

Expresia markerilor surogat ER, PR, Her2, CK5 și Ki67 în carcinomul mamar invaziv de tip NOS și metastazele limfonodale corespondente

Veaceslav Fulga

Catedra de Histologie, Citologie și Embriologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu", Chișinău, Republica Moldova

Autor corespondent

*Veaceslav Fulga, dr. șt. med., conf. univ.,
Catedra de Histologie, Citologie și Embriologie,
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu",
bd. Ștefan cel Mare 165, MD-2004, Chișinău, Republica Moldova,
e-mail: vmfulga@usmf.md*

Expression of ER, PR, Her2, CK5 and Ki67 surrogate markers in invasive breast carcinoma not otherwise specified type and its correspondent lymph node metastasis

Veaceslav Fulga

Department of Histology, Cytology and Embryology, State University of Medicine and Pharmacy "Nicolae Testemițanu", Chisinau, Republic of Moldova

Corresponding author

*Veaceslav Fulga, MD, PhD,
Department of Histology, Cytology and Embryology,
State University of Medicine and Pharmacy "Nicolae Testemițanu",
Ștefan cel Mare str. 165, MD-2004, Chisinau, Republic of Moldova;
e-mail: vmfulga@usmf.md*

Rezumat

În pofida realizărilor contemporane în morfopatologie și genetică, incidența carcinomului mamar rămâne a fi una înaltă. În scopul depistării unui tratament eficace, cancerul de sân a fost divizat în categorii, fiecare având la bază criterii specifice.

Un nou concept propune de a clasifica această maladie în câteva clase moleculare. Tradițional, morfologul descrie în detalii tumora primară fără a menționa profilul molecular al metastazelor limfonodale (LNM). În literatura de specialitate pot fi depistate doar câteva publicații cu date controversate privitor la studiul comparativ, molecular al tumorii primare și metastazei la același pacient.

Prin aplicarea markerilor surogat pentru receptorii ER (estrogen), PR (progesteron), Her2 (factorul uman de creștere epidermală 2 sau Her2/neu), CK5 (citokeratina bazală) și Ki67 (marker al proliferării) am comparat subtipul molecular al tumorii primare și metastazelor limfonodale corespondente a 88 paciente diagnosticate cu carcinom mamar invaziv de tip NOS (not otherwise specified). Am demonstrat că, la un prag de peste 30% pentru celule ER și PR positive, subtipul molecular al metastazei limfonodale în 21,59% nu corespunde celui din tumora primară. Cea mai înaltă rată s-a înregistrat la comutarea subtipului Luminal A în triplu negativ (9.09%). Rata cazurilor comutate rămâne a fi una înaltă (18,18%) chiar și la utilizarea recomandărilor ASCO (American Society of Clinical

Abstract

Despite advances in genetic and histopathology, the incidence of breast cancer remains very high. In order to find the best treatment, breast cancer was divided into categories, each based on different criteria. A new concept is purposing to categorize this disease into several molecular classes.

Traditionally pathologists are describing in details the primary tumor without mentioning molecular profile of metastases at the lymph nodes level. Nowadays, in the literature could find only several publications with controversial data, which are comparing these two sites from molecular position, primary tumor and its metastasis simultaneously at the same patient.

By using ER (estrogen), PR (progesteron), Her2 (human epidermal growth factor receptor 2 or Her2/neu), CK5 (basal cytokeratin) and Ki67 (marker of proliferation) surrogate markers we've compared the molecular subtype of primary tumor and its paired lymph node metastasis of 88 patients with invasive breast cancer NOS type (not otherwise specified). We demonstrated that for a cut-off >30% of ER and PR positive cells, in 21,59% the molecular subtype from LNM doesn't follow the same one from primary situs. The highest rate was established for Luminal A-triple negative switch (9.09%). The ratio of switched cases remained anyway high (18,18%) by using ASCO (American Society of Clinical On-

Oncology) privitor la pragul pozitivității >1% pentru markerii ER și PR [1].

