



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας  
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών  
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Νέοι καρκινικοί δείκτες στον καρκίνο του μαστού και η σημασία τους για την πρώιμη διάγνωση και πρόγνωση**

POST GRADUATE THESIS

**New tumor markers in breast cancer and their importance for early diagnosis and prognosis**



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ(ΤΩΝ)/NAME OF STUDENTS

**Γιούλα Λαμτσελλάρι**

Jula Lamcellari

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

**Φραγκίσκη Ανθούλη-Αναγνωστοπούλου**

Fragkiski Anthouli-Anagnostopoulou

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2024



Faculty of Health and Caring Professions  
Department of Biomedical Sciences  
Postgraduate program:  
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

**New tumor markers in breast cancer and their importance for early diagnosis and prognosis**

JULA LAMCELLARI

Dml21012

Dml21012@uniwa.gr

FIRST SUPERVISOR

FRAGKISKI ANTHOULI-ANAGNOSTOPOULOU

SECOND SUPERVISOR

NIKOLAOS THALASSINOS

AIGALEO 2024

## Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 9/2/2024

Υπογραφή

1<sup>ος</sup> Εξεταστής Φραγκίσκη Ανθούλη Α-  
ναγνωστοπούλου

2<sup>ος</sup> Εξεταστής Νικόλαος Θαλασσινός

## **Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας**

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Γιούλα Λαμτσελλάρι του Σάντρι, με αριθμό μητρώου dml21012 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

Γιούλα Λαμτσελλάρι

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την στήριξη που μου παρείχε κατά την διάρκεια της υλοποίησης της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κυρία Φραγκίσκη Ανθούλη, για την βοήθεια της στη διεκπεραίωση της εργασίας μου.

## Αφιέρωσεις

Αφιερώνω την διπλωματική εργασία αυτή στον γιο μου Φίλιππο.

## Περίληψη

**Εισαγωγή:** Ο καρκίνος του μαστού είναι μια σύνθετη και ετερογενής ασθένεια με βαθύ αντίκτυπο στην παγκόσμια δημόσια υγεία. Η έγκαιρη διάγνωση και η ακριβής πρόγνωση είναι ζωτικής σημασίας για την αποτελεσματική διαχείριση των ασθενών και τη βελτίωση των κλινικών αποτελεσμάτων.

**Σκοπός:** Η παρούσα διπλωματική εργασία διερευνά τις δυνατότητες νέων καρκινικών δεικτών στο πλαίσιο του καρκίνου του μαστού, με στόχο την ενίσχυση της διαγνωστικής και της προγνωστικής ακρίβειας.

**Μέθοδος:** Αυτή η αναλυτική ανασκόπηση βιβλιογραφίας παρέχει μια εις βάθος ανάλυση του τρέχοντος τοπίου των δεικτών όγκου του καρκίνου του μαστού. Χρησιμοποιήθηκαν εργαλεία αναζήτησης όπως το PubMed, το google scholar και το ResearchGate.

**Αποτελέσματα:** Ενώ κανένας μεμονωμένος βιοδείκτης δεν συμβάλλει αποκλειστικά στη διάγνωσή του, ένα σύμπλεγμα πολλαπλών διαγνωστικών βιοδεικτών διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ανίχνευση, την πρόγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Οι σημαντικοί διαγνωστικοί δείκτες περιλαμβάνουν διάφορα μακρομόρια, όπως RNA, miRNA, DNA, πρωτεΐνες, εξωσώματα, αντισώματα, ctDNA και των CTCs. Η ταυτοποίηση αυτών των μορίων αποτελεί πολύτιμη προσέγγιση στην ανίχνευση του καρκίνου του μαστού.

**Συμπεράσματα:** Η χρήση μοριακών μεθοδολογιών έχει τη δυνατότητα να συμπληρώσει και να βελτιώσει τις παραδοσιακές διαγνωστικές διαδικασίες στην διάγνωση του καρκίνου του μαστού. Ωστόσο, προτού αυτοί οι αναδυόμενοι βιοδείκτες ενσωματωθούν στην κλινική πρακτική, πρέπει να υποβληθούν τόσο σε αναλυτική όσο και σε κλινική επικύρωση. Μέσω του συνδυασμού καθιερωμένων προγνωστικών παραγόντων με επικυρωμένους προγνωστικούς/προβλεπτικούς δείκτες, μπορούμε να ξεκινήσουμε την πορεία προς την εξατομικευμένη θεραπεία για κάθε νέοδιαγνωσθείσα ασθενή με καρκίνο του μαστού.

**Λέξεις κλειδιά:** καρκινικοί δείκτες, καρκίνος του μαστού, διάγνωση, πρόγνωση, μοριακοί δείκτες, πρωτεομικοί δείκτες, υγρή βιοψία.

## **Abstract**

**Introduction:** Breast cancer is a complex and heterogeneous disease with a profound impact on global public health. Early diagnosis and accurate prognosis are vital for effective patient management and improved clinical outcomes.

**Purpose:** This thesis explores the possibilities of new cancer markers in the context of breast cancer, with the aim of enhancing diagnostic and prognostic accuracy.

**Method:** This analytical literature review provides an in-depth analysis of the current landscape of breast cancer tumor markers. Search tools such as PubMed, google scholar and ResearchGate were used.

**Results:** While no single biomarker contributes exclusively to its diagnosis, a complex of multiple diagnostic biomarkers plays a critical role in the detection, prognosis and treatment of breast cancer. Important inter-diagnostic markers include various macromolecules such as RNA, miRNA, DNA, proteins, exosomes, antibodies, ctDNA and CTCs. The identification of these molecules is a valuable approach to breast cancer detection

**Discussion:** The use of molecular methodologies has the potential to complement and improve traditional diagnostic procedures in the diagnosis of breast cancer. However, before these emerging biomarkers can be incorporated into clinical practice, they must undergo both analytical and clinical validation. Through the combination of established prognostic factors with validated prognostic/predictive markers, we can begin the path to personalized treatment for each newly diagnosed breast cancer patient.

**Key words:** cancer markers, breast cancer, diagnosis, prognosis, molecular markers, proteomic markers, liquid biopsy.



## Πίνακας περιεχομένων

<b>Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας</b> .....	iv
<b>Ευχαριστίες</b> .....	v
<b>Αφιερώσεις</b> .....	vi
<b>Περίληψη</b> .....	vii
<b>Abstract</b> .....	viii
<b>Introduction:</b> .....	viii
<b>Συνομογραφίες</b> .....	xii
<b>Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή</b> .....	3
<b>Κεφάλαιο 2. Βασικές έννοιες</b> .....	5
2.1 Ο μαστός.....	5
2.2 Καρκινογένεση και παθογένεση του καρκίνου του μαστού .....	6
2.3 Επιδημιολογία καρκίνου του μαστού .....	9
2.4 Παράγοντες κινδύνου .....	10
2.4.1 Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες .....	10
2.4.2 Μεγαλύτερη ηλικία.....	10
2.4.3 Οικογενειακό ιστορικό.....	11
2.4.4 Γενετικές μεταλλάξεις .....	11
2.4.4 Φυλή/Εθνικότητα .....	12
2.4.5 Αναπαραγωγικό ιστορικό .....	13
2.5 Τροποποιήσιμοι παράγοντες.....	14
2.5.1 Σωματική δραστηριότητα .....	14
2.5.2 Δείκτης μάζας σώματος .....	14
2.5.3 Πρόσληψη αλκοόλ και κάπνισμα.....	15
2.5.4 Πρόσληψη επεξεργασμένων τροφίμων/διατροφή.....	15
2.6 Ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού .....	16
2.6.1 Παραδοσιακές ταξινομήσεις.....	16
2.6.2 Διαβάθμιση καρκίνου του μαστού .....	17
2.6.3 Ανοσοφαινότυπος (Υποδοχέας οιστρογόνων, Υποδοχέας προγεστερόνης, Υποδοχέας 2 του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα).....	17
2.6.4 Μέγεθος όγκου, κατάσταση κόμβων και σταδιοποίηση απομακρυσμένων μεταστάσεων .....	19
2.6.5 Μοριακή ταξινόμηση .....	19

<b>Κεφάλαιο 3: Εξέλιξη της έρευνας των καρκινικών δεικτών</b> .....	22
3.1 Ορισμός καρκινικού δείκτη.....	22
3.2 Μεθοδολογικές εξελίξεις στην ανακάλυψη καρκινικών δεικτών .....	22
3.2.1 Γονιδιωματικές προσεγγίσεις .....	23
3.2.2 Πρωτεομική και μεταβολομική στην αναζήτηση νέων καρκινικών δεικτών.....	24
<b>Κεφάλαιο 4: Προγνωστικοί και προβλεπτικοί καρκινικοί δείκτες στον καρκίνο του μαστού</b> .....	26
4.1 Κλασσικοί δείκτες .....	26
4.1.1 Καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA) .....	26
4.1.2 Καρκινικό αντιγόνο (CA) 15-3 .....	27
4.1.3 CA 27.29 .....	28
4.1.4 Οιστρογονικός υποδοχέας (ER).....	29
4.1.5 Υποδοχέας προγεστερόνης (PR) .....	29
4.1.6 Ki-67 .....	30
4.1.7 Υποδοχέας του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (HER2) .....	31
4.1.8 Πρωτεΐνη όγκου P53 .....	32
4.1.9 Ενεργοποιητής πλασμινογόνου ουροκινάσης (uPA) και αναστολέας του ενεργοποιητή πλασμινογόνου 1 (PAI-1) .....	32
4.2 Άλλοι γενετικοί βιοδείκτες.....	33
4.2.1 BRCA1/BRCA2 .....	33
4.2.2 PTEN (Phosphatase and tensin homolog) .....	34
4.2.3 CDH1 gene .....	34
4.2.4 PALB2 (partner and localizer of BRCA2) .....	35
4.2.5 BRIP1 gene (breast cancer 1 interacting helicase 1).....	35
4.2.6 BARD1(BRCA1-associatedringdomain1).....	36
4.2.7 Μικροδορυφόροι DNA ως καρκινικοί δείκτες .....	36
4.2.8 Αυτοαντισώματα ως καρκινικοί δείκτες .....	37
<b>5. Υγρή βιοψία: το μέλλον στη διάγνωση του καρκίνου του μαστού</b> .....	37
5.1 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) .....	39
5.2 Κυκλοφορούν DNA όγκου (ctDNA) / ελεύθερο DNA κυττάρων (cfDNA).....	40
5.3 Ελεύθερο κυττάρων RNA (cfRNA / miRNAs /incRNAs).....	41
5.4 Εξωσώματα .....	42
<b>6. Προφίλ γονιδιακής έκφρασης</b> .....	44
6.1 MammaPrint® και BluePrint® .....	44

6.2 Oncotype DX® .....	44
6.3 Prosigna® (PAM50) .....	45
6.4 Breast Cancer Index® .....	46
<b>7. Συμπεράσματα.....</b>	<b>46</b>
<b>Αναφορές.....</b>	<b>47</b>

## Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
ER	Estrogen receptor	Υποδοχέας οιστρογόνου
PR	Progesteron receptor	Υποδοχέας προγεστερόνης
HER2	human epidermal growth factor receptor 2	Υποδοχέας ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2
ctDNA	Circulating tumor DNA	Κυκλοφορούν καρκινικό DNA
miRNAs	Micro RNAs	Μικρό RNA
Ki 67	Antigen kiel 67	Αντιγόνο kiel 67
BRCA	Breast cancer gene	Γονίδιο καρκίνου του μαστού
CTCs	Circulating tumor cells	Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
BC	Breast cancer	Καρκίνος μαστού
ATM	Ataxia telangiectasia-mutated	Αταξία τελαγγειεκτασία-μεταλλαγμένη
PALB2	Partner and Localizer of BRCA2	Συνεργάτης και εντοπιστής του BRCA2
BRIP 1	BRCA1 Interacting protein 1	BRCA1 αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη 1
CHEK 2	Checkpoint Kinase 2	Κινάση 2 σημείου ελέγχου
IDC -NST	Invasive ductal carcinoma of no special type	Διηθητικό καρκίνωμα του πόρου χωρίς ειδικό τύπο
ILC	Invasive lobular carcinoma	Διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα
WGS	Whole genome sequencing	Αλληλούχιση ολόκληρου γονιδιώματος
LncRNAs	Long non coding RNAs	Μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs

## Πρόλογος

Ο καρκίνος του μαστού παραμένει μια από τις πιο διαδεδομένες και θανατηφόρες κακοήθειες που επηρεάζουν τις γυναίκες παγκοσμίως. Υπήρξαν περίπου 2,3 εκ. νέες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού και 685.000 θάνατοι παγκοσμίως το 2020 (1). Η ετερογενής φύση του (2), η πολύπλοκη βιολογία του και η ποικίλη ανταπόκρισή του στη θεραπεία υπογραμμίζουν την επείγουσα ανάγκη για καινοτόμες προσεγγίσεις για τη βελτίωση της διάγνωσης, της πρόγνωσης και της θεραπείας. Καθώς η επιστημονική κατανόηση του καρκίνου του μαστού συνεχίζει να εξελίσσεται, αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ο καθοριστικός ρόλος που διαδραματίζουν οι βιοδείκτες στη βελτίωση της κατανόησης της νόσου και στην προσαρμογή εξατομικευμένων στρατηγικών θεραπείας. Αυτή η βιβλιογραφική ανασκόπηση εμβαθύνει στα συναρπαστικά σύνορα της έρευνας για τον καρκίνο του μαστού εστιάζοντας στον εντοπισμό και την επικύρωση νέων καρκινικών δεικτών που έχουν τη δυνατότητα να φέρουν επανάσταση στην προσέγγισή μας στη διάγνωση, την πρόγνωση και τη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων.

Πρώτον, η διπλωματική εργασία αυτή διευκρινίζει τη διαγνωστική και προγνωστική αξία των δεικτών όγκου του καρκίνου του μαστού στο τρέχον κλινικό πεδίο. Αναλύονται συστηματικά καθιερωμένοι δείκτες όπως ενδεικτικά είναι ο υποδοχέας οιστρογόνων (ER), ο υποδοχέας προγεστερόνης (PR), ο υποδοχέας ανθρώπινου αυξητικού παράγοντα 2 (HER 2), το Ki 67 και γονίδια όπως το BRCA1 και BRCA2 (3).

Δεύτερον, η εργασία αυτή στοχεύει να ρίξει φως στις πρόσφατες εξελίξεις στους καρκινικούς δείκτες του καρκίνου του μαστού αποκαλύπτοντας τη διαγνωστική και προγνωστική τους αξία. Στον απόηχο των ανακαλύψεων στην γονιδιωματική, τη μεταγραφωμική, και την πρωτεομική αναδεικνύονται νέοι καινοτόμοι δείκτες που περιλαμβάνουν γενετικά, επιγενετικά και βιομόρια που βασίζονται σε πρωτεΐνες (4). Από την αποκάλυψη μη κωδικοποιημένου RNA (incRNAs) και των microRNAs έως την εμφάνιση πρωτεομικών τεχνολογιών όπως αιχμής όπως φασματομετρία μάζας και πολυπλεκτικών ανοσοδοκιμασιών έχουν εντοπιστεί νέοι πολλά υποσχόμενοι καρκινικοί δείκτες. Κεντρική εστίαση της εργασίας αυτής είναι η αναλυτική παρουσίαση υποψήφιων δεικτών αξιολογώντας την χρησιμότητά τους στην πρώιμη ανίχνευση του καρκίνου και τις προγνωστικές τους επιπτώσεις.

Τρίτον, βιβλιογραφική ανασκόπηση διερευνά το αναδυόμενο πεδίο της υγρής βιοψίας (6), επιδιώκοντας να εντοπίσει κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα(CTCs) (7), ελεύθερο DNA (8) και εξωσώματα (9) ως πιθανούς βιοδείκτες σε δείγμα αίματος. Επιπρόσθετα, εξετάζεται το πάνελ πολλαπλών δεικτών και του γονιδιωματικού προφίλ για την βελτίωση της διαγνωστικής ακρίβειας και της διαστρωμάτωσης του κινδύνου των ασθενών (10).

## Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

Ο καρκίνος του μαστού, η κύρια αιτία παγκόσμιας θνησιμότητας μεταξύ των γυναικών, είναι μια ετερογενής νόσος που περιλαμβάνει έξι διακριτούς μοριακούς υποτύπους: luminal A ( PR+, ER+, HER2- και Ki67), luminal B (ER+, HER+/- και Ki67+), Υποδοχέας ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (HER2)+, τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (ER-, PR- και HER2-) βασικός υπότυπος (ER+, PR +/-, HER 2 – και χαμηλό Ki67 και τύπος χαμηλός σε κλαουδίνη (11). Η έγκαιρη ανίχνευση και παρακολούθηση είναι ζωτικής σημασίας για τη βελτιστοποίηση των θεραπευτικών αποτελεσμάτων και τη διασφάλιση θετικών προγνώσεων για τους ασθενείς. Η μαστογραφία, μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την αναγνώριση του καρκίνου του μαστού, αντιμετωπίζει περιορισμούς όπως η χαμηλή ευαισθησία, ειδικά σε νεότερες γυναίκες με πυκνούς μαστούς, που οδηγεί σε λανθασμένα αρνητικά και θετικά ευρήματα (12).

Η εξέλιξη των θεραπευτικών εννοιών δίνει έμφαση στις βιολογικά κατευθυνόμενες θεραπείες για τον μετριασμό των δυσμενών επιπτώσεων. Παρά την εγγενή μοριακή ποικιλομορφία, ορισμένα χαρακτηριστικά, όπως το τοπικό φορτίο όγκου και τα μεταστατικά μοτίβα, παραμένουν κοινές επιρροές της θεραπείας. Ο καρκίνος του μαστού σε πρώιμο στάδιο, που περιορίζεται στο μαστό ή στους μασχαλιαίους λεμφαδένες, θεωρείται ιάσιμος με πολυτροπική θεραπεία, βελτιώνοντας τις πιθανότητες ίασης για περίπου 70-80% των ασθενών. Αντίθετα, η προχωρημένη (μεταστατική) νόσος δεν είναι ιάσιμη, αλλά παραμένει μια θεραπεύσιμη κατάσταση, με στόχο την παράταση της επιβίωσης και τον έλεγχο των συμπτωμάτων με χαμηλή τοξικότητα που σχετίζεται με τη θεραπεία, βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής.

Η ζήτηση για εξατομικευμένες θεραπείες έχει οδηγήσει στην αναζήτηση νέων βιοδεικτών που είναι απαραίτητοι για τη διάγνωση, την πρόγνωση και την πρόβλεψη του καρκίνου του μαστού (13). Η τεχνητή νοημοσύνη, ειδικά η μηχανική μάθηση, υπόσχεται την προώθηση της ανάπτυξης αντικαρκινικών φαρμάκων. Διάφορα συστατικά που παράγονται από καρκινογόνα κύτταρα, φυσιολογικοί δείκτες και άθικτα κύτταρα χρησιμεύουν ως βιοδείκτες, βοηθώντας στη διάγνωση και τη διαχείριση του καρκίνου (14) (15). Οι καρκινικοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό του τύπου του όγκου, την εξέλιξή του, την ανταπόκριση στη θεραπεία και τη γενική αξιολόγηση της βιολογικής του ασθένειας (16). Ωστόσο, λόγω της ετερογενούς φύσης των καρκινικών κυττάρων, ένας

μοναδικός βιοδείκτης δεν έχει την απαιτούμενη ευαισθησία και ακρίβεια. Έτσι, ευνοείται ένας συνδυασμός βιοδεικτών.

Πρόσφατα βήματα στα γενετικά δακτυλικά αποτυπώματα και τις διαδικασίες μοριακής σηματοδότησης έχουν αποκαλύψει μια πληθώρα βιοδεικτών σε ιστούς και υγρές βιοψίες. Αυτοί οι βιοδείκτες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην πρόβλεψη της εξάπλωσης του καρκίνου, της επανεμφάνισης, των συστάσεων θεραπείας, της πρόβλεψης και της ανοχής στα φάρμακα. Ενώ ορισμένοι βιοδείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές, η ευαισθησία και η επιλεκτικότητά τους παραμένουν χαμηλής κλίμακας, καθιστώντας αναγκαία την εξερεύνηση νέων και πιο αποτελεσματικών βιοδεικτών. Επιπλέον, αρκετές θεραπευτικές προσεγγίσεις για τον καρκίνο του μαστού, ιδιαίτερα στον τομέα των ανοσοθεραπειών, βρίσκονται σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, υπογραμμίζοντας την επείγουσα ανάγκη εντοπισμού ακριβών βιοδεικτών που θα καθοδηγούν την εφαρμογή τους (17) (16). Αυτή η ανασκόπηση υπογραμμίζει τις συνεχιζόμενες προκλήσεις και την επιτακτική ανάγκη για συνεχή έρευνα στην αναζήτηση προηγμένων και ακριβών βιοδεικτών στη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού.



## Κεφάλαιο 2. Βασικές έννοιες

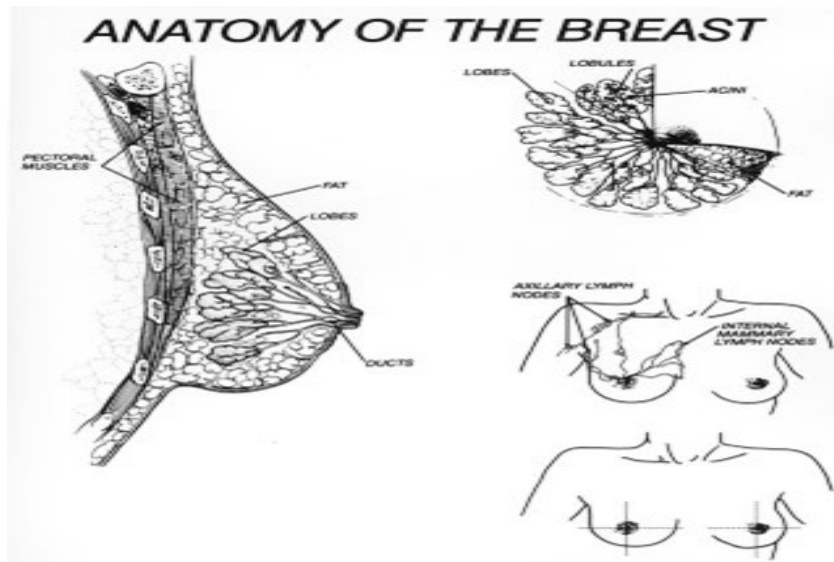
### 2.1 Ο μαστός

Ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα των θηλαστικών είναι η παρουσία μαστικών αδένων ή μαστών, οι οποίοι βρίσκονται και στα δύο φύλα. Κατά μήκος των μαστικών ραχών αναπτύσσονται κατά την εμβρυολογική ανάπτυξη αμφίπλευρες εκτοδερμικές παχύνσεις, οι οποίες εκτείνονται από την αναπτυσσόμενη μασχάλη έως τη βουβωνική περιοχή. Στον άνθρωπο, μόνο ένα ζεύγος κυτταρικών ομάδων αναπτύσσεται περαιτέρω, σχηματίζοντας υποτυπώδη ιστό του μαστού σε κάθε πλευρά. Κατά τη γέννηση, και τα δύο φύλα διαθέτουν υποτυπώδεις μαστικούς αδένες που ανταποκρίνονται κάπως στις μητρικές ορμόνες.

Οι πόροι του μαστικού ιστού συνεχίζουν να επιμηκύνονται και να διακλαδίζονται. Στα θηλυκά, η εφηβεία επιταχύνει αυτή την ανάπτυξη υπό την επίδραση ορμονών, συγκεκριμένα των ωοθηκικών οιστρογόνων και της προγεστερόνης. Αυτές οι ορμόνες προωθούν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την αναδιαμόρφωση των πόρων και του συνδετικού ιστού, σχηματίζοντας τελικά τους ενήλικους μαστικούς αδένες. Καθ' όλη τη διάρκεια του εμμηνορροϊκού κύκλου, τα επίπεδα των ορμονών επηρεάζουν τους ενήλικους μαστικούς αδένες. Κατά το δεύτερο μισό του εμμηνορροϊκού κύκλου, το επιθήλιο των πόρων υφίσταται πολλαπλασιασμό, ακολουθούμενο από διαδοχική απόπτωση με μειωμένα επίπεδα οιστρογόνων και προγεστερόνης κατά την έναρξη της εμμήνου ρύσεως (18).

