

UNIVERSITÀ degli STUDI di TORINO



**XXXII CICLO DEL DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE E ONCOLOGIA**

**“Espressione immunoistochimica e ruolo prognostico di alcuni
biomarkers nelle pazienti affette da Carcinoma Triplo Negativo della
Mammella.”**

Dottorando

PAOLA MODAFFARI

Responsabile del Dottorato di Ricerca

Prof. **Emilio Hirsch**

Relatrice

Prof.ssa **Nicoletta Biglia**

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1. Epidemiologia

1.2. Presentazione clinica e caratteristiche istopatologiche

1.3. Classificazione dei TNBC secondo il profilo genomico (GEP)

1.4. I biomarkers del TNBC

1.4.a. Il recettore degli Androgeni (AR)

1.4.b. Il Forkhead box A1 (FOXA1)

1.4.c. Le citocheratine CK5/6

1.4.d. Il Ki67

1.4.e. I Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs)

1.5. Trattamento

1.5.a. Stadi iniziali

1.5.b. Stadi avanzati

2. OBIETTIVI dello STUDIO

3. MATERIALI E METODI

3.1. Pazienti e loro caratteristiche clinico-istopatologiche

3.2. Analisi immunoistochimica

3.3. Valutazione TILs

3.4. Analisi statistica

4. RISULTATI

4.1. Caratteristiche istopatologiche dei TNBC

4.2. Caratteristiche immunoistochimiche dei TNBC

4.3. Valutazione dei TILs e loro associazione con le caratteristiche istopatologiche ed immunoistochimiche

4.4. L'analisi di sopravvivenza

4.5. Analisi univariata e multivariata della sopravvivenza libera da malattia (DFS)

5. DISCUSSIONE

6. APPENDICE

6.1. Appendice 1: Stadiazione del Tumore della Mammella secondo AJCC (7^a edizione)

6.2. Appendice 2: Metodo di approccio standardizzato per la valutazione dei TILs nel tumore della mammella

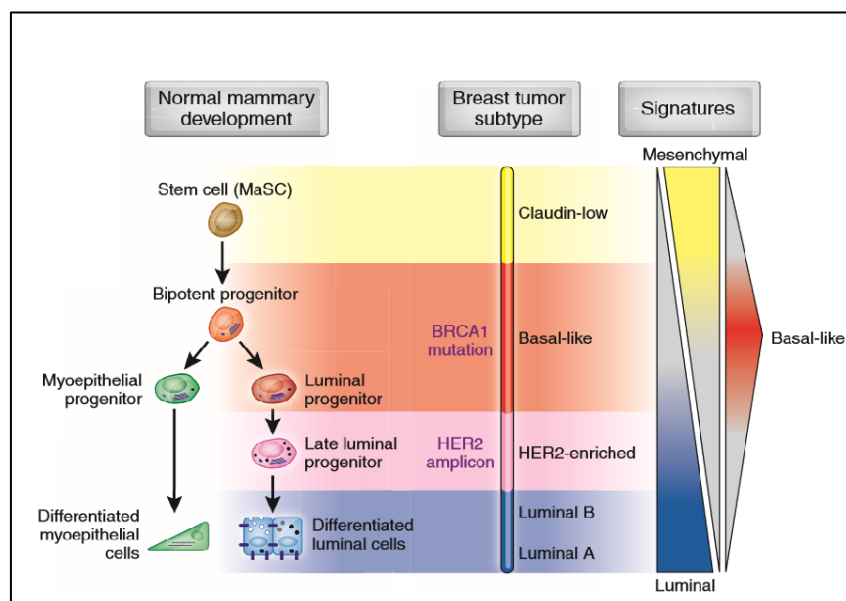
7. BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUZIONE

I tumori triplo negativi della mammella (TNBC) sono neoplasie che si caratterizzano per l'assenza di espressione nucleare dei recettori degli estrogeni (ER) e del progesterone (PgR) e dell'assenza dell'espressione o dell'amplificazione del gene Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2). In particolare, si considerano TNBC i tumori che presentano un'espressione di ER e PgR $\leq 1\%$ all'indagine immunohistochimica (IHC) e presentano HER2 tra 0 e +1 all'IHC o 2+ con FISH negativa (non amplificata) [1] [2] [3].

Gli studi di espressione genica (Genomic Expression Profile, GEP) su DNA microarrays hanno permesso di identificare 5 sottotipi intrinseci o molecolari di carcinoma della mammella (BC) [1]. In particolare, Sørli et al [4]. hanno individuato due sottotipi ER positivi (Luminal A e Luminal B) e tre sottotipi ER negativi (il sottotipo Basal-Like HER2-/ER-; il sottotipo HER2+/ER- e il sottotipo normal-like/non classificato), caratterizzati da prognosi significativamente differenti.

La figura sottostante riporta un modello del possibile sviluppo dei differenti sottotipi di BC a partire da sottotipi cellulari del normale tessuto mammario e dalle cellule staminali [5]:



Tuttavia, il GEP non può essere attualmente utilizzato su larga scala, per gli eccessivi costi, o su preparati fissati in formalina e inclusi in paraffina in studi retrospettivi, pertanto l'analisi IHC è stata utilizzata come suo surrogato. Inoltre, il profilo ottimale del Basal-Like BC rimane incerto (ER/PgR/Her2 negativi e citocheratina CK 5/6 positivi e/o EGFR positivi).

Sebbene, in circa l'80% dei casi il fenotipo clinico e immunohistochimico "triplo negativo" corrisponda al sottotipo molecolare Basal-Like, il TNBC e il Basal-Like BC costituiscono due entità separate [6] [7] [8] [9]. Infatti, il TNBC include anche alcuni istotipi speciali come il carcinoma midollare, il carcinoma secretorio, il carcinoma metaplastico di basso grado e il carcinoma adenocistico [1].

1.1. Epidemiologia

I TNBC rappresentano il 15-20% di tutti i casi di tumore della mammella (276480 nuovi casi stimati nel 2020, il primo per incidenza nel genere femminile e la prima causa di morte tra le neoplasie del genere femminile) [10] [6].

I TNBC si caratterizzano per una prognosi peggiore ed un comportamento clinico più aggressivo dei non-TNBC. In particolare, la sopravvivenza a 5 anni delle pazienti affette da TNBC è del 76.7% contro il 90.4% delle pazienti affette da non-TNBC [11]. Inoltre, tra le pazienti con TNBC vi è una variabilità di sopravvivenza a 5 anni correlata allo stadio clinico di malattia: 91.2% per una malattia localizzata, 65% per una malattia con diffusione regionale del 65% e 11.5% a distanza [11] [12].

Analogamente il tasso di recidiva dei TNBC è più alto rispetto a quello dei tumori non-TNBC a con un picco entro i 3 anni dalla diagnosi [13] [14]. In particolare, Li et al. hanno calcolato un tasso di recidiva a 3 anni di circa l'8%, 15% e 40% per gli stadi I, II e III, rispettivamente [15]. Tuttavia, l'incidenza delle recidive tende a ridursi con il tempo fino a raggiungere gli stessi livelli dei BC ER positivi/HER2 negativi (HR di morte a più di 6 anni dalla diagnosi 0.86, IC95% 0.30-2.46) [16]. Infine,

il rischio di recidiva a lungo termine in pazienti con TNBC è basso. In uno studio retrospettivo su 873 pazienti con TNBC in stadio I-III libere da malattia a 5 anni dalla diagnosi, Reddy et al [17] hanno dimostrato che il Recurrence Free Interval annuale era del 97% a 10 anni e del 95% a 15 anni. Inoltre, il tasso di Recurrence Free Survival del 91% a 10 anni e del 83% a 15 anni.

Diversamente dai non-TNBC, le sedi principali di secondarietà sono viscerali (polmone, fegato e sistema nervoso centrale) [14] [18] . La sopravvivenza mediana dopo diagnosi di metastasi del sistema nervoso centrale è minore di sei mesi [19].

I fattori di rischio per TNBC comprendono:

- 1- La mutazione BRCA: fino al 20% delle pazienti con TNBC presenta una mutazione del gene BRCA, in particolare di BRCA1 (al contrario solo il 6% dei non-TNBC sono associati alla mutazione di BRCA) [20].
- 2- Età: L'età media alla diagnosi è inferiore ai 40 anni, al contrario degli altri istotipi (età mediana 62 anni, range 55-64 anni [10]). Trivers et al. hanno riportato che le donne di 40 anni hanno un rischio 2 volte maggiore di essere affette da TNBC alla diagnosi delle donne di età superiore ai 50 anni (odds ratio [OR] 2.41, IC95% 1.81-3.21) [21].
- 3- Razza: sono colpite più frequentemente donne di origine Latina [22] [6], Afroamericana e Africana [6] [11] [21].
- 4- Altri fattori: obesità [23] e età giovanile alla prima gravidanza sono stati associati ad un aumentato rischio di TNBC, mentre la parità e l'allattamento sembrerebbero avere un ruolo protettivo [21] [24].

1.2. Presentazione clinica e caratteristiche istopatologiche

I TNBC hanno un comportamento clinico più aggressivo caratterizzato da una rapida crescita, che rende più frequente la diagnosi clinica rispetto a quella mammografica [13] [25].

Si presentano solitamente come tumori con un istotipo duttale infiltrante [26] o con il raro istotipo di carcinoma midollare della mammella.

I TNBC presentano generalmente dimensioni maggiori, elevato indice mitotico, margini di invasione definiti (“pushing border”) ed una risposta linfocitica stromale [26].

Inoltre, i TNBC hanno generalmente uno scarso grading valutato secondo i criteri del Nottingham Grading System, che considera la % di differenziazione tubulare/ghiandolare, il pleomorfismo nucleare ed il numero di mitosi per 10HPF.

1.3. Classificazione dei TNBC secondo il profilo genomico (GEP)

Sono stati effettuati alcuni studi di GEP nel tentativo di ottenere una caratterizzazione molecolare dei TNBC in differenti sottotipi ed ipotizzare nuovi approcci terapeutici, che possano affiancarsi ai trattamenti convenzionali, per la gestione di queste pazienti.

In particolare, sono state proposte le seguenti classificazioni:

2011 classificazione di Lehmann et al. include 7 sottotipi molecolari: luminal androgen receptor (LAR), due tipi di basal-like (BL1 and BL2), mesenchymal (M), mesenchymal stem-like (MSL), immunomodulatory (IM), unstable (UNS).

In tabella ne sono riportate le caratteristiche biologiche e le possibili terapie dei diversi sottotipi genomici [9] :

Sottotipo genomico	Alterazione biologica	Possibili terapie
Luminal AR (LAR)	Gene del Recettore per gli Androgeni	Terapia antiandrogenica
Basal-Like 1	Proliferazione cellulare Ciclo cellulare Riparazione DNA (92% mutazione p53 e high gain/amplificazione cMYC)	PARP-inibitori CHT contenente platino
Basal-Like 2	Ciclo cellulare	CHT contenente taxani
Mesenchymal*	Transizione epiteliale-mesenchimale Growth factor signaling	mTOR inhibitors PI3K inhibitors SRC inhibitors
Mesenchymal stem cell-like*	Transizione epiteliale-mesenchimale Angiogenesi Claudin-low	Terapia antiangiogenetica mTOR inhibitors PI3K inhibitors SRC inhibitors
Immunomodulatory°	Cellule immunitarie Cytokines signaling Chemokine signaling Antigen presentation	Inibitori dei checkpoint immunitari e altre terapie immuno-based

*Mesenchymal stem-like= è simile al mesenchimale, con maggior angiogeneasi e più bassi livelli di claudina

° GEP sostanzialmente combacia con l'istotipo midollare.

Successivamente la stessa classificazione è stata semplificata dagli stessi autori in: Basal-Like 1, Basal-Like 2, Mesenchimale e Luminal AR [27].

2015 classificazione di Bustein et al. [28] include 4 sottotipi: cluster 1 (LAR), cluster 2 (mesenchimali), cluster 3 (Basal-Like Immune Suppressed, BLIS), cluster 4 (Basal-Like Immune Activated, BLIA). L'analisi del DNA e RNA è stata condotta su 198 TNB, dimostrando una prognosi peggiore per i tumori BLIS in termini di DFS e OS, mentre i tumori BLIA sembrerebbero aver una prognosi migliore.

Nella figura sottostante è riportato un confronto tra le due classificazioni [29].

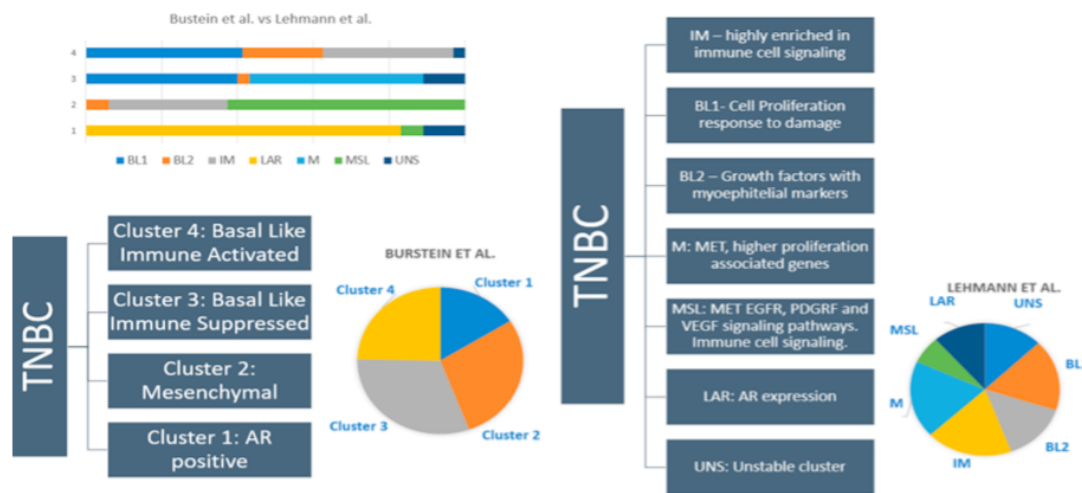


Fig. 1. Intersections of the subclassifications of Lehmann et al. and Burstein et al. Lehmann et al. in 2011 proposed a division of TNBCs into 7 molecular subtypes: immunomodulatory (IM), mesenchymal (M), mesenchymal stem-like (MSL): luminal androgen receptor (LAR), unstable (UNS) subtype and two basal-like subtypes (BL1 and BL2). In 2015, Burstein et al. used DNA profiling to identify TNBC subtypes: Cluster 1: luminal AR (AI), cluster 2: mesenchymal (MES), cluster 3: basal-like immunosuppressed (BLIS), and cluster 4: basal-like immune-activated (BLIA). Comparing the two classifications, cluster 1 contains all of Lehmann's LAR tumors and cluster 2 contains most of Lehmann's mesenchymal stem-like. Lehmann's basal-like 1 and basal-like 2 tumors are split between clusters 3 and 4, mesenchymal tumors reside in cluster 3, whereas the immunomodulatory tumors are distributed across clusters 2 and 4: [which express common signaling pathways]

1.4. I biomarkers del TNBC

I biomarkers sono definiti come variabili biologiche quantificabili e riproducibili. Nella pratica medica oncologica, essi possono essere utilizzati come parametri per predire la sopravvivenza o persino la risposta ad un trattamento [29]. Nella ricerca traslazionale, essi possono essere fattori usati per la diagnosi precoce, monitoraggio del trattamento e per fornire indicazioni per una targeted therapy.

Di seguito sono riportati i biomarkers considerati nello studio, con l'indicazione del ruolo prognostico, del ruolo predittivo e delle possibili applicazioni terapeutiche se disponibili i dati in letteratura.

1.4.a. Il recettore degli Androgeni (AR)

È parte di un complesso di recettori nucleari per gli ormoni steroidei che modulano fattori di trascrizione, controllando l'espressione genica in diversi processi cellulari, talora in maniera dualistica. In particolare, AR può sia stimolare la proliferazione sia la de-differenziazione cellulare ed indurre apoptosi e morte cellulare [29], grazie al cross-talk con altre vie di trasduzione del

segnale tra cui le pathways PI3K-AKT-mTOR e MAPK e con alcune key-protein come FOXA1, PTEN ed ERBB2 [30].

Nei BC, l'azione di AR è in funzione della presenza dei ER. In particolare, AR modula la trascrizione genica cellulare favorendo l'apoptosi nei BC ER positivi o la proliferazione cellulare nei BC ER negativi [30]. Nei TNBC, l'espressione IHC di AR varia tra il 10% e il 35% in relazione ai cut-off considerati.

Nei sottotipi LAR, il livello di AR è mediamente 9 volte maggiore degli altri sottotipi di TNBC [31]. Questo sottotipo è stato associato alla migliore OS nonostante abbia il più basso tasso di pCR alla NACT (10% versus 28% per i TNBC in generale) [32].

Ruolo Prognostico

In una metanalisi su 2826 pazienti con TNBC reclutate in 13 RCT, Wang et al. [33] hanno dimostrato che il 24.4% dei casi era AR positivo e che questa condizione si associava a basso grado tumorale (40.8% AR negativi versus 59.2%, $p < 0.001$) ed un minor rischio di metastasi linfonodali (28.8% versus 71.2%, $p < 0.01$). Le pazienti con AR positivo avevano un miglior DFS (HR 0.809, 95% CI = 0.659-0.995, $p < 0.05$), ma non una migliorata OS (HR 1.270, 95% CI=0.904-1.782, $p = 0.168$), indipendentemente dai cut-off utilizzati. Risultati simili sono stati ottenuti da Qu et al. [34] in una metanalisi su 551 pazienti con TNBC: i casi AR positivi presentavano un miglior DFS (HR 0.40, IC95% 0.23–0.69), ma nessun effetto sull'OS (HR 1.17, IC95% 0.60-2.28). Thike et al. (699 casi di TNBC) hanno dimostrato che i TNBC con elevata espressione di AR presenterebbero bassi livelli di indice mitotico e basso grado nucleare, con un DFS migliore delle pazienti con TNBC AR negativo ($p 0.05$) e un trend per una miglior OS ($p 0.09$) [35]. Risultati simili sarebbero stati ottenuti anche nell'analisi del sottotipo Basal-Like TNBC (593 pazienti).