Concluzii: Este important de a descrie profilul imunohistochimic (ER, PR, Her2, CK5, Ki67) la nivelul metastazelor limfonodale. Subtipurile moleculare determinate prin procedeele imunohistochimice nu sunt stabile de-a lungul progresiei tumorale. Rata cea mai înaltă de comutare a fost raportată de la fenotipul luminal la triplu negativ.

Cuvinte-cheie: carcinom mamar, metastaze, profil molecular, ER, PR, HER2/neu, CK5, Ki67.

Introducere

În baza datelor GLOBOCAN, circa 12.7 mln cazuri de cancer și 7.6 mln de decese cauzate de carcinom au fost determinate în anul 2008 [2]. Cancerul de sân este cel mai frecvent tip de cancer diagnosticat la femei. Acesta constituie 23% din numărul total de cancere și 14% din decesele cauzate de tumori. În pofida realizărilor în genetică și morfologie, incidența acestui tip de cancer rămâne una înaltă. Factori multipli își au contribuția la menținerea acestei înalte rate, precum stilul de viață, factori de mediu, genetici, biologici [3]. Întru determinarea unui tratament eficace, cancerul de sân a fost clasificat în categorii, fiecare bazat pe criteriile morfologice specifice. Un nou concept propune de a diviza această maladie în câteva clase moleculare [4-6]. Aceasta ne sugerează că, carcinomul mamar nu este o singură entitate nozologică, cuprinzând la moment cel puțin 5 subclase, fiecare cu semnătura moleculară, caractere de creștere și potențial invaziv deosebit. Din păcate, dezvoltarea rezistenței la terapie și recurența sunt frecvente.

O particularitate comună a tumorilor maligne este capacitatea de a invada țesuturile adiacente și răspândi la distanță prin sistemul circulator sanguin și limfatic. Tradițional morfologii descriu în detalii tumora primară, fără a menționa profilul molecular al metastazelor limfonodale. În literatura de specialitate pot fi depistate doar câteva publicații cu date controversate privitor la studiul comparativ, molecular al tumorii primare și metastazei sale la același pacient [7-13]. Unii cercetători consideră că, subtipul molecular este stabil în decursul dezvoltării tumorale, totodată unele date ne sugerează că, expresia genică și fenotipul molecular nu sunt stabili în timpul progresiei cancerului mamar. Aceasta ar putea explica rezistența la tratament și recurențele ulterioare.

Scopul acestei lucrări este studiul comparativ al tumorii primare și metastazelor sale limfonodale, bazat pe procedeele imunohistochimice de evaluare a expresiei receptorilor ER, PR, Her2/neu, CK5 și Ki67, drept cei mai frecvenți markeri utilizați în diagnosticarea carcinomului mamar.

Material și Metode

Pacienți

Au fost colectate 172 specimene (88 tumori primare și 88 noduli limfatici axilari cu metastaze) de la 88 paciente diagnosticate cu carcinom mamar invaziv în stadii clinice avansate. Toate pacientele au fost supuse mastectomiei radicale în asociere cu evidarea nodulilor limfatici axilari, fără chimio-

logy) recommendations to a cut-off >1% for ER, PR markers [1].

Conclusions: It's important to describe the immunohistochemical profile (ER, PR, Her2, CK5, Ki67) at the lymph nodes metastasis level. The molecular subtypes determined by immunohistochemical assay are not stable during tumor progression. The highest rate of shifting has been reported from luminal to triple negative phenotype.

Keywords: breast cancer, metastasis, molecular profile, ER, PR, HER2/neu, CK5, Ki67.

Introduction

Based on the GLOBOCAN 2008 results, about 12.7 million cancer cases and 7.6 million cancer deaths are estimated to have occurred in 2008 [2]. Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer among females. It accounts for 23% of the total cancer cases and 14% of the cancer deaths. Despite advances in genetic and histopathology, the incidence of this cancer type remains very high. Many factors are believed to contribute to this high rate of breast cancer, including lifestyle, environmental, genetic, and biological factors [3]. In order to find the best treatment, breast cancer was divided into categories, each based on different criteria. A new concept is purposing to categorize this disease into several molecular classes [4-6]. This one makes us to think about breast cancer not just as a single disease, but as several, at least 5 different subsets, with their proper molecular signs, characteristics of growth and different invasive potential. Unfortunately, development of resistance to therapy is frequent and often leads to cancer recurrence.