Η εγκυμοσύνη αυξάνει σημαντικά τον αριθμό των τελικών πόρων και σε αυτό το στάδιο ο μαστικός ιστός αποτελείται κυρίως από λοβιακό επιθήλιο. Η γαλουχία μεταμορφώνει περαιτέρω τις λοβιακές μονάδες των τελικών πόρων: διευρύνονται, το επιθήλιο γίνεται κενό και τα αυλάκια των πόρων διαστέλλονται από εκκριτικό υλικό. Η προλακτίνη εκκινεί την παραγωγή γάλακτος, ενώ η απελευθέρωση ωκυτοκίνης από την αδενούποφυση και τη νευροϋπόφυση διεγείρει την έκκριση του γάλακτος.

Κατά την εμμηνόπαυση, το μεταβαλλόμενο ορμονικό περιβάλλον προκαλεί ατροφία των λοβιακών μονάδων των τελικών πόρων. Ωστόσο, το ενδιάμεσο και το μεγαλύτερο σύστημα αγωγών επιμένουν. Συχνά παρατηρείται κυστική διαστολή των υπολειπόμενων πόρων, η οποία συνοδεύεται από μείωση του μεσολοβίου ινώδους συνδετικού ιστού, οδηγώντας σε αύξηση του ποσοστού του περιεχομένου του λιπώδους ιστού (18).



Εικόνα 1. Ανατομία του μαστού. Πηγή: <https://commons.wikimedia.org>

## 2.2 Καρκινογένεση και παθογένεση του καρκίνου του μαστού

Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν διάφορα χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας να διατηρούν χρόνιο πολλαπλασιασμό, να αντιστέκονται στον κυτταρικό θάνατο και να επάγουν αγγειογένεση. Η ρύθμιση της ανάπτυξης παρακάμπτεται μέσω μηχανισμών όπως η αυτάρκεια σε αυξητικούς παράγοντες ή η αλληλεπίδραση με το σχετιζόμενο με τον όγκο στρώμα, οδηγώντας σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό μέσω ενεργοποίησης μονοπατιών και αναστολής του κυτταρικού θανάτου. Μια ενδεικτική περίπτωση στον καρκίνο του μαστού είναι η ενίσχυση του HER2, ενός στόχου για θεραπείες όπως η τραστοζουμάμπη.

Εκτός από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, τα καρκινικά κύτταρα αντιστέκονται στον κυτταρικό θάνατο μέσω γονιδιακών μεταλλάξεων της απόπτωσης και επιτυγχάνουν αναπαραγωγική αθανασία μέσω της ρύθμισης της τελομεράσης. Η αγγειογένεση προάγεται με την απελευθέρωση του VEGF. Η διαδικασία εισβολής και μετάστασης περιλαμβάνει πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και του νεοπλασματικού στρώματος, οι οποίες ρυθμίζονται από το πρόγραμμα <<επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβαση>>.

Βασικές γενετικές μεταλλάξεις, όπως η ενεργοποίηση ογκογονιδίων και η απώλεια λειτουργίας ογκοκατασταλτικών γονιδίων, παίζουν ρόλο σε αυτές τις δυνατότητες. Η αστάθεια του γονιδιώματος, οι μεταλλάξεις και η φλεγμονή που προάγει τον όγκο

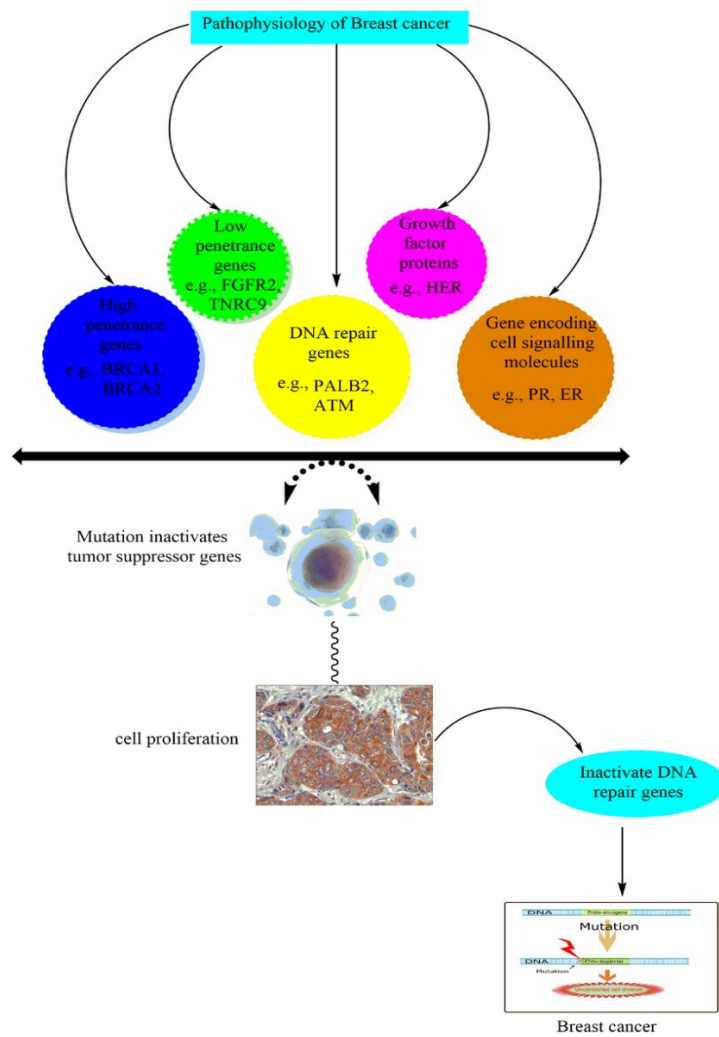
αποτελούν αναδυόμενα χαρακτηριστικά που επιτρέπουν την ανάπτυξη. Ο αναπρογραμματισμός του ενεργειακού μεταβολισμού και η αποφυγή της καταστροφής του ανοσοποιητικού συστήματος είναι επίσης αναγνωρισμένα χαρακτηριστικά, με σημαντική έμφαση στην αποφυγή καταστροφής του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα καρκινικά κύτταρα αναστέλλουν την ανοσολογική απόκριση με τη δέσμευση σε πρωτεΐνες της επιφάνειας των T κυττάρων, όπως η PD-1. Η ανοσοθεραπεία, με τη χρήση αντισωμάτων που στοχεύουν ανοσοποιητικά κύτταρα (π.χ. CTLA-4, PD-1, PD-L1), προσφέρει ένα μέσο για την επανενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης, με αρκετά αντισώματα διαθέσιμα για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου του μαστού (19).

Τα καρκινώματα και τα σαρκώματα αποτελούν τις δύο κύριες ομάδες καρκίνου του μαστού. Τα καρκινώματα προέρχονται από τον επιθηλιακό ιστό του μαστού, συγκεκριμένα από τα κύτταρα που επενδύουν τα λόβια και τους τελικούς αγωγούς που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή γάλακτος. Η πλειονότητα των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού εμπίπτει στην κατηγορία των καρκινωμάτων. Από την άλλη πλευρά, τα σαρκώματα, σπάνιες κακοήθειες, αναπτύσσονται από τον συνδετικό ιστό του μαστού. Τα κύτταρα που αποτελούν το στρωματικό συστατικό, συμπεριλαμβανομένων των μυοϊνοβλαστών και των κυττάρων των αιμοφόρων αγγείων, προκαλούν καρκίνους όπως οι όγκοι του φλύσχη και το αγγειοσάρκωμα. Τα σαρκώματα αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 1% των αρχικών καρκίνων του μαστού.

Εντός του πεδίου των καρκινωμάτων, υπάρχουν περαιτέρω διαχωρισμοί με βάση τους τύπους καρκίνου. Η αρχική διάκριση είναι μεταξύ *in situ* και διηθητικού καρκινώματος. Το *in situ* καρκίνωμα, που σημαίνει "στη θέση του", αναφέρεται σε μια προ-επεμβατική κατάσταση που δεν έχει εξαπλωθεί σε παρακείμενους ιστούς του μαστού. Τα κύτταρα αυτά αναπτύσσονται μέσα στο αρχικό τους περιβάλλον, όπως τα φυσιολογικά λόβια ή οι πόροι. Το *in situ* καρκίνωμα διαθέτει τη δυνατότητα να μετατραπεί σε διηθητικό καρκίνο, ο οποίος εξαπλώνεται πέρα από το αρχικό περιβάλλον, διεισδύοντας στους γύρω ιστούς, όπως ο συνδετικός ιστός. Τα διηθητικά καρκινώματα μπορούν να εξαπλωθούν περαιτέρω σε άλλα σημεία του σώματος, κυρίως μέσω των λεμφαδένων, με μεταστάσεις που επηρεάζουν τους λεμφαδένες και άλλα όργανα.

Περίπου το 80% των καρκινωμάτων είναι διηθητικά πορογενή καρκινώματα, ενώ τα διηθητικά λοβιακά καρκινώματα αποτελούν περίπου το 10-15% των περιπτώσεων. Οι υπόλοιπες περιπτώσεις περιλαμβάνουν διάφορους ειδικούς τύπους καρκίνου του

μαστού, συμπεριλαμβανομένων των κολλοειδών, μυελωδών, μικροκυλαίων, θηλωδών και σωληναριακών καρκινωμάτων. Κάθε ένας από αυτούς τους τύπους καρκινώματος παρουσιάζει ξεχωριστά χαρακτηριστικά, διαφορετικές προβλέψεις και ποικίλες θεραπευτικές επιλογές. Κατά συνέπεια, η ακριβής διαφοροποίηση κατά τη διαγνωστική διαδικασία είναι ζωτικής σημασίας (20).



Εικόνα 2. Παθοφυσιολογία καρκίνου του μαστού. Πηγή : Mumtaz, Samaira & Ali, Shaukat & Mumtaz, Shumaila & Pervaiz, Asim & Tahir, Muhammad & Farooq, Muhammad Adeel & Mughal, Tafail. (2023). Advanced treatment strategies in breast cancer: A comprehensive mechanistic review. Science progress. 106. 368504231175331. 10.1177/00368504231175331.

### 2.3 Επιδημιολογία καρκίνου του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τον πιο διαδεδομένο κακοήγη όγκο στις γυναίκες παγκοσμίως, αποτελώντας το 36% των ογκολογικών περιπτώσεων. Μόνο το 2018, εκτιμάται ότι 2,089 εκατομμύρια γυναίκες διαγνώστηκαν με καρκίνο του μαστού, με μια κλιμακούμενη επίπτωση που παρατηρείται παγκοσμίως, ιδιαίτερα σε βιομηχανικά ανεπτυγμένα κράτη όπου εκδηλώνονται σχεδόν οι μισές από τις παγκόσμιες περιπτώσεις. Αυτή η ανοδική τροχιά συνδέεται στενά με τον δυτικό τρόπο ζωής που χαρακτηρίζεται από κακές διατροφικές συνήθειες, κατανάλωση νικοτίνης, αυξημένα επίπεδα στρες και ελάχιστη φυσική δραστηριότητα. Η παγκόσμια επίπτωση του καρκίνου του μαστού αυξάνεται σταθερά με ρυθμό 3,1% ετησίως, φθάνοντας σε πάνω από 1,6 εκατομμύρια περιπτώσεις το 2010. Αυτή η ανοδική τροχιά αναμένεται να συνεχιστεί, συμβάλλοντας στην κλιμάκωση του καρκινικού φόρτου μεταξύ των γυναικών παγκοσμίως. Παρά τις διακυμάνσεις στα ποσοστά επίπτωσης, ο καρκίνος του μαστού επηρεάζει πληθυσμούς σε όλα τα επίπεδα εισοδήματος. Συγκεκριμένα, οι περιοχές με υψηλότερο εισόδημα, όπως η Βόρεια Αμερική, αναφέρουν σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα (92 ανά 100.000) σε σύγκριση με τις περιοχές με χαμηλότερο εισόδημα όπως η Μέση Αφρική και η Ανατολική Ασία (27 ανά 100.000). Αυτές οι διαφορές προέρχονται τόσο από παράγοντες κινδύνου όσο και από την προσβασιμότητα και τη χρήση της μαστογραφίας, με την υψηλότερη επίπτωση να καταγράφεται στη Βόρεια Αμερική, την Αυστραλία, τη Νέα Ζηλανδία και τη Βόρεια και Δυτική Ευρώπη (21).

Πρόσφατα δεδομένα από το GLOBOCAN 2018, που παρουσιάστηκαν από τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC), υπογραμμίζουν τον παγκόσμιο αντίκτυπο του καρκίνου του μαστού, αποκαλύπτοντας 2,3 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις (11,7%) και ποσοστό θνησιμότητας 6,9% σε 185 χώρες. Η συχνότητα εμφάνισης είναι σημαντικά υψηλότερη στις χώρες υψηλού εισοδήματος (571/100.000) σε σύγκριση με τις χώρες χαμηλού εισοδήματος (95/100.000), ευθυγραμμίζοντας με τις επιπτώσεις της παγκοσμιοποίησης. Ο καρκίνος του μαστού που αναγνωρίζεται ως ετερογενής ομάδα (>100 ασθένειες) παρουσιάζει ποικίλους βιολογικούς υποτύπους που χαρακτηρίζονται από διακριτά μοριακά προφίλ και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά (22).

Το 2018, υπήρχαν 234.087 περιπτώσεις καρκίνου του μαστού στις Ηνωμένες Πολιτείες (ακατέργαστο ποσοστό: 85/105), 55.439 στο Ηνωμένο Βασίλειο (ακατέργαστο ποσοστό: 94/105), 56.162 στη Γαλλία (ακατέργαστο ποσοστό: 99/105), 71.888 στη Γερμανία (ακατέργαστο ποσοστό: 85,4/105) και 66.101 στην Ιαπωνία (ακατέργαστο ποσοστό:

58/105). Το υψηλότερο ποσοστό επίπτωσης στον κόσμο βρίσκεται στο Βέλγιο (ακατέργαστο στο ποσοστό: 113/105) και η Αυστραλία ηγείται μεταξύ των ηπείρων (ακατέργαστο ποσοστό: 94/105). Ο καρκίνος του μαστού είναι επίσης ο πιο συχνά διαγνωσμένος κακοήθης όγκος στις γυναίκες στην Πολωνία, με σταθερή αύξηση των περιπτώσεων (1990- 8000 νέες περιπτώσεις, 2018 -20.203 νέες περιπτώσεις). Στην Ευρώπη το μέσο ποσοστό επίπτωσης είναι 84/105. Η χαμηλότερη επίπτωση εμφανίζεται στη Νοτιοανατολική Ασία και την Αφρική όπου το τυποποιημένο ποσοστό επίπτωσης δεν υπερβαίνει το 25/105 (23).

## 2.4 Παράγοντες κινδύνου

### 2.4.1 Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού είναι το γυναικείο φύλο, κυρίως λόγω της αυξημένης ορμονικής διέγερσης. Σε αντίθεση με τους άνδρες με ελάχιστα επίπεδα οιστρογόνων, οι γυναίκες διαθέτουν κύτταρα του μαστού ιδιαίτερα ευαίσθητα στις ορμονικές επιδράσεις, ιδίως στα οιστρογόνα και την προγεστερόνη, και σε τυχόν ανισορροπίες στα επίπεδά τους. Ο αυξημένος κίνδυνος καρκίνου του μαστού συσχετίζεται θετικά με τα κυκλοφορούντα οιστρογόνα και ανδρογόνα (24). Οι μεταβολές στα φυσιολογικά επίπεδα των ενδογενών ορμονών του φύλου συμβάλλουν σε υψηλότερο κίνδυνο καρκίνου του μαστού τόσο στις προεμμηνοπαυσιακές όσο και στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (25).

### 2.4.2 Μεγαλύτερη ηλικία

Επί του παρόντος, τα άτομα ηλικίας >50 ετών αποτελούν περίπου το 80% των ασθενών με καρκίνο του μαστού, ενώ πάνω από το 40% είναι άνω των 65 ετών (26). Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού αυξάνεται ως εξής: 1,5% στην ηλικία των 40 ετών, 3% στην ηλικία των 50 ετών και πάνω από 4% στην ηλικία των 70 ετών (27). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η σχέση μεταξύ ενός συγκεκριμένου μοριακού υποτύπου του καρκίνου και της ηλικίας μιας ασθενούς παρατηρήθηκε επιθετικός ανθεκτικός τριπλά αρνητικός υποτύπος του καρκίνου του μαστού διαγιγνώσκεται συχνότερα σε ομάδες κάτω των 40ετών, ενώ σε ασθενείς >70 ετών, πρόκειται για τον υποτύπο luminal A (28). Γενικά, η εμφάνιση του καρκίνου στις μεγαλύτερες ηλικίες δεν περιορίζεται μόνο στον καρκίνο του μαστού. Η

συσσώρευση ενός τεράστιου αριθμού κυτταρικών εναλλαγών και η έκθεση σε δυνητικά καρκινογόνα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της καρκινογένεσης με την πάροδο του χρόνου.

#### 2.4.3 Οικογενειακό ιστορικό

Ο αυξημένος κίνδυνος καρκίνου του μαστού συνδέεται με το οικογενειακό ιστορικό, καθώς περίπου το 13-19% των διαγνωσμένων ασθενών αναφέρει συγγενή πρώτου βαθμού που πάσχει από την ίδια πάθηση (29). Ο κίνδυνος κλιμακώνεται σημαντικά με μεγαλύτερο αριθμό προσβεβλημένων συγγενών πρώτου βαθμού, ιδίως όταν οι εν λόγω συγγενείς είναι ηλικίας κάτω των 50 ετών (30). Παρά τις ηλικιακές διαφορές, το ποσοστό επίπτωσης του καρκίνου του μαστού είναι σημαντικά υψηλότερο σε ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό. Η σχέση αυτή επηρεάζεται τόσο από επιγενετικές αλλαγές όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες που μπορούν να λειτουργήσουν ως πιθανοί εκλυτικοί παράγοντες (31). Επιπλέον, το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου των ωοθηκών, ιδίως εκείνων που χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις BRCA1 και BRCA2, μπορεί επίσης να συμβάλει σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (29).

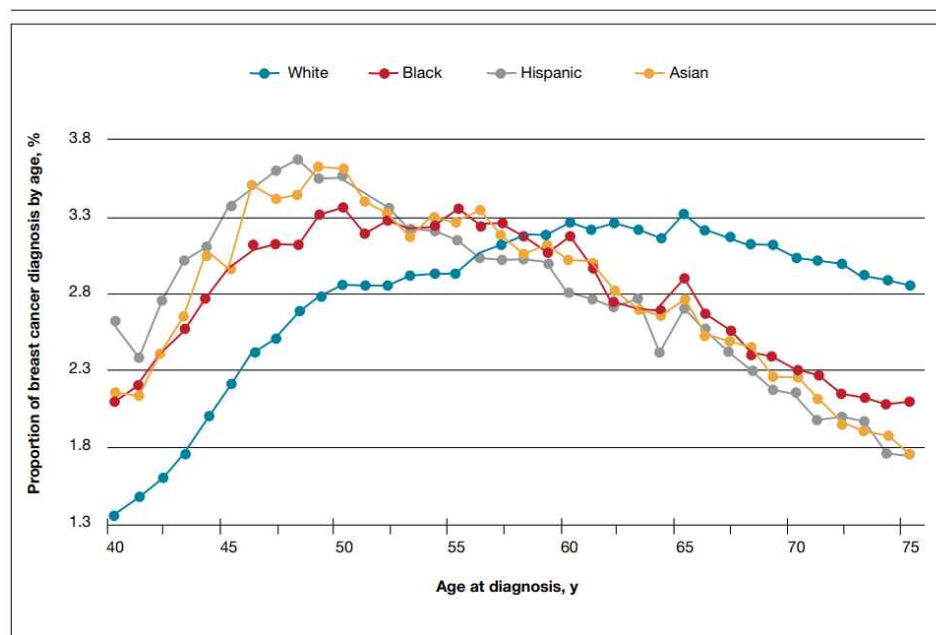
#### 2.4.4 Γενετικές μεταλλάξεις

Οι γενετικές μεταλλάξεις που συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού περιλαμβάνουν διάφορα βασικά ευρήματα. Τα δύο κύρια γονίδια που παρουσιάζουν υψηλή διεισδυτικότητα, δηλαδή το BRCA1 (που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17) και το BRCA2 (που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 13), συνδέονται ιδιαίτερα με αυξημένη ευαισθησία στην καρκινογένεση του μαστού (32). Ενώ αυτές οι μεταλλάξεις κληρονομούνται συνήθως με αυτοσωμικό επικρατούντα τρόπο, παρατηρούνται επίσης συχνά σποραδικές μεταλλάξεις. Επιπλέον, αξιοσημείωτα γονίδια καρκίνου του μαστού με υψηλή διεισδυτικότητα περιλαμβάνουν τα TP53, CDH1, PTEN και STK11 (33)(34). Οι φορείς αυτών των μεταλλάξεων όχι μόνο αντιμετωπίζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού, αλλά επιδεικνύουν επίσης αυξημένη ευαισθησία στον καρκίνο των ωοθηκών. Στο πεδίο των γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA αρκετά παίζουν ρόλο στην καρκινογένεση του μαστού αλληλεπιδρώντας με τα γονίδια BRCA. Αξιοσημείωτα παραδείγματα είναι τα ATM,

PALB2, BRIP1 και CHEK2, τα οποία, ωστόσο, παρουσιάζουν χαμηλότερη διεισδυτικότητα (μέτριου βαθμού) σε σύγκριση με τα BRCA1 ή BRCA2 (35).

#### 2.4.4 Φυλή/Εθνικότητα

Μεταξύ των ατόμων που πάσχουν από καρκίνο του μαστού, εξακολουθούν να υπάρχουν αξιοσημείωτες ανισότητες όσον αφορά τη φυλή και την εθνικότητα. Οι μηχανισμοί που διέπουν αυτό το φαινόμενο δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Οι λευκές μη ισπανόφωνες γυναίκες παρουσιάζουν σταθερά τα υψηλότερα ποσοστά επίπτωσης του καρκίνου του μαστού (36). Αντίθετα, οι μαύρες γυναίκες εμφανίζουν σημαντικά αυξημένο ποσοστό θνησιμότητας από αυτή την κακοήθεια, ενώ παρουσιάζουν και τα χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης (37). Ο λόγος είναι ότι οι μαύρες γυναίκες είναι πιο πιθανό να διαγνωστούν σε νεότερες ηλικίες και σε πιο προχωρημένα στάδια της νόσου, επηρεάζονται δυσανάλογα από πιο επιθετικούς υποτύπους όπως ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (TNBC) και ο φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού.



Εικόνα 3. Κατανομή της ηλικίας κατά τη διάγνωση για τις γυναίκες με καρκίνο του μαστού. Πηγή: Stapleton SM, Oseni TO, Bababekov YJ, Hung YC, Chang DC, 2018 Jun 1. Race/ethnicity and age distribution of breast cancer diagnosis in the United States.



#### 2.4.5 Αναπαραγωγικό ιστορικό

Όσον αφορά την πιθανή επαγωγή καρκινογόνων γεγονότων στο μικροπεριβάλλον του μαστού, η εμφάνιση και η διάρκεια συγκεκριμένων γεγονότων όπως η εγκυμοσύνη, ο θηλασμός, η πρώτη έμμηνος ρύση και η εμμηνόπαυση, μαζί με την ταυτόχρονη ορμονική ανισορροπία τους, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο. Πολυάριθμες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει μια αυστηρή σχέση μεταξύ της έκθεσης σε ενδογενείς ορμόνες -ιδίως οιστρογόνα και προγεστερόνη- και του υπερβολικού κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού στις γυναίκες. Μια πρώιμη τελειόμηνη εγκυμοσύνη, ιδίως στις αρχές της εικοσαετίας, μαζί με έναν αυξανόμενο αριθμό γεννήσεων, σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (38). Προστατευτικές επιδράσεις κατά του πιθανού καρκίνου παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ιδίως γύρω στην 34η εβδομάδα, χωρίς να επιβεβαιώνονται για εγκυμοσύνες που διαρκούν 33 εβδομάδες ή λιγότερο (39).