Ruolo predittivo

Alcune evidenze indicano che le pazienti con TNBC AR positivo sarebbero maggiormente resistenti al trattamento chemioterapico rispetto alle AR negativo. In particolare, la presenza di AR sembrerebbe predittiva della risposta alla NACT. In particolare, Asano et al. [36] hanno dimostrato su 61 pazienti con TNBC sottoposte a NACT (4 cicli di FEC trisettimanali e 12 cicli settimanali di paclitaxel) che le pazienti con tumori AR positivi presentavano un tasso di pCR significativamente inferiore (p 0.001) e minor DFS (p 0.006). L'assenza di espressione di AR correlava con un più lungo DFS (HR 5.26, IC95% 1.39-19.86, p 0.014) all'analisi univariata, non confermata però all'analisi multivariata (p 0.08). Simili risultati sono stati ottenuti da Zhu et al. su 165 pazienti con TNBC trattate con NACT (schema sequenziale con antracicline e taxani) [37]. La pCR è stata ottenuta più frequentemente in pazienti con early-stage BC, tumori di basso grado e tumori AR negativi (OR 0.327, IC95% 0.161–0.667, p 0.002, confermato all'analisi multivariata p 0.003). Al contrario, Jongen et al. [38] hanno trovato che la probabilità di pCR era indipendente dallo status AR, ma le 71 pazienti coinvolte erano state sottoposte a NACT con farmaci in combinazioni differenti.

Le possibili applicazioni terapeutiche

Gli antagonisti dei recettori per gli androgeni sono comunemente utilizzati per il trattamento del carcinoma della prostata e sono stati valutati per il trattamento dei TNBC, quale alternativa alla chemioterapia in pazienti con malattie metastatiche o avanzate. Tra i farmaci a disposizione, il *bicalutamide* è un antagonista AR di prima generazione non steroideale, che compete con l'androgeno per il legame con AR e, quindi, con le sequenze ARE (Androgens Response Elements), inibendo la proliferazione cellulare [30].

Gucalp et al. [39] hanno somministrato 150mg di bicalutamide a pazienti con TNBC metastatici, dimostrando un beneficio clinico nel 19% (IC95% 7-39%), un PFS mediano di 12 settimane (range 11-22 settimane) ed un buon grado di tolleranza del farmaco senza eventi avversi di grado 4/5.

L'enzalutamide, è un antagonista AR di seconda generazione, che inibisce la traslocazione nucleare del recettore per gli androgeni ed il suo legame con la cromatina e con cofattori. Traina et al. [40] hanno trattato 78 pazienti con TNBC avanzato o metastatico con enzalutamide 160mg/die, dimostrando un beneficio clinico a 16 settimane del 33% (IC95% 23-45%) e a 24 settimane del 28% (IC95% 19-39%). La PFS mediana è stata 3.3mesi (IC95% 1.9-4.1 mesi) e l'astenia è stato il solo effetto avverso di grado 3 con un'incidenza del 2%.

L'Abiraterone è un inibitore irreversibile e selettivo dell'attività enzimatica di CYP17. In uno studio di fase II [41] è stato somministrato con il prednisone a 34 pazienti con TNBC localmente avanzato o metastatico. Il beneficio clinico a 6 mesi è stato del 20% (IC95% 7.7-38.6%) e la PFS mediana 2.8 mesi (IC95% 1.7-5.4 mesi). I principali effetti collaterali sono stati astenia, ipertensione, ipokaliemia e nausea di grado1-2.

1.4.b. Il Forkhead box A1 (FOXA1)

FOXA1 è espresso da differenti tumori, incluso il BC, e può legarsi ai promotori di più di 100 geni associati con la regolazione di vie di segnalazione cellulare e del ciclo cellulare. FOXA1 è infatti regolerebbe il legame tra ER e DNA e la trascrizione dei suoi geni target [42], interagendo con gli istoni H3 e H4 ed aprendo così la cromatina [43]. Nei tumori ER positivi, l'espressione di FOXA1 sembrerebbe direttamente correlata con quella di AR e si assocerebbe ad una miglior prognosi, indipendentemente dall'espressione di AR [44] [45].

Nei sottotipi LAR di TNBC, FOXA1 sembrerebbe essere fondamentale per il legame di AR con la cromatina, la sua trascrizione e la crescita cellulare [46]. In particolare, FOXA1 permetterebbe ad AR di occupare i siti normalmente occupati da ER nei tumori Luminal, inducendo una proliferazione cellulare simile a quello indotto dagli estrogeni [47]. Nel 2015 Guiu et al hanno dimostrato che nel 15.2% dei TNBC c'era una co-espressione di AR e FOXA1 (592 pazienti) [48]. Questi tumori colpivano

donne più anziane ed erano più frequentemente tumori lobulari infiltranti con basso grado nucleare e un coinvolgimento linfonodale maggiore. Inoltre, gli autori hanno trovato una minor presenza di infiltrati linfocitari, margini tumorali definiti (“pushing borders”), architettura sinciziale e necrosi o fibrosi centrale. Pertanto, questi tumori sembrerebbero comportarsi come tumori Luminal e costituire un tipo morfologico distinto dagli altri TNBC.

Ruolo prognostico

Guiu et al. hanno valutato il ruolo prognostico della co-espressione di FOXA1/AR in 333 pazienti con TNBC non metastatico, correlandolo con altri biomarkers come PD-L1 e PIK3CA [49]. Il 42.4% dei tumori è risultata FOXA1 positivo/AR positivo. Le pazienti con questo sottotipo di TNBC erano più anziane (p 0.003), presentavano tumori di basso grado (38.3% versus 4.2% for AR+/FOXA1- versus 9.8% for AR-; p < 0.001), lobulari (10.2% vs 0% for AR +/FOXA1- vs 1.6% for AR-; p 0.001) e con mutazione di PIK3CA (p <0.001). Non sono state riscontrate differenze nella presenza di TILs e nell’espressione di PD-L1. I tumori FOXA1 positivo/AR positivo hanno presentato una peggior DFS (p 0.020) e OS (p 0.024, confermato come fattore prognostico indipendente anche all’analisi multivariata) rispetto agli altri gruppi, con un aumentato rischio di recidiva a lungo termine. Inoltre, la OS e DFS sono risultate più corte tra le pazienti con FOXA1 positivo/AR positivo e PD-L1 positivo (p 0.012 e 0.002, rispettivamente). Risultati simili sono stati trovati da Mangia et al [46] su 124 TNBC. Gli autori hanno riscontrato anche una ridotta densità di TILs nei TNBC con FOXA1 positivo/AR positivo (p 0.028), confermando l’associazione di questo sottotipo con una peggior DFS (p 0.0117).

Ruolo predittivo

In uno studio retrospettivo su 40 casi di TNBC localmente avanzato (T clinico ≥ 2) e sottoposti a NACT, i tassi di FOXA1 positivo erano più bassi in caso di pCR ma la differenza non è risultata

significativa (8% versus 29%, p 0.233), probabilmente per l'esiguità del campione [49]. Simili risultati sono stati riportati da Jiang et al. su 29 casi di TNBC [50].

1.4.c. Le citocheratine CK5/6

Sono citocheratine mioepiteliali basali. In particolare, CK5 forma dimeri con CK14 e compone i filamenti intermedi che costituiscono il citoscheletro delle cellule epiteliali basali.

Il sottotipo Basal-Like, considerato un sottotipo aggressivo di TNB, esprime CK5/6 con CK 14 e CK 17 e/o EGFR (Human Epidermal Growth Factor) [51].

Ruolo Prognostico

Il tasso di espressione di CK5/6 varia dal 24 al 72% dei TNBC ed i tumori che le esprimono sembrerebbero avere una prognosi peggiore indipendentemente dalle loro caratteristiche clinico patologiche [29]. Inoltre, sembrerebbe esserci una correlazione tra le dimensioni del tumore e la presenza di metastasi linfonodali. In uno studio retrospettivo [51], il 35% dei TNBC esprimeva CK5/6 e il 71% EGFR. Inoltre, nel 48.6% erano espressi EGFR e CK5/6, mentre nel 20% entrambi erano negativi. L'espressione di CK5/6 correlava significativamente con alto grado tumorale (p 0.007), una risposta sfavorevole alla NACT (p 0.048), scarsa OS (p <0.001) e DFS (p 0.043). Thike et al. [53] hanno valutato 653 TNBC: le pazienti con immunofenotipo Basal-Like tendevano ad essere più giovani ed avere tumori di grado maggiore e linfonodi positivi rispetto alle non-BL. In un altro studio coinvolgente 192 casi di TNBC non metastatico [53], le pazienti sono state stratificate in casi ad espressione basale bassa (EGFR≤15% e CK5/6≤50%) o elevata (EGFR > 15% e CK5/6 >50%). Il gruppo ad espressione basale bassa con ki67 basso e basso pT e pN presentava una miglior sopravvivenza di quelle con un'elevata espressione/stadio delle tre variabili, log-rank p 0.015 (100% versus 68% a 50 mesi). Le pazienti con elevata espressione basale di entrambi i markers (EGFR > 15% e CK5/6

>50%) avevano una sopravvivenza peggiore (DFS media 25 mesi, tasso di eventi 41.7%) di quelle con espressione elevata di uno solo dei due markers (DFS media 34 mesi, tasso di eventi 25.5%).

Maeda et al [55] hanno analizzato con l'IHC i campioni di 52 TNBC, trovando un'iperespressione di membrana di CK5/6 nel 53.8% delle pazienti con il 58.3% dei casi AR negativo. Le pazienti CK5/6 e AR negative con p53 iperespresso hanno presentato una prognosi peggiore sia in termini di DFS sia di OS (p 0.01 e 0.02, rispettivamente).

1.4.d. Il Ki67

È una proteina nucleare, presente nella cellula durante tutta la fase attiva del ciclo cellulare (G1, S, G2 e mitosi), per cui viene diffusamente utilizzata come biomarker della proliferazione tumorale.

La sua attività è valutata mediante colorazione IHC ed il cut-off di elevata attività è $\geq 20\%$ [29].

Ruolo prognostico

Il ruolo prognostico del Ki67 è stato studiato in numerosi cancro, tra cui il BC. La sua importanza è tale che nelle conferenze di St. Gallen del 2011 e 2013 è stato utilizzato come discriminante degli istotipi di BC Luminal A e Luminal B [54] [55]. Nei TNBC, il ki67 è iperespresso nel 44.7-53.4% [29], tuttavia il suo ruolo prognostico nel TNBC è incerto. In una metanalisi di 35 studi (7716 pazienti in totale con un follow-up mediano di 11-112 mesi), Wu et al. [56] hanno dimostrato che ad un'elevata espressione di ki67 corrisponde una peggior per DFS (pooled HR 1.73, IC95% 1.45-2.07, $p < 0.001$) e OS (HR = 1.65, 95%CI:1.27-2.14, $p < 0.001$) in pazienti con TNBC sottoposte a chirurgia e a trattamento chemioterapico (neoadiuvante o adiuvante). Quando gli autori hanno considerato un cut-off del $ki67 \geq 40\%$, il pooled HR per DFS e OS è risultato 2.30 (95% CI 1.54-3.44, $p < 0.001$) e 2.95 (95% CI 1.67-5.19, $p < 0.001$), rispettivamente. Le pazienti affette da TNBC con ki67 elevato sembrerebbero quindi avere una peggior DFS e OS, indipendentemente dalle strategie di trattamento, i cut-off del ki67 o le soglie di ER/PgR. In uno studio su 1392 pazienti con TNBC [37], il

cut-off 30% è risultato un fattore prognostico indipendente di peggior OS (HR 1.947, IC95% 1.108-3.421, p 0.020) e DFS (HR 1.604, IC95% 1.118-2.300, p 0.010). Inoltre, in un'analisi di sottogruppi, $ki67 \geq 30\%$ è risultato un fattore predittivo e prognostico per DFS per tumori di dimensioni $\leq 2\text{cm}$ (p 0.008) o con linfonodi negativi (p 0.038). Risultati simili sono stati ottenuti da Wang et al. [57] su 363 early TNBC: all'analisi multivariata alti livelli di Ki67 sono risultati fattori di rischio indipendenti per DFS (RR 2.83, IC95% 1.58-5.06, p <0.001) e OS (RR 3.18, IC95% 1.48-6.79, p 0.003).

Ruolo predittivo

L'alta chemiosensibilità dei TNBC altamente proliferanti sembrerebbe confermata dall'analisi dei livelli basali di $ki67$, con un tasso di pCR elevato dopo NACT. Tuttavia, gli stessi tumori presenterebbero una prognosi scarsa a causa dell'alto tasso di recidive a 3 anni dal trattamento.

In particolare, in una metanalisi di 53 studi (10848 pazienti), Chen et al. [58] hanno trovato che alti livelli di $ki67$ si associavano a un più elevato tasso di pCR (OR 3.10 IC95% 2.52-3.81), indipendentemente dall'espressione recettoriale, i cut-off del $ki67$ e la definizione di pCR. Inoltre, $ki67$ sarebbe in grado di predire la pCR nelle pazienti riceventi NAC contenente antracicline, sole o in associazione con i taxani.

1.4.e. I Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs)

I TILs sono infiltrati di cellule immunitarie mononucleate presenti nel tessuto tumorale. Sono stati descritti in alcuni tumori solidi, quali il cancro del polmone, il melanoma e il cancro del colon [59].

Il tessuto mammario normalmente non contiene infiltrati infiammatori. Tuttavia, sin dal 1922 è nota l'associazione positiva tra l'alto numero di TILs nei BC e l'outcome clinico favorevole in pazienti con early BC, confermato poi successivamente. Recentemente alcuni studi si sono concentrati sul microambiente tumorale come determinante della sopravvivenza, invasività e capacità di metastatizzazione a distanza in caso di TNBC [46]. I TNBC presentano infatti molte mutazioni, coinvolte nella sintesi di proteine anomale, che possono comportarsi come neoantigeni neoplastici

e innescare la risposta immune antitumorale [60]. In particolare, Loi et al. [61] hanno dimostrato che i TILs erano presenti nel 20% di pazienti affette da BC con metastasi linfonodali ER negativo/HER2 negativo rispetto al 10% dei casi di ER positivo/HER2 negativo.

Uno dei compiti fondamentali del sistema immunitario è il mantenimento dell'omeostasi tissutale attraverso la sorveglianza immunologica continua e l'attivazione di reazioni infiammatorie che implicano l'attivazione coordinata dell'immunità cellulare innata e adattativa. In particolare, il sistema immunitario innato (neutrofili, monociti, macrofagi e cellule presentanti gli antigeni) e il sistema immunitario adattativo (linfociti B e T) sono entrambi fondamentali per il rapido riconoscimento e la risposta sia a patogeni sia a cellule non-self ed antigeni tumorali. La trasformazione neoplastica di una cellula di un tessuto si associa infatti ad una variazione di alcune sue strutture che permette al sistema immunitario di riconoscerla ed eliminarla. Quando l'eliminazione è incompleta, la trasformazione neoplastica cellulare è capace di sfuggire al controllo immunologico [62]. Le cellule tumorali sopravvissute possono pertanto persistere in uno stato di quiescenza e, dopo l'attivazione di vie pro-sopravvivenza, esprimere molecole che promuovano la soppressione immunitaria e la angiogenesi [63]. Questo processo di progressione maligna viene descritto dalla teoria del "Cancer Immunoediting" [64], che si compone di tre fasi: l'eliminazione, l'equilibrio e la fuga.

Elevati livelli di TILs sono espressi in circa il 20% dei TNBC. Nel BC, ed in particolare nel TNBC, i TILs potrebbero essere quindi un biomarker surrogato della risposta immune adattativa antineoplastica [44] [62].

I TILs sono generalmente identificati su preparati istologici colorati con ematossilina/eosina (EE) e si dividono in:

- Stromale: i TILs infiltrano lo stroma adiacente le cellule neoplastiche, che è parte del tumore
- Intratumorale: I TILs infiltrano i “nidi” di cellule tumorali e sono a diretto contatto con esse [59].

Essi sono costituiti principalmente da cellule T, ed in minor misura da cellule B, cellule NK e macrofagi. Possono essere focali, multifocali o diffusi. Una volta identificate, le popolazioni di TILs sono quantificate determinando la % di infiltrazione in un’area circoscritta del tumore e nello stroma circostante (vedi appendice) [62]. Questo metodo di quantificazione dei TILs è stato dimostrato essere un biomarker riproducibile, rappresentando un elemento integrativo relativamente semplice dell’indagine istopatologica standard [62] [65].

I TILs stromali sono facilmente identificabili con la colorazione EE, tuttavia l’IHC ha favorito l’identificazione dei TILs intratumorali grazie ad una più accurata discriminazione delle cellule immunitarie da quelle neoplastiche. Nella tabella seguente sono riportati i vantaggi e gli svantaggi dell’applicazione delle due tecniche:

TECNICA	
Colorazione EE	<p>VANTAGGI</p> <ul style="list-style-type: none"> - basso costo, - è compresa nella routine clinico-patologica, - tiene conto dell’eterogeneità degli infiltrati linfocitari. <p>SVANTAGGI</p> <ul style="list-style-type: none"> - è aspecifica; - non identifica i differenti sottotipi linfocitari che potrebbero avere un importante ruolo nell’attività antitumorale.
Colorazione IHC	<p>VANTAGGI</p> <ul style="list-style-type: none"> - permette una valutazione funzionale del microambiente tumorale; - permette una distinzione più accurata dei sottotipi di linfociti intratumorali; - possono essere utilizzati markers immunoistochimici come CD3 e CD8 (cellule T), CD20 (cellule B) e CD103 (cellule T intraepiteliali e dendritiche); - può essere effettuata su molti campioni utilizzando i microarrays tissutali (TMA);

	<p>SVANTAGGI</p> <ul style="list-style-type: none"> - le piccole dimensioni dei TMA possono creare dei bias di prelievo in campioni eterogenei; - può escludere importanti caratteristiche periferiche, come le strutture linfoidi terziarie; - ulteriore processo di analisi rispetto le indagini patologiche di routine; - Alcuni markers immunoistochimici non sono standardizzati ed affidabili (ad es. anticorpi verso PDL-1)
--	---

Ruolo prognostico

Sembrerebbe esistere una relazione lineare tra l'aumento del numero di TILs in pazienti con TNBC e l'incremento del DFS. In una pooled analisi di dati provenienti da due RCT di fase 3 (ECOG 2197 e ECOG 1199), Adams et al [66] hanno riportato che ogni 10% di aumento TILs si associava ad una riduzione del 14% di recidiva o morte (p 0.02), 18% di riduzione del rischio di recidiva a distanza (p 0.04) e di riduzione del rischio di morte (p 0.01). Risultati simili sono stati riportati da Park et al su 476 pazienti con early stage TNBC non sottoposte a chemioterapia adiuvante [67]. All'analisi multivariata, la presenza di TILs correlava con una miglior sopravvivenza in termini di DFS e OS: ad ogni incremento in TILs del 10% corrispondeva un HR di 0.90 per invasive-DFS, 0.86 per distant-DFS e 0.88 per OS.