A common feature of malignant tumors is capacity to invade the nearby tissues and spread to more distant parts of the body through the bloodstream or lymphatic system. Traditionally pathologists are describing in details the primary tumor without mentioning molecular profile of metastases at the lymph nodes level. Nowadays, in the literature could find only several publications with controversial data, which are comparing these two sites from molecular position, primary tumor and its metastasis simultaneously at the same patient [7-13]. Some scientists consider that molecular subtype is stable during tumor development, in the same time some data let us suppose, that genes expression and molecular phenotype are not stable throughout tumor progression in breast cancer. This could explain the drug resistance and distant recurrences.

The aim of this study is a differential approach of primary tumor and its lymph node metastasis based on immunohistochemical assay of ER, PR, Her2/neu, CK5 and Ki67 receptors expression, as the most used markers in breast cancer diagnose.

Materials and Methods

Patients

The 172 specimens (88 primary tumors and paired 88 axillary lymph nodes) were collected from 88 patients with invasive breast cancer in advanced clinical stages. No drug therapy preceded and all of patients underwent radical mastectomy and lymph nodes dissection. All biological material was col-

radioterapie antecedentă. Tot materialul biologic a fost colectat pe parcursul anilor 2012-2013 de la IMSP, Institutul Oncologic din Republica Moldova. Diagnosticul histopatologic a fost primar stabilit de morfologii acreditați ai instituției vizate și reconfirmat de 2 specialiști ai Centrului de Cercetări în Angiogeneză, Timișoara, România.

Procesarea tisulară

Specimenele, tumora primară și metastaza limfonodală au fost plasate într-o casetă și ulterior procesate în condiții identice: fixare în formalină tamponată 10% timp de 24-48 ore și includere în parafină după un protocol tradițional. Pentru investigațiile histopatologice de rutină au fost colorate cu hematoxilină și eozină secțiuni de 4-6 μm grosime. Întru evitarea interpretărilor greșite privitor la procesarea tisulară, speci­menele (tumora primară și nodul limfatic) aceluiași caz au fost incluse într-un singur bloc de parafină, iar secțiunile ulterioare colorate pe aceeași lamă histologică (Fig. 1, pag. 51). Metastazele limfonodale au fost confirmate imunohistochimic cu un cocktail de citokeratine AE1/AE3. Suplimentar, secțiunile au fost colorate cu 5 anticorpi monoclonali utilizând tehnici imunohistochimice de rutină (Tabelul 1). Toate etapele imunohistochimice au fost efectuate automat prin utilizarea autostainer-ului Leica Bond-Max (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK). Contracolorarea nucleilor s-a efectuat cu hematoxilină Lille modificată.

Tabelul 1

Anticorpii utilizați: sursa, diluția, sistem de demascare, sistem de detecție, timp de incubare

	Anticorp/ clona	Sursa/timp de incubare / diluția	Sistem de demascare/ timp	Sistem de detecție/timp
1	ER/6F11	Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK/15 min/ RTU	Bond Epitope Retrieval Solution1, (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK)/20 min	Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), 15 min
2	PR/16			
3	Multi-cytokeratin/ (AE1/AE3)			
4	Her2 / policlonal	Dako Glostrup Denmark/30 min/RTU	Dako Target Retrieval Solution, pH6/20 min	EnVision-HER/30 min
5	Ki67/K2	Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK/15 min/ RTU	Bond Epitope Retrieval Solution2, (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK)/20 min	Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), 15 min
6	CK5/ XM26	Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK/15 min/ RTU		

lected during 2012-2013 from Oncological Institute, Republic of Moldova. The histopathological diagnosis was firstly established by accredited pathologists from above mentioned institution and confirmed by two specialists from Angiogenesis Research Center, Timisoara, Romania.