Γυναίκες με ιστορικό προεκλαμψίας κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ή παιδιά που γεννήθηκαν από προεκλαμψία έχουν χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Τα απορρυθμισμένα επίπεδα ορμονών κατά τη διάρκεια της προεκλαμψίας, συμπεριλαμβανομένων των αυξημένων επιπέδων προγεστερόνης και των μειωμένων επιπέδων οιστρογόνων, μαζί με αποκλίσεις της ινσουλίνης, της κορτιζόλης, του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα-1, των ανδρογόνων, της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης, του παράγοντα απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης και της πρωτεΐνης δέσμησης IGF-1 από τα φυσιολογικά επίπεδα, εμφανίζουν προστατευτική δράση έναντι της καρκινογένεσης του μαστού. Η μεγαλύτερη διάρκεια του θηλασμού μειώνει επίσης τον κίνδυνο εμφάνισης τόσο ER/PR θετικών όσο και αρνητικών καρκίνων (40). Η πρώιμη ηλικία κατά την εμμηναρχή είναι ένας άλλος παράγοντας κινδύνου για τον καρκίνο του μαστού, που πιθανώς σχετίζεται με τον βαθμό του όγκου και τη συμμετοχή λεμφαδένων. Επιπλέον, η προγενέστερη ηλικία της πρώτης εμμήνου ρύσεως θα μπορούσε να οδηγήσει σε συνολικά χειρότερη πρόγνωση. Αντίθετα, η πρώιμη εμμηνόπαυση, είτε φυσική είτε χειρουργική, μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (41). Γενικά, ως βασικός παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου του μαστού θεωρείται σε συνδυασμό η πρώιμη εμμηναρχή και η όψιμη εμμηνόπαυση.

## 2.5 Τροποποιήσιμοι παράγοντες

### 2.5.1 Σωματική δραστηριότητα

Αν και ο μηχανισμός παραμένει αδιευκρίνιστος, είναι ευρέως αποδεκτό ότι η τακτική σωματική δραστηριότητα λειτουργεί ως προστατευτικός παράγοντας έναντι της εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Στη μελέτη τους, οι Chen et al. διαπίστωσαν ότι μεταξύ των γυναικών με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού, η άσκηση σωματικής δραστηριότητας συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο καρκίνου, ιδίως κατά τη μετεμμηνοπαυσιακή περίοδο (42). Διάφορες υποθέσεις επιχειρούν να διευκρινίσουν τον προστατευτικό ρόλο της σωματικής δραστηριότητας όσον αφορά την επίπτωση του καρκίνου του μαστού. Προτείνεται ότι η σωματική δραστηριότητα μπορεί να προλαμβάνει τον καρκίνο μειώνοντας την έκθεση σε ενδογενείς ορμόνες του φύλου, τροποποιώντας τις αντιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος ή επηρεάζοντας τα επίπεδα του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα-1 (43).

### 2.5.2 Δείκτης μάζας σώματος

Σύμφωνα με επιδημιολογικά στοιχεία, η παχυσαρκία συνδέεται με μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Η συσχέτιση αυτή εντείνεται κυρίως στις παχύσαρκες μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που τείνουν να αναπτύσσουν καρκίνο του μαστού θετικό στους οιστρογονικούς υποδοχείς. Ωστόσο, ανεξάρτητα από την εμμηνοπαυσιακή κατάσταση, οι παχύσαρκες γυναίκες επιτυγχάνουν χειρότερα κλινικά αποτελέσματα (44).

Έρευνες έδειξαν ότι οι γυναίκες άνω των 50 ετών με μεγαλύτερο Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο καρκίνου σε σύγκριση με εκείνες με χαμηλό ΔΜΣ. Εκτός αυτού, οι ερευνητές παρατήρησαν ότι ο μεγαλύτερος ΔΜΣ σχετίζεται με πιο επιθετικά βιολογικά χαρακτηριστικά του όγκου συμπεριλαμβανομένου υψηλότερου ποσοστού λεμφαδενικών μεταστάσεων και μεγαλύτερου μεγέθους. Η παχυσαρκία μπορεί να είναι ένας λόγος για μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας και μεγαλύτερη πιθανότητα υποτροπής του καρκίνου, ιδίως σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (45).

### 2.5.3 Πρόσληψη αλκοόλ και κάπνισμα

Υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ έχει συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κακοηθειών στον γαστρεντερικό σωλήνα και καρκίνου του μαστού, όπως επιβεβαιώνεται από πολυάριθμα στοιχεία. Ο τύπος του αλκοόλ φαίνεται να έχει μικρότερη σημασία από την περιεκτικότητα των αλκοολούχων ποτών, η οποία παίζει καθοριστικό ρόλο στην επίδραση του κινδύνου καρκίνου. Η συσχέτιση αυτή εξηγείται από τα αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων που προκαλούνται από την κατανάλωση αλκοόλ, οδηγώντας σε ορμονική ανισορροπία και επηρεάζοντας τον κίνδυνο καρκινογένεσης στα γυναικεία όργανα (46). Ειδικότερα, έχει παρατηρηθεί ότι η κατανάλωση αλκοόλ αυξάνει ειδικά τον κίνδυνο οιστρογονοθετικών καρκίνων του μαστού (47).

Στην επαγωγή προκαρκινογόνων γεγονότων συμβάλλει σημαντικά τόσο το ενεργητικό όσο και το παθητικό κάπνισμα, καθώς οι καρκινογόνες ουσίες από τον καπνό μεταφέρονται στον ιστό του μαστού, αυξάνοντας την πιθανότητα μεταλλάξεων εντός ογκογονιδίων και κατασταλτικών γονιδίων, με ιδιαίτερη έμφαση στο p53. Επιπλέον, παράγοντες κινδύνου, όπως το μεγαλύτερο ιστορικό καπνίσματος και το κάπνισμα πριν από την πρώτη πλήρη εγκυμοσύνη, είναι πιο έντονοι σε γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού (48).

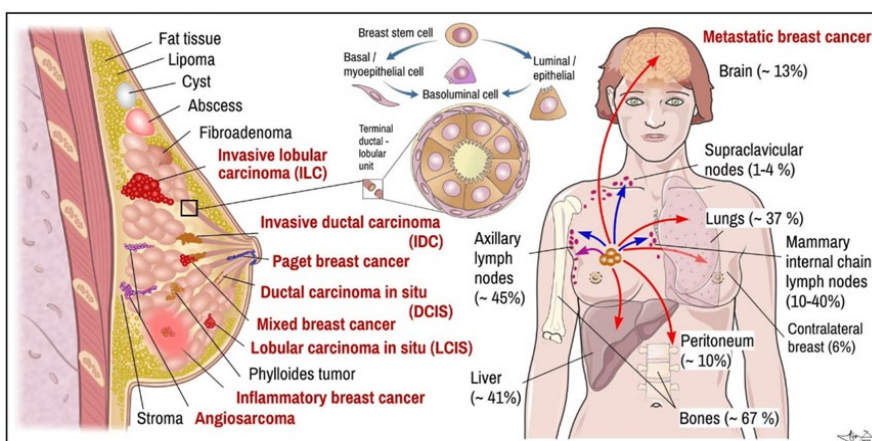
### 2.5.4 Πρόσληψη επεξεργασμένων τροφίμων/διατροφή

Υπερβολική πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών παρατηρήθηκε ότι αυξάνει τον κίνδυνο γαστρεντερικού καρκίνου και καρκίνου του μαστού, όπως ταξινομείται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) (49). Σε αυτούς τους κινδύνους εμπλέκεται το υψηλά επεξεργασμένο κρέας, το οποίο έχει χαρακτηριστεί ως καρκινογόνο της ομάδας Επιπλέον, η κατανάλωση εξαιρετικά επεξεργασμένων τροφίμων, πλούσιων σε νάτριο, λίπος και ζάχαρη, συνδέεται με την παχυσαρκία, η οποία αναγνωρίζεται ως άλλος παράγοντας που συμβάλλει στον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Η έρευνα δείχνει ότι μια αύξηση κατά 10% της κατανάλωσης υπερ-επεξεργασμένων τροφίμων στη διατροφή συσχετίζεται με 11% υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (50).

## 2.6 Ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού

### 2.6.1 Παραδοσιακές ταξινομήσεις

Η ιστολογική ταξινόμηση των καρκίνων του μαστού βασίζεται στο παθολογικό πρότυπο ανάπτυξης. Υπάρχουν πάνω από 20 διαφορετικοί ιστολογικοί τύποι διηθητικού καρκίνου του μαστού. Ο επικρατέστερος είναι ο IDC-NST (Πορογενές διηθητικό καρκίνωμα), που αποτελεί το 70% έως 80% όλων των διηθητικών καρκίνων. Ακολουθούν με μεγάλη απόσταση τα διηθητικά λοβιακά καρκινώματα (ILC), που αντιπροσωπεύουν περίπου το 10% όλων των διηθητικών καρκίνων. Οι υπόλοιποι τύποι περιλαμβάνουν λιγότερο συχνές ιστολογικές παραλλαγές, όπως βλεννώδη, ηθμοειδή, θηλώδη, σωληνοειδή, μυελώδη, μεταπλαστικά και αποκρinoειδή καρκινώματα. Αυτή η ταξινόμηση σε ιστολογικούς τύπους βασίζεται σε ποικίλα κριτήρια, που περιλαμβάνουν τον τύπο των κυττάρων του όγκου (π.χ. καρκίνωμα με αποκρinoειδή χαρακτηριστικά), την εξωκυτταρική έκκριση (π.χ. βλεννώδες καρκίνωμα), τα αρχιτεκτονικά χαρακτηριστικά (π.χ. θηλώδες καρκίνωμα) και το ανοσοϊστοχημικό προφίλ (π.χ. καρκίνωμα με νευροενδοκρινική διαφοροποίηση). Ο διηθητικός πορογενής καρκίνος μη ειδικού ιστολογικού τύπου (IDC-NST) δεν διαθέτει διακριτά μορφολογικά χαρακτηριστικά άλλων ειδικών ιστολογικών τύπων, γεγονός που οδηγεί στην κατηγοριοποίηση των περισσότερων καρκίνων του μαστού σε μία ενιαία ομάδα, δηλαδή τον IDC-NST. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι αυτή η ταξινόμηση δεν μπορεί να αποτυπώσει πλήρως τη βιολογική ετερογένεια που ενυπάρχει στους καρκίνους του μαστού (51)(52).



Εικόνα 4. Στη μέση, υπάρχει ένα σχήμα της μονάδας του τελικού πόρου-λοβίου που απεικονίζει τη θέση των βασικών-μυοεπιθηλιακών κυττάρων (υπεύθυνα για την έκκριση του γάλακτος) και των λοβιακών κυττάρων (που ασχολούνται με την παραγωγή γάλακτος). Αριστερά βρίσκονται οι κύριοι ιστοπαθολογικοί τύποι καρκίνου (επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα), μαζί με άλλα

παθολογικά ευρήματα. Δεξιά, θα βρείτε τους κύριους στόχους της μετάστασης του καρκίνου του μαστού (με αναγραφόμενες συχνότητες). Τα βέλη χρησιμοποιούνται για να δείξουν τη μεταστατική εξάπλωση: ιώδες για την τοπική, μπλε για τη λεμφική και κόκκινο για τη μετάσταση που μεταφέρεται με το αίμα. Πηγή: Beňáčka R, Szabóová D, Gulášová Z, Hertelyoná Z, Radoňák J. *Classic and New Markers in Diagnostics and Classification of Breast Cancer. Cancers (Basel)*. 2022 Nov 5

### 2.6.2 Διαβάθμιση καρκίνου του μαστού

Η ευρέως αποδεκτή σήμερα τροποποίηση του Nottingham της ταξινόμησης Scarff-Bloom Richardson αξιολογεί κάθε παράμετρο με ένα αριθμητικό σύστημα βαθμολόγησης από το 1 έως το 3 (53). Περιλαμβάνει τη μικροσκοπική αξιολόγηση της ιστολογικής διαφοροποίησης με τη μορφή σχηματισμού σωληναρίων, πυρηνικού πλειομορφισμού και πολλαπλασιασμού, όπως υποδεικνύεται από τον μιτωτικό δείκτη. Αυτό το σύστημα βαθμολόγησης παράγει μια αθροιστική βαθμολογία για την απόδοση βαθμού. Η διαβάθμιση, ένας ισχυρός προγνωστικός παράγοντας, χρησιμεύει ως αναπόσπαστο στοιχείο σε ορισμένα κλινικά εργαλεία λήψης αποφάσεων, όπως ο προγνωστικός δείκτης του Nottingham και το Adjuvant online. Είναι ενδιαφέρον ότι συγκεκριμένα γενετικά και μεταγραφικά χαρακτηριστικά των καρκίνων του μαστού συσχετίστηκαν με συγκεκριμένες και διαφορετικές βαθμίδες όγκου (54).

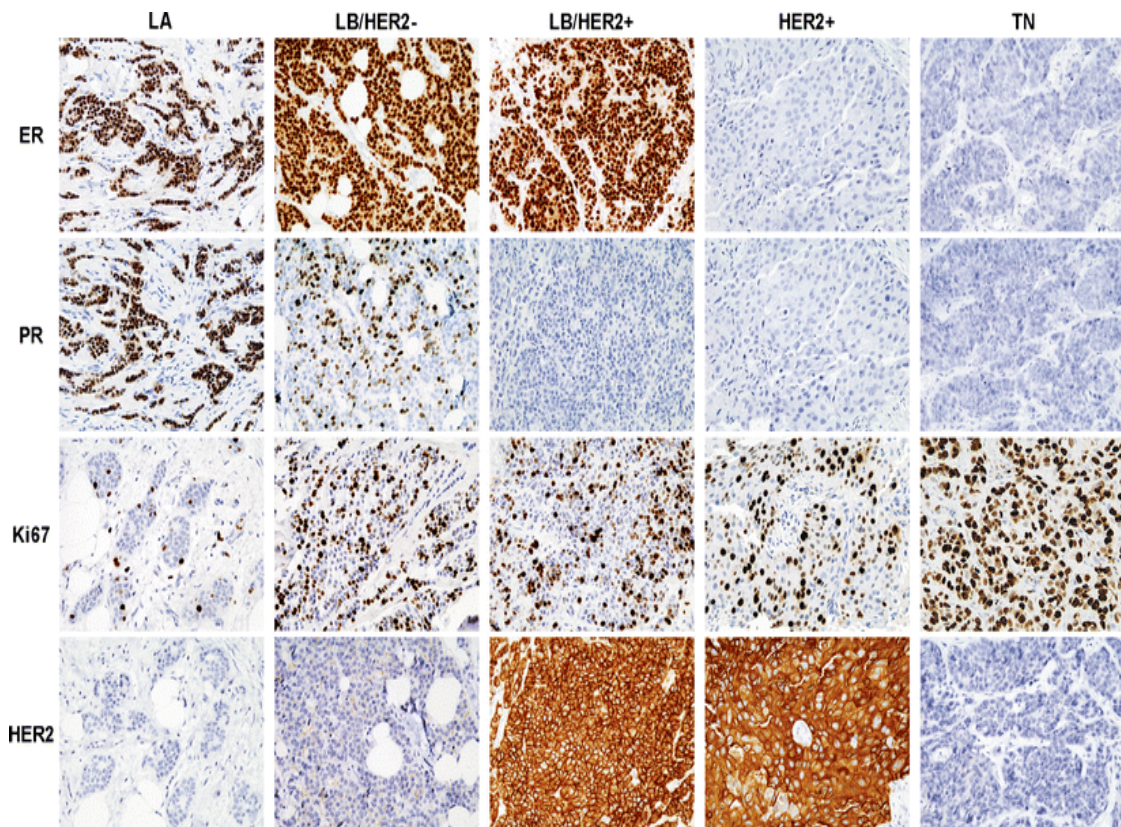
### 2.6.3 Ανοσοφαινότυπος (Υποδοχέας οιστρογόνων, Υποδοχέας προγεστερόνης, Υποδοχέας 2 του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα)

Η αξιολόγηση ρουτίνας στη διαχείριση του καρκίνου του μαστού περιλαμβάνει τους δείκτες ER, PR και HER2, οι οποίοι χρησιμεύουν ως προγνωστικοί δείκτες και κρίσιμοι παράγοντες πρόβλεψης για ορμονική και στοχευμένη θεραπεία κατά του HER2. Οι πυρηνικοί στεροειδείς υποδοχείς του φύλου, ER και PR διεγείρουν τη φυσιολογική και νεοπλασματική ανάπτυξη του επιθηλίου του μαστού, που εκφράζονται σε περίπου 75% όλων των καρκίνων του μαστού. Η παρουσία τους υποδεικνύει την ανταπόκριση στην ορμονική θεραπεία, με ανοσοϊστοχημική αξιολόγηση χρησιμοποιώντας ένα όριο πυρηνικής έκφρασης 1% (55). Συνήθως, οι ER/PR-θετικοί καρκίνοι εμφανίζουν χαμηλότερους βαθμούς και είναι λιγότερο επιθετικοί, ενώ η πλειονότητα των ER-θετικών καρκίνων είναι επίσης PR+. Ωστόσο, ένα μικρό ποσοστό παρουσιάζει θετικότητα ενός μόνο ορμονικού υποδοχέα, που συσχετίζεται με αυξημένη επιθετικότητα και μειωμένη ανταπόκριση στην ορμονική θεραπεία σε σύγκριση με τους ER/PR-θετικούς καρκίνους (56)(57). Περίπου το 15% των



καρκίνων του μαστού υπερεκφράζουν το HER2, με ενίσχυση του αντίστοιχου γονιδίου στο 17q12. Η κατάσταση του HER2 προσδιορίζεται μέσω ανοσοϊστοχημικών (IHC) και τεχνικών υβριδισμού DNA in situ, ακολουθώντας τακτικά επικαιροποιημένες κατευθυντήριες γραμμές (58).

Επί του παρόντος, οι HER2-θετικοί όγκοι ορίζονται από >10% των κυττάρων με ισχυρή περιφερική χρώση ή λόγο HER2:CEP17  $\geq 2$ . Αν και η υπερέκφραση του HER2 συνδέεται με επιθετική κλινική πορεία και κακή πρόγνωση, προβλέπει επίσης θετική ανταπόκριση σε στοχευμένες θεραπείες κατά του HER2 (59). Το υπόλοιπο 10% έως 15% των καρκίνων του μαστού που στερούνται αυτών των τριών δεικτών ονομάζονται τριπλά αρνητικοί καρκίνοι του μαστού (TNBC). Ο TNBC είναι γενικά υψηλού βαθμού και σχετίζεται με κακή πρόγνωση, ενώ οι ασθενείς δεν επωφελούνται από τις τρέχουσες στοχευμένες θεραπείες (60).



Εικόνα 5. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα των διαφόρων υποτύπων καρκίνου του μαστού με τη χρήση τυποποιημένης IHC. Πηγή: Beňáčka, R.; Szabóová, D.; Guľašová, Z.; Hertelyoná, Z.; Radoňák, J. *Classic and New Markers in Diagnostics and Classification of Breast Cancer*. *Cancers* 2022.

#### 2.6.4 Μέγεθος όγκου, κατάσταση κόμβων και σταδιοποίηση απομακρυσμένων μεταστάσεων

Η Αμερικανική Κοινή Επιτροπή για τον Καρκίνο δημοσιεύει τη σταδιοποίηση TNM, η οποία ενσωματώνει τόσο κλινικά όσο και παθολογικά δεδομένα, αξιολογώντας το μέγεθος του όγκου (T), την κατάσταση των περιφερειακών λεμφαδένων (N) και τις απομακρυσμένες μεταστάσεις (M). Το σύστημα σταδιοποίησης κατηγοριοποιεί τη νόσο σε πέντε στάδια (0, I, II, III και IV). Στην τελευταία έκδοση (AJCC-TNM8), ο βαθμός και οι πληροφορίες για ER, PR και HER2 περιλαμβάνονται για τη δημιουργία προγνωστικής σταδιοποίησης. Η προσέγγιση αυτή αντιμετωπίζει τον περιορισμό της στήριξης αποκλειστικά στην αξιολόγηση της ανατομικής έκτασης της νόσου, λαμβάνοντας υπόψη βιολογικές παραμέτρους με προγνωστική και προβλεπτική αξία. Η προκύπτουσα προγνωστική σταδιοποίηση προσφέρει ακριβέστερες προγνωστικές πληροφορίες σε σύγκριση με προηγούμενα συστήματα σταδιοποίησης (61).

#### 2.6.5 Μοριακή ταξινόμηση

Οι αλλαγές στα πρότυπα βιολογίας του καρκίνου του μαστού έχουν προκληθεί από τις τεχνολογίες υψηλής απόδοσης, οι οποίες έχουν παράσχει άμεσες αποδείξεις της ετερογένειας σε μοριακό επίπεδο. Μελέτες σφαιρικού προφίλ γονιδιακής έκφρασης, οι οποίες χρησιμοποιούν ιεραρχική ομαδοποίηση, έχουν ταξινομήσει τους καρκίνους του μαστού σε εγγενείς υποτύπους: luminal A, luminal B, που υπερεκφράζουν το HER2, καρκίνους του μαστού που μοιάζουν με βασικούς (BLBC) και όγκους που μοιάζουν με φυσιολογικούς. Οι μελέτες αυτές υπογράμμισαν τη σημασία της ανοσοφαινοτυπικής ταξινόμησης με βάση τους ορμονικούς υποδοχείς και την κατάσταση HER2.

Οι καρκίνοι του μαστού διαστρωματώνονται σε διακριτές ομάδες με βάση την έκφραση του ER: ER+ και ER-. Οι υπότυποι Luminal A και B είναι εμπλουτισμένοι με ER-θετικούς καρκίνους, ενώ οι HER2-επανεκφραστές, οι BLBC και οι φυσιολογικοί όγκοι είναι ER-. Πέρα από τα γονίδια που σχετίζονται με τον ER και τον ER, οι υπότυποι παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, το αμπλικόνιο

HER2 και τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα. Αυτοί οι ενδογενείς υποτύποι παρουσιάζουν παραλλαγές στη συχνότητα εμφάνισης, τα κλινικά και παθολογικά χαρακτηριστικά, που σε μεγάλο βαθμό συμπίπτουν με τις καθιερωμένες κλινικές και ιστοπαθολογικές ταξινομήσεις. Οι υποομάδες Luminal A και B, που χαρακτηρίζονται από προφίλ γονιδιακής έκφρασης που μοιάζουν με φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα, αντιπροσωπεύουν τους πιο κοινούς μοριακούς υποτύπους (62). Το Luminal A, που αποτελεί το 40% έως 50% των διηθητικών καρκίνων του μαστού, είναι συνήθως χαμηλού βαθμού με την καλύτερη πρόγνωση (63) ενώ το Luminal B τείνει να είναι υψηλότερου βαθμού με χειρότερη πρόγνωση, παρουσιάζοντας χαμηλότερη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον ER και υψηλότερη έκφραση σε γονίδια που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό. Κλινικά, η ομάδα luminal A επωφελείται μόνο από την ορμονική θεραπεία, ενώ οι όγκοι luminal B μπορεί να απαιτούν πρόσθετη χημειοθεραπεία.

Ο υποτύπος που υπερεκφράζει το HER2, που περιλαμβάνει το ~15% των διηθητικών καρκίνων του μαστού, χαρακτηρίζεται από υπερέκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τη σηματοδότηση HER2/HER2. Αυτοί οι όγκοι είναι υψηλού βαθμού, ER και PR- και ακολουθούν επιθετική κλινική πορεία. Ωστόσο, ανταποκρίνονται καλά στη στοχευμένη θεραπεία κατά του HER2, με αποτέλεσμα σημαντικά βελτιωμένη έκβαση. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν ανήκουν όλοι οι κλινικά HER2+ καρκίνοι στον υποτύπο που υπερεκφράζει το HER2 (64).

Ο BLBC σχετίζεται με την έκφραση γονιδίων σε φυσιολογικά βασικά/μυοεπιθηλιακά κύτταρα του μαστού, εμφανίζοντας ιστολογία υψηλού βαθμού με τριπλά αρνητικό φαινότυπο (62). Οι ασθενείς αυτές έχουν κακή πρόγνωση και οι υποτροπές μπορεί να εμφανιστούν εντός 5 ετών από τη διάγνωση. Το σύμπλεγμα που μοιάζει με φυσιολογικά κύτταρα, το οποίο αρχικά θεωρήθηκε αμφιλεγόμενο, θεωρήθηκε αργότερα ως τεχνούργημα λόγω επιμόλυνσης πραγματικών φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων σε όγκους με χαμηλή περιεκτικότητα σε κακοήθη κύτταρα (65).