In un'analisi di dati su 2148 pazienti con early stage TNBC partecipanti a 9 diversi RCT e trattate con chemioterapia adiuvante a base di antracicline ± taxani [67], Loi et al. hanno riportato un HR per un incremento del 10% di TILs stromali pari a 0.86 (IC95% 0.83-0.90) per l'invasive-DFS e HR 0.83 per distant-DFS e OS (IC95% 0.78-0.87 e IC95% 0.79-0.88, rispettivamente). Inoltre, per le pazienti con pN0 e TILs ≥30%, l'invasive-DFS a 3 anni era del 92%, la distant-DFS era del 97% e la OS del 99%.

Mangia et al. [46] hanno osservato che le pazienti con TILs ≥50% presentavano miglior DFS a 5 anni (84% versus 75%, p 0.037) e OS (98% versus 88%, p 0.019). Inoltre, all'analisi multivariata i TILs sono risultati un fattore prognostico indipendente di DFS (HR 0.34, IC95% 0.12-0.98, p 0.045). In una

metanalisi di 25 studi (22964 pazienti) [68], i TILs sia stromali sia intratumorali sono risultati un fattore prognostico di miglior DFS (HR 0.82, IC95% 0.76-0.88) e OS (HR 0.79, IC95% 0.71-0.87) in pazienti affette da TNBC.

Ruolo predittivo

I TILs sembrerebbero essere un fattore predittivo di risposta alla chemioterapia. L'effetto citotossico della chemioterapia è parzialmente influenzato dalla reazione immune contro le cellule tumorali. Allo stesso modo, la chemioterapia produrrebbe una miglior risposta immune modificando il microambiente, aumentando l'immunogenicità del tumore e portando a una riduzione del tumore.

Ochi et al. [69] hanno riscontrato che bassi livelli di TILs ($\leq 9\%$) alla biopsia pre-NACT si associavano a minor tassi di pCR (4% versus 43.6%, $p < 0.001$). All'analisi multivariata, le pazienti con malattia residua dopo NACT e bassi livelli di TILs pre-NACT avevano una peggior DFS (HR 3.844, IC95% 1.190-12.421, $p 0.024$). Una tendenza simile è stata rilevata per bassi livelli di TILs post-NACT (HR 2.836, IC95% 0.951-8.457, $p 0.061$). In uno studio che includeva 314 casi di TNBC [70], la presenza di TILs stromali e di Lymphocytes Predominant BC (tumori con TILs stromali o intratumorali $\geq 60\%$) sono risultati fattori predittivi di pCR all'analisi univariata (OR 1.15, IC95% 1.17-1.45, $p < 0.001$ e OR 4.78, IC95% 2.53-9.05, $p < 0.001$, rispettivamente). Infine, Dieci et al hanno analizzato i dati di 278 TNBC con malattia residua dopo NACT: l'OS a 5 anni è stato 91% (IC95= 68-97%) per high TILs $\geq 60\%$ versus 55% per low TILs (IC95= 48-61%) (HR 0.19, IC 0.06-0.61, $p 0.0017$) [71].

Le possibili applicazioni terapeutiche

Recentemente, sono state introdotte nuove terapie che riattivano la risposta del sistema immunitario antineoplastico nel trattamento del melanoma e il cancro del polmone, con miglioramento degli outcomes.

Programmed cell Death Protein 1 (PD-1) è un recettore del checkpoint immune espresso dai linfociti T, che limita l'azione delle stesse cellule T all'interno dei tessuti [29]. Ha due ligandi, PD-L1 e PD-L2, espressi dalle cellule neoplastiche con distinti profili di espressione nei diversi tumori. In particolare, il legame tra il ligando e il recettore PD-1 causerebbe l'attenuazione delle funzioni delle cellule T, mediando così l'immunosoppressione verso le cellule neoplastiche [72]. Pertanto, l'immunoterapia con gli inibitori di PD1 e PD-L1 causerebbe un'attivazione delle cellule T e la riattivazione dell'attività immunitaria antineoplastica dell'ospite.

Il tasso di espressione di PD1 e PD-L1 è variabile nei diversi studi a causa della differenza nelle tecnologie di rilevazione (IHC, DNA microarrays e ibridizzazione in situ di mRNA), dei cut-off utilizzati per indicare la positività del campione e dei metodi del prelievo dei campioni di tumore [29] [73]. All'indagine IHC di campioni provenienti da pazienti con TNBC, PD-L1 è stato identificato nel 15.8-30% dei casi. Tuttavia, Schalper et al, usando l'ibridizzazione in situ su 636 BC in stadio I-III, ha riscontrato PD-L1 nel 55.7-59.5% dei microarrays tissutali. Elevati livelli di mRNA di PD-L1 correlavano con livelli più elevati di TILs (p 0.04) ed una più lunga DFS (p-log rank 0.01) [74]. In uno studio retrospettivo coinvolgente pazienti con BC, l'iperespressione di PD-L1, riscontrata attraverso l'analisi mRNA, si associava a caratteristiche prognostiche sfavorevoli (quali dimensioni maggiori del tumore, status ER e PgR negativo, iperespressione di HER2, alto indice mitotico, sottotipo istologico basale o HER2), migliori tassi di pCR (50% versus 21%) e DFS a 5 anni del 61% (IC95% 0.58-0.64) [75]. Risultati simili sono stati riportati da Cerbelli et al [76]: la presenza di PD-L1 \geq 25% sulle cellule tumorali si associava a migliori tassi di status e pCR (p 0.024, confermata all'analisi multivariata OR 1.13, IC95% 1.01-1.27). A conclusioni simili è giunta una recente metanalisi su 5 studi (2546 pazienti con BC) [77]: l'espressione di PD-L1 si associava a metastasi linfonodali, elevato grading tumorale, status ER- negativo e TNBC. In particolare, l'iperespressione di PD-L1 si assocerebbe ad una peggior OS con HR 1.76 (IC95% 1.09-2.82, p 0.02).

I farmaci studiati nei TNBC sono: atezolizumab e pembrolizumab.

Atezolizumab è un anticorpo monoclonale diretto verso PD-L1 che agisce stimolando l'attività delle cellule T contro le cellule neoplastiche inibendo il legame PD-1/PD-L1. Emens et al hanno valutato l'attività di atezolizumab in monoterapia in 116 pazienti con TNBC metastatico, riportando un tasso di risposta obiettiva (ORR) del 24% e un OS di 17.6 mesi in pazienti trattate in prima linea e un ORR del 6% per le linee successive. Inoltre, le pazienti con almeno 1% di cellule con PD-L1 nell'infiltrato tumorale presentavano miglior ORR e OS (10.1 mesi, IC95% 7-13.8 mesi) [78]. Al contrario, in un altro RCT di fase III su 902 pazienti con TNBC avanzato o metastatico (IMpassion130) [79], il trattamento con NAB-paclitaxel e atezolizumab non si è associato a un prolungamento dell'OS nella popolazione generale (21 mesi, HR 0.86 IC95% 0.72-1.02, 0.078). Tuttavia, le pazienti con PD-L1 sembrerebbero avere un significativo beneficio dell'OS (25 mesi, HR 0.71 IC95% 0.54-0.94) rispetto alle pazienti del braccio placebo all'analisi ad interim.

Pembrolizumab è un anticorpo monoclonale diretto verso PD-1. Recentemente, è stato pubblicato uno studio di fase II di un regime di terapia neoadiuvante contenente chemioterapia e *pembrolizumab* in 60 pazienti con TNBC ad alto rischio, non metastatico [80]. Il tasso di pCR è stato del 60% (range 49-71%) con tassi di DFS a 1 anno e OS variabili tra le coorti dall'80% al 100% in relazione allo schema chemioterapico. Alti tassi di pCR si sono associati a iperespressione pretrattamento di PD-L1 (p 0.0127) e (prima e durante il trattamento, p 0.0059 e 0.0085 rispettivamente). In un altro studio su 55 donne con TNBC avanzato o metastatico trattate con pembrolizumab e niraparib, si sono ottenuti tassi di risposta obiettiva del 21% (IC90% 12-33%) e di controllo della malattia del 49% (IC90% 36-62%), che crescevano ulteriormente nelle pazienti BRCA positive [81].

1.5. Trattamento

1.5.a. Stadi iniziali

Per i TNBC non metastatici, il principale obiettivo del trattamento è l'eradicazione della malattia a livello mammario e linfonodale ascellare e la prevenzione della recidiva. Il trattamento chirurgico può essere conservativo o demolitivo, come avviene per i non-TNBC, associato alla biopsia del linfonodo sentinella o alla dissezione linfonodale ascellare [12]. In caso di chirurgia mammaria conservativa, è previsto un trattamento radioterapico postoperatorio adiuvante [82].

La chemioterapia è il trattamento principale per i TNBC, in assenza di terapie targeted (ormonoterapia o antiHER2) disponibili. Generalmente tutte le pazienti con TNBC di dimensioni superiori ai 5mm, anche in assenza di secondarietà linfonodali, dovrebbero essere sottoposte a chemioterapia adiuvante dopo l'intervento chirurgico [12]. Tuttavia, in caso di pazienti con malattia localmente avanzata o nei casi in cui la chirurgia conservativa non avrebbe dei buoni risultati estetici, è indicato il trattamento chemioterapico neoadiuvante (NACT) [1].

Gli schemi di trattamento contenenti taxani e antracicline e/o agenti alchilanti sono la scelta più appropriata nelle pazienti ad alto rischio [12]. In particolare, le antracicline sembrano essere i farmaci più importanti nel trattamento di pazienti con TNBC e metastasi linfonodali [83].

Nello studio GEICAM 9906 (RCT di fase III [84]), il trattamento adiuvante con 4 cicli di fluoruracile, epirubicina e ciclofosfamide (FEC) seguito da 8 cicli settimanali di paclitaxel ha avuto un miglioramento del DFS a 7 anni rispetto al solo trattamento adiuvante con 6 cicli di FEC (74% versus 56%, p 0.015). In particolare, per il sottotipo di TNBC EGFR + o CK5/6 + (Basal-Like), il miglioramento del DFS a 7 anni nel braccio FEC+P è stato dell'83% versus 57% del braccio solo FEC (p 0.018).

Una risposta patologica completa (pCR) dopo NACT si associa ad un miglioramento del DFS [14] [85]. In particolare, Berry et al. hanno dimostrato una riduzione del 55% del rischio di recidiva e del tasso di mortalità in pazienti con TNBC trattate con chemioterapia rispetto alle pazienti affette da non-TNBC (rispettivamente del 26% e del 23%) [86]. Inoltre, Huang et al. (metanalisi di 25 studi, 1157 pazienti) hanno osservato che la pCR dopo chemioterapia in TNBC si associava a un miglioramento di DFS (HR 0.24 IC95%= 0.20-0.29) e dell'OS (HR 0.19 IC95%= 0.15-0.24) [87]. Tuttavia, non è chiaro se sia necessario effettuare un trattamento chemioterapico addizionale in caso di riscontro di malattia residua dopo NACT contenente antracicline. Masuda et al. (RCT, 910 pazienti) hanno dimostrato in pazienti con tumore residuo dopo NACT e sottoposte a trattamento adiuvante con 6-8 cicli di capecitabina una miglior DFS a 5 anni (69.8% versus 56.1% delle pazienti non trattate, HR 0.58 IC95% 0.39-0.87, p 0.01) e una miglior OS (78.8% versus 70.3%, HR 0.52, IC95% 0.30-0.90) [88]. Al contrario, Lluch et al. (RCT, 876 pazienti), non hanno trovato alcun beneficio nel DFS a 7 anni dall'aggiunta di 8 cicli di capecitabina alla chemioterapia rispetto alla semplice osservazione (HR 0.82, IC95% 0.63-10.6, p 0.136) [89]. Tuttavia, in questo studio le pazienti del braccio di trattamento erano state sottoposte a chemioterapia adiuvante (78.8%) o a NACT (19.9%) e considerate a minor rischio di recidiva (maggior rischio di recidiva nella popolazione asiatica).

1.5.b. Stadi avanzati

Al contrario degli altri sottotipi di BC (i.e. ER positivi o HER2 positivi), la chemioterapia resta il principale approccio terapeutico per gli stadi avanzati di TNBC. La monochemioterapia è il trattamento di scelta nella maggior parte dei casi, con tassi di risposta intorno al 20-30%. I farmaci utilizzati sono antracicline, taxani, platino, eribulina, capecitabina, gemcitabin, vinorelbina, ixabepilone e ciclofosfamida [9] [12].

I regimi combinati di chemioterapia possono essere considerati appropriati per le pazienti con malattia secondaria estesa o rapidamente progressiva, in cui si pensa che la probabilità di risposta sia maggiore del rischio di tossicità. Inoltre, sebbene si possano avere dei tassi di risposta elevati, questi non si associano ad un prolungamento dell'OS [9].

Sebbene la classificazione genomica non sia utilizzata nella scelta del trattamento, recentemente sono stati identificati due gruppi di pazienti per i quali la US FDA ha approvato due targeted therapies [9]. Si tratta di pazienti con TNBC metastatico con:

- Mutazione BRCA germinale, per le quali i PARP inibitori (olaparib e talazoparib) sono stati autorizzati per l'uso dopo progressione durante chemioterapia;
- Espressione di Programmed cell Death Ligand 1 (PD-L1) in almeno 1% delle cellule all'IHC, per cui è stato approvato il trattamento con atezolizumab in combinazione con *nab*-paclitaxel.

In queste pazienti sarebbe comunque auspicabile la conferma della diagnosi mediante biopsia della lesione sospetta perché è stata dimostrata una discrepanza di ER, PgR ed HER2 tra il tumore primario e la malattia metastatica [90] [91]. Inoltre, dovrebbe essere eseguita anche la valutazione di PD-L1.

2. OBIETTIVI dello STUDIO

Lo scopo dello studio è stato di valutare il ruolo di alcuni nuovi biomarkers immunoistochimici (AR, FOXA1, CK5/6 e i linfociti intra tumorali) come fattori prognostici della sopravvivenza libera da malattia e della sopravvivenza globale nelle pazienti affette da tumore della mammella triplo negativo. Inoltre, sono state valutate le possibili correlazioni degli stessi biomarkers con i fattori prognostici noti utilizzati nella pratica clinica, quali ad esempio le dimensioni del tumore, lo stato linfonodale o l'indice di proliferazione.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Pazienti e loro caratteristiche clinico-istopatologiche

Lo studio è stato condotto sui preparati istologici ottenuti da 145 pazienti affette da TNBC e trattate presso le “Breast Unit” dell’A.O.U. “Città della Scienza e della Salute” e dell’A.O. “Umberto I” di Torino tra il 2006 e il 2016.

I **criteri di inclusione** nello studio sono stati: a) genere femminile; b) diagnosi istologica di carcinoma infiltrante della mammella con esclusione dei casi di carcinoma in situ o di carcinoma primitivo occulto con localizzazioni secondarie linfonodali a livello ascellare; c) diagnosi immunohistochemica di istotipo TNBC, definito dalla presenza all’indagine IHC di ER<1%, PgR<1% ed assenza di iperespressione o amplificazione di HER2 [2] [3] ed effettuata su un campione tissutale prelevato al momento dell’intervento chirurgico o della biopsia mammaria, che ha preceduto la chemioterapia neoadiuvante (NACT); d) conferma della diagnosi istologica mediante la revisione dei preparati istologici ed immunohistochemici.

Un consenso informato per l’uso anonimo dei dati clinici e strumentali e la partecipazione a studi scientifici è stato firmato da ogni paziente.

Per tutte le pazienti partecipanti allo studio sono stati raccolti i seguenti dati:

- **Dati clinici:** età al momento della diagnosi; stato BRCA della paziente; stadio clinico della malattia al momento della diagnosi [92]; trattamento ricevuto (intervento chirurgico, chemioterapia adiuvante o NACT); condizione clinica al momento dello studio (NED, AWD, DOD, DOC). Il follow-up clinico è stato effettuato utilizzando i dati inseriti nei database

prospettici di entrambi i reparti, o nel caso fosse necessario mediante gli uffici dell'anagrafe dei comuni di residenza delle pazienti.

- **Caratteristiche istologiche del tumore** (confermate alla revisione dei preparati istologici e immunoistochimici): istotipo, dimensioni del tumore (pT, misurato in mm [92]), grading nucleare (secondo i criteri di Ellis Elston [1]), stato linfonodale (pN, [92]) e indice di proliferazione cellulare (Ki67>20% indicativo di neoplasia altamente proliferante [54] [55]).

3.2. Analisi immunoistochimica

Le Divisioni di Anatomia Patologica dell'A.O.U. "Città della Scienza e della Salute" e dell'A.O. "Umberto I" hanno eseguito separatamente la diagnosi istologica sui campioni di tessuto mammario asportato durante l'intervento chirurgico o la biopsia che ha preceduto la NACT delle rispettive pazienti.

Per ciascuna paziente, è stato scelto il preparato fissato in formalina ed incluso in paraffina più rappresentativo della lesione asportata.

In particolare, microarrays tissutali sono stati ottenuti nei casi in cui il materiale biologico tumorale fosse risultato sufficiente (45 casi). In altri 83 casi, le reazioni sono state seguite su sezione intera. Per le pazienti sottoposte a NACT (17 casi) l'analisi IHC è stata eseguita sul tessuto prelevato durante la biopsia diagnostica.

Le reazioni immunoistochimiche sono state eseguite utilizzando il sistema automatizzato Ventana BenchMark XT (Ventana Medical System Inc., Tucson, AZ USA). Le Divisioni di Anatomia Patologica

dell'A.O.U. "Città della Scienza e della Salute" e dell'A.O. "Umberto I" hanno utilizzato gli stessi prodotti, tranne nel caso di PgR e Ki67. Gli anticorpi monoclonali utilizzati, le modalità di esecuzione dell'indagine IHC ed i cut-off impiegati sono indicati nella seguente Tabella.

