de heterogen, are o evoluție mai agresivă decât subtipurile luminal A sau B [6].

5.2. Tumorile RE negative

Din punctul de vedere al originii, cele mai multe studii susțin, pentru subtipul Her2 și subtipul bazal-like, potențialul de transformare malignă a unei celule stem mamare RE– [13,14]. Există însă și opinii diferite pentru subtipul bazal-like, care vor fi prezentate ulterior, în conexiune cu discuțiile legate de caracterizarea (dificilă) a acestuia.

Subtipul HER2 pozitiv

Tumorile HER2 sunt caracterizate printr-o serie de modificări genetice complexe, care implică creșterea expresiei genelor localizate în aceeași regiune a cromozomului 17q, anume gena pentru EGFR (ERBB2) și proteina 7 de legare a receptorului factorului de creștere (*eng. Growth Factor Receptor Bound Protein 7 – GRB7*) [2]. Au fost identificate, suplimentar, mutații ale genei tumorale supresor TP53 și pierderea (foarte rar) heterozigozității în poziția RB1 [2]. Supraexpresia proteinei HER2, ca rezultat al alterărilor în amplificarea ERBB2, este asociată cu grad histologic înalt, expresie scăzută a RE și RP, uneori expresie crescută a receptorului androgenic (RA), și prognostic negativ [56,57] prin metastare agresivă.

Profilul imunohistochimic al acestui subtip este RE–/RP–/Her2+.

Mecanismul patogenetic prin care HER2 intervine în secvența carcinogenezei și metastazării este însă nedefinit. Acest subtip este în mod particular rezistent la terapia endocrină, fapt care justifică tratamentul cu anticorp monoclonal recombinat, Trastuzumab (Herceptin), care crește semnificativ supraviețuirea [58].

Prin raportare la clasificarea histologică, CM HER2+ corespunde predominant carcinomului ductal invaziv moderat diferențiat (grad 2) și nediferențiat (grad 3) [59], precum și carcinoamelor mamare apocrine [60,61].

Controverse asupra apartenenței exclusive la tumorile RE negative; posibile subtipuri

Subtipul HER2+, clasificat inițial în categoria tumorii RE–, nu este însă absolut omogen. La această concluzie s-a ajuns datorită faptului că amplificarea genei HER2, prezentă în peste 80% din CM HER2+, a fost decelată și în 10-15% din cazurile de CM RE+ [48,62-64].

Consecutiv, imunohistochimic au fost separate două subgrupe HER2+, unele RE–, altele RE+, subgrupe pentru care este deschisă investigarea asupra modului în care HER2 poate determina comportamente clinice diferite [59]. Subgrupa HER2+/RE+ este asociată subtipului luminal B, motiv pentru care s-a propus denumirea de subtip „bazoluminal” [65].

De asemenea, în categoria altor posibile subtipuri moleculare a căror profil este parțial suprapus peste cele existente, și parțial diferit, se discută despre grupul tumorilor moleculare „apocrine”. În baza potențialului similar subtipului HER2, a prezenței genelor pentru RA, a secvenței patogenice în care intervine activarea semnalizării RA și a caracteristicilor histologice de tip apocrin, studiile dedicate acestui grup pledează pentru individualizarea sa, ca entitate distinctă în cadrul clasificării moleculare [66,67]. Profilul imunohistochimic al acestui posibil subtip este RE–/RA+/Her2+.

Subtipul bazal-like

Subtipul bazal-like este denumit astfel datorită celulelor neoplazice care exprimă în mod evident gene prezente în celulele bazale/mioepiteliale normale ale sânului [7,68-74]. Acestea sunt: gene pentru citokeratine cu greutate moleculară înaltă (*KRT5* – citokeratina 5, *KRT6* – citokeratina 6, *KRT14* – citokeratina14, *KRT17* – citokeratina 17), pentru calponina 1 (*CNN1*), caveolina 1 și 2 (*CAVI*), laminină (*LAMBI*), P-cadherine, nestine, vimentină, fascină, CD44, EGFR [2,42,43,70,75-78]. Tumorile bazal-like pot exprima însă și caracteristicile genetice ale epiteliului luminal, inclusiv citokeratinele 8/18 (dar la un nivel mai scăzut decât în subtipul luminal), și KIT, specific epiteliului luminal RE– [2,79]. Au fost identificate, asociat, amplificarea genică a genei EGFR [49], aneusomie [80], modificări genomice (câștiguri în regiunile 12p13 și 10p, pierderi în regiunile 4p și 5q) [51,81], pierderea heterozigozității în poziția RB1, mutații tip TP53 (în peste 85% din cazuri) și BRCA1 [82,83], precum și expresia crescută a genelor legate de proliferare [43,70]. Mutațiile genei BRCA1 sunt dovezi clare în favoarea unor caracteristici comune CM ereditar și CM sporadic bazal-like [3,84,85].