Η PAM50, μια τυποποιημένη μέθοδος, κατηγοριοποιεί τους καρκίνους του μαστού σε luminal A, luminal B, εμπλουτισμένους με HER2 και BLBC. Το Prosigna, μια εξέταση εγκεκριμένη από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ, χρησιμοποιεί μια τροποποιημένη έκδοση του PAM50((Prediction Analysis of Microarray using 50 classifier genes plus 5 reference genes) για την πρόγνωση, επιδεικνύοντας προγνωστική αξία για την



απομακρυσμένη υποτροπή, το όφελος της επικουρικής χημειοθεραπείας και την ανταπόκριση στη νεοεπικουρική θεραπεία (66).

Η επακόλουθη σκιαγράφιση του προφίλ γονιδιακής έκφρασης έχει εντοπίσει σπάνιους υποτύπους, όπως ο χαμηλός σε claudin (67) ο μοριακός αποκρinoειδής (68) και ο πλούσιος σε ιντερφερόνη (69). Ωστόσο, αυτοί οι υπότυποι στερούνται αντιπροσωπευτικών υπογραφών για τον προσδιορισμό τους ως ξεχωριστών οντοτήτων και αναγνωρίζονται μόνο σε ιεραρχική ομαδοποίηση (70).

**Πίνακας 1.** Σύνοψη μοριακών υποτύπων καρκίνου του μαστού

<b>Ενδογενής υποτύπος</b>	<b>Βασικά χαρακτηριστικά</b>
Luminal A	- Προφίλ γονιδιακής έκφρασης που μοιάζουν με φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα και γονίδια που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του ER. - Αντιπροσωπεύει το 40% έως 50% των διηθητικών καρκίνων του μαστού. - Συνήθως χαμηλού βαθμού με την καλύτερη πρόγνωση μεταξύ όλων των ενδογενών υποτύπων. - Πιθανόν να ωφεληθεί μόνο από την ορμονική θεραπεία.
Luminal B	- Υψηλότερος βαθμός σε σύγκριση με το Luminal A με χειρότερη πρόγνωση. - Χαμηλότερη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον ER, υψηλότερη έκφραση σε γονίδια που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό και μεταβλητή έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το HER2. - Κλινικά μπορεί να ωφεληθεί από ορμονική θεραπεία και πρόσθετη χημειοθεραπεία.
HER2-overexpressing	- Χαρακτηρίζεται από την υπερέκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τη σηματοδότηση HER2/HER2 και των γονιδίων που βρίσκονται στο αμπλικόνιο HER2 στο χρωμόσωμα 17q12. - Αντιπροσωπεύει περίπου το 15% όλων των διηθητικών καρκίνων του μαστού. - Υψηλού βαθμού, ER και PR αρνητικός, επιθετική κλινική πορεία. - Υψηλή ανταπόκριση στη θεραπεία κατά του HER2.
Basal-like Breast Cancer	Συνδέεται με την έκφραση γονιδίων στα φυσιολογικά βασικά/μυεπιθηλιακά κύτταρα του μαστού, συμπεριλαμβανομένων των βασικών κυτταροκερατινών. - Υπερέκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό. - Έλλειψη έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τα ER, PR και HER2. - Υψηλού βαθμού με κακή πρόγνωση και τριπλά αρνητικό φαινότυπο
Normal-like	- Αρχικά χαρακτηρίζεται από έκφραση γονιδίων παρόμοιων με το φυσιολογικό επιθήλιο του μαστού. - Αμφιλεγόμενη υποομάδα που αργότερα θεωρήθηκε τεχνούργημα λόγω επιμόλυνσης. - Δεν αναγνωρίζεται ευρέως ως διακριτός υπότυπος

## Κεφάλαιο 3: Εξέλιξη της έρευνας των καρκινικών δεικτών

### 3.1 Ορισμός καρκινικού δείκτη

Στα θεμέλια κάθε διάγνωσης καρκίνου βρίσκονται ακριβείς και ολοκληρωμένες παθολογικές εκθέσεις. Οι εκθέσεις αυτές αποτελούν την προϋπόθεση για τη διασφάλιση της σωστής διάγνωσης, της εξατομικευμένης βέλτιστης θεραπείας και της καλύτερης δυνατής πρόγνωσης και έκβασης για τον εκάστοτε ασθενή. Ένας καρκινικός δείκτης προσδιορίζεται στο αίμα, στα ούρα ή στους ιστούς του σώματος και μπορεί να είναι αυξημένος λόγω της παρουσίας ενός ή περισσότερων τύπων καρκίνου. Η προέλευσή του εντοπίζεται είτε στον ίδιο τον όγκο είτε στην αντίδραση του ξενιστή στον όγκο. Τα επιθυμητά χαρακτηριστικά για έναν ιδανικό δείκτη όγκου περιλαμβάνουν τόσο την ειδικότητα όσο και την ευαισθησία, επιτρέποντας την ανίχνευση μικρών όγκων για έγκαιρη διάγνωση ή βοηθώντας στον έλεγχο. Ειδικότερα, μόνο λίγοι δείκτες είναι ειδικοί για έναν μόνο όγκο, ενώ οι περισσότεροι παράγονται από διαφορετικούς όγκους του ίδιου τύπου ιστού. Αυτοί οι δείκτες βρίσκονται σε μεγαλύτερες ποσότητες στον καρκινικό ιστό ή στο αίμα των καρκινοπαθών σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα. Οι καρκινικοί δείκτες διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην αξιολόγηση της εξέλιξης της κατάστασης της νόσου μετά την αρχική χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία, διευκολύνοντας την παρακολούθηση των επακόλουθων θεραπευτικών στρατηγικών (71).

Ο όρος "βιοδείκτης" έχει διάφορους ορισμούς, και σύμφωνα με τα Εθνικά Ινστιτούτα Υγείας των ΗΠΑ (NIH), ένας βιοδείκτης ορίζεται ως εξής: *Ένας βιοδείκτης είναι ένα χαρακτηριστικό που μετριέται αντικειμενικά και αξιολογείται ως δείκτης φυσιολογικών βιολογικών διεργασιών, παθογόνων διεργασιών ή φαρμακολογικών αποκρίσεων σε μια θεραπευτική παρέμβαση* (72).

### 3.2 Μεθοδολογικές εξελίξεις στην ανακάλυψη καρκινικών δεικτών

Στη σφαίρα της εξατομικευμένης ογκολογικής φροντίδας των ασθενών, οι προγνωστικοί και προγνωστικοί δείκτες όγκου αποκτούν ολοένα και πιο κρίσιμο ρόλο (73). Οι δείκτες αυτοί περιλαμβάνουν ένα φάσμα από συμβατικούς δείκτες που βασίζονται σε μία πρωτεΐνη, RNA ή DNA έως μοριακές υπογραφές που προέρχονται από δοκιμασίες πολλαπλών αναλύσεων. Η εφαρμογή των προγνωστικών και προβλεπτικών δεικτών επεκτείνεται στην καθοδήγηση της κλινικής διαχείρισης των ασθενών που διαγιγνώσκονται με εδραιωμένες

μορφές καρκίνου. Οι αμιγώς προγνωστικοί δείκτες διαφοροποιούν τις κλινικές εκβάσεις μεταξύ υποομάδων ασθενών (π.χ. θετικοί έναντι αρνητικών για τον δείκτη) ελλείψει μιας μελλοντικής, εξεταζόμενης θεραπείας. Αυτό προϋποθέτει ότι οι ασθενείς θα υποβληθούν είτε σε καμία θεραπεία είτε σε κάποια επιλεγμένη βασική θεραπεία, όπως τοπικές θεραπείες όπως η χειρουργική επέμβαση ή/και η ακτινοβολία. Ένας ισχυρός προγνωστικός παράγοντας μπορεί να έχει τη δυνατότητα να εντοπίζει ασθενείς με καρκίνο που είναι τόσο πιθανό να θεραπευτεί με τη βασική θεραπεία, ώστε να μην είναι απαραίτητη η πρόσθετη θεραπεία, ακόμη και αν είναι ενεργή. Σε περιπτώσεις όπου η πρόσθετη θεραπεία κρίνεται απαραίτητη, οι προγνωστικοί δείκτες μπαίνουν στο παιχνίδι προσδιορίζοντας υποπληθυσμούς ασθενών που θα αποκομίσουν ή δεν θα αποκομίσουν ουσιαστικό όφελος από τις πολλά υποσχόμενες νέες στοχευμένες θεραπείες. Για παράδειγμα στον καρκίνο του μαστού η κατάσταση του υποδοχέα οιστρογόνων και του υποδοχέα 2 του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (HER2) χρησιμεύει ως προγνωστικός δείκτης, υποδεικνύοντας την πιθανότητα οφέλους ή αντίστασης σε ενδοκρινικές και αντι-HER2 θεραπείες, αντίστοιχα (74).

Δεδομένης της ετερογενούς φύσης των καρκινικών κυττάρων, ένας μοναδικός βιοδείκτης δεν διαθέτει την ευαισθησία και την ακρίβεια που απαιτούνται για την αποτελεσματική διάγνωση. Ως εκ τούτου, προτιμάται ένας συνδυασμός βιοδεικτών. Η πρόοδος στα γενετικά αποτυπώματα και τις μοριακές διαδικασίες σηματοδότησης έχει αποκαλύψει βιοδείκτες στους ιστούς και το αίμα, με τις υγρές βιοψίες να προσφέρουν πληροφορίες σχετικά με την πιθανότητα εξάπλωσης του καρκίνου, την επανεμφάνιση, τις συστάσεις θεραπείας, την πρόβλεψη και την ανοχή στη φαρμακευτική αγωγή. Επιπλέον, οι θεραπευτικές προσεγγίσεις σε πρώιμο στάδιο για τον καρκίνο του μαστού υπογραμμίζουν τη σημασία της εύρεσης ακριβών βιοδεικτών για την υποστήριξη των ανοσοθεραπειών (75).

### 3.2.1 Γονιδιωματικές προσεγγίσεις

Ο καρκίνος, μια πολύπλοκη ομάδα ασθενειών, εκδηλώνεται ως πολυπαραγοντική γενετική διαταραχή. Στην κατάσταση αυτή, τα κύτταρα παρουσιάζουν ανεξέλεγκτη ανάπτυξη, επιμένουν μετά από βλάβη ή αχρηστία και παρουσιάζουν χαρακτηριστικά αθανασίας (76).

Η διαδικασία δημιουργίας του καρκίνου περιλαμβάνει διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των περιβαλλοντικών επιδράσεων, του τρόπου ζωής και των

λοιμώξεων. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν τελικά να οδηγήσουν σε ανωμαλίες στα γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο σε επίπεδο μοριακής βιολογίας. Σε αυτό το επίπεδο οι μη φυσιολογικές αλλαγές στα μόρια των κυττάρων του σώματος συγκεκριμένα τα γονίδια και τα προϊόντα τους μπορούν να εντοπιστούν και να χρησιμεύσουν ως γενετικοί δείκτες όγκων. Αυτοί οι άμεσοι δείκτες όγκου γενετικής προέλευσης παρέχουν ακριβέστερη και έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου σε σύγκριση με τους παραδοσιακούς δείκτες όγκου που βασίζονται σε πρωτεΐνες (77). Αυτοί οι δείκτες όγκου με βάση τα γονίδια προσφέρουν ένα πρόσθετο πλεονέκτημα, καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της πρόγνωσης της νόσου. Η παρακολούθηση των μεταβολών σε έναν ή περισσότερους από αυτούς τους καρκινικούς δείκτες κατά τη διάρκεια και μετά τη θεραπεία παρέχει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την εξέλιξη της νόσου (78).

Επιπλέον, οι γενετικοί βιοδείκτες, που προέρχονται από μοριακές ανωμαλίες εντός των γονιδίων ή του DNA, παρέχουν δυνητικούς στόχους στα καρκινικά κύτταρα. Αυτοί οι στόχοι μπορούν να αξιοποιηθούν για την ανάπτυξη ειδικών γονιδιακών φαρμάκων σχεδιασμένων να αναγνωρίζουν και να επιτίθενται αποκλειστικά σε αυτούς τους ανώμαλους στόχους, προσφέροντας έτσι μια μέθοδο θεραπείας του καρκίνου με ελάχιστες ή καθόλου παρενέργειες. Η αξιοποίηση αυτών των γενετικών βιοδεικτών επεκτείνεται στην ενίσχυση της θεραπείας με ανοσοποιητικά κύτταρα κατά του καρκίνου (79).

Οι εμπορικά διαθέσιμοι προγνωστικοί και προγνωστικοί δείκτες για τον καρκίνο του μαστού, συμπεριλαμβανομένων των μοριακών τεχνολογιών, έχουν αναπτυχθεί με προφίλ γονιδιακής έκφρασης. Αξιοσημείωτα παραδείγματα είναι το MammaPrint, μια μελέτη μικροσυστοιχίας 70 γονιδίων που σχεδιάστηκε για την πρόβλεψη της υποτροπής του καρκίνου του μαστού, και το OncotypeDx, ένα προφίλ έκφρασης 21 γονιδίων που αναλύεται μέσω RT-PCR. Τόσο το MammaPrint όσο και το OncotypeDx έλαβαν έγκριση από τον FDA και διατίθενται στο εμπόριο από το 2007 και το 2004, αντίστοιχα (80).

### 3.2.2 Πρωτεομική και μεταβολομική στην αναζήτηση νέων καρκινικών δεικτών

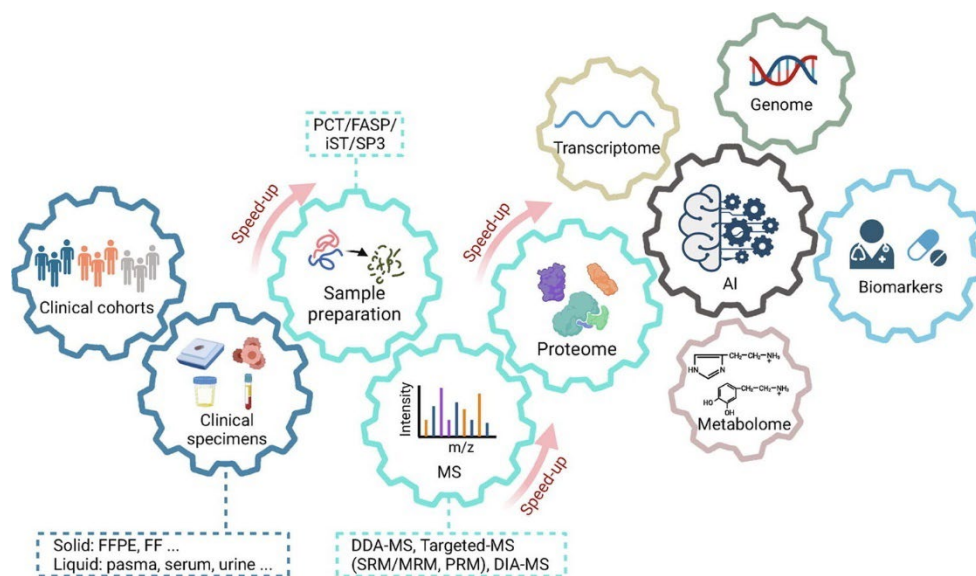
Οι πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις επέτρεψαν την ανάλυση διαφόρων ιστών και υγρών, όπως το αίμα, τα ούρα, το σάλιο, η λέμφος, η αναρρόφηση μυελού των οστών και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, για τον εντοπισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό βιοδεικτών. Η ανίχνευση, η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός μιας πληθώρας βιομορίων σε πολύπλοκες μήτρες, που διευκολύνεται από αυτές τις εξελίξεις, έχουν επιφέρει επανάσταση στην

ανακάλυψη βιοδεικτών. Στην πρώτη γραμμή των πρόσφατων μελετών ανακάλυψης βιοδεικτών βρίσκονται οι τεχνικές που βασίζονται στη φασματομετρία μάζας, οι οποίες βασίζονται σε μεγάλο βαθμό σε διαφορετικές χρωματογραφικές μεθόδους για το διαχωρισμό των βιομορίων και σε μεθόδους φασματομετρίας μάζας για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών ή άλλων μικρών μορίων σε βιολογικά δείγματα. Σε αυτές τις προσεγγίσεις ανακάλυψης, που χρησιμοποιούνται συνήθως σε κλινικές μελέτες βιοδεικτών, πραγματοποιείται ο σχετικός ποσοτικός προσδιορισμός πολλαπλών πρωτεϊνών ή μικρών μορίων και τα δεδομένα από δείγματα ελέγχου συγκρίνονται με δείγματα που λαμβάνονται από ασθενείς. Η όλη διαδικασία που εκτείνεται από την ανακάλυψη έως την επικύρωση και την κλινική έγκριση περιλαμβάνει αρκετές πρόσθετες μελέτες επικύρωσης μέσω του αγωγού ανάπτυξης βιοδεικτών (81).

Η πρωτεωμική του αίματος και η φασματομετρία μάζας έχουν απεικονίσει συστηματικά και ολοκληρωμένα τις παθολογικές και φυσιολογικές πτυχές της πρωτεωμικής του αίματος. Η προσέγγιση αυτή οδήγησε στην ανακάλυψη πολυάριθμων πρωτεϊνικών βιοδεικτών στο αίμα, καθιερώνοντάς το ως τη δεύτερη επιλογή για την αναγνώριση και την ανάλυση του καρκίνου του μαστού. Στην ανίχνευση του καρκίνου του μαστού, αυτοί οι πρωτεϊνικοί βιοδείκτες που προέρχονται από το αίμα έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικοί για διαγνωστικούς σκοπούς. Ειδικότερα, ένα πάνελ των παραγόντων τριφυλλοειδών πεπτιδίων (TFF) 1, TFF2 και TFF3 έχει αναγνωριστεί ως πολλά υποσχόμενοι βιοδείκτες για την ανίχνευση του καρκίνου του μαστού. Αυτές οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν ειδική διαφορική έκφραση στον ορό των ασθενών με καρκίνο του μαστού, διαχωρίζοντάς τες από τις πρωτεΐνες που παράγονται από υγιή κύτταρα (82).

Η μελέτη του μεταβολώματος του καρκίνου μπορεί να αποκαλύψει σημαντικές γνώσεις σχετικά με τις βιολογικές μεταβολές εντός των ασθενών ιστών, δεδομένου ότι τα μικρά μόρια που αποτελούν το μεταβολισμό ενός οργανισμού ή ενός κυττάρου είναι στενά συνδεδεμένα με τη λειτουργία ή τον φαινότυπο του κυττάρου (83). Σε ένα βιολογικό σύστημα οι μεταβολίτες μικρών μορίων είναι ενδεικτικοί τόσο των αναβολικών όσο και των καταβολικών διεργασιών και έχουν την ικανότητα να αποκαλύπτουν πληροφορίες όχι μόνο για τον κυτταρικό μεταβολισμό αλλά και για τον μεταβολισμό του οργανισμού. Η επανάσταση στην ανακάλυψη βιοδεικτών στον τομέα αυτό στηρίζεται στην εφαρμογή τεχνολογιών omics υψηλής απόδοσης. Πολλαπλές επιδείξεις έχουν επιβεβαιώσει ότι, για διαγνωστικούς σκοπούς, μια υπογραφή βιοδεικτών που περιλαμβάνει πολλούς

υποψηφίους εμπνέει μεγαλύτερη εμπιστοσύνη σε σύγκριση με τη στήριξη σε έναν μόνο βιοδείκτη (84). Η διερεύνηση της χρήσης πολλαπλών γονιδιωματικών και πρωτεομικών βιοδεικτών αποσκοπεί στην ενίσχυση της διαγνωστικής ακρίβειας κατά την πρόβλεψη της θεραπευτικής ανταπόκρισης (85).



Εικόνα 6. Η ανάπτυξη των βιοδεικτών ωθείται στα όριά της από τα κλινικά δεδομένα που βασίζονται στην τεχνητή νοημοσύνη, τα οποία συνδυάζουν πάνελ πολλαπλών αναλύσεων, ενισχύοντας την προγνωστική δύναμη των βιοδεικτών. Πηγή: Qi Xiao, Fangfei Zhang, Luang Xu, Liang Yue, Oi Lian Kon, Yi Zhu, Tiannan Guo, High-throughput proteomics and AI for cancer biomarker discovery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 176, 2021

## Κεφάλαιο 4: Προγνωστικοί και προβλεπτικοί καρκινικοί δείκτες στον καρκίνο του μαστού

### 4.1 Κλασικοί δείκτες

#### 4.1.1 Καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA)

Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος δείκτης όγκου στην κλινική πρακτική είναι το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA), που ανήκει σε μια οικογένεια συναφών γλυκοπρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας. Το CEA χρησιμεύει ως δείκτης όγκου για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, του γαστρεντερικού, του πνεύμονα και του μαστού (86). Το CEA, που αρχικά αναγνωρίστηκε ως αντιγόνο ειδικό για τον όγκο, το οποίο υπάρχει σε εκχυλίσματα ιστών όγκων, είναι επίσης παρόν στα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα του εμβρυϊκού

γαστρεντερικού σωλήνα. Αυτή η γλυκοπρωτεΐνη περιέχει 45-50% υδατάνθρακες και αποτελείται από μια απλή πολυπεπτιδική αλυσίδα που περιλαμβάνει 641 αμινοξέα (87).

Το CEA, ενώ δεν έχει ευαισθησία και ειδικότητα για τη νόσο, είναι ακατάλληλο για τον έλεγχο του γενικού ασυμπτωματικού πληθυσμού, των ατόμων με υψηλό κίνδυνο κακοήθειας ή για την ανεξάρτητη διάγνωση του καρκίνου. Παρόλα αυτά, βρίσκει χρησιμότητα στην υποβοήθηση της διάγνωσης, στην κλινική σταδιοποίηση, στην ανίχνευση υποτροπής μετά από χειρουργική επέμβαση και στην παρακολούθηση της θεραπευτικής ανταπόκρισης σε ασθενείς που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία (88). Στον καρκίνο του μαστού, η αύξηση του CEA συνδέεται με μεταστατική νόσο. Οι προεγχειρητικές μετρήσεις CEA συσχετίζονται με το παθολογικό στάδιο και την έκταση του όγκου, και η συσχέτιση αυτή εξαρτάται από το στάδιο. Τα κυκλοφορούντα επίπεδα CEA σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού συνδέονται άμεσα με το μέγεθος τόσο των πρωτοπαθών όσο και των μεταστατικών όγκων. Ωστόσο, στο πλαίσιο του καρκίνου του μαστού, το CEA αντικαθίσταται σταδιακά από πιο ειδικούς δείκτες όπως το CA 15-3 (89). Τα ευρήματα δείχνουν ότι η στήριξη αποκλειστικά στο CEA για τη διάγνωση του καρκίνου του μαστού είναι μη ειδική. Προτείνεται η καθιέρωση συσχέτισης μεταξύ CEA, CA 15-3 και κλινικοπαθολογικών παραμέτρων για ακριβέστερη διάγνωση σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού (90).

#### 4.1.2 Καρκινικό αντιγόνο (CA) 15-3

Το όνομα αυτού του δείκτη προέρχεται από το συνδυασμό της μοριακής δομής και των δοκιμών που αναπτύχθηκαν για την ανίχνευσή του. Συγκεκριμένα, στις ανοσοδοκιμές για αυτά τα αντιγόνα, οι αριθμοί 15-3 υποδηλώνουν τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται (86).

Το CA 15-3, που ανήκει στην οικογένεια MUC1, είναι ένα πρωτεϊνικό αντιγόνο που περιέχει υδατάνθρακες, γνωστό ως μουκίνη (MUC). Το γονίδιο MUC1, που υπάρχει σε διάφορους ιστούς, παράγει μια βασική πρωτεΐνη που φαίνεται να είναι πανομοιότυπη. Ο βασικός παράγοντας διάκρισης μεταξύ των διαφόρων ιστικών πηγών είναι η διαφοροποίηση στη γλυκοζυλίωση (περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες). Στον ιστό του μαστού, η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες είναι περίπου 50%. Αν και οι ακριβείς φυσιολογικές λειτουργίες των πρωτεϊνών MUC1 παραμένουν ατελώς κατανοητές, φαίνεται ότι παίζουν ρόλο στη

μείωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ κυττάρων και ενδεχομένως στην αναστολή της λύσης των καρκινικών κυττάρων (91).