Marker	Clone anticorpo	Specie	Azienda	Smascheramento	Diluiz.*	Sede	Cut-off
ER	SP1	R	Ventana/Roche	52' CC1		Ncl	<1%
PgR	1A6 1E2	M	NovocastraHD/Leica Ventana/Roche	52' CC1 36' CC1	1:40	Ncl	<1%
HER2	4B5	R	Ventana/Roche	36' CC1		MCit	0/1+ o 2+ e FISH negativa
Ki67	MIB-1 (30-9)	M	Dako Ventana/Roche	36' CC1	1:80	Ncl	Alto ≥20%
AR	SP107	R	Cell Marque/Roche	52' CC1		Ncl	>1%
CK 5/6	D5/16B4	M	Ventana/Roche	36' CC1		Cit	Almeno un cluster di cellule neoplastiche positivo
FOXA1	2F83	M	Cell Marque/Roche	36' CC1		Ncl	>1%

R= rabbit, M= mouse, Ncl= nucleo, MCit= membrana citoplasmatica, Cit= citoplasma * prediluito tranne dove specificato.

3.3. Valutazione dei TILs

La presenza dei TILs è stata valutata su sezioni colorate con ematossilina-eosina, seguendo le raccomandazioni dell'International TILs Working Group 2014 [62]. Nella tabella seguente (e nell'appendice 2) sono riportate le principali raccomandazioni per la valutazione dei TILs nel BC.

Table 2. Recommendations for assessing tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer

- 1) TILs should be reported for the stromal compartment (= % stromal TILs). The denominator used to determine the % stromal TILs is the area of stromal tissue (i.e. area occupied by mononuclear inflammatory cells over total intratumoral stromal area), not the number of stromal cells (i.e. fraction of total stromal nuclei that represent mononuclear inflammatory cell nuclei).
- 2) TILs should be evaluated within the borders of the invasive tumor.
- 3) Exclude TILs outside of the tumor border and around DCIS and normal lobules.
- 4) Exclude TILs in tumor zones with crush artifacts, necrosis, regressive hyalinization as well as in the previous core biopsy site.
- 5) All mononuclear cells (including lymphocytes and plasma cells) should be scored, but polymorphonuclear leukocytes are excluded.
- 6) One section (4–5 μm , magnification $\times 200$ – 400) per patient is currently considered to be sufficient.
- 7) Full sections are preferred over biopsies whenever possible. Cores can be used in the pretherapeutic neoadjuvant setting; currently no validated methodology has been developed to score TILs after neoadjuvant treatment.
- 8) A full assessment of average TILs in the tumor area by the pathologist should be used. Do not focus on hotspots.
- 9) The working group's consensus is that TILs may provide more biological relevant information when scored as a continuous variable, since this will allow more accurate statistical analyses, which can later be categorized around different thresholds. However, in daily practice, most pathologists will rarely report for example 13.5% and will round up to the nearest 5%–10%, in this example thus 15%. Pathologists should report their scores in as much detail as the pathologist feels comfortable with.
- 10) TILs should be assessed as a continuous parameter. The percentage of stromal TILs is a semiquantitative parameter for this assessment, for example, 80% stromal TILs means that 80% of the stromal area shows a dense mononuclear infiltrate. For assessment of percentage values, the dissociated growth pattern of lymphocytes needs to be taken into account. Lymphocytes typically do not form solid cellular aggregates; therefore, the designation '100% stromal TILs' would still allow some empty tissue space between the individual lymphocytes.
- 11) No formal recommendation for a clinically relevant TIL threshold(s) can be given at this stage. The consensus was that a valid methodology is currently more important than issues of thresholds for clinical use, which will be determined once a solid methodology is in place. Lymphocyte-predominant breast cancer can be used as a descriptive term for tumors that contain 'more lymphocytes than tumor cells'. However, the thresholds vary between 50% and 60% stromal lymphocytes.

Le sezioni sono state valutate indipendentemente da due osservatori esperti e, in caso di dubbio, da un terzo osservatore esperto presso la Divisione di Anatomia Patologica dell'A.O.U. "Città della Scienza e della Salute".

In caso di TIL eterogeneo, sono state effettuate delle sezioni aggiuntive ed è stato calcolato un valore medio dall'osservazione di due aree differenti. Non è stata eseguita alcuna tipizzazione IHC per la tipizzazione linfocitaria, come riportato in Tabella.

3.4. Analisi Statistica

Le variabili analizzate sono riportate nella seguente tabella con la loro codifica e cut-off:

Variabile	Tipologia	Valore
Età	Continua	-
Grading	Continua categorica	1 2 3
Dimensione tumore	Dicotomica	Cut-off ≥ 15 mm
pT	Continua categorica	1: dimensioni del tumore < 2 cm 2: dimensioni del tumore ≥ 2 cm, ma < 5 cm 3: dimensioni del tumore ≥ 5 cm 4: tumore di qualsiasi dimensione con estensione diretta alla parete toracica e/o alla cute (ulcerazione o noduli cutanei)
pN	Continua categorica	0: assenza di metastasi o ITC isolate 1: da 1 a 3 linfonodi coinvolti 2: da 4 a 9 linfonodi coinvolti 3: più di 9 linfonodi coinvolti
Coinvolgimento Linfonodale	Dicotomica	Assente Presente
NACT	Dicotomica	Sì No
Ki67	Dicotomica	Cut-off $\geq 20\%$
AR	Dicotomica	Cut-off $\geq 1\%$
FOXA1	Dicotomica	Cut-off $\geq 1\%$
C5/6	Dicotomica	Espresso Non espresso
TILs	Dicotomica	Cut-off $\geq 10\%$
Follow-up	Categorica	NED: No evidence of disease AWD: Alive with disease DOD: Dead of Disease
“Disease Free Survival” (DFS)	Continua	calcolata dalla data di diagnosi di carcinoma della mammella fino alla data di recidiva di malattia locoregionale o a distanza o dell’ultimo controllo effettuato, espressa in mesi
“Overall Survival” (OS)	Continua	Calcolata dalla data di diagnosi di carcinoma della mammella fino alla data di morte per qualsiasi, espressa in mesi

La distribuzione (normale o non normale) delle variabili quantitative in studio è stata valutata con il test di Kolmogorov-Smirnov.

Il test del Chi Quadrato di Pearson e il test t di Student sono stati utilizzati per le analisi di correlazione in caso rispettivamente di variabili categoriche o variabili continue

Il cut-off relativo all'entità dell'infiltrato linfocitario è stato definito mediante valutazione della curva ROC eseguita per valori di TILs > 10%, > 20%, >30%, >40%, >50%, successivamente correlati con l'evento recidiva (log-rank trend test). Il valore statisticamente discriminante è stato scelto in base al valore maggiore di AUC ed è risultato essere $\geq 10\%$ (AUC 0.601).

La determinazione delle probabilità di sopravvivenza è stata definita dalle curve di Kaplan-Meier e le differenze sono state confrontate utilizzando il Logrank test di Mantel.

L'Hazard Ratio (HR) per le analisi univariata (per il confronto delle singole variabili) e multivariata della sopravvivenza e del DFS è stato calcolato utilizzando il Cox Proportional Hazard Regression Model.

Sono stati considerati statisticamente significativi valori di $p < 0,05$.

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il software R 3.3 2016 con il pacchetto Rcommander (versione 2.3-0; estensione RcmdrPlugin.EZR).

4. RISULTATI

Sono state incluse nello studio 145 pazienti. L'età mediana alla diagnosi delle pazienti era 57 anni (range 21-92 anni). La fascia di età più frequentemente coinvolta è stata tra i 50 e 69 anni (40%).

Il 11.7% era stato sottoposto a NACT, con un tasso di risposta patologica completa (pCR) del 23.5%.

Il 31% (45 casi) delle pazienti ha avuto una recidiva, riscontrata nel 77.8% entro i 3 anni dalla diagnosi (tempo mediano 4.4 anni, range 0.1-10.3 anni). La sede di recidiva più frequentemente coinvolta è stato il cavo ascellare omolaterale (22.2%). Il follow-up mediano è stato 5.4 anni (range 0.1-10.7 anni). A 5 anni dalla diagnosi, 76 pazienti (54.5% dei casi) erano ancora vive: 64 libere da malattia (84.2%) e altre 12 (15.8%) avevano avuto una recidiva, trattata con chemioterapia.

Le caratteristiche cliniche delle pazienti sono riportate nella seguente Tabella.

Caratteristica	N	%
Età della paziente: mediana 57 (range 21-92 anni)		
≤39	11	7.6%
40-49	36	24.8%
50-69	58	40%
≥70	40	27.6%
Chemioterapia neoadiuvante (NACT)		
Si	17	11.7%
No	128	88.3%
Risposta patologica alla NACT		
Completa	4	23.5%
Incompleta	13	76.5%
Recidiva		
Si	45	31%
No	100	69%
Tempo alla recidiva (Mediana = 4.4 anni, range 0.1-10.3 anni)		
≤ 3 anni	35	77.8%
>3.1 anni	10	22.2%
Sede della recidiva		
Locale	6	13.3%
Linfonodi ascellari	10	22.2%
Linfonodi sovraclaveari	1	2.2%
Epatica	4	8.9%
Polmonare	9	20%
Encefalica	7	15.6%
Controlaterale	2	4.4%
Ossea	4	8.9%
Missing	2	4.4%
Follow-up (Mediana= 5.4 anni, range 0.1-10.7 anni)		
NED	92	63.4%
AWD	21	14.5%
DOD	32	22.1%
Pazienti NED* a 5 anni dalla diagnosi suddivise per lo stadio di malattia (64 casi)		
0	2	3.1%
I	28	43.8%
II	25	39.1%
III	9	14.1%

*NED= no evidence of disease

4.1. Caratteristiche istopatologiche dei TNBC

I TNBC inclusi nello studio avevano un diametro mediano di 23mm (range 0-100mm), con dimensioni ≥ 15 mm nel 75.2% dei casi. Nella maggior parte dei casi, i tumori si presentavano di alto grado (G3 nel 83.1%) e con un alto indice mitotico (Ki67 $\geq 20\%$ nel 93.1%). Tra le pazienti con metastasi linfonodali (53 casi, 36.6%), il 67.9% dei casi erano pN1 con micrometastasi o metastasi in 1-3 linfonodi ascellari omolaterali.

Nella tabella seguente sono riportati le caratteristiche clinico-patologiche delle pazienti incluse nello studio.

Caratteristica	N	%
Grading Istologico		
1	1	0.7%
2	17	11.8%
3	122	83.1%
Missing	5	3.4%
Dimensione del tumore (Mediana 23mm, range 0-100mm)		
≥ 15 mm	109	75.2%
≤ 14 mm	36	24.8%
pT		
0	4	2.8%
1	62	42.8%
2	63	43.4%
3	11	7.6%
4	5	3.4%
pN		
0	92	63.4%
1	36	24.8%
2	12	8.3%
3	5	3.5%
Indice di proliferazione Ki67$\geq 20\%$		
No	10	6.9%
Si	135	93.1%

4.2. Caratteristiche immunoistochimiche dei TNBC

L'indagine IHC sui preparati di TNBC ha evidenziato la presenza di AR nel 35.2% dei casi e di FOXA1 nel 59.3% dei casi. Le citocheratine CK5/6 sono risultate espresse nel 56.6% dei casi. Nella tabella seguente sono riportati i tassi di espressione dei diversi biomarkers nei TNBC esaminati.

Biomarker	N	%
AR		
Si	51	35.2%
No	94	64.8%
FOXA1		
Si	86	59.3%
No	59	40.7%
CK5/6		
Si	80	55.2%
No	61	42.1%
Missing	4	2.7%

FOXA1 e AR erano co-iperespressi nel 31% dei casi. In particolare, AR era risultato iperespresso nel 52.3% dei tumori FOXA1 positivi (versus 16.9% dei FOXA1 negativi, $p < 0.001$), mentre tra i casi di FOXA1 negativi l'83% erano anche AR negativi (versus 47.3% dei FOXA1 positivi, $p < 0.001$).

FOXA1 e CK5/6 erano co-iperespressi nel 31% in maniera inversamente proporzionale. Infatti, le CK5/6 non sono risultate iperesprese nel 52.3% (45/86 casi) dei tumori FOXA1 positivi, mentre lo erano nel 69.5% (41/56) dei casi FOXA1 negativi ($p 0.015$).

Considerando il percorso terapeutico delle pazienti, il 17.2% delle pazienti con FOXA1 positivo era stata sottoposta a NACT (versus 3.3% con FOXA1 negativo, $p 0.020$). Inoltre, tra le pazienti che hanno avuto una recidiva, il 38.4% aveva un'iperespressione di FOXA1 (versus 18.6% con FOXA1 negativo, $p 0.18$).

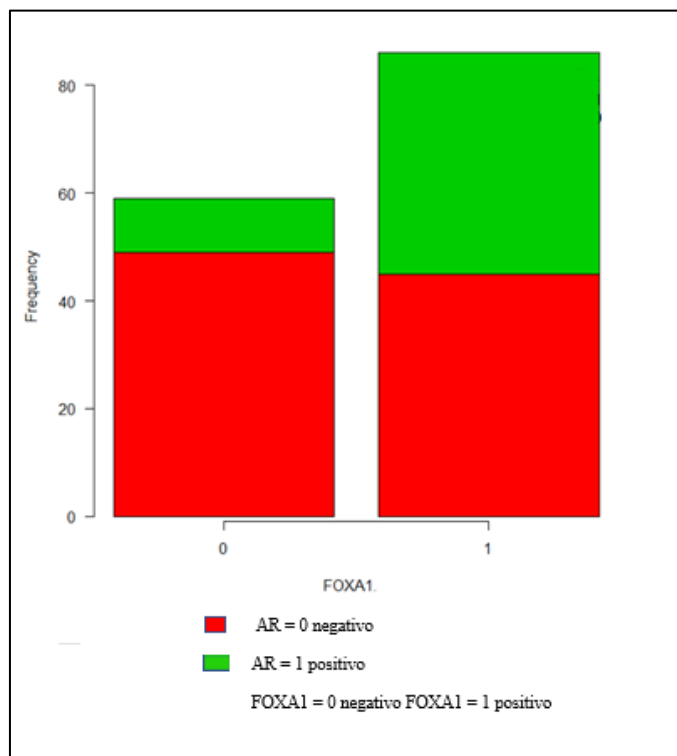
Non si sono osservate differenze nell'espressione di FOXA1 in relazione all'età e alle altre caratteristiche istopatologiche, come riportato nella seguente tabella.

	FOXA1 positivo (86 casi) [n (%)]	FOXA1 negativo (59 casi) [n (%)]	p
Età ≤49 anni ≥50 anni	30 (34.9%) 56 (65.1%)	17 (28.8%) 42 (71.2%)	0.475
Grading (140 casi) 1 2 3	1 (1.2%) 13 (15.9%) 68 (82.9%)	0 (0%) 4 (6.9%) 54 (93.1%)	0.241
pT 0 1 2 3 4	3 (3.5%) 38 (44.2%) 36 (41.9%) 6 (7%) 3 (3.5%)	1 (1.7%) 24 (40.7%) 27 (45.8%) 5 (8.5%) 2 (3.3%)	0.931
pN 0 1 2 3	56 (65.1%) 20 (23.3%) 7 (8.1%) 3 (3.5%)	36 (61%) 16 (27.1%) 5 (8.5%) 2 (3.3%)	0.958
Ki67 ≤19% ≥20%	9 (10.5%) 77 (89.5%)	1 (1.7%) 58 (98.3%)	0.086
AR Espresso Non espresso	45 (52.3%) 41 (47.3%)	10 (16.9%) 49 (83%)	<0.001
CK5/6 Espresso Non espresso	41 (47.3%) 45 (52.3%)	41 (69.5%) 18 (30.5%)	0.015
Trattamento NACT Chirurgia primaria	15 (17.4%) 71 (82.6%)	2 (3.3%) 57 (96.6%)	0.020
pCR Si No	3 (20%) 12 (80%)	1 (50%) 1 (50%)	0.958
Recidiva Si No	33 (38.4%) 53 (61.6%)	11 (18.6%) 48 (81.4%)	0.018

Considerando il rapporto tra l'espressione di FOXA1 e AR, si è osservato che nella maggior parte dei casi in cui FOXA1 non era iperespresso, anche AR non era espresso (83% dei casi versus 47.3% dei

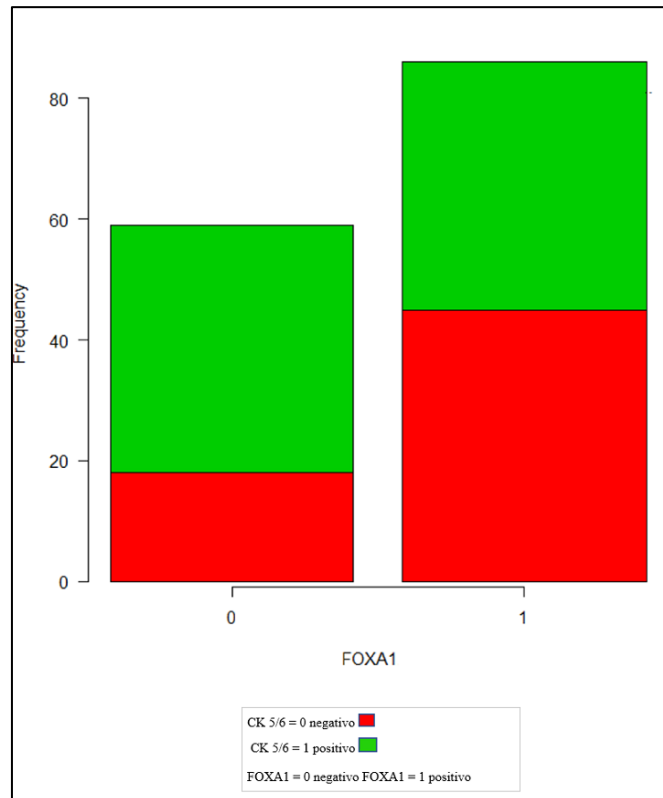
FOXA1 positivi, $p < 0.001$). Viceversa, quando FOXA1 era iperespresso, il 52.3% dei casi esprimeva AR.