Carcinoamele basal-like au grad histologic înalt și rată de proliferare înaltă. Prin raportare la clasificarea histologică, CM bazal-like include carcinoamele ductale invazive nediferențiate (16-37% din total), cu grad 3 și cu heterogenitate morfologică importantă (tip tubular solid/medular atipic, sau având o importantă zonă acelulară centrală), carcinoame medulare tipice, tumori având caracteristici medulare, carcinoame metaplazice de tipul carcinosarcoamelor [43,70,76,82,86-91].

Acest subtip are un prognostic rezervat datorită comportamentului clinic agresiv, cu supraviețuire fără evenimente recurente redusă și supraviețuire generală mai scăzută decât orice alt subtip al CM. Probleme majore sunt legate de alegerea terapiei, deoarece terapia endocrină și/sau trastuzumabul sunt ineficiente datorită lipsei receptorilor RE, RP și HER2/neu.

Pentru subtipul bazal-like, profilul genic atât de complex face dificilă o caracterizare IHC – având în vedere și faptul că termenul generic „triplu negativ” se referă exclusiv la RE, RP și HER2 (RE–/RA–/Her2–), și nu la expresia altor markeri [43].

Un subtip bazal-like propus [70] este definit prin secvența markerilor moleculari RE–/HER2–/EGFR+ și/sau CK5/6+, comună pentru 15-25% din totalul CM. Introducerea suplimentară în panel a altor citokeratine (de exemplu CK14), specifice celulelor bazale, a condus la identificare mai precisă a cazurilor, cu rezultat în scăderea procentului de tumori subtip bazal-like menționat mai sus [75].

Panelul IHC a fost recent completat prin alți markeri mezenchimali și mioepiteliali (EGFR, CD10, p63, P-caderină și caveolină), a căror asociere oferă sensibilitate și specificitate crescută în trasarea profilului molecular al subtipului bazal-like [90].

Controverse asupra originii

În cercetările axate pe stabilirea originii subtipului bazal-like, profilul genic identificat în celulele tumorale (prezentat anterior) a constituit un argument major pentru a susține asocierea cu celulele bazale mioepiteliale. Această asociere este însă contestată printr-un studiu publicat în 2009 [92]. În baza rezultatelor obținute, autorii susțin că în subtipul bazal-like dezvoltat în context sporadic, precum și pentru CM ereditare (ambele entități patologice prezentând mutații ale genelor BRCA1) originea este reprezentată de celule precursorare tip luminal, și nu de celule bazale. Consecutiv, în caracterizarea subtipului bazal-like – în conformitate cu criteriile clasificării moleculare – apar o multitudine de probleme, de la stabilirea unui acord în terminologia deja implementată la explicarea profilului genic și molecular în contextul actual al datelor asupra originii. Cu referire strictă la terminologie, există opinii care susțin că această (posibilă) origine diferită nu influențează numele atribuit [93], și opinii care consideră că termenul bazal-like trebuie obligatoriu înlocuit [4,3,7,49].

Subtipul normal-like

Grupul neclasificabil, normal-like, definit inițial după expresia asemănătoare țesutului mamar normal și tumorilor benigne [5,17], este încă slab caracterizat [2,53,81], iar unele studii contestă chiar existența sa [5,6,94]. Este posibil ca acest subtip să fie, în realitate, datorat unui artefact de prelevare/eșantionare, prin contaminarea probei cu o cantitate importantă de țesut normal [48,95].

Alte subtipuri moleculare

Recent, aprofundarea investigării genice și IHC a CM RE– a condus la identificarea unor profile diferite de cele existente, ceea ce deschide perspectivele completării clasificării moleculare. Conform fluxului principal de publicații, cercetările sunt orientate asupra descifrării semnificației biologice și clinice a trei noi subtipuri moleculare [2,6]: grupul „apocrin” (prezentat succint în cadrul subtipului Her2), grupul „interferon” (caracterizat prin expresia înaltă a genelor reglate de interferon (*STAT1*) [96] și grupul „claudin-low”, desprins din categoria triplu-negativă, bazal-like (caracterizat prin expresia scăzută sau absentă a markerilor de diferențiere luminală, prezența markerilor de tranziție epitelio-mezenchimală, a genelor implicate în reglarea răspunsului imun și a unor trăsături similare celulelor stem tumorale) [93].