Αυτός ο δείκτης αποδεικνύεται πιο πολύτιμος για τον προσδιορισμό της πρόγνωσης του καρκίνου του μαστού και την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας. Μελέτες έχουν καταδείξει ότι η συγκέντρωση στον ορό και το ποσοστό των ασθενών με αυξημένες τιμές CA 15-3 τείνουν να αυξάνονται με τη σοβαρότητα (στάδιο) της νόσου ή/και το μέγεθος του όγκου. Έχει προταθεί ότι το CEA και το CA 15-3 θα πρέπει να θεωρούνται συμπληρωματικά στην ανίχνευση της υποτροπής του καρκίνου του μαστού (92). Ωστόσο, η ευαισθησία τους είναι χαμηλή και είναι ανεξάρτητη από την πλειονότητα των προγνωστικών παραμέτρων που μπορεί να εξεταστούν πριν από την υποτροπή. Αναφέρθηκε ότι τα επίπεδα CA 15-3 στον ορό αποτελούν ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού (93).

#### 4.1.3 CA 27.29

Ως καρκινικός δείκτης όγκου του καρκίνου του μαστού το CA 27.29 είναι ένα πρωτεϊνικό αντιγόνο που περιέχει υδατάνθρακες και παράγεται από το γονίδιο MUC-1 (94). Η συσχέτισή του με τον καρκίνο του μαστού είναι σημαντική, καθώς το 80% των γυναικών που διαγιγνώσκονται με καρκίνο του μαστού εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα CA 27-29. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το CA 27.29 μπορεί επίσης να ανιχνευθεί σε ασθενείς με διάφορες κακοήθειες ή καλοήθειες διαταραχές που επηρεάζουν το μαστό, το ήπαρ και τους νεφρούς, καθώς και σε άτομα με κύστες ωθηκών. Κατά συνέπεια, η αύξηση αυτού του δείκτη δεν είναι ειδική για κάποιο συγκεκριμένο όργανο. Τα στοιχεία δείχνουν ότι το CA 27.29, σε σύγκριση με το CA 15.3, παρουσιάζει κλινική απόδοση παρόμοια με εκείνη του CA 15.3 σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Αν και το CA 27.29 μπορεί να θεωρηθεί πιο ευαίσθητος αλλά λιγότερο ειδικός δείκτης από την CA 15-3, η οριστική απόδειξη αυτού του γεγονότος παραμένει ασαφής. Γενικά, θεωρούνται ουσιαστικά ισοδύναμοι για τους περισσότερους κλινικούς σκοπούς (95).

Για τον προσυμπτωματικό έλεγχο του καρκίνου του μαστού, η δοκιμασία δεν συνιστάται λόγω της χαμηλής ευαισθησίας και της έλλειψης ειδικότητας. Αντίθετα, φαίνεται να έχει μεγαλύτερη χρησιμότητα στην ανίχνευση της εξέλιξης της νόσου και στον εντοπισμό της μεταστατικής συμμετοχής. Όσον αφορά την ευαισθησία και την ειδικότητα, το CA 27.29 υπερτερεί έναντι του CEA, αλλά παρουσιάζει παρόμοια απόδοση με το CA 153 στην



έγκαιρη ανίχνευση μεταστατικής νόσου κατά τη διάρκεια του διαγνωστικού ελέγχου παρακολούθησης (96).

#### 4.1.4 Οιστρογονικός υποδοχέας (ER)

Ο ER είναι ένας πυρηνικός υποδοχέας που λειτουργεί ως παράγοντας μεταγραφής ενεργοποιούμενος από συνδέτες (97). Στον πυρήνα υπάρχουν δύο ισομορφές του υποδοχέα οιστρογόνων (ER): ERα και ERβ (98). Ο ER, η επικρατούσα μορφή στον καρκίνο του μαστού, χρησιμεύει ως παράγοντας μεταγραφής για γονίδια που σχετίζονται με την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (99).

Σε νεοδιαγνωσθείσες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού, η μέτρηση του ER είναι υποχρεωτική και συνιστάται (100). Ο ER, ο πιο καθιερωμένος κοινός προγνωστικός δείκτης που χρησιμοποιείται στο BC, χρησιμοποιείται κυρίως για την ταξινόμηση και τον καθορισμό των θεραπευτικών επιλογών μέσω ενδοκρινικής θεραπείας. Η έκφραση του ER χρησιμεύει ως βιοδείκτης ευνοϊκής πρόγνωσης σε σύγκριση με ER-αρνητικές περιπτώσεις στον καρκίνο του μαστού. Η ανταπόκριση στην ενδοκρινική θεραπεία εξαρτάται από τη θετικότητα του ER και κυμαίνεται με βάση τα επίπεδα έκφρασης του ER στον όγκο (101). Οι εγκεκριμένες ενδοκρινικές θεραπείες, που χρησιμοποιούνται συνήθως για την επικουρική θεραπεία των ασθενών με ER-θετικό BC, καταδεικνύουν βελτιωμένη επιβίωση και χρόνο μέχρι την υποτροπή της νόσου (102)(103). Σε BC τύπου luminal, όπου εκφράζονται τόσο ο υποδοχέας ER όσο και ο υποδοχέας προγεστερόνης, συνιστάται η συνήθης επικουρική ενδοκρινική θεραπεία (ET) για τουλάχιστον 5 έτη μετά τη χειρουργική επέμβαση. Οι θεραπείες καταστολής των οιστρογόνων χρησιμοποιούν ανταγωνιστές του ER για την εξάλειψη των ER-θετικών κυττάρων του καρκίνου του μαστού (103).

#### 4.1.5 Υποδοχέας προγεστερόνης (PR)

Στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων, ο υποδοχέας της προγεστερόνης (PR) λειτουργεί ως παράγοντας μεταγραφής ενεργοποιούμενος από συνδέσμους, παρόμοιος με τον ER (101). Ο PR, όταν είναι ενεργός, συνδέεται με το DNA και ρυθμίζει την έκφραση διαφόρων γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, την κυτταρική διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό (104). Περίπου το 80-90% των περιπτώσεων ER-θετικού καρκίνου του μαστού παρουσιάζουν θετικότητα για τον PR (101). Η μέτρηση του PR

πραγματοποιείται γενικά παράλληλα με τον ER και είναι υποχρεωτική και συνιστάται σε νεοδιαγνωσθείσες περιπτώσεις καθώς και σε υποτροπιάζουσες και μεταστατικές βλάβες (100). Για την αξιολόγηση του PR, η ανοσοϊστοχημεία (IHC) είναι η συνιστώμενη εξέταση, όπως και για τον ER (101).

Η τρέχουσα κατανόηση της μέτρησης των οφελών του PR είναι ελλιπής και παραμένει αμφιλεγόμενη (104), καθώς ο υποδοχέας μπορεί να επάγεται από τα οιστρογόνα (100). Αυτό οφείλεται στη ρύθμιση του γονιδίου PGR από τον ER, προκαλώντας διασταύρωση μεταξύ αυτών των υποδοχέων (101). Ως εκ τούτου, η παρουσία του PR χρησιμεύει ως βιοδείκτης που υποδεικνύει ένα λειτουργικό και άθικτο μονοπάτι του ER(100) (104), επηρεάζοντας άμεσα την ανταπόκριση ενός όγκου στις ενδοκρινικές θεραπείες (ET). υψηλότερη έκφραση του PR μπορεί να συνδέεται με βελτιωμένη ανταπόκριση στην ταμοξιφαίνη, χαμηλότερα ποσοστά υποτροπής και μεγαλύτερη επιβίωση χωρίς νόσο (104). Εκτός από τη συσχέτισή της με ένα λειτουργικό μονοπάτι ER, η θετικότητα της PR υποδηλώνει επίσης ευνοϊκότερη ανταπόκριση στις ενδοκρινολογικές θεραπείες. Γενικά, οι ασθενείς με PR-θετικούς όγκους εμφανίζουν καλύτερη κλινική έκβαση (105).

#### 4.1.6 Ki-67

Το Ki-67, που κωδικοποιείται από το γονίδιο MKI-67 στο χρωμόσωμα 10q26.2 στον άνθρωπο, είναι μια μη ιστονική πρωτεΐνη που βρίσκεται στον πυρήνα και στον πυρηνίσκο (106). Η έκφρασή της συνδέεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τα αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης συνδέονται με αυξημένη βιολογική επιθετικότητα στον καρκίνο του μαστού (106)(101). Η προγνωστική αξία της χρώσης Ki-67 χρησιμεύει ως πολύτιμο εργαλείο για την πρόβλεψη της επιβίωσης και των ποσοστών υποτροπής. Όταν συνδυάζεται με άλλους δείκτες, καθίσταται χρήσιμη για την ταξινόμηση του πρωτοπαθούς όγκου και την αξιολόγηση των μεταστάσεων (107). Στην κλινική πρακτική, ιδίως σε περιπτώσεις θετικών ορμονικών υποδοχέων (HR), το Ki-67 έχει συγκεντρώσει σημαντική προσοχή. Χρησιμεύει ως διακριτικός παράγοντας μεταξύ των τύπων luminal A και B, με τον luminal B να παρουσιάζει γενικά υψηλότερο πολλαπλασιασμό και μεγαλύτερη ανίχνευση Ki-67 από τον luminal A (101)(108).

Η μέτρηση του Ki-67 μετά από μια σύντομη νεοεπικουρική ενδοκρινική θεραπεία (NET) αποτελεί βασικό μέτρο για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (101). Η μελέτη IMPACT, η οποία συνέκρινε την υποτροπή και τον κίνδυνο θανάτου σε ασθενείς με

υποδοχείς οιστρογόνων θετικών BC σε τρία σχήματα NET (109), χρησιμοποίησε τη μεταβολή των επιπέδων Ki-67 ως πρωτεύοντα βιοδείκτη τελικού σημείου. Σε αυτή τη μελέτη, μετά από 2 και 12 εβδομάδες χρήσης αναστροζόλης και ταμοξιφαίνης, η αναστροζόλη επέδειξε μεγαλύτερη καταστολή του Ki-67 (76% και 82%) σε σύγκριση με την ταμοξιφαίνη (60% και 62%) και τον συνδυασμό αναστροζόλης και ταμοξιφαίνης (64% και 61%) (110). Η μελέτη αναδεικνύει τον προγνωστικό χαρακτήρα των βραχυπρόθεσμων μεταβολών του Ki-67 για τα μακροπρόθεσμα οφέλη και αποτελέσματα, διευκολύνοντας την αξιολόγηση των συγκεκριμένων απαντήσεων στη θεραπεία.

4.1.7 Υποδοχέας του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (HER2)  
Ο HER2 (υποδοχέας 2 του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα) κωδικοποιείται από το γονίδιο ERBB2 και είναι μέλος της οικογένειας των υποδοχέων του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, μαζί με τους HER1, HER3 και HER4 (111). Στον καρκίνο του μαστού, η ενίσχυση του ERBB2 και η επακόλουθη υπερέκφραση εμφανίζονται στο 13-15% των περιπτώσεων, συμβάλλοντας σε χειρότερη πρόγνωση που αποδίδεται στο υψηλό μεταστατικό δυναμικό των HER2-θετικών όγκων (101)(112).

Η ανοσοϊστοχημεία (IHC) ή/και ο υβριδισμός *in situ* (ISH) χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της κατάστασης HER2. Η υπερέκφραση του HER2 συνδέεται με μικρότερο χρόνο επιβίωσης και οδηγεί σε ιστολογικά χαρακτηριστικά επιθετικότητας. Η IHC, για την αξιολόγηση του HER2, αποκαλύπτει μια ανταπόκριση που αντικατοπτρίζει την υπερέκφραση του HER2 με βαθμολογία που κυμαίνεται από 0 έως 3+. Η βαθμολογία 0/1+ θεωρείται αρνητική, η βαθμολογία 3+ θεωρείται θετική και η βαθμολογία 2+ θεωρείται διφορούμενη, καθιστώντας αναγκαία την περαιτέρω αξιολόγηση μέσω FISH (101). Η διφορούμενη βαθμολογία 2+, αποδεικνύεται αν είναι πράγματι 2+ ή αρνητική μέσω SISH (Silver *in Situ* Hybridization), με αποτέλεσμα να βοηθήσει στη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου του μαστού (113). Αυξημένη δραστηριότητα κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διείσδυσης παρουσιάζουν οι όγκοι με βαθμολογία 3+ (112). Οι στοχευμένες θεραπείες κατά του HER-2 έχουν επιδείξει αποτελεσματικότητα σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού που χαρακτηρίζονται από ενίσχυση του ERBB2 ή υπερέκφραση της πρωτεΐνης HER (114).

Η ανταπόκριση στη θεραπεία κατά του HER2 επηρεάζεται αρνητικά τόσο από την ενδο- όσο και από τη διατομική ετερογένεια του HER2. Αυτή η επίδραση έχει ως αποτέλεσμα συντομότερο χρόνο υποτροπής, μειωμένη επιβίωση των ασθενών, αυξημένο μέγεθος

όγκου, χειρότερη ιστολογία και μεγαλύτερο αριθμό λεμφαδενικών μεταστάσεων . Οι θεραπευτικές στρατηγικές επηρεάζονται περαιτέρω από τις αλλαγές στην κατάσταση HER2 μετά τη μετάσταση. Η απώλεια του HER2 είναι πιο διαδεδομένη σε μεταστατικούς όγκους, ιδίως σε περιπτώσεις εγκεφαλικών μεταστάσεων, όπου η αντίσταση του όγκου είναι αυξημένη λόγω των προκλήσεων στη διείσδυση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Κατά συνέπεια, οι ασθενείς με εγκεφαλικές μεταστάσεις συχνά αποκλείονται από κλινικές δοκιμές κατά του HER2 (114)(115).

#### 4.1.8 Πρωτεΐνη όγκου P53

Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο TP53, διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση που σχετίζεται με τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, τη διαφοροποίηση, τη γήρανση, την απόπτωση, την επιδιόρθωση του DNA και την κυτταρική ανάπτυξη (116)(117). Η αποικοδόμησή της συνδέεται άμεσα με το σχηματισμό, την εξέλιξη και τη μετάσταση των όγκων, καθιστώντας το σημαντικό κατασταλτικό παράγοντα των όγκων (117).

Το γονίδιο TP53 είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο στον καρκίνο του μαστού οποίο υπάρχει στο 30-35% των πρωτοπαθών διηθητικών περιπτώσεων . Οι μεταλλάξεις του TP53 ποικίλλουν ανάλογα με τους υποτύπους της BC, με το 80% να εμφανίζεται σε τριπλά αρνητικούς καρκίνους του μαστού (TNBC) και το 70% σε HER2-θετικές περιπτώσεις . Λόγω της υψηλής επίπτωσης του TNBC, οι μεταλλάξεις TP53 χρησιμεύουν ως κρίσιμος βιοδείκτης στην κλινική πρακτική και ως δυνητικός θεραπευτικός στόχος (118).

Το TP53, όπως και το BRCA1, διαθέτει σημαντικές δυνατότητες ως μοριακή υπογραφή κινδύνου καρκίνου. Αυτά τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, BRCA1 και TP53, χρησιμεύουν ως πιθανοί βιοδείκτες για την έγκαιρη εκτίμηση του κινδύνου, την επιτήρηση και την προδιάθεση για καρκίνο του μαστού. Αποτελούν επίσης θεραπευτικούς στόχους για χημειοπροφύλαξη και στοχευμένες θεραπείες (119).

#### 4.1.9 Ενεργοποιητής πλασμινογόνου ουροκινάσης (uPA) και αναστολέας του ενεργοποιητή πλασμινογόνου 1 (PAI-1)

Παίζοντας σημαντικό ρόλο στην αιμόσταση και συμμετέχοντας στην εξέλιξη του καρκίνου, η πρωτεάση uPA και ο αναστολέας της PAI-1 ευθύνονται κυρίως για τη διευκόλυνση της

μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων μέσω της ικανότητάς τους να αποδομούν την εξωκυτταρική μήτρα (120). Προβλέποντας μειωμένη επιβίωση και ανταπόκριση στη θεραπεία σε πρώιμο καρκίνο του μαστού, έχουν παρατηρηθεί υψηλά ενδοαυλικά επίπεδα ετερομερών του ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (uPA) - αναστολέα ενεργοποιητή πλασμινογόνου-1 (PAI-1). Ωστόσο, ο παθογενετικός ρόλος αυτού του πρωτεϊνικού συμπλέγματος παραμένει ασαφής (121).

Στην κλινική πρακτική ρουτίνας, η uPA/PAI-1 χρησιμοποιείται μαζί με άλλους βιοδείκτες για την καθοδήγηση των θεραπευτικών επιλογών. Ωστόσο, επί του παρόντος δεν θεωρείται επαρκής για να υποκαταστήσει τις καθιερωμένες παραμέτρους στην κλινική πρακτική. Οι βιοδείκτες του καρκίνου του μαστού uPA και PAI-1 αξιολογούν την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας (CT) σε ασθενείς με HER2-αρνητικό, θετικό υποδοχέα οιστρογόνων, χαμηλού ή ενδιάμεσου βαθμού, καθορίζοντας τα πιθανά οφέλη της (122).

## 4.2 Άλλοι γενετικοί βιοδείκτες

### 4.2.1 BRCA1/BRCA2

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια BRCA1 και BRCA2 διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA μέσω της οδού του ομόλογου ανασυνδυασμού. Η απώλεια της λειτουργίας τους οδηγεί σε αναποτελεσματική επιδιόρθωση του DNA, οδηγώντας σε αυξημένα ποσοστά μεταλλάξεων και συμβάλλοντας στην ανάπτυξη όγκων (123). Συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών (124), οι μεταλλάξεις γεννητικής γραμμής σε αυτά τα γονίδια οδηγούν σε μέσο αθροιστικό κίνδυνο καρκίνου του μαστού 72% και 69% στην ηλικία των 80 ετών για τα BRCA1 και BRCA2, αντίστοιχα (114). Υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα σχετικά με την προγνωστική και προγνωστική αξία των μεταλλάξεων BRCA στην επιβίωση των ασθενών με μη μεταστατικό BC (125).

Μελέτες δείχνουν ότι οι γυναίκες που φέρουν μεταλλάξεις BRCA1/BRCA2 και υποβάλλονται σε αμφοτερόπλευρη μαστεκτομή έχουν λιγότερες πιθανότητες να πεθάνουν από καρκίνο του μαστού σε σχέση με εκείνες που υποβλήθηκαν σε μονόπλευρη μαστεκτομή. Οι γυναίκες που φέρουν μεταλλάξεις BRCA έχουν περισσότερες πιθανότητες να αναπτύξουν δευτερογενή καρκίνο και συνιστάται η διμερής μαστεκτομή (126).

#### 4.2.2 PTEN (Phosphatase and tensin homolog)

Το PTEN (Phosphatase and tensin homolog), ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που μεταβάλλεται ευρέως στον ανθρώπινο καρκίνο συμπεριλαμβανομένου του BC, θεωρείται ένα από τα πιο συχνά επηρεαζόμενα γονίδια. Ο εγγενής του ρόλος στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, την κυτταρική ανάπτυξη και την επιβίωση είναι καθοριστικός. Ενώ οι περισσότερες μελέτες δεν έχουν αναφέρει σύνδεση μεταξύ της απώλειας του PTEN και της πρόγνωσης σε ασθενείς με BC που συμμετέχουν σε κλινικές δοκιμές, πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η υπορύθμιση της έκφρασης του PTEN μπορεί να συνδέεται με χειρότερη έκβαση σε BC HR+/HER2- ή HER2+ (127).

Οι σωματικές μεταλλάξεις είναι η κύρια αιτία της απενεργοποίησης του PTEN. Σχεδόν στο ήμισυ όλων των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού αναφέρεται απώλεια της δραστηριότητας του PTEN, η οποία οφείλεται σε πρωτεϊνικές, γενετικές ή επιγενετικές μεταβολές. Αυτή η αδρανοποίηση οδηγεί στην υπερβολική ενεργοποίηση του ογκογόνου μονοπατιού PI3K/Akt, διεγείροντας την κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση. Στα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα του μαστού, τα επίπεδα PTEN είναι σημαντικά χαμηλότερα από ό,τι στα τοπικά καρκινικά κύτταρα, ευνοώντας τον πολλαπλασιασμό, την εισβολή και τη μετάσταση. Τα καρκινικά κύτταρα με διαγραφές ή μεταλλάξεις του PTEN παρουσιάζουν σημαντικά αυξημένη δραστηριότητα μετανάστευσης και εισβολής (128)(129).

Ενώ υπάρχουν ενδείξεις για συσχέτιση μεταξύ της λειτουργικής κατάστασης του PTEN, της κλινικής έκβασης και της ανταπόκρισης σε διάφορες θεραπείες, δεν υπάρχουν ισχυρά δεδομένα για να καθοριστεί επαρκώς ο προβλεπτικός/προγνωστικός του ρόλος στο BC. Επομένως, η συσχέτιση μεταξύ της λειτουργικής κατάστασης του PTEN, της κλινικής έκβασης και της ανταπόκρισης σε διάφορες θεραπείες έχει κάποια στοιχεία, αλλά λείπουν ισχυρά δεδομένα για να καθοριστεί επαρκώς ο προβλεπτικός/προγνωστικός του ρόλος στο BC (127).

#### 4.2.3 CDH1 gene

Το μόριο κυτταρικής προσκόλλησης E-cadherin, που καταστέλλει την εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων κωδικοποιείται από το γονίδιο CDH1 (130). Η μειωμένη έκφραση και λειτουργία της E-καντερίνης, που συνδέεται με τη μετάσταση του καρκίνου, προέρχεται από την απώλεια της κυτταρικής προσκόλλησης. Η απώλεια αυτή οδηγεί σε αυξημένη

κινητικότητα των κυττάρων, επιτρέποντας στα καρκινικά κύτταρα να εισβάλλουν σε κοντινούς ιστούς διασχίζοντας τη βασική μεμβράνη (131). Στο HER2- και ER-αρνητική BC, η υπερμεθυλίωση του CDH1 είναι γενικά αυξημένη, χωρίς να παρουσιάζει συσχέτιση με την κατάσταση PR. Οι ασθενείς με υπερμεθυλίωση του CDH1-προαγωγέα αντιμετωπίζουν 5,83 φορές αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης BC. Επιπλέον, η δυσλειτουργία του CDH1 μπορεί να οδηγήσει σε χειρότερη πρόγνωση και χαμηλότερη επιβίωση (131).

Υποστηρίζοντας τις συσχετίσεις της υπερμεθυλίωσης του CDH1 και της μετάστασης μελέτη έδειξε ότι το CDH1 ήταν το πιο συχνό μεθυλιωμένο γονίδιο (90%) σε περιπτώσεις με μετάσταση σε λεμφαδένες φρουρούς (132). Η υπερμεθυλίωση του CDH1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για το μεταστατικό δυναμικό του όγκου (133).

#### 4.2.4 PALB2 (partner and localizer of BRCA2)

Συμμετέχοντας στη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος, το PALB2 (συνεργάτης και εντοπιστής του BRCA2) χρησιμεύει ως καταστολέας όγκων. Η παρουσία παθογόνων παραλλαγών αυξάνει τον σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης BC κατά 2-30 (134). Οι ασθενείς με γεννητική μετάλλαξη PALB2 εμφανίζουν αθροιστικό κίνδυνο καρκίνου του μαστού 35% μέχρι την ηλικία των 70 ετών και η 10ετής επιβίωσή τους είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με τα άτομα χωρίς μεταλλάξεις PALB2 (135). Στο μεταστατικό BC, το PALB2 συγκαταλέγεται μεταξύ των οκτώ γονιδίων που μεταλλάσσονται συνήθως (136). Η χαμηλότερη συνολική επιβίωση παρατηρήθηκε σε σχεδόν 2800 ασθενείς με BC στην Κίνα με παθογενετικές παραλλαγές PALB2 (137).

#### 4.2.5 BRIP1 gene (breast cancer 1 interacting helicase 1)

Η διατήρηση της σταθερότητας του γονιδιώματος βασίζεται στον ουσιαστικό ρόλο του γονιδίου BRIP1 (breast cancer 1 interacting helicase 1) στην επιδιόρθωση των διασταυρούμενων δεσμών του DNA. Το BRIP1, όταν μεταλλάσσεται ή υπερεκφράζεται, αναδεικνύεται ως ισχυρός υποψήφιος για την εξέλιξη του όγκου και σχετίζεται με την εμφάνιση του καρκίνου του μαστού. Παίζοντας κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της γενετικής πληροφορίας ενός κυττάρου και λειτουργώντας ως καταστολέας όγκων, το BRIP1 δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με το BRCA1 και να επιδιορθώσει το κατεστραμμένο DNA εάν είναι ελλιπές ή χαμένο (138). Σε οικογένειες χωρίς μεταλλάξεις BRCA1/BRCA2, το BRIP1 θα μπορούσε

ενδεχομένως να είναι το γονίδιο που εμπλέκεται στην έναρξη του καρκίνου του μαστού (139).