Nel grafico sottostante sono riportati i rapporti di co-espressione di FOXA1 e AR.



Per quanto riguarda la co-espressione di FOXA1 e Citocheratine 5/6: la maggior parte dei FOXA1 negativi esprimevano CK5/6 (69.5% versus 47.3%, $p 0.015$). Inoltre, il 52.3% dei casi FOXA1 positivi erano CK5/6 negativi.

Nel grafico sottostante sono riportati i rapporti di co-espressione di FOXA1 e CK5/6.



Infine, non sono state trovate associazioni significative nell'espressione AR e CK5/6. In particolare, in caso di assenza di espressione di AR (94 pazienti), CK5/6 era iperespresso nel 60.6% (57/94) dei casi. Tra i 51 casi AR positivi, il 49% delle pazienti esprimeva CK5/6 (p 0.241).

4.3. Valutazione dei TILs e loro associazione con le caratteristiche istopatologiche ed immunoistochimiche

In generale, il valore mediano di TILs era 10% (range 1-90%) con il 53.8% dei TNBC (78 casi) con TILs \geq 10%. In particolare, 22 casi con TILs=10%; 15 casi con TILs=20%; 15 casi con TILs=30%; 3 casi con TILs=40% e 23 casi con TILs \geq 50%.

Il 57.7% delle pazienti (45/78) con TILs \geq 10% non aveva metastasi linfonodali e presentava un TILs medio di 31.8% (IC95% 25.6-38, mediana 20 range 10-80). Nel gruppo con TILs \leq 9%, il 70.1% delle pazienti non presentava metastasi linfonodali al momento della diagnosi con un TILs medio di 2.9% (IC95% 2.31-3.52, mediana 1 range 1-5).

Le pazienti con TILs $\leq 9\%$ hanno recidivato più frequentemente (40.3% versus 23.1%, p 0.039).

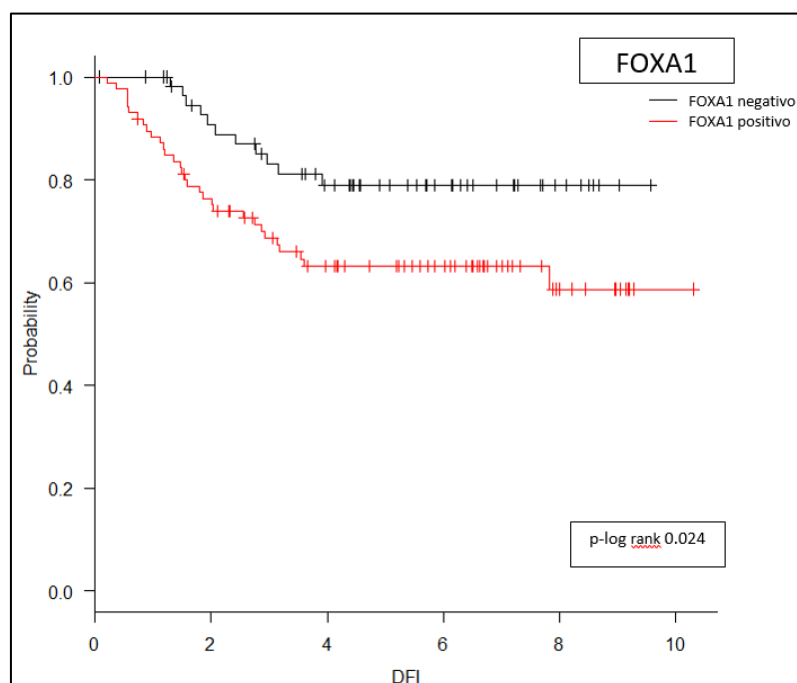
Non si sono osservate differenze in caso di TILs $\geq 10\%$ in relazione all'età, trattamento e alle altre caratteristiche istopatologiche, come riportato nella seguente tabella.

	TILs $\geq 10\%$ (78 casi) [n (%)]	TILs $\leq 9\%$ (67 casi) [n (%)]	p-value
Età			0.252
≤49 anni	29 (37.2%)	18 (26.9%)	
≥50 anni	49 (68.2%)	49 (73.1%)	
Grading (140 casi)			0.165
1	0 (0%)	1 (1.5%)	
2	6 (8%)	11 (16.9%)	
3	69 (92%)	53 (81.5%)	
pT			0.877
0	2 (2.6%)	2 (3%)	
1	37 (47.4%)	25 (37.3%)	
2	32 (41%)	31 (46.3%)	
3	5 (6.4%)	6 (9%)	
4	2 (2.6%)	3 (4.4%)	
pN			0.541
0	45 (57.7%)	47 (70.1%)	
1	23 (29.5%)	13 (19.4%)	
2	7 (9%)	5 (7.5%)	
3	3 (3.8%)	2 (3%)	
Ki67			0.563
≤19%	4 (5.1%)	6 (9%)	
≥20%	74 (94.9%)	61 (91%)	
AR			0.744
Espresso	26 (33.3%)	25 (37.3%)	
Non espresso	52 (66.7%)	42 (62.7%)	
CK5/6			0.970
Espresso	44 (56.4%)	38 (56.7%)	
Non espresso	34 (43.6%)	29 (43.3%)	
FOXA1			0.349
Espresso	43 (55.1%)	43 (64.2%)	
Non espresso	35 (44.9%)	24 (35.8%)	
Trattamento			0.059
NACT	5 (6.4%)	12 (17.9%)	
Chirurgia primaria	73 (93.6%)	55 (82.1%)	
pCR			0.567
Si	2 (40%)	2 (14.3%)	
No	3 (60%)	12 (85.7%)	
Recidiva			0.039
Si	18 (23.1%)	27 (40.3%)	
No	60 (76.9%)	40 (59.7%)	

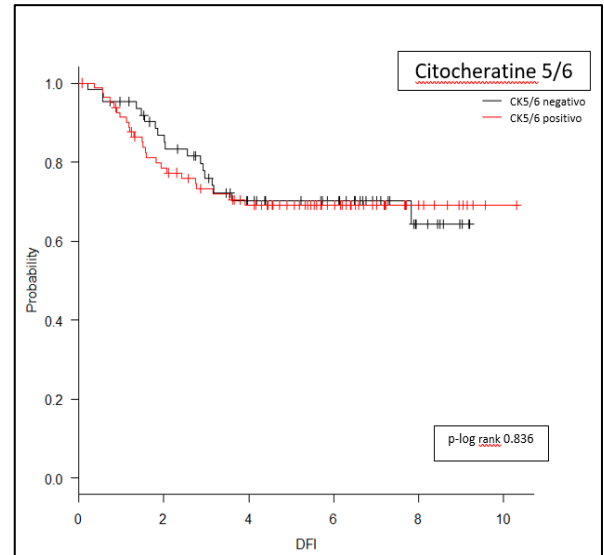
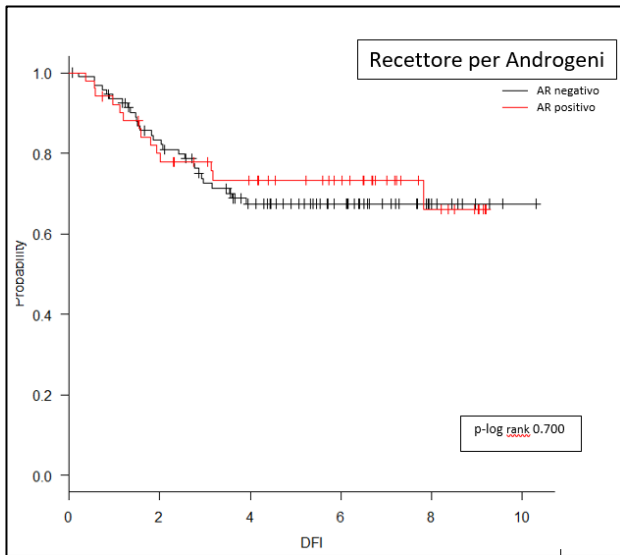
4.4. L'analisi di sopravvivenza

Per l'analisi della sopravvivenza di Kaplan-Meier le pazienti con pT0 dopo NACT (γ pT0=4/145 casi, 2.8% della popolazione) sono state accorpate alle pazienti con pT1, mentre le pazienti con tumore pT4 (5/145, 3.4%) sono state accorpate ai pT3.

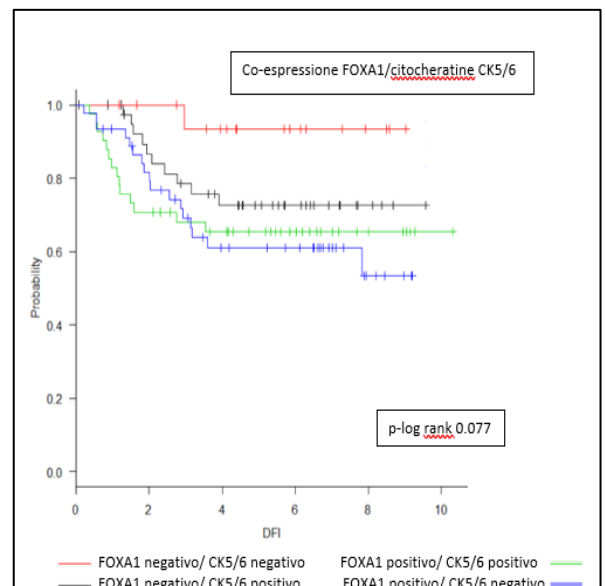
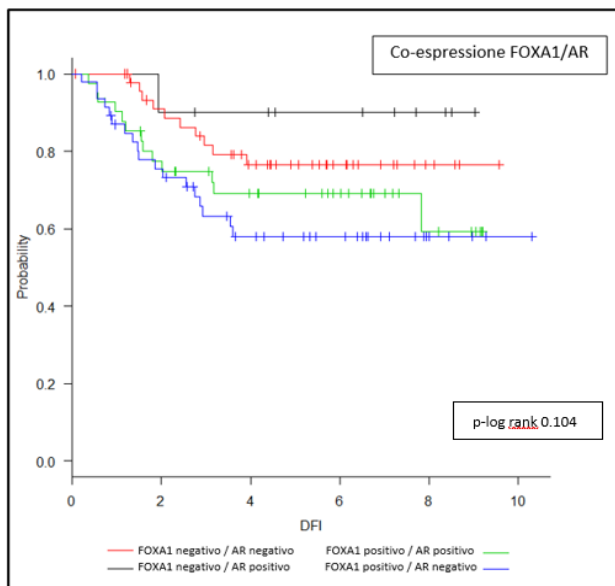
Il log rank test e l'analisi di Kaplan-Meier hanno dimostrato che le pazienti con iperespressione di FOXA1 avevano una peggior DFS (p-log rank 0.024) senza un peggioramento dell'OS (p 0.46). Il grafico sottostante riporta le curve di sopravvivenza del DFS per i due gruppi.



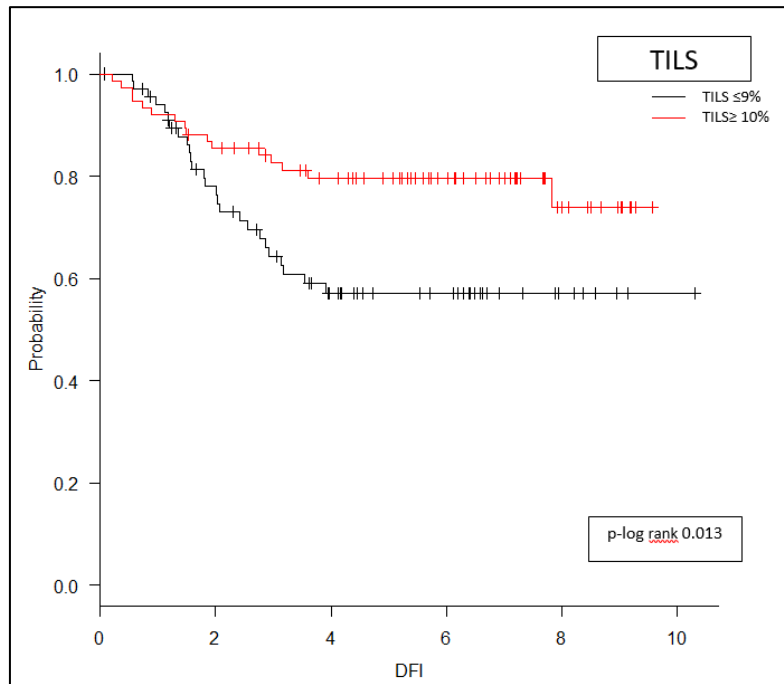
Non sono state rilevate differenze nella DFS per le pazienti che esprimevano AR o CK5/6 rispetto a quelle che non li esprimevano (p-log rank 0.700 e 0.836, rispettivamente), come mostrato nei seguenti grafici. Risultati simili sono stati ottenuti per l'OS considerando l'espressione di AR (p 0.12). Al contrario, i TNBC senza espressione di CK5/6 presentavano una miglior OS di quelli che le iperesprimevano (p 0.017).



L'analisi della DFS in relazione alla co-espressione di FOXA1/AR non ha dimostrato differenze tra i gruppi, sebbene i gruppi FOXA1 negativo/AR positivo e FOXA1 positivo/AR negativo sembrerebbero aver un comportamento prognostico differente (p 0.104). Per quel che riguarda la co-espressione di FOXA1 e le citocheratine CK 5/6, non si sono osservate differenze di DFS tra i gruppi (p 0.077).

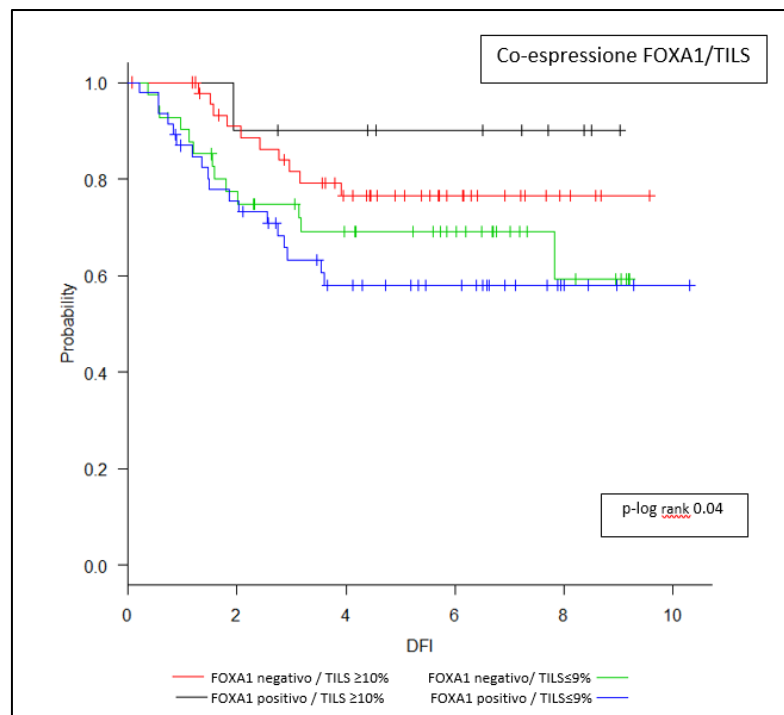


All'analisi di Kaplan-Meier e al log rank test, le pazienti con TILs \geq 10% presentavano una miglior DFS (p-log rank 0.013), come mostrato nel grafico sottostante. Per quel che concerne la sopravvivenza, le pazienti con TILs \geq 10% sembrerebbero presentare una miglior OS (p 0.052)



La DFS è risultata significativamente più breve per le pazienti con FOXA1 positivo e TILS≤9% rispetto agli altri gruppi (p-log rank 0.04). In particolare, il tasso di recidive a 3 anni è stato 34.8% (15/43 pazienti).

L'OS non sembrerebbe essere influenzata dalla co-espressione di FOXA1 e TILS (p-log rank 0.22).



4.5. Analisi univariata e multivariata della sopravvivenza libera da malattia (DFS)

L'analisi univariata ha identificato quali fattori predittivi di una peggior DFS lo stadio tumorale (pT4 HR 1.65, IC95% 1.086-2.50, p 0.01), il coinvolgimento linfonodale (pN1 HR 2.109, IC95% 1.07-4.159, p 0.031), l'iperespressione di FOXA1 (HR 2.16, IC95% 1.08-4.31, p 0.027). La presenza di TILs \geq 10% è risultata invece protettiva (HR 0.46, IC95% 0.248-0.864, p 0.015).

All'analisi multivariata aggiustata per l'età della paziente, il coinvolgimento linfonodale e l'iperespressione di FOXA1 sono risultati fattori indipendenti di peggior DFS. Risultati simili sono stati ottenuti nella valutazione dell'associazione di FOXA1/TILs: le pazienti con FOXA1 negativo/TILs \leq 9% hanno una maggior probabilità di avere una recidiva (HR 1.5, IC95% 1.124-1.998, p 0.006). La presenza di TILs \geq 10% è risultata invece predittiva di una miglior DFS (HR 0.477, IC95% 0.251-0.906, p 0.023). Nella tabella successiva sono riportati tutti gli altri parametri considerati.