6. PERSPECTIVE

Cercetările asupra CM realizate în ultimul deceniu urmăresc implementarea profilului expresiei genice ca și standard de aur pentru evaluarea acestei patologii, translat într-un sistem taxonomic ideal, cu impact benefic în practica diagnostică și terapeutică [6,95]. Până în momentul de față, însă, rezultatele sunt incomplet validate, existând numeroase neconcordanțe care pot fi explicate inclusiv prin utilizarea de “gene intrinseci” diferite, prin reproductibilitatea limitată a metodologiei sau a prevalenței limitate a tipurilor histologice speciale. Consecutiv, se deschid direcții de cercetare pentru aprofundarea acestui subiect, o caracterizare moleculară precisă oferind perspectiva unei abordări terapeutice individualizate.

NOTA

Primul autor este doctorand în cadrul proiectului POSDRU/88/1.5/S/58965, Burse Doctorale pentru Doctoranzi Competitivi în Aria Europeană a Cercetării, lucrarea fiind rezultat al documentării realizate în cadrul stagiului doctoral.

BIBLIOGRAFIE

1. WHO. WHO fact sheet no 297. Geneva: World Health Organization; 2006.
2. McCafferty PJ, Healy NA, Kerin MJ. Breast cancer subtypes and molecular biomarkers. *Diag Histopathol* 2009; 15(10): 485-489.
3. Moinfar F. Is 'basal-like' carcinoma of the breast a distinct clinicopathological entity? A critical review with cautionary notes. *Pathobiology* 2008; 75(2): 119–131.
4. Gusterson B. Do 'basal-like' breast cancers really exist? *Nat Rev Cancer* 2009; 9(2): 128-134.
5. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(19): 10869-10874.
6. Hergueta-Redondo M, Palacios J, Cano A, Moreno-Bueno G. „New” molecular taxonomy in breast cancer. *Clin Trans Oncol* 2008; 10(2): 777-785.
7. Gusterson BA, Ross DT, Heath VJ, Stein T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005; 7(4): 143-148.
8. Liu S, Dontu G, Wicha MS. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Res* 2005; 7(3): 86–95.
9. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100(7): 3983-3988.
10. Stingl J. Detection and analysis of mammary gland stem cells. *J Pathol* 2009; 217(2): 229-241.
11. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(14): 8418-8423.
12. Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest* 2007; 117(11): 3155-3163.
13. Dontu G, El-Ashry D, Wicha MS. Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15(5): 193–197.
14. Behbod F, Rosen M. Will cancer stem cells provide new therapeutic targets? *Carcinogenesis* 2005; 26(4): 703-711.
15. Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(10): 791-799.
16. Vargo-Gogola T, Rosen JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(9): 659-672.
17. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406(6797): 747–752.
18. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Monville F et al. Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogene* 2006; 25(15): 2273–2284.
19. Weigelt B, Hu Z, He X. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65(20): 9155–9158.
20. van de Vijver MJ, He Y, van't Veer LJ et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347(25): 1999–2009.
21. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415(6871): 530-536.
22. Wang Y, Klijn JGM, Sieuwerts AM et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005; 365(9460): 671–679.
23. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(4): 262-272.
24. Potti A, Dressman HK, Bild A et al. Genomic signatures to guide the use of chemotherapeutics. *Nat Med* 2006; 12(11): 1294-1300.
25. Straver ME, Glas AM, Hannemann J et al. The 70-gene signature as a response predictor for neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 119(3): 551–558.
26. Knauer M, Mook S, Rutgers EJT et al. The predictive value of the 70-gene signature for adjuvant chemotherapy in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 120(3): 655–661.