Η υπερέκφραση του BRIP1 έχει συνδεθεί με τους υποτύπους όγκων του μαστού, την κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή και την επιβίωση των ασθενών με BC. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το BRIP1 θα μπορούσε να χρησιμεύσει όχι μόνο ως προγνωστικός μοριακός βιοδείκτης για την ανάπτυξη και την πρόγνωση του BC, αλλά και να λειτουργήσει ενδεχομένως ως κρυφός θεραπευτικός στόχος (138).

#### 4.2.6 BARD1(BRCA1-associatedringdomain1)

Η BARD1 (BRCA1-associated ring domain 1) είναι απαραίτητη για την επιδιόρθωση βλαβών του DNA που σχετίζονται με την ευαισθησία στον καρκίνο του μαστού και αποτελεί πρωτεΐνη-συνεργάτη του BRCA1 (140). Αντοχή στη χημειοθεραπεία, συμπεριλαμβανομένης της σισπλατίνης και της αδριαμυκίνης παρατηρείται σε ανθεκτικά στην ταμοξιφαίνη κύτταρα του μαστού που εκφράζουν σημαντικά περισσότερο BARD1 και BRCA1. Επιπλέον, η υψηλότερη έκφραση των BARD1 και BRCA1 συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού, ιδίως σε εκείνους που υποβάλλονται σε ακτινοθεραπεία (141).

#### 4.2.7 Μικροδορυφόροι DNA ως καρκινικοί δείκτες

Οι μικροδορυφόροι, που αποτελούνται από σύντομες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στο DNA, παρουσιάζουν αστάθεια επαναλήψεων γνωστή ως αστάθεια μικροδορυφορικών επαναλήψεων (MSI). Αυτός ο φαινότυπος συνδέεται συνήθως με την απενεργοποίηση των γονιδίων επιδιόρθωσης αναντιστοιχιών του DNA (MMR). Έχει ως αποτέλεσμα αυξημένες μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου σε ορισμένα γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο, συμβάλλοντας τελικά στην ανάπτυξη όγκων (142). Η μοριακή διάγνωση του MSI μπορεί να περιλαμβάνει τεχνολογίες αλληλούχισης του DNA ή PCR, οδηγώντας σε αυξημένη ακρίβεια (143). Έχουν αναπτυχθεί δοκιμασίες ψηφιακής PCR (ddPCR) πολλαπλών σταγονιδίων, οι οποίες αποδεικνύουν ότι η MSI μπορεί να αποτελέσει δείκτη για ανοσοθεραπεία. Αυτές οι δοκιμασίες στοχεύουν σε τέσσερις μικροδορυφόρους καρκίνου του μαστού (144). Σε αντίθεση με τους περισσότερους τύπους όγκων που απαιτούν



περιορισμένο αριθμό δεικτών για ακριβή διάγνωση, η διάγνωση του καρκίνου του μαστού με τη χρήση προκαθορισμένων ομάδων μικροδορυφόρων παραμένει πρόκληση (142).

#### 4.2.8 Αυτοαντισώματα ως καρκινικοί δείκτες

Η παραγωγή αυτοαντισωμάτων (AABs) που στρέφονται κατά αυτοαντιγόνων μπορεί να προκληθεί από καρκίνους, οδηγώντας σε ανοσολογική απόκριση. Αυτά τα AABs, γνωστά για τη σταθερότητα και την αντοχή τους στην πρωτεόλυση σε σύγκριση με άλλες πρωτεΐνες του ορού, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αισθητήρες για την παρακολούθηση πρωτεωμικών αλλαγών που σχετίζονται με τη νόσο. Ως διαγνωστικοί δείκτες για την έγκαιρη ανίχνευση διαθέτουν πολλά ελκυστικά χαρακτηριστικά. Παρουσιάζουν επίμονη απόκριση με την πάροδο του χρόνου, κυκλοφορώντας για μεγάλα χρονικά διαστήματα, σε αντίθεση με τα αντιγόνα όγκων, τα οποία υποφέρουν από χαμηλές συγκεντρώσεις και σύντομο χρόνο κυκλοφορίας λόγω αποικοδόμησης και ταχείας κάθαρσης. Αυτό καθιστά την επεξεργασία των δειγμάτων πολύ ευκολότερη (145).

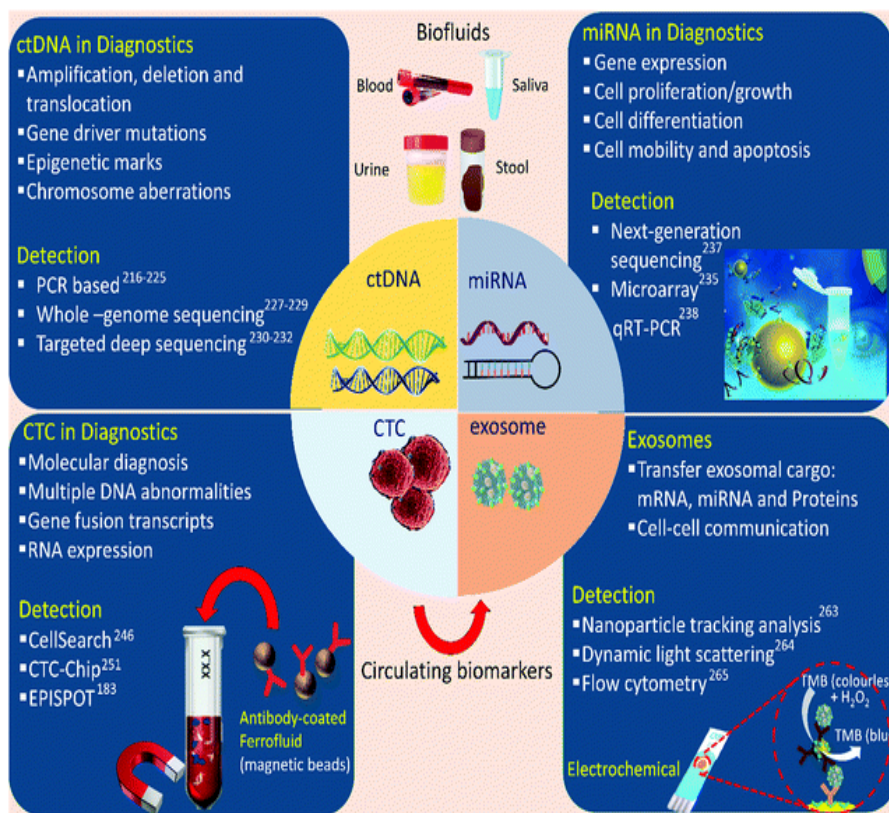
Για την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του μαστού έχουν αναγνωριστεί πολλαπλά AAB ειδικά για τον καρκίνο του μαστού. Τα πάνελ αυτοαντισωμάτων, παρά το γεγονός ότι τα μεμονωμένα αυτοαντισώματα επιδεικνύουν φτωχή απόδοση στον πληθυσμιακό έλεγχο, έχουν εμφανίσει ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Ο προσυμπτωματικός έλεγχος για τον καρκίνο του μαστού με τη χρήση της σύγχρονης ψηφιακής μαστογραφίας επιτυγχάνει ευαισθησία 86,9% (146). Μέχρι στιγμής, κανένα από τα πάνελ αυτοαντισωμάτων που έχουν αναφερθεί για τον καρκίνο του μαστού δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αυτόνομος ανιχνευτικός έλεγχος, αλλά μπορεί να αποδειχθεί επωφελής όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τον συνήθη μαστογραφικό έλεγχο (147).

## 5. Υγρή βιοψία: το μέλλον στη διάγνωση του καρκίνου του μαστού

Οι τρέχουσες τεχνικές χρυσού κανόνα για την καθοδήγηση της θεραπείας του καρκίνου του μαστού είναι η βιοψία ιστού και η ανοσοϊστοχημεία- ωστόσο, δεν επαρκούν για την αξιολόγηση της μοριακής ετερογένειας του όγκου. Για να αντιμετωπιστούν αυτές οι βιολογικές και κλινικές πολυπλοκότητες, η εξατομικευμένη ιατρική επιδιώκει να προχωρήσει. Μέσω της προόδου των τεχνικών και των υπολογιστικών αναλύσεων, η υγρή βιοψία εφαρμόζεται όλο και περισσότερο με αυξημένη ευαισθησία, ειδικότητα και ακρίβεια. Αυτή

η πρόδος σηματοδοτεί μια νέα εποχή στην ιατρική ακριβείας, η οποία επικεντρώνεται στην εξατομικευμένη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, τον έγκαιρο έλεγχο, την ακριβή διάγνωση και πρόγνωση, την ανίχνευση υποτροπών, τη διαχρονική παρακολούθηση και την επιλογή φαρμάκων (148).

Η υγρή βιοψία περιλαμβάνει τη δειγματοληψία συστατικών καρκινικών κυττάρων που απελευθερώνονται στο αίμα, τα ούρα, τα κόπρανα, το σάλιο και άλλες βιολογικές ουσίες. Τα συστατικά αυτά περιλαμβάνουν κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), κυκλοφορούν DNA όγκου (ctDNA) ή κυκλοφορούν RNA όγκου (ctRNA), αιμοπετάλια και εξωσώματα (149). Οι βιοδείκτες όγκου καθιστούν δυνατή την ακριβή διάκριση μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών με καρκίνο καθώς είναι συγκεκριμένοι. Επιπλέον, η υγρή βιοψία προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τη βιοψία όγκου. Για παράδειγμα, επιτρέπει ευκολότερη πρόσβαση, είναι λιγότερο επώδυνη και επιτρέπει την αξιολόγηση της ετερογένειας του όγκου με την απελευθέρωση δεικτών από όλες τις περιοχές του όγκου στο αίμα (150).



Εικόνα 7. Μια νέα διαγνωστική έννοια, η υγρή βιοψία, προσφέρει κρίσιμες πληροφορίες για την παρακολούθηση και τον εντοπισμό των γονιδιωμάτων των όγκων σε δείγματα υγρών του σώματος. Ο έλεγχος του καρκίνου, η διάγνωση σε πρώιμο στάδιο και η αξιολόγηση της ανταπόκρισης

στη θεραπεία διευκολύνονται με ελάχιστα επεμβατικά μέσα, μέσω της ανίχνευσης βιομορίων που σχετίζονται με την προέλευση του όγκου, όπως τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), κυκλοφορούντα ειδικά για τον όγκο νουκλεϊκά οξέα (συμπεριλαμβανομένου του κυκλοφορούντος DNA του όγκου (ctDNA), του κυκλοφορούντος RNA του όγκου (ctRNA)), των *microRNAs* (miRNAs), των μακρών μη κωδικοποιημένων RNAs (lnRNAs), των εξωσωμάτων και των αυτοαντισωμάτων στο αίμα, το σάλιο, τα κόπρανα, τα ούρα κ.λπ. Πηγή : *liquid biopsy : Soda N, BerRehm BHA, Sonar P, Nguyen NT, Shiddiky MJA. (2019) Advanced liquid biopsy technologies for circulating biomarker detection.*

## 5.1 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs)

Τα καρκινικά κύτταρα που απομακρύνονται από τις βλάβες των συμπαγών όγκων, γνωστά ως κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTC), παραμένουν στην κυκλοφορία του αίματος. Αποτελούν έναν κρίσιμο πληθυσμό πρόδρομων μεταστατικών κυττάρων που είναι απαραίτητοι για τον εντοπισμό της εξέλιξης της νόσου. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στο πλαίσιο της διαλογής για τον καρκίνο του μαστού με τη χρήση υγρής βιοψίας (151).

Έχουν προκύψει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα από τη χρήση των CTCs ως μη επεμβατικών βιοδεικτών στην έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του μαστού. Αναπτύχθηκε μια ταχεία και ιδιαίτερα ευαίσθητη διαγνωστική μέθοδος, η οποία χρησιμοποιεί την τεχνολογία ανιχνευτών ενεργοποιούμενων με νουκλεάση. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ ασθενών με BC και υγιών ατόμων ελέγχου μέσω της ανάλυσης πλάσματος (152).

Αρκετές μελέτες αξιολόγησαν την παρουσία των CTCs και τη δυνατότητά τους ως προγνωστικών βιοδεικτών για την ανταπόκριση στη θεραπεία ή την υποτροπή. Οι μελέτες αυτές συνέδεσαν τον υψηλό αριθμό CTC με μικρότερη επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου(153)(154–157) διαφορετική αντίσταση των θεραπειών(154)(158) χειρότερα αποτελέσματα, υποτροπή της νόσου (155)(158) και μετάσταση(159). Σε διάφορες μελέτες, η κλινική σημασία των μεσεγχυματικών κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (mCTCs) και των επιθηλιακών κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (eCTCs) έχει αξιολογηθεί μέσω διαφορετικών φαινοτύπων. Η συσχέτιση υψηλού αριθμού mCTCs, σε σύγκριση με τα eCTCs, με την προοδευτική νόσο και την ανάπτυξη μεταστάσεων έχει καταδειχθεί σε αυτές τις έρευνες, υπογραμμίζοντας τη σημασία τους στη θεραπευτική αντίσταση (154)(159).

## 5.2 Κυκλοφορούν DNA όγκου (ctDNA) / ελεύθερο DNA κυττάρων (cfDNA)

Σε άτομα με καρκίνο, το κυκλοφορούν DNA όγκου (ctDNA) είναι ένας υποπληθυσμός του κυκλοφορούντος DNA χωρίς κύτταρα (cfDNA), το οποίο είναι ένας άλλος ευρέως μελετημένος δείκτης (160). Το CtDNA, που αποτελεί ένα μικρό ποσοστό του συνολικού cfDNA, αναφέρεται σε DNA που απελευθερώνεται από κύτταρα τόσο σε υγιείς όσο και σε καρκινικούς ιστούς. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ανιχνεύσιμου ctDNA περιλαμβάνει την εξέταση παραγόντων όπως ο τύπος του όγκου, το φορτίο του όγκου και διάφορες βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της αντίστασης στη θεραπεία. Μία από τις τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος για την ανίχνευση ctDNA είναι η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS), ικανή να εντοπίζει σωματικές μεταλλάξεις, παραλλαγές του αριθμού αντιγράφων (CNV) και δομικές αναδιατάξεις. Επιπλέον, υπάρχει μια τεχνική που βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση ψηφιακής πολυμεράσης σταγονιδίων (ddPCR) και στη στοχευμένη ψηφιακή αλληλούχιση (TARDIS) (161).

Σε μία μελέτη εξετάστηκε η συσχέτιση μεταξύ των κυκλοφορούντων μορίων DNA και των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTC). Η μελέτη αξιολόγησε τη σχέση μεταξύ του αριθμού των CTC και του ελεύθερου κυτταρικού DNA (cfDNA), καθώς και των συμβατικών δεικτών καρκίνου του μαστού (CA15-3 και αλκαλική φωσφατάση (AP)). Τα ευρήματα έδειξαν μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ αυξημένου αριθμού CTC, cfDNA, CA15-3 και αλκαλικής φωσφατάσης αποδεικνύοντας χειρότερη έκβαση σε ασθενείς με μεταστατικές καταστάσεις. Επιπλέον, τα αυξημένα επίπεδα CTCs και AP αναδείχθηκαν ως δείκτες προοδευτικής νόσου. Ως πολύτιμη διαπίστωση, το κυκλοφορούν ελεύθερο κυττάρων DNA (cfDNA) αναδείχθηκε ως προγνωστικός δείκτης της θεραπευτικής ανταπόκρισης, διακρίνοντας μεταξύ ομάδων ασθενών που ανταποκρίνονται και ομάδων ασθενών που δεν ανταποκρίνονται (162).

Επιδεικνύοντας ανώτερη συσχέτιση με το φορτίο του όγκου και την πρόβλεψη της θεραπευτικής ανταπόκρισης στο μεταστατικό σενάριο, το ctDNA υπερτερεί έναντι του υδατανθρακικού αντιγόνου 15.3 (CA15.3) και των CTCs (163). Οι τρέχουσες έρευνες προτείνουν τη δυνητική χρήση των CTCs(164) και του ctDNA (165) ως εναλλακτική λύση για την αξιολόγηση της ορμονικής κατάστασης και της κατάστασης HER2 στον προχωρημένο καρκίνο του μαστού. Η υγρή βιοψία, μια μη επεμβατική και εύκολα επαναλαμβανόμενη

προσέγγιση δειγματοληψίας, εξετάζεται για τον σκοπό αυτό. Ωστόσο, οι κύριες κατευθυντήριες γραμμές δεν συνιστούν επί του παρόντος αυτή τη στρατηγική, καθώς δεν διαθέτει κλινική επικύρωση.

### 5.3 Ελεύθερο κυττάρων RNA (cfRNA / miRNAs /incRNAs)

Η ταυτοποίηση των μορίων mRNA και miRNA στα σωματικά υγρά έχει καταστεί δυνατή με την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών και πιο ευαίσθητων μεθόδων. Τα μόρια αυτά μπορούν να βρεθούν σε σύμπλοκα ριβονουκλεοπρωτεϊνών, αιμοπετάλια ή CTCs και εξωκυτταρικά κυστίδια, συμπεριλαμβανομένων των εξωσωμάτων (166).

Μελετάται διεξοδικά η ανίχνευση και η παραμονή των miRNAs στην κυκλοφορία του αίματος, καθώς και ο ρόλος τους στις διαγνωστικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις. Τα miRNAs, μικρά RNAs (20-25 νουκλεοτίδια) είναι μονόκλωνα μη κωδικοποιητικά και καταστέλλουν τη μετα-μεταγραφική έκφραση ειδικά επιλεγμένων γονιδίων μέσω της διάσπασης του mRNA ή της έκφρασης του mRNA (167). Σε δύο μορφές, τα miRNAs μπορούν να ταξιδέψουν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος: ενσωματωμένα σε μεμβρανικά κυστίδια, μικροκυψελίδες ή εξωσώματα, ή χωρίς κύτταρα (168). ως ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά του καρκίνου, τα cfRNAs μπορούν να προσφέρουν πληροφορίες σχετικά με το προφίλ γονιδιακής έκφρασης του όγκου. Τα miRNAs, που αντικατοπτρίζουν επιγενετικές μεταβολές, έχουν επίσης αναδειχθεί ως ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου (169). Η χρήση miRNAs από δείγματα υγρής βιοψίας έχει το κύριο πλεονέκτημα ότι είναι πιο σταθερά από τα mRNAs. Επιπλέον, τα miRNAs, τα οποία είναι ειδικά για κάθε ιστό, διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση διαφόρων σημαντικών στόχων που σχετίζονται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου (170).

Ο εντοπισμός ελάχιστα επεμβατικών βιοδεικτών για την πρώιμη διάγνωση του καρκίνου του μαστού μέσω της ανίχνευσης μοριακών προφίλ microRNA αποτελεί πολύτιμη ευκαιρία. Σε τρεις ξεχωριστές μελέτες αξιολογήθηκαν προφίλ έκφρασης miRNA στον ορό ασθενών με BC και υγιών γυναικών. Η αρχική μελέτη κατέδειξε την αποτελεσματικότητα ενός συνδυασμού πέντε miRNAs (miR-1246, miR-1307-3p, miR-4634, miR-6861-5p και miR-6875-5p) στην ανίχνευση του BC, με ευαισθησία 97,3%, ειδικότητα 82,9% και συνολική ακρίβεια 89,7%. Είναι αξιοσημείωτο ότι ο συνδυασμός αυτός παρουσίασε ευαισθησία 98,0% για τον εντοπισμό ατόμων με BC σε πρώιμο στάδιο, συγκεκριμένα με

καρκίνωμα *in situ* (171). Στη συνέχεια, μια άλλη μελέτη επέκτεινε τα ευρήματα της πρώτης μελέτης με τον εντοπισμό διαφορικών προφίλ κυκλοφορούντων miRNA (miR-21, miR-125b, miR-451 και miR-155) στο αίμα και τα ούρα ασθενών με BC. Αυτό επέτρεψε την ακριβή διάκριση μεταξύ ασθενών με τοπική BC και υγιών γυναικών. Ειδικότερα, η μελέτη αυτή τόνισε την αξιοπιστία και την αναπαραγωγικότητα των αναλύσεων που περιλαμβάνουν δείγματα ούρων (172). Επιπλέον, μια τρίτη μελέτη επικεντρώθηκε στον εντοπισμό της διαφορικής έκφρασης τεσσάρων ct-miRNAs (miR-424, miR-423, miR-660 και let7-i) στα ούρα ασθενών με BC. Αυτό το συγκεκριμένο σύνολο miRNAs διέκρινε επιτυχώς τους ασθενείς με BC από τους υγιείς μάρτυρες, αναδεικνύοντας περαιτέρω τις δυνατότητες των προσεγγίσεων που βασίζονται σε miRNA στην έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου (173).

Οι δυνητικοί καρκινικοί δείκτες είναι άφθονοι σε πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του BC, ως lncRNAs που προέρχονται από εξωσώματα πλάσματος (174). Η μελέτη που αναλύθηκε επικεντρώθηκε στο εξωσωματικό lncRNA H19 του ορού, ένα ογκογονίδιο που συνδέεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την εισβολή και την απόπτωση. Αυτός ο βιοδείκτης, ο οποίος έχει ήδη αναφερθεί για την παρακολούθηση της εξέλιξης του καρκίνου του μαστού παρουσίασε σημαντική ρύθμιση της έκφρασης του εξωσωματικού H19 στον ορό των ασθενών με καρκίνο του μαστού σε σύγκριση με εκείνους χωρίς κακοήθεια. Οι συγγραφείς παρατήρησαν ότι αυτός ο πολλά υποσχόμενος διαγνωστικός δείκτης ξεπέρασε τους τυπικούς δείκτες, τονίζοντας τη δυνητική του σημασία (175).

## 5.4 Εξωσώματα

Εκκρινόμενα από διάφορα είδη κυττάρων, τα εξωσώματα είναι μεμβρανικά κυστίδια ενδοκυτταρικής προέλευσης με διάμετρο 40-100nm. Περιέχουν ένα ευρύ φάσμα φορτίων, συμπεριλαμβανομένων νουκλεϊκών οξέων (π.χ. DNA, mRNA, miRNA, μακρύ και βραχύ μη κωδικοποιούμενο RNA), πρωτεϊνών (π.χ. κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες θερμικού σοκ) και ενζύμων (GAPDH, ATPase, pgk1) (176). Μεταφέροντας γενετικές πληροφορίες, τα εξωσώματα έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν τις κυτταρικές δραστηριότητες στα κύτταρα-δέκτες (177).

Η διερεύνηση των εξωσωμάτων στην καρκινογένεση και την εξέλιξη του καρκίνου έχει γνωρίσει σημαντική αύξηση στην πρόσφατη έρευνα, η οποία περιλαμβάνει την ανοσοκαταστολή, την αγγειογένεση, την κυτταρική μετανάστευση και την εισβολή (177)(178).

Τα εξωσώματα, ικανά να μεταφέρουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα σε κύτταρα-δέκτες εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου ή σε απομακρυσμένες περιοχές, χρησιμεύουν ως εργαλείο για τα καρκινικά κύτταρα ώστε να προσδώσουν έναν κακοήγη φαινότυπο σε φυσιολογικά κύτταρα (179). Τα εξωσώματα που προέρχονται από τον όγκο, τα οποία λαμβάνονται από τα σωματικά υγρά των ασθενών και περιέχουν miRNA και πρωτεΐνες, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου (180). Η αναγνώριση αυτών των χαρακτηριστικών τοποθετεί τα εξωσώματα ως πιθανούς βιοδείκτες για υγρή βιοψία, προσφέροντας σημαντικές υποσχέσεις για την έγκαιρη διάγνωση της νόσου και την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας ελλείψει δειγμάτων ιστού.