Variabile	Analisi univariata			Analisi Multivariata aggiustata per l'età		
	HR	IC95%	p	HR	IC95%	p
Età ≤49 anni ≥50 anni	Ref 1.01	Ref 0.987-1.031	0.40			
Grading 1 2 3	- Ref 1.47	- Ref 0.52-4.13	0.461			
pT 1 2 3 4	Ref 1.251 1.552 1.65	Ref 0.63-2.48 0.93-2.57 1.086-2.50	0.521 0.08 0.01	Ref 1.47	0.977-2.219	0.064
Coinvolgimento linfonodale 0 1 2 3	Ref 2.109 1.485 1.336	Ref 1.07-4.159 0.918-2.42 0.822-2.17	0.031 0.112 0.240	Ref 2.26	1.20-4.28	0.011
Ki67 ≤19% ≥20%	Ref 0.984	Ref 0.30-33.18	0.978			
FOXA1 Non espresso Espresso	Ref 2.16	Ref 1.08-4.31	0.027	Ref 2.09	1.04-4.22	0.038
AR Non espresso Espresso	Ref 0.897	Ref 0.47-1.70	0.740			
CK5/6 Non espresso Espresso	Ref 1.066	Ref 0.57-1.96	0.836			
TILs ≤9% ≥10%	Ref 0.46	Ref 0.248-0.864	0.015	Ref 0.477	0.251-0.906	0.023
FOXA1-/AR+ FOXA1-/AR- FOXA1+/AR+ FOXA1+/AR-	Ref 2.375 1.976 1.702	Ref 0.304-18.56 0.712-2.94 0.869-3.33	Ref 0.409 0.189 0.120			
FOXA1-/TILs≥10% FOXA1-/TILs≤9% FOXA1+/TILs≥10% FOXA1+/TILs≤9%	Ref 2.984 1.709 1.631	Ref 0.871-10.22 0.975-2.944 1.136-2.341	0.08 0.06 0.008	1.50	1.124-1.998	0.006

6. DISCUSSIONE

Il tumore triplo negativo della mammella è una malattia eterogenea ad andamento clinico aggressivo, per cui non sono attualmente disponibili terapie targeted alternative al trattamento chemioterapico [1] [12]. Tuttavia, lo studio genomico dei TNBC ha permesso di classificarli in sottotipi molecolari differenti [27] [28], che sembrerebbero avere prognosi differenti, e di ipotizzare nuove strategie terapeutiche da affiancare ai trattamenti convenzionali [9].

Gli infiltrati tumorali linfocitari (TILs) stanno acquisendo sempre più importanza in qualità sia di fattore prognostico del TNBC [46] [66] [67] [68] sia predittivo di risposta alla chemioterapia [69] [70] [71]. Lo sviluppo di nuovi farmaci in grado riattivare la risposta immunitaria cellulo-mediata antineoplastica potrebbe pertanto rappresentare un'ulteriore possibilità di trattamento dei TNBC [29].

Caratteristiche cliniche ed istopatologiche delle pazienti

Le pazienti coinvolte nel nostro studio hanno presentato tumori di alto grado (83% dei casi), di dimensioni superiori ai 15mm (75% dei casi), con elevato indice mitotico (93% dei casi) e coinvolgimento linfonodale nel 36.6% dei casi. Circa un terzo delle pazienti ha avuto una recidiva, avvenuta nella maggior parte dei casi entro tre anni dalla diagnosi. Inoltre, solo il 54.5% delle pazienti era ancora viva a 5 anni di distanza dalla diagnosi. Questi dati sono in linea con i dati presenti in letteratura circa comportamento clinico aggressivo riscontrato nel tumore triplo negativo della mammella e la sua tendenza a recidivare precocemente [13] [14] [15].

Nel nostro studio, l'analisi univariata ha identificato quali fattori prognostici di una peggior DFS lo stadio tumorale ed il coinvolgimento linfonodale, in accordo con i dati presenti in letteratura [11] [12] [15]. Il coinvolgimento linfonodale è risultato, inoltre, un fattore prognostico indipendente di peggior DFS all'analisi multivariata. In uno studio retrospettivo su 605 pazienti, Leon Ferre et al

sono giunti a conclusioni simili: solo lo stato linfonodale è risultato un fattore predittivo indipendente di peggior DFS [93].

FOXA 1

FOXA1 è una proteina nucleare la cui interazione è fondamentale per favorire il legame di ER o AR con il DNA, favorendo la trascrizione dei loro geni target. Sebbene la sua presenza nei BC ER positivi sembri associato ad una prognosi migliore [44] [45], il suo ruolo nei TNBC è ancora controverso [47].

Tra le pazienti incluse nello studio, il 59.3% dei casi ha presentato un'iperespressione di FOXA1. Rispetto ai casi con FOXA1 negativo, le pazienti che iperesprimevano FOXA1 sono state sottoposte più frequentemente a chemioterapia neoadiuvante (p 0.020) e hanno avuto un tasso di recidiva più alto (p 0.018). In particolare, la positività a FOXA1 si è associata ad un raddoppiamento del rischio di avere una recidiva rispetto alle pazienti con FOXA1 negativo (HR 2.16, IC95% 1.08-4.31, p 0.027).

FOXA1 è inoltre risultato un fattore predittivo indipendente di peggior DFS all'analisi multivariata.

Habashy et al [96] avevano analizzato il ruolo prognostico di FOXA1 nel BC (696 casi) trovando che la sua espressione si associava a tumori della mammella di dimensioni minori, basso grado ed indice mitotico, espressione di recettori steroidei (AR, ER e PgR) e buon Nottingham Prognostic Index. Inoltre, l'espressione di FOXA1 si associava ad una riduzione dell'OS (p 0.008), non confermata però all'analisi multivariata. Tuttavia, la popolazione in studio comprendeva tumori ER positivi ed il metodo di quantificazione di FOXA1 prevedeva l'applicazione di uno score istochimico. Recentemente Mangia et al hanno valutato il ruolo di FOXA1 quale fattore predittivo di recidiva e di sopravvivenza in 124 pazienti con TNBC, senza ottenere tuttavia dei risultati significativi [46]. A differenza del nostro studio, il metodo di valutazione IHC di FOXA1 ha utilizzato un quickscore system, che prevedeva la moltiplicazione dello score percentuale per lo score di intensità.

Il recettore per gli Androgeni

Nel nostro studio circa un terzo dei casi ha presentato l'iperespressione di AR, in accordo con i dati di letteratura [29] [33]. È stata osservata una correlazione diretta tra l'iperespressione di FOXA1 e AR (52.3% dei casi AR positivi, $p < 0.001$) o, viceversa, della sua assenza (83% dei casi AR negativi, $p < 0.001$). Questi risultati sono in accordo con i dati di letteratura che riportano tassi di espressione di FOXA1 nei sottotipi LAR fino a 9 volte maggiore degli altri istotipi di TNBC [31] e che identificano in FOXA1 un fattore fondamentale per l'interazione di AR con la cromatina e l'induzione della proliferazione cellulare nei sottotipi LAR di TNBC [46] [47].

Il ruolo prognostico di AR non è ancora chiaro. Nel nostro studio non sembrerebbero esserci differenze nel DFS in relazione all'espressione o meno di AR. Questi dati sono in parziale accordo con i dati presenti in letteratura, che riportano una miglior DFS nelle pazienti con AR positivo in assenza di un effetto sull'OS [33] [34] [35]. La differenza è probabilmente da ricondurre alla numerosità del campione analizzato che risulta inferiore a quello degli autori citati. In particolare, nella metanalisi di Wang et al (2826 pazienti da 13 RCT), questo risultato è rimasto invariato anche quando l'effetto di AR su OS e DFS è stato valutato con cut-off di positività differenti [33].

La valutazione dell'espressione di FOXA1 e AR ha permesso di distinguere 4 gruppi differenti (FOXA1 positivo/AR positivo, FOXA1 negativo/AR positivo, FOXA1 positivo/AR negativo, FOXA1 negativo/AR negativo). Sebbene non siano state osservate delle differenze significative nel DFS e OS tra i gruppi, sembrerebbe che le pazienti con FOXA1 positivo ed AR negativo abbiano un DFS peggiore. Al contrario, Guiu et al [49] hanno riportato che le pazienti con TNBC FOXA1 positivo/AR positivo presentavano una peggior OS e DFS a 5 anni dalla diagnosi. Tuttavia, Guiu et al hanno considerato TNBC anche tumori con espressione di ER/PgR fino al 10%: questo potrebbe spiegare la differenza tra i risultati dei due studi.

Le citocheratine CK5/6

Sono citocheratine mioepiteliali basali espresse da un sottotipo di TNBC, il Basal-Like, che ha un comportamento clinico particolarmente aggressivo [51] [53].

Circa il 56% delle pazienti incluse nello studio ha presentato l'iperespressione di CK5/6. È stata osservata una correlazione inversa nella co-espressione di FOXA1 e citocheratine 5/6. Quasi il 70% dei casi che iperesprimevano CK5/6 erano FOXA1 negativi (p 0.015), in accordo con quanto osservato da Habashy et al [96]. Inoltre, non sono state osservate associazioni significative nell'espressione di AR e citocheratine CK5/6, anche se in circa il 60% dei casi con AR negativo, le citocheratine erano iperesprese. Questi risultati sono in accordo con il profilo genomico espresso dai diversi sottotipi di TNBC, classificati da Lheman et al. [31] e successivamente da Burstein et al [28]. In particolare, utilizzando i surrogati IHC, il TNBC basal-Like si caratterizzerebbe per un'iperespressione dei CK5/6, mentre il sottotipo Luminal-AR per iperespressione di FOXA1 e AR. Inoltre, risultati simili sono stati riportati da Maeda et al, nonostante gli autori avessero adottato cut-off differenti per indicare la positività dei biomarkers [55].

Per quel che riguarda il ruolo prognostico delle citocheratine CK5/6, non sono state trovate differenze significative in termini di DFS tra chi le esprime e chi non le esprime. Inoltre, le pazienti con TNBC CK5/6 negativo hanno avuto una miglior OS (p 0.017). Questi risultati sono in disaccordo con quanto riportato in letteratura, ma la differenza potrebbe essere spiegata dalla diversa numerosità campionaria del nostro studio (35 pazienti nello studio di Abdelrahman et al [52], 52 casi nello studio di Maeda et al. [55]).

Gli infiltrati linfocitari tumorali

Sebbene non ci sia una concordanza sulla definizione di positività ai TILs, se ne rende sempre più

necessaria l'identificazione, considerando la necessità di trasformare una variabile continua in dicotomica e rendere omogenei i risultati dei diversi studi. Nel nostro studio, per la valutazione dei TILs è stato scelto un cut-off $\geq 10\%$ è stata fatta sulla base della curva ROC, che ha permesso di classificare il 54% circa delle pazienti come TILs positive. Tuttavia, altri autori hanno utilizzato altri valori come cut-off, ad esempio $TILs \geq 50\%$ [46] [94], o hanno creato uno score di espressione (ad esempio basso/medio/elevato [70] [71]).

Nel nostro studio, non sono state osservate differenze significative rispetto a grado istologico, stadio tumorale o linfonodale, indice mitotico o espressione IHC dei biomarkers (FOXA1, AR e CK 5/6) tra le pazienti con $TILs \geq 10\%$ e quelle con $TILs \leq 9\%$. Sebbene non ci siano state differenze nel trattamento, le pazienti con $TILs \leq 9\%$ hanno avuto un tasso di recidiva maggiore (40.3% versus 23.1%, $p = 0.039$). La presenza di $TILs \geq 10\%$ è infatti risultata un fattore prognostico positivo con una minor incidenza di recidive (p -log rank 0.013) e una tendenza ad avere anche una miglior OS (p -log rank 0.052). Le pazienti con TNBC ed un infiltrato linfocitario $\geq 10\%$ hanno presentato una riduzione del rischio di recidive del 55% all'analisi multivariata. Questi dati sono concordi con i dati presenti in letteratura [66] [67] [93] e suggerirebbero l'importanza di introdurre la valutazione dei TILs nella pratica clinica quotidiana, al contrario di quanto affermato da Salgado et al [62].

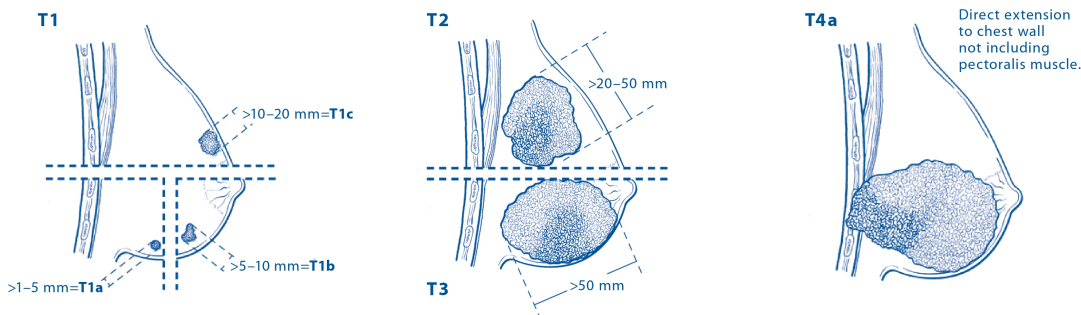
La valutazione dell'espressione di FOXA1 e TILs ha permesso di distinguere 4 gruppi differenti (FOXA1 positivo/ $TILs \leq 9\%$, FOXA1 negativo/ $TILs \leq 9\%$, FOXA1 positivo/ $TILs \geq 10\%$, FOXA1 negativo/ $TILs \geq 10\%$) che sembrerebbero avere tassi di recidiva differenti. In particolare, il gruppo con FOXA1 positivo e $TILs \leq 9\%$ ha mostrato una peggior DFS (HR 1.50, $p = 0.006$) con un tasso di recidive a 3 anni di quasi il 35%. I nostri risultati, che confermerebbero il ruolo prognostico di FOXA1 e TILs sia da soli, sia in associazione, sono in disaccordo con i risultati di Mangia et al [46]. Nello studio, le pazienti FOXA1 negative/TILs negative avrebbero un DFS peggiore degli altri gruppi, tuttavia i cut-off di positività erano diversi dai nostri per entrambe le variabili.

Conclusioni

In conclusione, la prognosi delle pazienti affette da TNBC è variabile a causa della grande eterogeneità del tumore stesso. L'indagine immunohistochimica è una metodica diffusa e con costi contenuti che risulta utile per una più precisa caratterizzazione del sottotipo di TNBC. In particolare, l'espressione di FOXA1 è risultata un fattore prognostico negativo indipendente di recidiva, sia da solo sia in associazione con bassi infiltrati linfocitari intratumorali. Al contrario, la presenza di infiltrati linfocitari intratumorali $\geq 10\%$ è risultata predittiva di una miglior prognosi. Alla luce degli avanzamenti della ricerca farmacologica in campo di immunoterapia e farmaci alternativi al trattamento chemioterapico, si rende necessaria l'integrazione dell'analisi immunohistochimica nella pratica clinica quotidiana e la definizione di specifici cut-off di positività.

APPENDICE 1

Stadiazione del Tumore della Mammella secondo AJCC (7^a edizione) [92]



Primary Tumor (T)

- TX** Primary tumor cannot be assessed
- T0** No evidence of primary tumor
- Tis** Carcinoma in situ
 - Tis (DCIS)** Ductal carcinoma in situ
 - Tis (LCIS)** Lobular carcinoma in situ
- Tis (Paget's)** Paget's disease of the nipple NOT associated with invasive carcinoma and/or carcinoma in situ (DCIS and/or LCIS) in the underlying breast parenchyma. Carcinomas in the breast parenchyma associated with Paget's disease are categorized based on the size and characteristics of the parenchymal disease, although the presence of Paget's disease should still be noted

- T1** Tumor ≤ 20 mm in greatest dimension
- T1mi** Tumor ≤ 1 mm in greatest dimension
- T1a** Tumor > 1 mm but ≤ 5 mm in greatest dimension
- T1b** Tumor > 5 mm but ≤ 10 mm in greatest dimension
- T1c** Tumor > 10 mm but ≤ 20 mm in greatest dimension
- T2** Tumor > 20 mm but ≤ 50 mm in greatest dimension
- T3** Tumor > 50 mm in greatest dimension

- T4** Tumor of any size with direct extension to the chest wall and/or to the skin (ulceration or skin nodules)
Note: Invasion of the dermis alone does not qualify as T4
- T4a** Extension to the chest wall, not including ipsilateral muscle adherence/invasion
- T4b** Ulceration and/or ipsilateral satellite nodules and/or edema (including peau d'orange) of the skin, which do not meet the criteria for inflammatory carcinoma
- T4c** Both T4a and T4b
- T4d** Inflammatory carcinoma (see "Rules for Classification")

Distant Metastases (M)

- M0** No clinical or radiographic evidence of distant metastases
- cM0(i+)** No clinical or radiographic evidence of distant metastases, but deposits of molecularly or microscopically detected tumor cells in circulating blood, bone marrow, or other nonregional nodal tissue that are no larger than 0.2 mm in a patient without symptoms or signs of metastases
- M1** Distant detectable metastases as determined by classic clinical and radiographic means and/or histologically proven larger than 0.2 mm

ANATOMIC STAGE/PROGNOSTIC GROUPS			
Stage 0	Tis	N0	M0
Stage IA	T1*	N0	M0
Stage IB	T0	N1mi	M0
	T1*	N1mi	M0
Stage IIA	T0	N1**	M0
	T1*	N1**	M0
	T2	N0	M0
Stage IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stage IIIA	T0	N2	M0
	T1*	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Stage IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Stage IIIC	Any T	N3	M0
Stage IV	Any T	Any N	M1

Notes

- * T1 includes T1mi.
- ** T0 and T1 tumors with nodal micrometastases only are excluded from Stage IIA and are classified Stage IB.
- M0 includes M0(i+).
- The designation pM0 is not valid; any M0 should be clinical.
- If a patient presents with M1 prior to neoadjuvant systemic therapy, the stage is considered Stage IV and remains Stage IV regardless of response to neoadjuvant therapy.
- Stage designation may be changed if postsurgical imaging studies reveal the presence of distant metastases, provided that the studies are carried out within 4 months of diagnosis in the absence of disease progression and provided that the patient has not received neoadjuvant therapy.
- Postneoadjuvant therapy is designated with "yc" or "yp" prefix. Of note, no stage group is assigned if there is a complete pathologic response (CR) to neoadjuvant therapy, for example, ypT0ypN0cM0.



Financial support for AJCC 7th Edition Staging Posters provided by the American Cancer Society



Copyright © 2009 American Joint Committee on Cancer • Printed with permission from the AJCC.