Tissue processing

The specimens, primary tumor and its lymph node, placed in one cassette, were processed in an identical manner: fixed in 10% phosphate buffered formalin for 24-48h and paraffin embedded as traditionally. For routine histopathological assessment 4-6 μm sections were cut and stained with hematoxylin and eosin (HE). To avoid any misunderstandings about tissue processing, the specimens (primary tumor and lymph node) of the same patient have been embedded in a single paraffin block and sections were stained on the same slide (Fig. 1, pag. 51). The lymph nodes metastases were confirmed by immunohistochemistry with AE1/AE3 cytokeratin cocktail. In addition, sections were also stained with 5 monoclonal antibodies, using standard immunohistochemical techniques (Table 1). All stages of immunohistochemistry were performed automatically by using Leica Bond- Max (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK) autostainer. A modified Lille haematoxylin was used for counterstaining.

Table 1

Used antibodies: source, dilution, systems of detection and retrieval, time of incubation

	Antibody/ clone	Source/ incubation time/ dilution	Retrieval system/time	Detection/time
1	ER/6F11	Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK/15 min/ RTU	Bond Epitope Retrieval Solution1, (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK)/20 min	Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), 15 min
2	PR/16			
3	Multi-cytokeratin/ (AE1/AE3)			
4	Her2 / policlonal	Dako Glostrup Denmark/30 min/RTU	Dako Target Retrieval Solution, pH6/20 min	EnVision-HER/30 min
5	Ki67/K2	Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK/15 min/ RTU	Bond Epitope Retrieval Solution2, (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK)/20 min	Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), 15 min
6	CK5/ XM26	Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK/15 min/ RTU		

Evaluarea microscopică

Tumora a fost evaluată drept ER, PR pozitivă dacă cel puțin 30% din celulele tumorale în secțiune prezentau un pattern nuclear specific (Fig. 2, pag. 52). Media aritmetică a fiecărui marker din metastaza limfonodală a fost comparată cu media markerului dat în tumora primară.

Colorarea cu Her2 a fost interpretată în corespundere cu recomandările ASCO [14]: Her2/neu-0 – în lipsa colorării sau colorarea membranară slabă, abia perceptibilă până la 10% din celule; Her2/neu+1 – la colorare membranară a >10% celule; Her2/neu+2 – în cazul colorării membranare incomplete, slab/moderată, circumferențială a >10% din celulele tumorale sau la colorarea circumferențială completă a <10% celule; Her2/neu+3 – la colorare circumferențială intensă a >10% celule tumorale. Cazurile interpretate Her2/neu +2 și +3 au fost considerate pozitive (Fig. 3, pag. 52).

Expresia CK5 a fost interpretată după Azoulay et al. [15]: 0 – în lipsa colorării; +1 – la colorarea a mai puțin de 10% din celulele tumorale; +2 – 10-50% din celule tumorale colorate; +3 – mai mult de 50% din celule tumorale colorate. Cazurile >0 au fost considerate pozitive (Fig. 4 pag. 53).

Pentru markerul Ki67 (Fig. 5, pag. 53) s-a utilizat un prag de 14% pentru delimitarea cazurilor pozitive/negative [16].

Celulele colorate a ducturilor normale au servit drept control intern. Rezultatele au fost grupate în 4 subgrupe:

1. ER⁺ și/sau PR⁺, Her2⁻, CK5⁻, Ki67<14 drept Luminal A;
2. ER⁺ și/sau PR⁺, Her2⁺, CK5⁻, Ki67<14 sau ER⁺ și/sau PR⁺, Her2⁻, CK5⁻, Ki67>14 drept Luminal B;
3. ER⁻, PR⁻, Her2⁺, CK5⁻, orice valoare a Ki67 drept Her2-su-praexpresat;
4. ER⁻, PR⁻, Her2⁻, CK5⁺, orice valoare a Ki67 drept triplu negativ/basal like.

Achiziția imaginilor și procesarea datelor

Numărarea a fost efectuată semi-automat [17] cu microscop Nikon Eclipse 80i cu cameră încorporată Nikon DS-Fi1, utilizând soft Nis-elements 2.30. Zece câmpuri microscopice (x400) a secțiunii imunocolorate cu cel mai înalt număr de celule pozitive au fost cuantificate. Pentru stocarea și gruparea datelor a fost utilizată baza de date MS Access 2003.