Τα εξωσώματα που προέρχονται από τον καρκίνο βρέθηκαν να συσσωρεύονται εντός των καρκινικών κυττάρων και ήταν ανιχνεύσιμα στον ορό, τις πλευριτικές συλλογές, τα ούρα και το ασκίτικό υγρό ατόμων με καρκίνο. Οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων εξωσωματικών βιοδεικτών που υπάρχουν στα σωματικά υγρά ασθενών με καρκίνο υποδηλώνουν τη δυνητική χρήση των εξωσωμάτων ως πρώιμων δεικτών για τη διάγνωση και την παρακολούθηση της πρόγνωσης. Ειδικότερα, σε άτομα με καρκίνο του μαστού, τα επίπεδα των CEA και CA 15.3 εντός των κυκλοφορούντων εξωσωμάτων έχουν συσχετιστεί με την εξέλιξη της νόσου (181).

Το δυναμικό των εξωσωμάτων ως βιοδεικτών έχει αναδειχθεί ως μια πολλά υποσχόμενη οδός για τη διάγνωση και τη διαχείριση του καρκίνου του μαστού. Τα microRNAs (miRNAs) που ενσωματώνονται σε εξωσώματα έχουν αναγνωριστεί ως πρώιμοι ιδανικοί βιοδείκτες για τον καρκίνο του μαστού, με τα πρότυπα έκφρασής τους να συσχετίζονται με την κακοήθεια του όγκου και την πρόγνωση (182). Σε μια μελέτη που ανέλυσε την περιεκτικότητα σε microRNA από εξωσώματα πλάσματος ασθενών, η qRT-PCR και η αλληλούχιση μικρών RNA αποκάλυψαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα miR-21 και miR-1246 σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες (183). Διάφορα miRNAs έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με τον υπότυπο και το στάδιο του όγκου του μαστού. Για παράδειγμα, το εξωσωματικό MiR-939 παρουσιάζει υψηλή έκφραση σε υποτύπους όγκων βασικής μορφής και συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση σε τριπλά αρνητικούς καρκίνους του μαστού (183). Έρευνες έχουν δείξει ότι τα μειωμένα επίπεδα συγκεντρώσεων εξωσωματικού miR-101 σχετίζονται με καρκίνο θετικό σε λεμφαδένες, ενώ τα επίπεδα του miR-373 ρυθμίζονται σημαντικά σε ασθενείς με τριπλά αρνητικό και ER- και PR-αρνητικό καρκίνο του μαστού (184).

Συγκρίνοντας τα εξωσώματα που προέρχονται από τον όγκο κατά την έναρξη, τα στάδια πριν από τη θεραπεία και τα στάδια μετά τη θεραπεία κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης και συσχετίζοντας τα τόσο με την κλινική όσο και με την παθολογική ανταπόκριση, ενδέχεται να είναι δυνατή η πρόβλεψη της θεραπευτικής ανταπόκρισης και της πρόγνωσης των ασθενών.

## 6. Προφίλ γονιδιακής έκφρασης

Η θεραπεία για τον καρκίνο του μαστού αρχικού σταδίου περιλαμβάνει επικουρική συστηματική θεραπεία, η οποία περιλαμβάνει χημειοθεραπεία, ενδοκρινική θεραπεία και παράγοντες που στοχεύουν στον υποδοχέα 2 του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (HER2), είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό (185). Στην κλινική διαχείριση, ο προσδιορισμός του βιολογικού προφίλ ενός όγκου βοηθά στην επιλογή της θεραπείας. Οι γονιδιωματικές εξετάσεις παίζουν ρόλο στην πρόβλεψη των κλινικών αποτελεσμάτων και στην υποστήριξη της λήψης αποφάσεων σχετικά με τις θεραπευτικές στρατηγικές (186)(187).

### 6.1 MammaPrint® και Blueprint®

Το MammaPrint®, μια υπογραφή 70 γονιδίων, η οποία παρέχει μια διμερή ταξινόμηση της πρόγνωσης του όγκου ("υψηλού κινδύνου" ή "χαμηλού κινδύνου")(188) Το MammaPrint® έχει σχεδιαστεί για να αξιολογεί τον κίνδυνο απομακρυσμένης υποτροπής εντός 5 και 10 ετών και να καθορίζει την καταλληλότητα για χημειοθεραπεία και απευθύνεται σε γυναίκες πριν και μετά την εμμηνόπαυση με καρκίνο του μαστού σταδίου 1 ή 2. Εφαρμόζεται σε όγκους έως 5 cm και περιλαμβάνει τόσο την αρνητική σε λεμφαδένες όσο και τη θετική σε λεμφαδένες νόσο (έως τρεις θετικούς λεμφαδένες). Ειδικότερα, η εξέταση αυτή εφαρμόζεται ανεξάρτητα από την κατάσταση του υποδοχέα οιστρογόνων και του υποδοχέα 2 του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (189).

### 6.2 Oncotype DX®

Το Oncotype DX® έχει σχεδιαστεί για την πρόβλεψη της υποτροπής του καρκίνου μετά από θεραπεία σε γυναίκες πριν και μετά την εμμηνόπαυση με πρώιμο στάδιο ER+/HER2- BC και είτε LN- είτε LN+ (έως τρεις θετικούς λεμφαδένες) (189). Η εξέταση αξιολογεί την



έκφραση 21 γονιδίων, με 16 γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο και την επιβίωση χωρίς απομακρυσμένη υποτροπή και 5 που χρησιμεύουν ως γονίδια αναφοράς για την ομαλοποίηση (187). Το σκορ υποτροπής (RS) καθορίζεται από έναν αλγόριθμο που βασίζεται στα δεδομένα έκφρασης αυτών των γονιδίων και κυμαίνεται από 0 έως 100. Αυτό το RS ποσοτικοποιεί τον κίνδυνο υποτροπής σε 10 έτη, υποθέτοντας 5 έτη ενδοκρινικής θεραπείας. Το τεστ καθοδηγεί τη συνταγογράφηση χημειοενδοκρινικών φαρμάκων για την πρώιμη θεραπεία της ER+/HER2- BC, με τα τρέχοντα σημεία αποκοπής να ορίζονται σε <18 (χαμηλός κίνδυνος), μεταξύ 18 και 30 (ενδιάμεσος κίνδυνος) και ≥31 (υψηλός κίνδυνος) (189).

### 6.3 Prosigna® (PAM50)

Η δοκιμασία Prosigna® Breast Cancer Assay (PAM50) προσδιορίζει την ομάδα κινδύνου (χαμηλή, ενδιάμεση ή υψηλή), τον κίνδυνο υποτροπής και τον ενδογενή υποτύπο του όγκου (luminal A, luminal B, HER2 ή βασικός τύπος). Αυτή η εξέταση, η οποία έχει σχεδιαστεί για μετεμμηνοπαυσιακές ασθενείς με ER+/HER2- και αρνητικό σε λεμφαδένες πρώιμο καρκίνο του μαστού ή θετικό σε λεμφαδένες, με περιορισμό σε τρεις θετικούς λεμφαδένες, αποσκοπεί στην παροχή πληροφοριών σχετικά με τον υποτύπο του BC και στην πρόβλεψη της 10ετούς επιβίωσης χωρίς απομακρυσμένη υποτροπή (189).

Το PAM50 αξιολογεί την έκφραση πενήντα γονιδίων για την υποτυποποίηση, οκτώ εσωτερικών γονιδίων για την ομαλοποίηση του σήματος, έξι για θετικούς ελέγχους και οκτώ για αρνητικούς ελέγχους. Χρησιμοποιώντας αυτά τα δεδομένα, το Prosigna® υπολογίζει τον κίνδυνο απομακρυσμένης υποτροπής εντός 10 ετών, υποθέτοντας 5 χρόνια ενδοκρινικής θεραπείας. Ο προσδιορισμός αυτός βασίζεται στην υπογραφή των γονιδίων PAM50 και στα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένου του μεγέθους του όγκου, της κατάστασης των όζων και της βαθμολογίας πολλαπλασιασμού. Η βαθμολογία πολλαπλασιασμού, η οποία λαμβάνεται με την αξιολόγηση πολλαπλών γονιδίων που σχετίζονται με την οδό πολλαπλασιασμού, συμβάλλει σε αυτή την εκτίμηση κινδύνου. Η βαθμολογία PAM50, που κυμαίνεται από 0 έως 100, μαζί με την κατάσταση των κόμβων, κατηγοριοποιεί τα δείγματα σε ομάδες κινδύνου: 1) αρνητικοί λεμφαδένες-χαμηλός κίνδυνος (0 έως 40), ενδιάμεσος κίνδυνος (41 έως 60) ή υψηλός κίνδυνος (61 έως 100) και 2)

θετικοί λεμφαδένες (έως τρεις θετικοί λεμφαδένες)-χαμηλός κίνδυνος (0 έως 15), ενδιάμεσος κίνδυνος (16 έως 40) ή υψηλός κίνδυνος (41 έως 100) (189).

## 6.4 Breast Cancer Index®

Η δοκιμασία Breast Cancer Index® (BCI) είναι μια αλγοριθμική υπογραφή με βάση την έκφραση γονιδίων που αποτελείται από δύο ομάδες ανεξάρτητων λειτουργικών βιοδεικτών. Ο δείκτης μοριακού βαθμού (MGI), που περιλαμβάνει πέντε γονίδια (BUB1B, CENPA, NEK2, RACGAP1 και RRM2), αξιολογεί τον πολλαπλασιασμό του όγκου. Ταυτόχρονα, ο λόγος έκφρασης των γονιδίων HOXB13/IL17BR (H/I) αξιολογεί τη σηματοδότηση των οιστρογόνων (190). Η προγνωστική βαθμολογία BCI, που προκύπτει από το συνδυασμό των παραμέτρων MGI και H/I, αξιολογεί αποτελεσματικά τον κίνδυνο γενικής (0 έως 10 έτη) και όψιμης (5 έως 10 έτη) υποτροπής εξ αποστάσεως. Οι ασθενείς με HR+ καρκίνο του μαστού αντιμετωπίζουν επίμονο κίνδυνο υποτροπής, με περίπου το ήμισυ των υποτροπών της νόσου να συμβαίνουν πέραν των αρχικών πέντε ετών της επικουρικής αντιοιστρογονικής θεραπείας (191)(192).

## 7. Συμπεράσματα

Τα τελευταία χρόνια, οι πρόοδοι στη μοριακή έρευνα έχουν βελτιώσει την κατανόηση των χαρακτηριστικών του όγκου, διευρύνοντας τις γνώσεις σχετικά με τους βιοδείκτες του καρκίνου του μαστού και ενισχύοντας την εξατομικευμένη θεραπεία των ασθενών. Η παρούσα ανασκόπηση συνοψίζει παραδοσιακούς, νέους και δυνητικούς βιοδείκτες, αναδεικνύοντας την πρόοδο στον τομέα αυτό. Επί του παρόντος, οι βιοδείκτες διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη διαχείριση των ασθενών που έχουν διαγνωστεί με καρκίνο του μαστού. Ωστόσο, υπάρχει επιτακτική ανάγκη για νέους βιοδείκτες με βάση το αίμα, ιδίως για την έγκαιρη διαπίστωση της νόσου και τη διευκόλυνση της έγκαιρης διάγνωσης. Μια άλλη επείγουσα ανάγκη αφορά τον εντοπισμό και την επικύρωση βιοδεικτών για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης σε συγκεκριμένες μορφές χημειοθεραπείας.

## Αναφορές

1. Lei S, Zheng R, Zhang S, Wang S, Chen R, Sun K, et al. Global patterns of breast cancer incidence and mortality: A population-based cancer registry data analysis from 2000 to 2020. *Cancer Commun (Lond)*. 2021 Nov;41(11):1183–94.
2. Roulot A, Héquet D, Guinebretière JM, Vincent-Salomon A, Lerebours F, Dubot C, et al. Tumoral heterogeneity of breast cancer. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2016 Dec 1;74(6):653–60.
3. Donepudi MS, Kondapalli K, Amos SJ, Venkanteshan P. Breast cancer statistics and markers. *J Cancer Res Ther*. 2014;10(3):506–11.
4. Basse C, Arock M. The increasing roles of epigenetics in breast cancer: Implications for pathogenicity, biomarkers, prevention and treatment. *Int J Cancer*. 2015 Dec 15;137(12):2785–94.
5. Neagu AN, Whitham D, Buonanno E, Jenkins A, Alexa-Stratulat T, Tamba BI, et al. Proteomics and its applications in breast cancer. *Am J Cancer Res*. 2021;11(9):4006–49.
6. Freitas AJA de, Causin RL, Varuzza MB, Calfa S, Hidalgo Filho CMT, Komoto TT, et al. Liquid Biopsy as a Tool for the Diagnosis, Treatment, and Monitoring of Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2022 Sep 1;23(17).
7. Seale KN, Tkaczuk KHR. Circulating Biomarkers in Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2022 Apr;22(3):e319–31.
8. Yu D, Tong Y, Guo X, Feng L, Jiang Z, Ying S, et al. Diagnostic Value of Concentration of Circulating Cell-Free DNA in Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Front Oncol*. 2019;9:95.
9. Chae YS, Moon PG, Lee JE, Cho YE, Lee SJ, Jung JH, et al. Exosome-derived Developmental Endothelial Locus-1 as a novel diagnostic marker for breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2015 May 20;33(15\_suppl):e22262–e22262.
10. Tsimberidou AM, Fountzilas E, Nikanjam M, Kurzrock R. Review of precision cancer medicine: Evolution of the treatment paradigm. *Cancer Treat Rev*. 2020 Jun;86:102019.
11. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747–52.
12. Oeffinger KC, Fontham ETH, Etzioni R, Herzig A, Michaelson JS, Shih YCT, et al. Breast Cancer Screening for Women at Average Risk: 2015 Guideline Update From the American Cancer Society. *JAMA*. 2015 Oct 20;314(15):1599–614.
13. Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer*. 2010 Dec;17(4):R245–62.

14. Loke SY, Lee ASG. The future of blood-based biomarkers for the early detection of breast cancer. *Eur J Cancer*. 2018 Mar;92:54–68.
15. Voith von Voithenberg L, Crocetti E, Martos C, Dimitrova N, Giusti F, Randi G, et al. Cancer registries - guardians of breast cancer biomarker information: A systematic review. *Int J Biol Markers*. 2019 Jun;34(2):194–9.
16. Wu HJ, Chu PY. Recent Discoveries of Macromolecule- and Cell-Based Biomarkers and Therapeutic Implications in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 10;22(2).
17. Nalejska E, Mączyńska E, Lewandowska MA. Prognostic and predictive biomarkers: tools in personalized oncology. *Mol Diagn Ther*. 2014 Jun;18(3):273–84.
18. Hassiotou F, Geddes D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clinical Anatomy*. 2013 Jan 19;26(1):29–48.
19. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 Mar;144(5):646–74.
20. <https://pathology.jhu.edu/breast/types-of-breast-cancer>.
21. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 Sep 23;5(1):66.
22. Kashyap D, Pal D, Sharma R, Garg VK, Goel N, Koundal D, et al. Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. *Biomed Res Int*. 2022 Apr 18;2022:1–16.
23. Smolarz B, Nowak AZ, Romanowicz H. Breast Cancer-Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers (Basel)*. 2022 May 23;14(10).
24. Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Travis RC, Alberg AJ, et al. Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *Lancet Oncol*. 2013 Sep;14(10):1009–19.
25. Zhang X, Tworoger SS, Eliassen AH, Hankinson SE. Postmenopausal plasma sex hormone levels and breast cancer risk over 20 years of follow-up. *Breast Cancer Res Treat*. 2013 Feb;137(3):883–92.
26. Benz CC. Impact of aging on the biology of breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008 Apr;66(1):65–74.
27. Stat bite: Lifetime probability among females of dying of cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Jun 2;96(11):818.
28. McGuire A, Brown J, Malone C, McLaughlin R, Kerin M. Effects of Age on the Detection and Management of Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2015 May 22;7(2):908–29.

29. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease. *The Lancet*. 2001 Oct;358(9291):1389–99.
30. Shiyanbola OO, Arao RF, Miglioretti DL, Sprague BL, Hampton JM, Stout NK, et al. Emerging Trends in Family History of Breast Cancer and Associated Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2017 Dec 1;26(12):1753–60.
31. Wu HC, Do C, Andrulis IL, John EM, Daly MB, Buys SS, et al. Breast cancer family history and allele-specific DNA methylation in the legacy girls study. *Epigenetics*. 2018 Mar 4;13(3):240–50.
32. Shiovitz S, Korde LA. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Annals of Oncology*. 2015 Jul;26(7):1291–9.
33. Shahbandi A, Nguyen HD, Jackson JG. TP53 Mutations and Outcomes in Breast Cancer: Reading beyond the Headlines. *Trends Cancer*. 2020 Feb;6(2):98–110.
34. pten tumor supressor.
35. Shiovitz S, Korde LA. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Annals of Oncology*. 2015 Jul;26(7):1291–9.
36. Hill DA, Prossnitz ER, Royce M, Nibbe A. Temporal trends in breast cancer survival by race and ethnicity: A population-based cohort study. *PLoS One*. 2019 Oct 24;14(10):e0224064.
37. Desantis C, Siegel R, Jemal A, Services H, Program R. *Breast Cancer Facts & Figures 2015-2016*.
38. Albrektsen G, Heuch I, Hansen S, Kvåle G. Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births: exploring interaction effects. *Br J Cancer*. 2005 Jan 14;92(1):167–75.
39. Husby A, Wohlfahrt J, Øyen N, Melbye M. Pregnancy duration and breast cancer risk. *Nat Commun*. 2018 Oct 23;9(1):4255.
40. Ursin G, Bernstein L, Lord SJ, Karim R, Deapen D, Press MF, et al. Reproductive factors and subtypes of breast cancer defined by hormone receptor and histology. *Br J Cancer*. 2005 Aug 2;93(3):364–71.
41. Orgéas CC, Hall P, Rosenberg LU, Czene K. The influence of menstrual risk factors on tumor characteristics and survival in postmenopausal breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2008 Dec 16;10(6):R107.
42. Chen X, Wang Q, Zhang Y, Xie Q, Tan X. Physical Activity and Risk of Breast Cancer: A Meta-Analysis of 38 Cohort Studies in 45 Study Reports. *Value in Health*. 2019 Jan;22(1):104–28.
43. Hoffinan-Goetz L. Influence of Physical Activity and Exercise on Innate Immunity. *Nutr Rev*. 2009 Apr 27;56(1):S126–30.

44. Kolb R, Zhang W. Obesity and Breast Cancer: A Case of Inflamed Adipose Tissue. *Cancers (Basel)*. 2020 Jun 25;12(6):1686.
45. Sun L, Zhu Y, Qian Q, Tang L. Body mass index and prognosis of breast cancer. *Medicine*. 2018 Jun;97(26):e11220.
46. Rachdaoui N, Sarkar DK. Effects of Alcohol on the Endocrine System. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2013 Sep;42(3):593–615.
47. Zeinomar N, Knight JA, Genkinger JM, Phillips KA, Daly MB, Milne RL, et al. Alcohol consumption, cigarette smoking, and familial breast cancer risk: findings from the Prospective Family Study Cohort (ProF-SC). *Breast Cancer Research*. 2019 Dec 28;21(1):128.
48. Łukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers (Basel)*. 2021 Aug 25;13(17):4287.
49. DANDAMUDI A, TOMMIE J, NOMMSEN-RIVERS L, COUCH S. Dietary Patterns and Breast Cancer Risk: A Systematic Review. *Anticancer Res*. 2018 Jun 30;38(6):3209–22.
50. Fiolet T, Srour B, Sellem L, Kesse-Guyot E, Allès B, Méjean C, et al. Consumption of ultra-processed foods and cancer risk: results from NutriNet-Santé prospective cohort. *BMJ*. 2018 Feb 14;k322.
51. Tan PH, Ellis I, Allison K, Brogi E, Fox SB, Lakhani S, et al. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology*. 2020 Aug 29;77(2):181–5.
52. Manolis I, Kafiri G, Venetikou M, Thalassinou N, Anthouli-Anagnostopoulou F. Prognostic factors of Invasive Ductal Breast Carcinoma Non Special Type (NST). A Study of 98 cases. *Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics, International Edition*. 2023;37(2):53–62.
53. Mook S, Schmidt MK, Rutgers EJ, van de Velde AO, Visser O, Rutgers SM, et al. Calibration and discriminatory accuracy of prognosis calculation for breast cancer with the online Adjuvant! program: a hospital-based retrospective cohort study. *Lancet Oncol*. 2009 Nov;10(11):1070–6.
54. Ivshina A V., George J, Senko O, Mow B, Putti TC, Smeds J, et al. Genetic Reclassification of Histologic Grade Delineates New Clinical Subtypes of Breast Cancer. *Cancer Res*. 2006 Nov 1;66(21):10292–301.
55. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2010 Jun 1;28(16):2784–95.

56. Cui X, Schiff R, Arpino G, Osborne CK, Lee A V. Biology of Progesterone Receptor Loss in Breast Cancer and Its Implications for Endocrine Therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2005 Oct 20;23(30):7721–35.
57. Ethier JL, Ocaña A, Rodríguez Lescure A, Ruíz A, Alba E, Calvo L, et al. Outcomes of single versus double hormone receptor–positive breast cancer. A GEICAM/9906 sub-study. *Eur J Cancer*. 2018 May;94:199–205.
58. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Journal of Clinical Oncology*. 2018 Jul 10;36(20):2105–22.
59. Bedard PL, Cardoso F, Piccart-Gebhart MJ. Stemming Resistance to HER-2 Targeted Therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2009 Mar 4;14(1):55–66.
60. Yam C, Mani SA, Moulder SL. Targeting the Molecular Subtypes of Triple Negative Breast Cancer: Understanding the Diversity to Progress the Field. *Oncologist*. 2017 Sep 1;22(9):1086–93.
61. Weiss A, Chavez-MacGregor M, Lichtensztajn DY, Yi M, Tadros A, Hortobagyi GN, et al. Validation Study of the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Prognostic Stage Compared With the Anatomic Stage in Breast Cancer. *JAMA Oncol*. 2018 Feb 1;4(2):203.
62. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747–52.
63. Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast Cancer Subtypes and the Risk of Local and Regional Relapse. *Journal of Clinical Oncology*. 2010 Apr 1;28(10):1684–91.
64. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *Journal of Clinical Oncology*. 2009 Mar 10;27(8):1160–7.
65. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathology*. 2011 Feb;24(2):157–67.
66. Gnant M, Filipits M, Greil R, Stoeger H, Rudas M, Bago-Horvath Z, et al. Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Annals of Oncology*. 2014 Feb;25(2):339–45.
67. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2010 Oct 2;12(5):R68.

68. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, Tubiana-Hulin M, Fumoleau P, Larsimont D, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene*. 2005 Jul 7;24(29):4660–71.
69. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron J, He X, Qaqish BF, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*. 2006 Dec 27;7(1):96.
70. Russnes HG, Lingjærde OC, Børresen-Dale AL, Caldas C. Breast Cancer Molecular Stratification. *Am J Pathol*. 2017 Oct;187(10):2152–62.
71. Ayamo A, Kuria J. Clinical application of tumour markers: a review. *East Afr Med J*. 2010 Dec 16;86(12).
72. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 Mar;69(3):89–95.
73. Schilsky RL. Personalizing Cancer Care: American Society of Clinical Oncology Presidential Address 2009. *Journal of Clinical Oncology*. 2009 Aug 10;27(23):3725–30.
74. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2010 Jun 1;28(16):2784–95.
75. Wu HJ, Chu PY. Recent Discoveries of Macromolecule- and Cell-Based Biomarkers and Therapeutic Implications in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 10;22(2):636.
76. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022 Jan 1;12(1):31–46.
77. Chen X, Gole J, Gore A, He Q, Lu M, Min J, et al. Non-invasive early detection of cancer four years before conventional diagnosis using a blood test. *Nat Commun*. 2020 Jul 21;11(1):3475.
78. Cheng X, Wang X, Nie K, Cheng L, Zhang Z, Hu Y, et al. Systematic Pan-Cancer Analysis Identifies TREM2 as an Immunological and Prognostic Biomarker. *Front Immunol*. 2021 Feb 17;12.
79. Walther W, Schlag PM. Current status of gene therapy for cancer. *Curr Opin Oncol*. 2013 Nov;25(6):659–64.
80. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004 Dec 30;351(27):2817–26.
81. Parker CE, Borchers CH. Mass spectrometry based biomarker discovery, verification, and validation — Quality assurance and control of protein biomarker assays. *Mol Oncol*. 2014 Jun 20;8(4):840–58.