Breast Cancer Staging

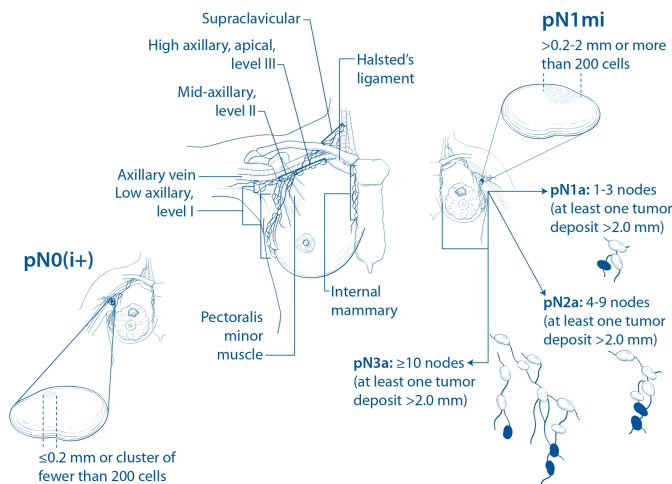
Regional Lymph Nodes (N)

CLINICAL

- NX** Regional lymph nodes cannot be assessed (for example, previously removed)
- N0** No regional lymph node metastases
- N1** Metastases to movable ipsilateral level I, II axillary lymph node(s)
- N2** Metastases in ipsilateral level I, II axillary lymph nodes that are clinically fixed or matted; or in clinically detected* ipsilateral internal mammary nodes in the absence of clinically evident axillary lymph node metastases
- N2a** Metastases in ipsilateral level I, II axillary lymph nodes fixed to one another (matted) or to other structures
- N2b** Metastases only in clinically detected* ipsilateral internal mammary nodes and in the absence of clinically evident level I, II axillary lymph node metastases
- N3** Metastases in ipsilateral infraclavicular (level III axillary) lymph node(s) with or without level I, II axillary lymph node involvement; or in clinically detected* ipsilateral internal mammary lymph node(s) with clinically evident level I, II axillary lymph node metastases; or metastases in ipsilateral supraclavicular lymph node(s) with or without axillary or internal mammary lymph node involvement
- N3a** Metastases in ipsilateral infraclavicular lymph node(s)
- N3b** Metastases in ipsilateral internal mammary lymph node(s) and axillary lymph node(s)
- N3c** Metastases in ipsilateral supraclavicular lymph node(s)

Notes

* "Clinically detected" is defined as detected by imaging studies (excluding lymphoscintigraphy) or by clinical examination and having characteristics highly suspicious for malignancy or a presumed pathologic macrometastasis based on fine needle aspiration biopsy with cytologic examination. Confirmation of clinically detected metastatic disease by fine needle aspiration without excisional biopsy is designated with an (f) suffix, for example, cN3a(f). Excisional biopsy of a lymph node or biopsy of a sentinel node, in the absence of assignment of a pT, is classified as a clinical N, for example, cN1. Information regarding the confirmation of the nodal status will be designated in site-specific factors as clinical, fine needle aspiration, core biopsy, or sentinel lymph node biopsy. Pathologic classification (pN) is used for excision or sentinel lymph node biopsy only in conjunction with a pathologic T assignment.



PATHOLOGIC (PN)*

- pNX** Regional lymph nodes cannot be assessed (for example, previously removed, or not removed for pathologic study)
- pN0** No regional lymph node metastasis identified histologically
Note: Isolated tumor cell clusters (ITC) are defined as small clusters of cells not greater than 0.2 mm, or single tumor cells, or a cluster of fewer than 200 cells in a single histologic cross-section. ITCs may be detected by routine histology or by immunohistochemical (IHC) methods. Nodes containing only ITCs are excluded from the total positive node count for purposes of N classification but should be included in the total number of nodes evaluated.
- pN0(i-)** No regional lymph node metastases histologically, negative IHC
- pN0(i+)** Malignant cells in regional lymph node(s) no greater than 0.2 mm (detected by H&E or IHC including ITC)
- pN0(mol-)** No regional lymph node metastases histologically, negative molecular findings (RT-PCR)
- pN0(mol+)** Positive molecular findings (RT-PCR)** but no regional lymph node metastases detected by histology or IHC
- pN1** Micrometastases; or metastases in 1–3 axillary lymph nodes; and/or in internal mammary nodes with metastases detected by sentinel lymph node biopsy but not clinically detected***
- pN1mi** Micrometastases (greater than 0.2 mm and/or more than 200 cells, but none greater than 2.0 mm)
- pN1a** Metastases in 1–3 axillary lymph nodes, at least one metastasis greater than 2.0 mm
- pN1b** Metastases in internal mammary nodes with micrometastases or macrometastases detected by sentinel lymph node biopsy but not clinically detected***
- pN1c** Metastases in 1–3 axillary lymph nodes and in internal mammary lymph nodes with micrometastases or macrometastases detected by sentinel lymph node biopsy but not clinically detected
- pN2** Metastases in 4–9 axillary lymph nodes; or in clinically detected**** internal mammary lymph nodes in the absence of axillary lymph node metastases
- pN2a** Metastases in 4–9 axillary lymph nodes (at least one tumor deposit greater than 2.0 mm)
- pN2b** Metastases in clinically detected**** internal mammary lymph nodes in the absence of axillary lymph node metastases
- pN3** Metastases in 10 or more axillary lymph nodes; or in infraclavicular (level III axillary) lymph nodes; or in clinically detected**** ipsilateral internal mammary lymph nodes in the presence of one or more positive level I, II axillary lymph nodes; or in more than three axillary lymph nodes and in internal mammary lymph nodes with micrometastases or macrometastases detected by sentinel lymph node biopsy but not clinically detected***; or in ipsilateral supraclavicular lymph nodes
- pN3a** Metastases in 10 or more axillary lymph nodes (at least one tumor deposit greater than 2.0 mm); or metastases to the infraclavicular (level III axillary) lymph nodes
- pN3b** Metastases in clinically detected**** ipsilateral internal mammary lymph nodes in the presence of one or more positive axillary lymph nodes; or in more than three axillary lymph nodes and in internal mammary lymph nodes with micrometastases or macrometastases detected by sentinel lymph node biopsy but not clinically detected****
- pN3c** Metastases in ipsilateral supraclavicular lymph nodes

Notes

* Classification is based on axillary lymph node dissection with or without sentinel lymph node biopsy. Classification based solely on sentinel lymph node biopsy without subsequent axillary lymph node dissection is designated (sn) for "sentinel node," for example, pN0(sn).
 ** RT-PCR: reverse transcriptase/polymerase chain reaction.
 *** "Not clinically detected" is defined as not detected by imaging studies (excluding lymphoscintigraphy) or not detected by clinical examination.
 **** "Clinically detected" is defined as detected by imaging studies (excluding lymphoscintigraphy) or by clinical examination and having characteristics highly suspicious for malignancy or a presumed pathologic macrometastasis based on fine needle aspiration biopsy with cytologic examination.

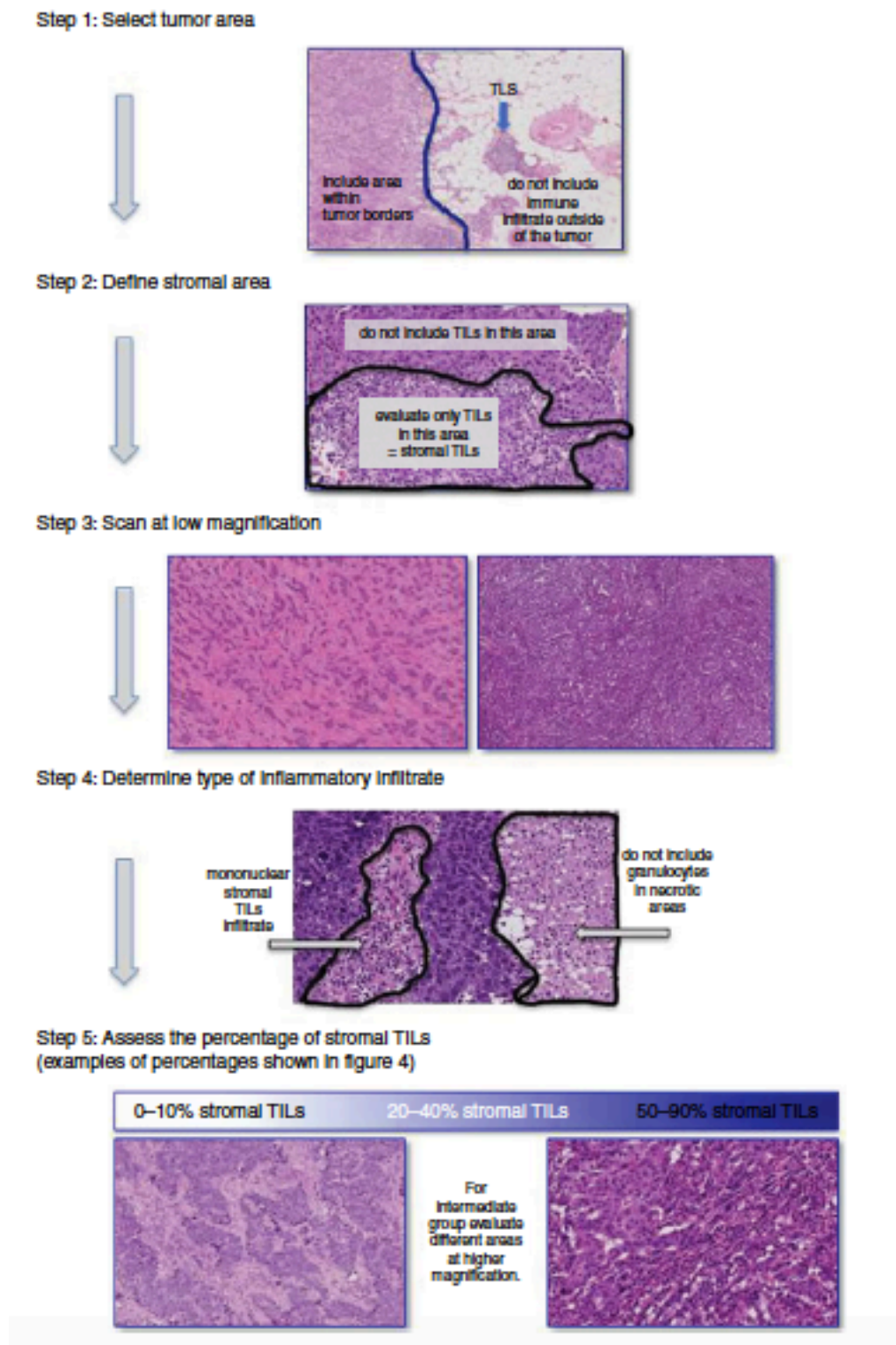


Financial support for AJCC 7th Edition Staging Posters provided by the American Cancer Society



APPENDICE 2

Metodo di approccio standardizzato per la valutazione dei TILs nel tumore della mammella [62].



BIBLIOGRAFIA

- [1] K. S. O. S. P.-L. F. P. P. R. I. Z. S. S. E. Cardoso F e E. G. Committee., *Ann Oncol*, vol. 30(8), pp. 1194-1220, 2019.
- [2] H. D. D. M. A. D. H. K. B. S. F. P. F. G. G. N. H. M. H. D. L. S. L. R. M. P. M. L. M. K. O. C. P. S. P. J. R. A. S. H. S. J. S. F. T. Hammond ME, «American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer.,» *Clin Oncol*, vol. 28(16), p. 2784, 2010.
- [3] H. M. H. D. D. M. M. L. A. K. A. D. B. J. B. M. F. P. H. W. J. R. M. P. P. S. P. E. P. M. S. P. V. G. V. G. H. D. A. S. o. C. O. C. Wolff AC, «Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update,» *J Clin Oncol*, vol. 31(31), p. 3997, 2013.
- [4] P. C. T. R. A. T. G. S. J. H. H. T. E. M. v. d. R. M. J. S. T. T. Q. H. M. J. B. P. B. D. L. P. B.-D. A. Sørliie T, «Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications,» *Proc Natl Acad Sci U S A .*, n. 98(19), pp. 10869-74, 2001.
- [5] P. C. Prat A, «Mammary development meets cancer genomics,» *NAt Med*, vol. 15(8), pp. 842-4, 2009.
- [6] B. P, «Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations,» *Ann Oncol*, vol. 23, p. vi7–vi12, 2012.
- [7] F. P. C. N. e. a. Bertucci F, «How basal are triple-negative breast cancer?,» vol. 123, pp. 236-40, 2002.
- [8] P. C. L. C. e. a. Carey LA, «Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study.,» *JAMA*, vol. 295, pp. 2492-2502, 2006.
- [9] E. L. Malhotra Mk, «The evolving management of metastatic triple negative breast cancer,» *Semin Oncol* , vol. 47(4), pp. 229-37, 2020.
- [10] seer.cancer.gov. [Online]. Available: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>.
- [11] seer.cancer.gov. [Online]. Available: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast-subtypes.html>.
- [12] W. E. Waks AG, «Breast Cancer Treatment: A Review,» *JAMA*, vol. 321(3), pp. 288-300, 2019.

- [13] T. M. P. K. H. W. K. H. S. C. L. L. R. E. S. P. N. S. Dent R, «Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence.,» *Clin Cancer Res*, vol. 13(15), p. 4429, 2007.
- [14] M. C. H. K. A. T. A. M. J. S. W. G.-A. A. H. B. G. M. C. M. H. G. P. L. Liedtke C, «Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer.,» *J Clin Oncol.*, vol. 26(8), n. 1275, 2008.
- [15] Y. J. P. L. e. a. Li X, «Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer,» *Breast Cancer Res Treat*, vol. 161, pp. 279-87, 2017.
- [16] V. A. H. M. T. R. E. S. W. Y. B. D. N. J. W. E. W. J. Lin NU, «Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network.,» *Cancer*, vol. 118(22), pp. 5463-72, 2012.
- [17] B. C. S. A. H. L. M. S. T. D. H. G. V. V. Reddy SM, «Long-term survival outcomes of triple-receptor negative breast cancer survivors who are disease free at 5 years and relationship with low hormone receptor positivity,» *Br J Cancer*, vol. 118(1), pp. 17-23, 2018.
- [18] C. E. S. J. R. A. A. W. E. Lin NU, «Sites of distant recurrence and clinical outcomes in patients with metastatic triple-negative breast cancer: high incidence of central nervous system metastases.,» *Cancer*, vol. 113(10), p. 2638, 2008.
- [19] D. A. M. C. K. C. M. H. B. E. L. C. F. K. E. M. P. C. C. L. Anders CK, «The prognostic contribution of clinical breast cancer subtype, age, and race among patients with breast cancer brain metastases.,» *Cancer*, vol. 117(8), p. 1602, 2011.
- [20] T. K. L. S. C. H. L. J. P. J. L. J. S.-H. K. H. B. A. B. H. G. D. K. M. G. M.-B. F. Gonzalez-Angulo AM, «Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer.,» *Clin Cancer Res*, vol. 17(5), p. 1082, 2011.
- [21] L. M. P. P. L. J. F. E. C. R. E. J. Trivers KF, «The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race,» *Cancer Causes Control*, vol. 20(7), pp. 1071-82., 2009.
- [22] B. K. B. M. C. V. Parise CA, «Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999-2004,» *Breast J*, vol. 15(6), pp. 593-602, 2009.
- [23] K. L. W. E. e. a. Kwan ML, «Epidemiology of breast cancer subtypes in two prospective cohort studies of breast cancer survivors.,» *Breast Cancer Res*, vol. 11, p. R31, 2009.
- [24] C. R. P. R. M. A. W.-W. J. K. L. A.-C. L. L. D. S. M. V. M. K. G. R. T. L. C. Phipps AI, «Reproductive history and oral contraceptive use in relation to risk of triple-negative breast cancer,» *J Natl Cancer Inst*, vol. 103(6), p. 470, 2011.
- [25] S. I. E. J. B. A. W. H. E. G. T. S. F. W. A. L. Collett K, «A basal epithelial phenotype is more frequent in interval breast cancers compared with screen detected tumors.,» *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, vol. 14 (5), pp. 1108-12, 2005.
- [26] K. G. N. R. T. M. O. O. M. D. P. C. Livasy CA, «Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma,» *Mod Pathol*, vol. 19(2), p. 264, 2006.

- [27] J. B. C. X. E. M. J. K. S. Y. M. H. S. M. P. J. Lehmann BD, «Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection,» *Plos One*, vol. e0157368, p. 11(6), 2016.
- [28] T. A. P. G. C. K. C. A. F. S. S. M. O. C. H. S. C. J. M. G. L. C. B. P. Burstein MD, «Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer.,» *Clin Cancer Res.*, vol. 21(7), pp. 1688-98, 2015.
- [29] C. N. N. I. P. d. M. G. d. M. A. da Silva JL, «Triple negative breast cancer: A thorough review of biomarkers,» vol. 145, p. 102855, 2020.
- [30] F. T. L. B. K. M. T. D. U. N. Kono M, « Androgen Receptor Function and Androgen Receptor-Targeted Therapies in Breast Cancer: A Review.,» *JAMA Oncol.*, vol. 3(9), pp. 1266-1273, 2017 .
- [31] B. J. C. X. e. a. Lehmann BD, «Identification of human triple-negative breast,» *s.J Clin Inves*, vol. 121(7), pp. 2750-67, 2011.
- [32] B. K. W. Y. e. a. Masuda H, «Differential response to neoadjuvant chemotherapy,» *s. Clin Cancer Res.*, vol. 19(19), pp. 5533-40, 2013.
- [33] P. B. Z. H. Z. Y. M. F. L. Y. X. Q. S. Q. Wang C, «Prognostic value of androgen receptor in triple negative breast cancer: A meta-analysis.,» *Oncotarget*, vol. 7(29), pp. 46482-46491, 2016.
- [34] M. Y. F. X. S. K. Qu Q, « The impact of androgen receptor expression on breast cancer survival: a retrospective study and meta-analysis.,» *PLoS One.*, vol. 8(12), p. e82650, 2013.
- [35] Y.-Z. C. L. C. P. L. H. W.-C. Y. G. H. B. B. T. G. I. J. T. P. Thike AA, « Loss of androgen receptor expression predicts early recurrence in triple-negative and basal-like breast cancer.,» *Mod Pathol*, vol. 27(3), pp. 352-60, 2014.
- [36] K. S. O. N. K. K. M. T. N. S. T. T. O. M. K. S. H. K. Asano Y, «Clinical verification of sensitivity to preoperative chemotherapy in cases of androgen receptor-expressing positive breast cancer.,» *Br J Cancer.*, vol. 114(1), pp. 14-20, 2016.
- [37] Y. Y. S. X. Z. L. W. L. Zhu M, «Predictors of Response and Survival Outcomes of Triple Negative Breast Cancer Receiving Neoadjuvant Chemotherapy.,» *Chemotherapy*, vol. 7, pp. 1-9, 2020.
- [38] F. G. W. H. C. F. R. F. L. A. D. C. A. J. P. K. S. A. B. P. V. I. N. P. Jongen L, «Tumor characteristics and outcome by androgen receptor expression in triple-negative breast cancer patients treated with neo-adjuvant chemotherapy.,» *Breast Cancer Res Treat*, vol. 176(3), pp. 699-708, 2019.
- [39] T. S. I. S. Gucalp A, «Phase II TRial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic Breast Cancer,» *Clin Cancer Res*, vol. 19(19), pp. 5502-12, 2013.
- [40] M. K. Y. D. TRaina TA, «Enzalutamide for the treatment of Androgen-Receptor- Expressing TRiple-Negative Breast Cancer,» *J Clin Oncol*, vol. 36(9), pp. 884-90, 2018.