Analiza statistică

Soft-ul WINSTAT 2012.1 a fost utilizat pentru analiza descriptivă, cu determinarea valorilor medii, erorilor standard a mediei. Cazurile cu $p \leq 0.05$ au fost considerate statistic semnificative.

Etică

Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică a Cercetării a Universității de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu", Chișinău, Republica Moldova, bazat pe consimțământul informat al pacientului.

Rezultate

Rezultatele primite (Tabelul 2) prezintă prevalența în tumorile primare a cazurilor ER⁺ (84.09%) față de cele PR⁺ (76.14%). În metastazele limfonodale distribuția a fost evalu-

Microscopic evaluation

The tumor was considered ER, PR positive if at least 30% of tumor cells in a section exhibited nuclear staining (Fig. 2, pag. 52). The mean levels of each marker from lymph node metastasis were compared with the primary tumor.

The Her2 status was interpreted in accordance with ASCO recommendations [14]: Her2/neu-0 if no staining observed or weak, barely perceptible membrane staining until 10% of cells; Her2/neu+1-in case of a weak membrane staining of >10%; Her2/neu+2- in case of incomplete, weak/moderate circumferential membrane staining >10% of tumor cells or complete circumferential intense staining <10% of cells; Her2/neu+3- in case of intense, circumferential staining of >10% of tumor cells. Cases with Her2/neu of +2 and +3 were considered as positive (Fig. 3, pag. 52).

The CK5 expression was interpreted as Azoulay et al. previously defined [15]: 0- no tumor cells stained; +1 – less of 10% of tumor cells stained; +2 – 10-50% of positive tumor cells; +3 – more than 50% of tumor cells stained. Expression was scored positive (>0) if any cytoplasmic and/or membranous staining tumor cells were observed (Fig. 4, pag. 53).

For Ki67 marker (Fig. 5, pag. 53) we used a 14% threshold as a limit to define positive/negative cases [16].

The positive cells of normal ducts served as internal control. The results were grouped in 4 subgroups:

1. ER⁺ and/or PR⁺, Her2⁻, CK5⁻, Ki67<14 as Luminal A;
2. ER⁺ and/or PR⁺, Her2⁺, CK5⁻, Ki67<14 or ER⁺ and/or PR⁺, Her2⁻, CK5⁻, Ki67>14 as Luminal B;
3. ER⁻, PR⁻, Her2⁺, CK5⁻, any Ki67 as Her2 over-expressed;
4. ER⁻, PR⁻, Her2⁻, CK5⁺, any Ki67 as triple negative/basal like.

Image acquisition and data processing

The counting was proceeded in a semi-automated way [17] on Nikon Eclipse 80i microscope with Nikon DS-Fi1 installed camera by using Nis-elements 2.30 imaging software. Ten microscope fields (x400) of immunostained section with the greatest number of positive cells were counted and summated to give a single figure. A MS Access 2003 database was used to store and group the data.

Statistical analysis

The WINSTAT 2012.1 software was used for a descriptive statistics, the mean value and standard error of mean determined and for all the tests a P0.05 was considered significant.

Ethics

The study has been approved by the Ethics Committee of the "Nicolae Testemițanu" University of Medicine and Pharmacy from Chisinau, Republic of Moldova, based on patients' informed consent.

Results

In case of primary tumors our results show (Table 2) the prevalence of ER⁺ cases (84.09%) to PR⁺ (76.14%). In lymph node metastasis the distribution was ER⁺ -67.05%, PR⁺ -60.23% respectively. The same amount, of 12.5% Her2/neu⁺ (>1+) was established at both sites.

ată cu cotă de 67.05% pentru cazurile ER⁺ și 60.23% respectiv, pentru PR⁺. Aceași rată de 12.5% au prezentat cazurile Her2/neu⁺ de ambele localizări.

Tabelul 2

Distribuția cazurilor pozitive după receptorii hormonal

	Tumora primară		Metastaze limfonodale	
	Nr cazuri	%	Nr cazuri	%
ER>30	74	84.09	59	67.05
PR>30	67	76.14	53	60.23
Her2/neu>1+	11	12.5	11	12.5

S-a determinat că, valorile medii ale celulelor ER⁺ și PR⁺ din tumora primară (ER⁺75.64%; PR⁺68.12%) prevalează față de valorile markerilor omonimi din metastazele limfonodale (ER⁺63.58% și PR⁺53.18%) (Tabelul 3).