82. Ishibashi Y, Ohtsu H, Ikemura M, Kikuchi Y, Niwa T, Nishioka K, et al. Serum TFF1 and TFF3 but not TFF2 are higher in women with breast cancer than in women without breast cancer. *Sci Rep*. 2017 Jul 7;7(1):4846.
83. Wishart DS. Is Cancer a Genetic Disease or a Metabolic Disease? *EBioMedicine*. 2015 Jun;2(6):478–9.
84. Srivastava A, Creek DJ. Discovery and Validation of Clinical Biomarkers of Cancer: A Review Combining Metabolomics and Proteomics. *Proteomics*. 2019 May 26;19(10).
85. Shukla HD, Mahmood J, Vujaskovic Z. Integrated proteo-genomic approach for early diagnosis and prognosis of cancer. *Cancer Lett*. 2015 Dec;369(1):28–36.
86. Shao Y, Sun X, He Y, Liu C, Liu H. Elevated Levels of Serum Tumor Markers CEA and CA15-3 Are Prognostic Parameters for Different Molecular Subtypes of Breast Cancer. *PLoS One*. 2015 Jul 24;10(7):e0133830.
87. Grunnet M, Sorensen JB. Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer. *Lung Cancer*. 2012 May;76(2):138–43.
88. Wu S gang, He Z yu, Zhou J, Sun J yuan, Li F yan, Lin Q, et al. Serum levels of CEA and CA15-3 in different molecular subtypes and prognostic value in Chinese breast cancer. *The Breast*. 2014 Feb;23(1):88–93.
89. Park BW, Oh JW, Kim JH, Park SH, Kim KS, Kim JH, et al. Preoperative CA 15-3 and CEA serum levels as predictor for breast cancer outcomes. *Annals of Oncology*. 2008 Apr;19(4):675–81.
90. GENG B, LIANG MM, YE XB, ZHAO WY. Association of CA 15-3 and CEA with clinicopathological parameters in patients with metastatic breast cancer. *Mol Clin Oncol*. 2015 Jan;3(1):232–6.
91. David JM, Hamilton DH, Palena C. MUC1 upregulation promotes immune resistance in tumor cells undergoing brachyury-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Oncoimmunology*. 2016 Apr 2;5(4):e1117738.
92. Lumachi F, Brandes AA, Ermani M, Bruno G, Boccagni P. Sensitivity of serum tumor markers CEA and CA 15-3 in breast cancer recurrences and correlation with different prognostic factors. *Anticancer Res [Internet]*. 2000;20(6C):4751–4755. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/11205212>
93. Darlix A, Lamy PJ, Lopez-Crapez E, Braccini AL, Firmin N, Romieu G, et al. Serum HER2 extra-cellular domain, S100 $\beta$  and CA 15-3 levels are independent prognostic factors in metastatic breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2016 Dec 7;16(1):428.
94. Copur MS, Wurdeman JM, Nelson D, Ramaekers R, Gauchan D, Crockett D. Normalization of Elevated Tumor Marker CA27-29 After Bilateral Lung Transplantation in a Patient With Breast Cancer and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*. 2018 Apr 10;26(3):515–8.

95. Kabel AM. Tumor markers of breast cancer: New perspectives. *Journal of Oncological Sciences*. 2017 Apr;3(1):5–11.
96. Hou MF, Chen YL, Tseng TF, Lin CM, Chen MS, Huang CJ, et al. Evaluation of serum CA27.29, CA15-3 and CEA in patients with breast cancer. *Kaohsiung J Med Sci* [Internet]. 1999 Sep;15(9):520—528. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/10561976>
97. Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. In 2019. p. 135–70.
98. Hernando C, Ortega-Morillo B, Tapia M, Moragón S, Martínez MT, Eroles P, et al. Oral Selective Estrogen Receptor Degradors (SERDs) as a Novel Breast Cancer Therapy: Present and Future from a Clinical Perspective. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021;22(15). Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/15/7812>
99. Mills JN, Rutkovsky AC, Giordano A. Mechanisms of resistance in estrogen receptor positive breast cancer: overcoming resistance to tamoxifen/aromatase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2018;41:59–65. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147148921830002X>
100. Nicolini A, Ferrari P, Duffy MJ. Prognostic and predictive biomarkers in breast cancer: Past, present and future. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2018;52:56–73. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X17300524>
101. Rakha EA, Chmielik E, Schmitt FC, Tan PH, Quinn CM, Gallagy G. Assessment of Predictive Biomarkers in Breast Cancer: Challenges and Updates. *Pathobiology*. 2022;89(5):263–77.
102. Hernando C, Ortega-Morillo B, Tapia M, Moragón S, Martínez MT, Eroles P, et al. Oral Selective Estrogen Receptor Degradors (SERDs) as a Novel Breast Cancer Therapy: Present and Future from a Clinical Perspective. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 22;22(15):7812.
103. Hanker AB, Sudhan DR, Arteaga CL. Overcoming Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Cancer Cell*. 2020 Apr;37(4):496–513.
104. Cenciarini ME, Proietti CJ. Molecular mechanisms underlying progesterone receptor action in breast cancer: Insights into cell proliferation and stem cell regulation. *Steroids*. 2019 Dec;152:108503.
105. Mote PA, Gompel A, Howe C, Hilton HN, Sestak I, Cuzick J, et al. Progesterone receptor A predominance is a discriminator of benefit from endocrine therapy in the ATAC trial. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Jun 28;151(2):309–18.
106. Menon SS, Guruvayoorappan C, Sakthivel KM, Rasmi RR. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clinica Chimica Acta*. 2019 Apr;491:39–45.
107. Remnant L, Kochanova NY, Reid C, Cisneros-Soberanis F, Earnshaw WC. The intrinsically disorderly story of Ki-67. *Open Biol*. 2021 Aug 11;11(8).

108. Hilton HN, Clarke CL, Graham JD. Estrogen and progesterone signalling in the normal breast and its implications for cancer development. *Mol Cell Endocrinol*. 2018 May;466:2–14.
109. Zhang A, Wang X, Fan C, Mao X. The Role of Ki67 in Evaluating Neoadjuvant Endocrine Therapy of Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Nov 3;12.
110. Yeo B, Dowsett M. Neoadjuvant endocrine therapy: Patient selection, treatment duration and surrogate endpoints. *The Breast*. 2015 Nov;24:S78–83.
111. Neves Rebello Alves L, Dummer Meira D, Poppe Meriguetti L, Correia Casotti M, do Prado Ventorim D, Ferreira Figueiredo Almeida J, et al. Biomarkers in Breast Cancer: An Old Story with a New End. *Genes (Basel)*. 2023 Jun 28;14(7):1364.
112. Chung I, Reichelt M, Shao L, Akita RW, Koeppen H, Rangell L, et al. High cell-surface density of HER2 deforms cell membranes. *Nat Commun*. 2016 Sep 7;7(1):12742.
113. Manolis I, Kafiri G, Glava C, Koniaris E, Venetikou M, Thalassinos N, et al. Correlation of Histological type, Grade and Results of IHC and SISH regarding *Cerb2-HER2/neu* Amplification. REVIEW CLINICAL PHARMACOLOGY AND PHARMACOKINETICS, INTERNATIONAL EDITION [Internet]. 2023;37(1):11–31. Available from: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
114. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 Sep 23;5(1):66.
115. Wynn CS, Tang SC. Anti-HER2 therapy in metastatic breast cancer: many choices and future directions. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2022 Mar 10;41(1):193–209.
116. Shahbandi A, Nguyen HD, Jackson JG. TP53 Mutations and Outcomes in Breast Cancer: Reading beyond the Headlines. *Trends Cancer*. 2020 Feb;6(2):98–110.
117. Xu Z, Wu W, Yan H, Hu Y, He Q, Luo P. Regulation of p53 stability as a therapeutic strategy for cancer. *Biochem Pharmacol*. 2021 Mar;185:114407.
118. Duffy MJ, Synnott NC, Crown J. Mutant p53 in breast cancer: potential as a therapeutic target and biomarker. *Breast Cancer Res Treat*. 2018 Jul 21;170(2):213–9.
119. Raimundo L, Ramos H, Loureiro JB, Calheiros J, Saraiva L. BRCA1/P53: Two strengths in cancer chemoprevention. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2020 Jan;1873(1):188339.
120. Märkl B, Kazik M, Harbeck N, Jakubowicz E, Hoffmann R, Jung T, et al. Impact of uPA/PAI-1 and disseminated cytokeratin-positive cells in breast cancer. *BMC Cancer*. 2019 Dec 15;19(1):692.
121. Uhl B, A Mittmann L, Dominik J, Hennel R, Smiljanov B, Haring F, et al. uPA-PAI-1 heteromerization promotes breast cancer progression by attracting tumorigenic neutrophils. *EMBO Mol Med*. 2021 Jun 7;13(6).

122. Reix N, Lodi M, Jankowski S, Molière S, Luporsi E, Leblanc S, et al. A novel machine learning-derived decision tree including uPA/PAI-1 for breast cancer care. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2019 May 27;57(6):901–10.
123. Ben Ayed-Guerfali D, Ben Kridis-Rejab W, Ammous-Boukhris N, Ayadi W, Charfi S, Khanfir A, et al. Novel and recurrent BRCA1/BRCA2 germline mutations in patients with breast/ovarian cancer: a series from the south of Tunisia. *J Transl Med*. 2021 Dec 16;19(1):108.
124. Liu L, Matsunaga Y, Tsurutani J, Akashi-Tanaka S, Masuda H, Ide Y, et al. BRCAness as a prognostic indicator in patients with early breast cancer. *Sci Rep*. 2020 Dec 3;10(1):21173.
125. De Talhouet S, Peron J, Vuilleumier A, Friedlaender A, Viassolo V, Ayme A, et al. Clinical outcome of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations according to molecular subtypes. *Sci Rep*. 2020 Apr 27;10(1):7073.
126. Godet I, M. Gilkes D. BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. *Integr Cancer Sci Ther*. 2017;4(1).
127. Carbognin L, Miglietta F, Paris I, Dieci MV. Prognostic and Predictive Implications of PTEN in Breast Cancer: Unfulfilled Promises but Intriguing Perspectives. *Cancers (Basel)*. 2019 Sep 19;11(9):1401.
128. Chen J, Sun J, Wang Q, Du Y, Cheng J, Yi J, et al. Systemic Deficiency of PTEN Accelerates Breast Cancer Growth and Metastasis. *Front Oncol*. 2022 Mar 18;12.
129. Xie P, Peng Z, Chen Y, Li H, Du M, Tan Y, et al. Author Correction: Neddylation of PTEN regulates its nuclear import and promotes tumor development. *Cell Res*. 2021 Mar 29;31(3):374–374.
130. Bücker L, Lehmann U. CDH1 (E-cadherin) Gene Methylation in Human Breast Cancer: Critical Appraisal of a Long and Twisted Story. *Cancers (Basel)*. 2022 Sep 8;14(18):4377.
131. Sheikh A, Hussain SA, Ghori Q, Naeem N, Fazil A, Giri S, et al. The Spectrum of Genetic Mutations in Breast Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015 Apr 3;16(6):2177–85.
132. Shinozaki M, Hoon DSB, Giuliano AE, Hansen NM, Wang HJ, Turner R, et al. Distinct Hypermethylation Profile of Primary Breast Cancer Is Associated with Sentinel Lymph Node Metastasis. *Clinical Cancer Research*. 2005 Mar 15;11(6):2156–62.
133. Sebova K, Zmetakova I, Bella V, Kajo K, Stankovicova I, Kajabova V, et al. RASSF1A and CDH1 hypermethylation as potential epimarkers in breast cancer. *Cancer Biomarkers*. 2012 Jan 21;10(1):13–26.
134. Nepomuceno T, De Gregoriis G, de Oliveira FMB, Suarez-Kurtz G, Monteiro A, Carvalho M. The Role of PALB2 in the DNA Damage Response and Cancer Predisposition. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 31;18(9):1886.

135. Li A, Geyer FC, Blecua P, Lee JY, Selenica P, Brown DN, et al. Homologous recombination DNA repair defects in PALB2-associated breast cancers. *NPJ Breast Cancer*. 2019 Aug 8;5(1):23.
136. Lefebvre C, Bachelot T, Filleron T, Pedrero M, Campone M, Soria JC, et al. Mutational Profile of Metastatic Breast Cancers: A Retrospective Analysis. *PLoS Med*. 2016 Dec 27;13(12):e1002201.
137. Deng M, Chen H, Zhu X, Luo M, Zhang K, Xu C, et al. Prevalence and clinical outcomes of germline mutations in *BRCA1/2* and *PALB2* genes in 2769 unselected breast cancer patients in China. *Int J Cancer*. 2019 Sep 15;145(6):1517–28.
138. Khan U, Khan MdS. Prognostic Value Estimation of BRIP1 in Breast Cancer by Exploiting Transcriptomics Data Through Bioinformatics Approaches. *Bioinform Biol Insights*. 2021 Jan 19;15:117793222110558.
139. Ouhtit A. BRIP1 a potential candidate gene in development of non-BRCA1 2 breast cancer. *Frontiers in Bioscience*. 2016;8(2):767.
140. Zheng Y, Li B, Pan D, Cao J, Zhang J, Wang X, et al. Functional consequences of a rare missense BARD1 c.403G>A germline mutation identified in a triple-negative breast cancer patient. *Breast Cancer Research*. 2021 Dec 1;23(1):53.
141. Zhu Y, Liu Y, Zhang C, Chu J, Wu Y, Li Y, et al. Tamoxifen-resistant breast cancer cells are resistant to DNA-damaging chemotherapy because of upregulated BARD1 and BRCA1. *Nat Commun*. 2018 Apr 23;9(1):1595.
142. Yamamoto H, Watanabe Y, Maehata T, Imai K, Itoh F. Microsatellite instability in cancer: a novel landscape for diagnostic and therapeutic approach. *Arch Toxicol*. 2020 Oct 6;94(10):3349–57.
143. Long DR, Waalkes A, Panicker VP, Hause Jr. RJ, Salipante SJ. Identifying Optimal Loci for the Molecular Diagnosis of Microsatellite Instability. *Clin Chem [Internet]*. 2020 Oct 1;66(10):1310–8. Available from: <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa177>
144. Klouch KZ, Stern MH, Trabelsi-Grati O, Kiavue N, Cabel L, Silveira AB, et al. Microsatellite instability detection in breast cancer using drop-off droplet digital PCR. *Oncogene [Internet]*. 2022;41(49):5289–97. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41388-022-02504-6>
145. Anderson KS, LaBaer J. The Sentinel Within: Exploiting the Immune System for Cancer Biomarkers. *J Proteome Res*. 2005 Aug 1;4(4):1123–33.
146. Lehman CD, Arao RF, Sprague BL, Lee JM, Buist DSM, Kerlikowske K, et al. National Performance Benchmarks for Modern Screening Digital Mammography: Update from the Breast Cancer Surveillance Consortium. *Radiology*. 2017 Apr;283(1):49–58.
147. Henderson MC, Silver M, Tran Q, Letsios EE, Mulpuri R, Reese DE, et al. A Noninvasive Blood-based Combinatorial Proteomic Biomarker Assay to Detect Breast

- Cancer in Women over age 50 with BI-RADS 3, 4, or 5 Assessment. *Clinical Cancer Research*. 2019 Jan 1;25(1):142–9.
148. Freitas AJA de, Causin RL, Varuzza MB, Hidalgo Filho CMT, Silva VD da, Souza C de P, et al. Molecular Biomarkers Predict Pathological Complete Response of Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients: Review. *Cancers (Basel)*. 2021 Oct 31;13(21):5477.
  149. Chen D, Xu T, Wang S, Chang H, Yu T, Zhu Y, et al. Liquid Biopsy Applications in the Clinic. *Mol Diagn Ther*. 2020 Apr 9;24(2):125–32.
  150. De Rubis G, Rajeev Krishnan S, Bebawy M. Liquid Biopsies in Cancer Diagnosis, Monitoring, and Prognosis. *Trends Pharmacol Sci*. 2019 Mar;40(3):172–86.
  151. Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating Tumor Cells: Liquid Biopsy of Cancer. *Clin Chem*. 2013 Jan 1;59(1):110–8.
  152. Kruspe S, Dickey DD, Urak KT, Blanco GN, Miller MJ, Clark KC, et al. Rapid and Sensitive Detection of Breast Cancer Cells in Patient Blood with Nuclease-Activated Probe Technology. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017 Sep;8:542–57.
  153. Pierga JY, Hajage D, Bachelot T, Delaloge S, Brain E, Campone M, et al. High independent prognostic and predictive value of circulating tumor cells compared with serum tumor markers in a large prospective trial in first-line chemotherapy for metastatic breast cancer patients. *Annals of Oncology*. 2012 Mar;23(3):618–24.
  154. Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, et al. Circulating Breast Tumor Cells Exhibit Dynamic Changes in Epithelial and Mesenchymal Composition. *Science (1979)*. 2013 Feb;339(6119):580–4.
  155. Horimoto Y, Tokuda E, Murakami F, Uomori T, Himuro T, Nakai K, et al. Analysis of circulating tumour cell and the epithelial mesenchymal transition (EMT) status during eribulin-based treatment in 22 patients with metastatic breast cancer: a pilot study. *J Transl Med*. 2018 Dec 20;16(1):287.
  156. Costa C, Muínelo-Romay L, Cebey-López V, Pereira-Veiga T, Martínez-Pena I, Abreu M, et al. Analysis of a Real-World Cohort of Metastatic Breast Cancer Patients Shows Circulating Tumor Cell Clusters (CTC-clusters) as Predictors of Patient Outcomes. *Cancers (Basel)*. 2020 Apr 29;12(5):1111.
  157. Brisotto G, Biscontin E, Rossi E, Bulfoni M, Piruska A, Spazzapan S, et al. Dysmetabolic Circulating Tumor Cells Are Prognostic in Metastatic Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Apr 19;12(4):1005.
  158. Jakabova A, Bielcikova Z, Pospisilova E, Petruzelka L, Blasiak P, Bobek V, et al. Characterization of circulating tumor cells in early breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy. *Ther Adv Med Oncol*. 2021 Jan 13;13:175883592110284.

159. Liu Y, Zhao R, Xie Z, Pang Z, Chen S, Xu Q, et al. Significance of circulating tumor cells detection in tumor diagnosis and monitoring. *BMC Cancer*. 2023 Dec 6;23(1):1195.
160. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2016 Sep 8;35(3):347–76.
161. Herberts C, Wyatt AW. Technical and biological constraints on ctDNA-based genotyping. *Trends Cancer*. 2021 Nov;7(11):995–1009.
162. Fernandez-Garcia D, Hills A, Page K, Hastings RK, Toghil B, Goddard KS, et al. Plasma cell-free DNA (cfDNA) as a predictive and prognostic marker in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2019 Dec 19;21(1):149.
163. Dawson SJ, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, et al. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2013 Mar 28;368(13):1199–209.
164. Sanches SM, Braun AC, Calsavara VF, Barbosa PNVP, Chinen LTD. Comparison of hormonal receptor expression and HER2 status between circulating tumor cells and breast cancer metastases. *Clinics [Internet]*. 2021;76. Available from: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:238248460>
165. Urso L, Vernaci G, Carlet J, Lo Mele M, Fassan M, Zulato E, et al. ESR1 Gene Mutation in Hormone Receptor-Positive HER2-Negative Metastatic Breast Cancer Patients: Concordance Between Tumor Tissue and Circulating Tumor DNA Analysis. *Front Oncol*. 2021 Mar 11;11.
166. Lee I, Baxter D, Lee MY, Scherler K, Wang K. The Importance of Standardization on Analyzing Circulating RNA. *Mol Diagn Ther*. 2017 Jun 30;21(3):259–68.
167. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2011 Jun 12;11(6):426–37.
168. Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics*. 2009 Jun 9;6(3):267–83.
169. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022 Jan 1;12(1):31–46.
170. Causin RL, Freitas AJA de, Trovo Hidalgo Filho CM, Reis R dos, Reis RM, Marques MMC. A Systematic Review of MicroRNAs Involved in Cervical Cancer Progression. *Cells*. 2021 Mar 17;10(3):668.
171. Shimomura A, Shiino S, Kawauchi J, Takizawa S, Sakamoto H, Matsuzaki J, et al. Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage. *Cancer Sci*. 2016 Mar 4;107(3):326–34.

172. Erbes T, Hirschfeld M, Rücker G, Jaeger M, Boas J, Iborra S, et al. Feasibility of urinary microRNA detection in breast cancer patients and its potential as an innovative non-invasive biomarker. *BMC Cancer*. 2015 Dec 28;15(1):193.
173. Hirschfeld M, Rücker G, Weiß D, Berner K, Ritter A, Jäger M, et al. Urinary Exosomal MicroRNAs as Potential Non-invasive Biomarkers in Breast Cancer Detection. *Mol Diagn Ther*. 2020 Apr 28;24(2):215–32.
174. Liu T, Zhang X, Gao S, Jing F, Yang Y, Du L, et al. Exosomal long noncoding RNA CRNDE-h as a novel serum-based biomarker for diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016 Dec 20;7(51):85551–63.
175. Zhou W, Ye X lei, Xu J, Cao MG, Fang ZY, Li LY, et al. The lncRNA H19 mediates breast cancer cell plasticity during EMT and MET plasticity by differentially sponging miR-200b/c and let-7b. *Sci Signal*. 2017 Jun 13;10(483).
176. Vader P, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. *Trends Mol Med*. 2014 Jul;20(7):385–93.
177. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Jun 7;9(6):654–9.
178. Iero M, Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Parmiani G, Fais S, et al. Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death Differ*. 2008 Jan 12;15(1):80–8.
179. Greening DW, Gopal SK, Mathias RA, Liu L, Sheng J, Zhu HJ, et al. Emerging roles of exosomes during epithelial–mesenchymal transition and cancer progression. *Semin Cell Dev Biol*. 2015 Apr;40:60–71.
180. Exosomes in Tumor Microenvironment Influence Cancer Progression and Metastasis.
181. Andre F, Scharz NE, Movassagh M, Flament C, Pautier P, Morice P, et al. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *The Lancet*. 2002 Jul;360(9329):295–305.
182. Joyce DP, Kerin MJ, Dwyer RM. Exosome-encapsulated microRNAs as circulating biomarkers for breast cancer. *Int J Cancer*. 2016 Oct 31;139(7):1443–8.
183. Hannafon BN, Trigoso YD, Calloway CL, Zhao YD, Lum DH, Welm AL, et al. Plasma exosome microRNAs are indicative of breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2016 Dec 8;18(1):90.
184. Takahashi R u, Miyazaki H, Ochiya T. The Roles of MicroRNAs in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2015 Apr 9;7(2):598–616.



185. Cardoso F, van't Veer LJ, Bogaerts J, Slaets L, Viale G, Delaloge S, et al. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2016 Aug 25;375(8):717–29.
186. Arpino G, Generali D, Sapino A, Del Matro L, Frassoldati A, de Laurentis M, et al. Gene expression profiling in breast cancer: A clinical perspective. *The Breast*. 2013 Apr;22(2):109–20.
187. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004 Dec 30;351(27):2817–26.
188. van de Vijver MJ, He YD, van 't Veer LJ, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW, et al. A Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2002 Dec 19;347(25):1999–2009.
189. Harnan S, Tappenden P, Cooper K, Stevens J, Bessey A, Rafia R, et al. Tumour profiling tests to guide adjuvant chemotherapy decisions in early breast cancer: a systematic review and economic analysis. *Health Technol Assess (Rockv)*. 2019 Jun;23(30):1–328.
190. Harbeck N, Sotlar K, Wuerstlein R, Doisneau-Sixou S. Molecular and protein markers for clinical decision making in breast cancer: Today and tomorrow. *Cancer Treat Rev*. 2014 Apr;40(3):434–44.
191. Sgroi DC, Sestak I, Cuzick J, Zhang Y, Schnabel CA, Schroeder B, et al. Prediction of late distant recurrence in patients with oestrogen-receptor-positive breast cancer: a prospective comparison of the breast-cancer index (BCI) assay, 21-gene recurrence score, and IHC4 in the TransATAC study population. *Lancet Oncol*. 2013 Oct;14(11):1067–76.
192. Zhang Y, Schnabel CA, Schroeder BE, Jerevall PL, Jankowitz RC, Fornander T, et al. Breast Cancer Index Identifies Early-Stage Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Patients at Risk for Early- and Late-Distant Recurrence. *Clinical Cancer Research*. 2013 Aug 1;19(15):4196–205.