- [41] G. T. T. O. Bonnefois H, «A phase II trial of abiraterone acetate plus prednisone in patients with triple-negative androgen receptor positive locally advanced or metastatic breast cancer (UCBG 12-1),» *Ann Oncol*, vol. 27(5), pp. 812-8, 2016.
- [42] H. K. R.-I. C. S. D. C. J. Hurtado A, «FOXA1 is a key determinant of estrogen receptor function and endocrine response.,» *Nat Genet*, vol. 43(1), pp. 27-33, 2011.
- [43] L. F. C. I. F. D. J. M. Z. K. Cirillo LA, «Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4,» . *Mol Cell*, vol. 9(2), p. 279–89, 2002.
- [44] F. N. O.-A. S. A. L. I. C. C. M. R. L. M. J. B. R. B. D. F. P. M. F. C. P. S. A. C. I. Rangel N, «FOXA1 and AR in invasive breast cancer: new findings on their co-expression and impact on prognosis in ER-positive patients,» *BMC Cancer* , vol. 18(1), p. 703, 2018.
- [45] L. Y. X. J. H. J. Shou J, «Prognostic value of FOXA1 in breast cancer: A systematic review and meta-analysis.,» *Breast.*, vol. 27, pp. 35-43., 2016 .
- [46] S. C. V. A. P. G. C. M. V. C. P. O. P. M. G. F. S. N. Mangia A, «Shoud Tumor Infiltrating Lymphocyte, Androgen Receptor, and FOXA1 Expression Predict the clinical Outcome in Triple NEgative Breast Cancer Patients?,» *Cancers*, vol. 11, p. 1393, 2019.
- [47] M. S. R.-I. C. T. W. N. D. M. I. C. J. Robinson JL, «Androgen receptor driven transcription in molecular apocrine breast cancer is mediated by FoxA1.,» *EMBO J*, vol. 30(15), pp. 3019-27, 2011.
- [48] C.-B. C. V. D. F. P. C. M. S. M. R. H. M. C. A. L. L. J. L.-T. M. Guiu S, «Coexpression of androgen receptor and FOXA1 in nonmetastatic triple-negative breast cancer: ancillary study from PACS08 trial.,» *Future Oncol*, vol. 11(16), pp. 2283-97, 2015.
- [49] M. A. N. A. I. Y. S. M. M. Y. Nakashoji A, «Clinical predictors of pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer.,» *Oncol Lett*, vol. 14(4), pp. 4135-41, 2017.
- [50] S. W. W. V. P. L. L. C. L. R. G. B. L. R. S. W. P. L. H. C. Jiang T, «Predictors of Chemosensitivity in Triple Negative Breast Cancer: An Integrated Genomic Analysis.,» *PLoS Med.* , vol. 13(12), p. e1002193, 2016 .
- [51] R. H. A. M. A. M. Abdelrahman AE, «Prognostic impact of EGFR and cytocheratin 5/6 immunohistochemical expression in triple-negative breast cancer,» *Ann Diagn Pathol*, vol. 28, pp. 43-53, 2017.
- [52] T. AA e C. P. Y. C. A. T. G. T. B. T. P. W. N. T. P. Iqbal J, «Triple negative breast cancer: outcome correlation with immunohistochemical detection of basal markers.,» *Am J Surg Path*, vol. 34(7), pp. 956-64, 2010.
- [53] A. K. C. X. Z. X. F. B. B. S. Yue Y, «Stratification of Prognosis of Triple-Negative Breast Cancer Patients Using Combinatorial Biomarkers.,» *PLoS One*, vol. 11(3), p. e0149661, 2016.
- [54] W. W. C. A. G. R. T. B. S. H. Goldhirsch A e P. members., «Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011,» *Ann Oncol*, vol. 22(8), pp. 1736-47, 2011.

- [55] W. E. C. A. G. R. P.-G. M. T. B. S. H. Goldhirsch A e P. members, «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*, vol. 24(9), pp. 2206-23, 2013.
- [56] M. G. D. Y. L. W. Z. Y. L. W. Z. Q. Wu Q, «Prognostic Value of Ki-67 in Patients With Resected Triple-Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis.,» *Front Oncol.*, vol. 9, p. 1068, 2019.
- [57] J. W. P. Z. X. F. Y. Z. X. C. O. H. J.-R. H. W. C. Y. L. K. S. L. Z. Wei Wang, «Prognostic and predictive value of Ki-67 in triple-negative breast cancer,» *Oncotarget*, vol. 7(21), p. 31079–87, 2016.
- [58] H. C. H. D. Z. M. W. Q. T. J. L. L. X. F. Z. E. Y. K. Chen X, «The predictive value of Ki-67 before neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: a systematic review and meta-analysis.,» *Future Oncol*, vol. 13(9), pp. 843-57, 2017.
- [59] S. R. D. C. S. C. D. P. S. M. L. S. Savas P, «Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from sto the clinic,» *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 13(4), pp. 228-41, 2016.
- [60] L. M. J. Z. W. X. Liu Z, «Comprehensive Immunologic Portait of Triple-Negative Breast Cancer,» *Cancer Trasl Oncol*, vol. 11, pp. 311-29, 2018.
- [61] S. N. P. F. S. R. V. G. V. E. F. R. G. F. P. C. J. H. E. d. A. E. Q. E. D. L. A. M. S. P. M. S. C. Loi S, «Prognostic and predictive value of tumor- infiltrating lymphocytes in a Phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98.,» *J Clin Oncol*, vol. 31, pp. 860-7, 2013.
- [62] D. C. D. S. S. N. K. F. P. G. W. S. V. d. E. G. B. F. P.-L. F. e. a. Salgado R, «The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: Recommendations by an International TILs Working Group 2014,» *Ann Oncol*, vol. 26, pp. 259-71, 2015.
- [63] C. N. N. I. P. d. M. G. d. M. A. da Silva JL, «Triple negative breast cancer: A thorough review of biomarkers,» *Crit Rev Oncol Hematol*, vol. 145, p. 102855, 2020.
- [64] O. L. S. M. Schreiber RD, «Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion,» *Science*, vol. 331(6024), pp. 1565-70, 2011.
- [65] W. S. P. A. L. S. B. J. B. S. B.-H. Z. B. A. B. S. B. J. C. E. C. M. C. C. D. S. V. d. E. G. F. G. F. S. G. D. I. H. B. K. S. K. Z. K. H. L. S. P. Denkert C, «Standardized evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: Results of the ring studies of the international immuno-oncology biomarker working group.,» *Mod Pathol*, vol. 29, pp. 1155-64, 2016.
- [66] G. R. D. S. G. L. P. E. S. L. M. S. W. M. J. V. S. T. W. A. W. W. D. N. S. G. S. J. B. S. Adams S, « Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199,» *J Clin Oncol*, vol. 32(27), pp. 2959-66, 2014.
- [67] D. D. A. S. P. G. F. P. L.-T. M. J. H. D. M. B. S. D. S. G. R. M. E. L. J. S. C. P. M. K.-L. P. V. A. G. K. A. F. D. C. S. R. M. S. Loi S, «Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers,» *J Clin Oncol.*, vol. 37(7), pp. 559-69, 2019.

- [68] Q. Q. C. X. H. O. W. J. S. K. Mao Y, «The Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis,» *PLoS One*, vol. 11(4), p. e0152500., 2016.
- [69] B. G. A. M. N. F. K. D. C. C. C. G. I. T. N. N. T. H. Y. A. T. J. S. K. Y. H. H. N. Ochi T, «Predictive and prognostic value of stromal tumour-infiltrating lymphocytes before and after neoadjuvant therapy in triple negative and HER2-positive breast cancer.,» *Eur J Cancer*, vol. 118, pp. 41-48, 2019.
- [70] v. M. G. B. J. S. B. G. S. K. R. P. B. S. C. L. S. S. W. S. C. F. K. D.-E. S. M. K. S. C. W. S. K. P. A. F. K. F. B. J. K. K. S. M. T. H. K. Denkert C, «Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers.,» *J Clin Oncol*, vol. 33(9), pp. 983-91, 2015.
- [71] C. C. G. A. V. G. C. P. G. V. F. G. M. M. D. S. C. G. A. F. Dieci MV, «Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study,» *Ann Oncol*, vol. 25(3), pp. 611-8, 2014.
- [72] D. C. Y. M. F. P. H. Q. Y. B. C. J. Zhu H, «PD-1/PD-L1 counterattack alliance: multiple strategies for treating triple-negative breast cancer.,» *Drug Discov Today*, Vol. %1 di %2S1359-6446(20), pp. 30265-8, 2020.
- [73] A. S. Kwa MJ, «Checkpoint inhibitors in triple-negative breast cancer (TNBC): Where to go from here.,» *Cancer*, vol. 124(10), pp. 2086-2103, 2018.
- [74] V. V. C. D. W. H. B. J. P. L. R. D. Schalper KA, «In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas,» *Clin Cancer Res*, vol. 20(10), pp. 2773-82, 2014.
- [75] F. P. M. E. A. J. C. M. A. H. V. P. C. C. B. D. B. F. Sabatier R, «Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer.,» *Oncotarget.*, vol. 6(7), pp. 5449-64, 2015.
- [76] P. A. B. A. F. L. M. M. S. P. C. D. M. F. M. M. N. G. M. P. d. G. C. L. Cerbelli B, «Expression in TNBC: A Predictive Biomarker of Response to Neoadjuvant Chemotherapy?,» *Biomed Res Int*, vol. 2017, p. 1750925, 2017.
- [77] S. H. Z. S. W. Y. P. H. W. Y. Z. Q. Zhang M, «Expression of PD-L1 and prognosis in breast cancer: a meta-analysis.,» *Oncotarget.*, vol. 8(19), pp. 31347-31354, 2017.
- [78] C. C. E. J. B. F. C. C. T. S. K. I. N. R. C. P. D. J. G. M. E. E. C. C. S. I. G. W. O. C. F. M. M. L. S. P. Emens LA, «Long-term Clinical Outcomes and Biomarker Analyses of Atezolizumab Therapy for Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: A Phase 1 Study.,» *JAMA Oncol.*, vol. 5(1), pp. 74-82, 2019.
- [79] R. H. A. S. S. A. B. C. I. H. D. V. H. V. M. L. C. S. M. V. H. A. W. E. L. S. E. L. Schmid P e I. Investigators., «Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial,» *Lancet Oncol*, vol. 21(1), pp. 44-59, 2020.
- [80] S. R. P. Y. M.-C. E. K. S. S. J. I. S. F. T. K. S. D. R. Y. L. W. A. T. K. K. V. C. J. L. S. Schmid P, «Pembrolizumab plus chemotherapy as neoadjuvant treatment of high-risk, early-stage triple-negative breast cancer: results from the phase 1b open-label, multicohort KEYNOTE-173

study.,» *Ann Oncol*, vol. 31(5), pp. 569-581, 2020.

- [81] T. S. S. L. M. M. M. G. T. A. W.-H. A. F. A. A. C. W. G. D. P. L. F. Z. C. E. J. Z. Y. B. N. G. J. A. S. D. B. T. M. Vinayak S, «Open-Label Clinical Trial of Niraparib Combined With Pembrolizumab for Treatment of Advanced or Metastatic Triple-Negative Breast Cancer.,» *JAMA Oncol*, vol. 5(8), p. 1132-40, 2019.
- [82] A. Fisher B, «Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer.,» *N Engl J Med*, vol. 347(16), pp. 1233-41, 2002.
- [83] F. P. Y. G. e. a. Blum JL, «Anthracyclines in early breast cancer: the ABC Trials-USOR 06-090, NSABP B-46-I/USOR 07132 and NSABP B-49 (NRG Oncology).,» *J Clin Oncol*, vol. 35(23), pp. 2647-55, 2017.
- [84] R.-L. A. R. A. A. E. C. L. R.-B. M. S. A. R. C. C. C. A. M. D. S. F. J. L. C. M. M. G. M. C. R. M. A. B. N. G. M. C. R. d. A. E. Martín M, «Molecular predictors of efficacy of adjuvant weekly paclitaxel in early breast cancer.,» *Breast Cancer Res Treat*, vol. 123(1), p. 149, 2010.
- [85] U. M. B. J. C. S. E. H. F. P. G. B. E. W. H. J. H. J. J. C. K. M. K. G. D. C. N. V. M. K. L. S. von Minckwitz G, «Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes.,» vol. 30(15), pp. 1796-804, 2012.
- [86] C. C. H. I. C. M. B. D. G. L. M. S. P. E. M. H. N. L. H. C. W. E. Berry DA, «Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer.,» *JAMA*, vol. 295(14), p. 1658, 2006.
- [87] O. J. Z. J. H. A. C. J. R. S. B. A. H. P. K. V. A. G. Q. C. G. C. X. J. Y. M. C. J. U. M. S. P. F. P. Huang M, «Association of Pathological Complete Response with Long-Term Survival Outcomes in Triple-Negative Breast Cancer: A Meta-analysis.,» vol. 14, p. canres.1792.2020., 2020.
- [88] L. S. O. S. I. Y. L. E. Y. I. K. K. I. S. P. B. K. S. Y. Y. O. S. T. S. A. K. I. H. J. J. K. A. P. K. S. H. O. Y. T. M. Masuda N, «Adjuvant capecitabine for breast cancer after preoperative chemotherapy.,» *N Engl J Med*, vol. 76(22), pp. 2147-2159, 2017.
- [89] B. C. T. L. R.-B. M. B. J. S. J. G.-Z. Á. G.-S. J. T. R. d. I. H. J. G.-M. E. G. H. L. A. B. J. B.-C. J. B. A. C. L. P.-M. L. R. M. F. Lluch A, «Phase III Trial of Adjuvant Capecitabine After Standard Neo-/Adjuvant Chemotherapy in Patients With Early Triple-Negative Breast Cancer (GEICAM/2003-11_CIBOMA/2004-01).,» *J Clin Oncol*, vol. 38(3), pp. 203-13, 2020.
- [90] M. N. G. W. G. D. O. M. D. G. C. M. Simmons C, «Does confirmatory tumor biopsy alter the management of breast cancer patients with distant metastases?,» *Ann Oncol.* , vol. 20(9), p. 1499, 2009.
- [91] C. G. O. C. C. G. K. W. 3. M. W. Hull DF 3rd, «Multiple estrogen receptor assays in human breast cancer.,» *Cancer Res.* , vol. 43(1), p. 413, 1983.
- [92] C. C. Edge SB, «The AJCC Cancer Staging Manual. 7th Edition.,» *Springer*, 2009.

- [93] *World J Clin Oncol* . .
- [94] C. P. J. S. Yadav BS, «Biomarkers in triple negative breast cancer: A review,» *World J Clin Oncol* , vol. 6, pp. 252-63, 2015.
- [95] L. T. B. Z. Y. Y. L. X. Z. J. S. B. Dai X, «Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends,» *Am J Cancer Res* , pp. 2929-43, 2015.
- [96] L. T. B. Z. Y. Y. L. X. Z. J. S. B. Dai X, «Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends.,» *Am J Cancer Res*, vol. 5(10), pp. 2929-43, 2015.
- [97] W. E. WAKS AG, «Breast cancer treatment. A review,» *JAMA*, vol. 321(3), pp. 288-300, 2019.
- [98] C. N. N. I. P. d. M. G. d. M. A. da Silva JL, «Triple negative breast cancer: A thorough review of biomarkers,» *Crit Rev Oncol Hematol*, vol. 145, p. 102855, 2020.
- [99] S. T. K. A. L. Y. S. A. C. M. L. X. B. O. H. T. L. O. W. J. A. R. W. D. Donehower LA, «Integrated Analysis of TP53 Gene and Pathway Alterations in The Cancer Genome Atlas.,» *Cell Rep*, vol. 28(5), pp. 1370-1384.e5, 2019.
- [100] M. E. S. O. M. I. S. L. D. M. P. S. V. A. Z. A. D. S. G. D. L. A. Turner N, «Targeting triple negative breast cancer: is p53 the answer?,» *Cancer Treat Rev*, vol. 39(5), pp. 541-50, 2013.
- [101] P. K. J. H. L. E. C. E. L. K. B. S. L. S. K. S. L. J. N. S. A. J. I. Y. P. Y. Kim JY, «Association between Mutation and Expression of TP53 as a Potential Prognostic Marker of Triple-Negative Breast Cancer.,» *Cancer Res Treat.*, vol. 48(4), pp. 1338-50, 2016.
- [102] T. C. G. A. Program. [Online]. Available: https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000141510?filters=%7B%22op%22%3A%22and%22%2C%22content%22%3A%5B%7B%22op%22%3A%22in%22%2C%22content%22%3A%7B%22field%22%3A%22cases.primary_site%22%2C%22value%22%3A%5B%22breast%22%5D%7D%7D%5D%7D.
- [103] C. J. L. S. B. Y. Kim MC, «Kim MC, Choi JE, Lee SJ, Bae YK.,» *Ann Surg Oncol*, vol. 23(11), pp. 3524-3530, 2016.
- [104] N. S. J. Y. L. S. P. B. L. W. J. S. Y. H. J. S. Bae SY, «Differences in prognosis and efficacy of chemotherapy by p53 expression in triple-negative breast cancer,» *Breast Cancer Res Treat.*, vol. 172(2), pp. 437-44, 2018.
- [105] C. L. H. B. W. Y. J. L. W. J. D. G. L. G. Y. K. S. Z. W. Z. Zhu X, «The prognostic and predictive potential of Ki-67 in triple-negative breast cancer.,» *Sci Rep*, vol. 10(1), p. 225, 2020.