27. Buyse M, Loi S, van't Veer L et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(17): 1183–1192.
28. Bender RA, Knauer M, Rutgers EJ. The 70-gene profile and chemotherapy benefit in 1600 breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2009; 27: 512.
29. Foekens JA, Atkins D, Zhang Y et al. Multicenter validation of a gene expression based prognostic signature in lymph node negative primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24(11): 1665–1671.
30. Ma XJ, Wang Z, Ryan PD et al. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell* 2004; 5(6): 607–616.
31. Jerevall PL, Brommesson S, Strand C et al. Exploring the two-gene ratio in breast cancer-independent roles for HOXB13 and IL 17BR in prediction of clinical outcome. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 107(2): 225–234.
32. Goetz MP, Suman VJ, Ingle JN et al. A two-gene expression ratio of homeobox 13 and interleukin-17B receptor for prediction of recurrence and survival in women receiving adjuvant tamoxifen. *Clin Cancer Res* 2006; 12(7): 2080–2087.
33. Jansen MP, Siewerts AM, Look MP et al. HOXB13-to-IL17BR expression ratio is related to tumor aggressiveness and response to tamoxifen of recurrent breast cancer: a retrospective study. *J Clin Oncol* 2007; 25(6): 662–668.
34. Cronin M, Pho M, Dutta D et al. Measurement of gene expression in archival paraffin embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol* 2004; 164(1): 35–42.
35. Paik S, Shak S, Tang G et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351(27): 2817–2826.
36. Habel LA, Shak S, Jacobs MK et al. A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res* 2006; 8(3): 1–15.
37. Esteva FJ, Sahin AA, Cristofanilli M et al. Prognostic role of a multigene reverse transcriptase-PCR assay in patients with node-negative breast cancer not receiving adjuvant systemic therapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11(9): 3315–3319.
38. Paik S, Tang G, Shak S et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24(23): 3726–3734.
39. Albain KS, Barlow WE, Shak S et al. Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet Oncol* 2010; 11(1): 55–65.
40. Martin M, Palacios Gonzales F, Cortes J, Haba J et al. Prognostic and predictive factors and genetic analysis of early breast cancer. *Clin Transl Oncol* 2009; 11(10): 634–642.
41. Fan C, Oh DS, Wessels L et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 355(6): 560–569.
42. Hsu AL, Tang SL, Halgamuge SK. An unsupervised hierarchical dynamic self-organizing approach to cancer class discovery and marker gene identification in microarray data. *Bioinformatics* 2003; 19(16): 2131–2140.
43. Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* 2008; 52(1): 108–118.
44. Cianfrocca M, Gradishar W. New Molecular Classifications of Breast Cancer. *CA Cancer J Clin* 2009; 59(5): 303–313.
45. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 2002; 41(3A): 403–410.
46. Ellis IO, Galea M, Broughton N et al. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1992; 20(6): 479–489.
47. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406(6797): 747–752.
48. Parker JS, Mullins M, Cheang MC et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009; 27(8): 1160–1167.

49. Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J Pathol* 2010; 220(2): 263-280.
50. Melchor L, Benítez J. An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes. *Carcinogenesis* 2008; 29(8): 1475–1482.
51. Adélaïde J, Finetti P, Bekhouche I et al. Integrated profiling of basal and luminal breast cancers. *Cancer Res* 2007; 67(24): 11565–11575.
52. Adem C, Soderberg CL, Hafner K et al. ERBB2, TBX2, RPS6KB1, and MYC alterations in breast tissues of BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 41(1): 1–11.
53. Correa Geyer F, Reis-Filho JS. Microarray-based gene expression profiling as a clinical tool for breast cancer management: are we there yet? *Int J Surg Pathol* 2009; 17(4): 285-302.
54. Cheang MC, Chia SK, Voduc D. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101(24): 736-750.
55. Herschkowitz JI, He X, Fan C, Perou CM. The functional loss of the retinoblastoma tumour suppressor is a common event in basal-like and luminal B breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 2008; 10(5): R75.
56. Kaptain S, Tan LK, Chen B. Her-2/neu and breast cancer. *Diagn Mol Pathol* 2001; 10(3): 139-152.
57. Lal P, Tan LK, Chen B. Correlation of HER-2 status with estrogen and progesterone receptors and histologic features in 3,655 invasive breast carcinomas. *Am J Clin Pathol* 2005; 123(4): 541-546.
58. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353(16): 1659-1672.
59. Vanden Bempt I, Drijkoningen M, De Wolf-Peeters C. The complexity of genotypic alterations underlying HER2-positive breast cancer: an explanation for its clinical heterogeneity. *Curr Opin Oncol* 2007; 19(6): 552–557.
60. Varga Z, Zhao J, Ohlschlegel C, Odermatt B, Heitz PU. Preferential HER-2/neu overexpression and/or amplification in aggressive histological subtypes of invasive breast cancer. *Histopathology* 2004; 44(4): 332–338.
61. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 2005; 24(29): 4660–4671.
62. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11(16): 5678-5685.
63. Ellis MJ, Tao Y, Young O et al. Estrogen-independent proliferation is present in estrogen-receptor HER2-positive primary breast cancer after neoadjuvant letrozole. *J Clin Oncol* 2006; 24(19): 3019–3025.
64. Marchiò C, Natrajan R, Shiu K et al. The genomic profile of HER2-amplified breast cancers: the influence of ER status. *J Pathol* 2008; 216(4): 399–407.
65. Laakso M, Tanner M, Nilsson J et al. Basoluminal carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(14): 4185–4191.
66. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 2005; 24(29): 4660–4671.
67. Doane AS, Danso M, Lal P et al. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene* 2006; 25(28): 3994-4008.
68. van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol* 2002; 161(6): 1991-1996.
69. Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol* 2004; 203(2): 661-671.
70. 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(16): 5367-5374.
71. Rakha EA, Putti TC, Abd El-Rehim et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *J Pathol* 2006; 208(4): 495-506.
72. Turner NC, Reis-Filho JS. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene* 2006; 25(43): 5846-5853.

73. Savage K, Lambros MB, Robertson D et al. Caveolin 1 is overexpressed and amplified in a subset of basal-like and metaplastic breast carcinomas: a morphologic, ultrastructural, immunohistochemical, and in situ hybridization analysis. *Clin Cancer Res* 2007; 13(1): 90-101.
74. Savage K, Leung S, Todd SK et al. Distribution and significance of caveolin 2 expression in normal breast and invasive breast cancer: an immunofluorescence and immunohistochemical analysis. *Breast Cancer Res* 2008; 110(2): 245-256.
75. Rakha EA, El-Syed ME, Green AR, Paish EC, Lee AH, Ellis IO. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology* 2007; 50(4): 434-438.
76. Jacquemier J, Padovani L, Rabayrol L et al. Typical medullary breast carcinomas have a basal/myoepithelial phenotype. *J Pathol* 2005; 207(3): 260-268.
77. Parry S, Savage K, Marchio C, Reis-Filho JS. Nestin is expressed in basal-like and triple negative breast cancers. *J Clin Pathol* 2008; 61(9): 1045-1050.
78. 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* 2010; 120(1): 95-109.
79. Westbury CB, Reis-Filho JS, Dexter T, Mahler-Araujo B. Genome-wide transcriptomic profiling of microdissected human breast tissue reveals differential expression of KIT (c-Kit, CD117) and oestrogen receptor-alpha (ER alpha) in response to therapeutic radiation. *J Pathol* 2009; 219(1): 131-140.
80. Gilbert JA, Goetz MP, Reynolds CA, Ingle JN. Molecular analysis of metaplastic breast carcinoma: high EGFR copy number via aneusomy. *Mol Cancer* 2008; 7(4): 944-951.
81. Pusztai L, Mazouni C, Anderson K et al. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. *Oncologist* 2006; 11(8):868-877.
82. Turner NC, Reis-Filho JS, Russell AM et al. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene* 2007; 26(14): 2126-2132.
83. Silver DP, Richardson AL, Eklund AC et al. Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(7):1145-1153.
84. Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, Penault-Llorca F. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res* 2005; 11(14): 5175-5180.
85. Honrado E, Benítez J, Palacios J. The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. *Mod Pathol* 2005; 18(10): 1305-1320.
86. Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS, Sofronis A. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology* 2006; 49(1): 22-34.
87. Livasy CA, Karaca G, Nanda R et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2006; 19(2): 264-271.
88. Reis-Filho JS, Milanezi F, Steele D et al. Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. *Histopathology* 2006; 49(1): 10-21.
89. Rodríguez-Pinilla SM, Rodríguez-Gil Y, Moreno-Bueno G et al. Sporadic invasive breast carcinomas with medullary features display a basal-like phenotype: an immunohistochemical and gene amplification study. *Am J Surg Pathol* 2007; 31(4): 501-508.
90. Sarrió D, Rodríguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 2008; 68(4): 989-997.
91. Sasaki Y, Tsuda H. Clinicopathological characteristics of triple-negative breast cancers. *Breast Cancer* 2009; 16(4): 254-259.
92. 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(8): 907-913.
93. Prat A, Perou CM. Mammary development meets cancer genomics. *Nat Med* 2009; 15(8): 842-844.
94. Gruvberger S, Ringner M, Chen Y et al. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res* 2001; 61(16): 5979-5984.
95. Peppercorn J, Perou CM, Carey LA. Molecular subtypes in breast cancer evaluation and management: divide and conquer. *Cancer Invest* 2008; 26(1): 1-10.
96. Hu Z, Fan C, Oh DS et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 2006; 7: 96.