Tabelul 3

Analiza statistică descriptivă pentru markerii ER și PR: valorile medii, eroarea standard a mediei

	Tumora primară		Metastaze limfonodale	
	ER	PR	ER	PR
Numar cazuri	88	88	88	88
Media (%)	75.64	68.12	63.58	53.18
Eroarea standard a mediei	3.74	4.20	4.73	4.57

În 72.73% cazuri carcinomul mamar a fost înregistrat drept ER⁺ și PR⁺ (Tabelul 4). În metastazele limfonodale (LNM) o așa combinație a fost depistată în 47.73%. Această combinație (ER>30 și PR>30) a fost unica combinație prevalentă la nivelul tumorii primare. O discrepanță înaltă a fost determinată la combinația ER<30, PR>30: 3.41% în tumora primară și 12.5% în LNM. O diferență dublă a fost înregistrată pentru cazurile ER<30, PR<30: 12.5% în tumora primară și 20.45% în LNM. Combinația ER>30, PR<30 a fost mai frecvent întâlnită în LNM (19.32%) comparativ cu situs-ul primar (11.36%). Distribuția markerului Her2/neu a înregistrat aceleași valori în tumora primară și LNM (Tabelul 5).

Tabelul 4

Distribuția cazurilor după markerii ER, PR

	Tumora primară		Metastaze limfonodale	
	Nr cazuri	%	Nr cazuri	%
ER>30, PR>30	64	72.73	42	47.73
ER>30, PR<30	10	11.36	17	19.32
ER<30, PR>30	3	3.41	11	12.5
ER<30, PR<30	11	12.5	18	20.45

După gruparea cazurilor în subtipuri moleculare am realizat că, cel mai frecvent profil în ambele situs-uri este Luminal

Table 2

Cases distribution by hormon receptors immunopositivity

	Primary tumor		Lymph node metastasis	
	Nr of cases	%	Nr of cases	%
ER>30	74	84.09	59	67.05
PR>30	67	76.14	53	60.23
Her2/neu>1+	11	12.5	11	12.5

It was determined that the mean values of ER⁺ and PR⁺ cells are much higher in the primary tumor (ER⁺75.64%; PR⁺68.12%) than in LNM – ER⁺63.58% and PR⁺53.18% (Table 3).

Table 3

Descriptive statistics for ER and PR markers: the mean values, standard error of mean

	Primary tumor		Lymph node metastasis	
	ER	PR	ER	PR
Valid cases	88	88	88	88
Mean (%)	75.64	68.12	63.58	53.18
Std. Error of mean	3.74	4.20	4.73	4.57

The 72,73% of ER⁺ breast cancers were also PR⁺ (Table 4). In the lymph node metastasis (LNM) a such combination was valid in 47,73%. The ER>30, PR>30 combination was a single one which prevailed at the level of primary situs (72.73% and 47.73% in LNM). A high discrepancy was determined for ER<30, PR>30 combination, as 3.41% in primary tumor and 12.5% in LNM. Almost a double difference was established for ER<30, PR<30 combination: 12.5% in primary tumor and 20.45% in LNM. The combination ER>30, PR<30 was higher in LNM (19.32%) in comparison with primary situs (11.36%). The distribution of Her2/neu by the grade was the same, in the primary tumor and lymph node metastasis (Table 5).

Table 4

Cases' distribution according to ER, PR positivity

	Primary tumor		Lymph node metastasis	
	number of cases	%	number of cases	%
ER>30, PR>30	64	72.73	42	47.73
ER>30, PR<30	10	11.36	17	19.32
ER<30, PR>30	3	3.41	11	12.5
ER<30, PR<30	11	12.5	18	20.45

After grouping HR results in molecular subtypes, we realized that the most common profile in both sites is Luminal A (77.27% in primary tumor and 71.59% in LNM) (Table 6). The Luminal B subtype was slightly higher in primary tumor –10.23% and 7.95% in LNM, respectively.

An increased incidence of Basal Like subtype was deter-

A (77.27% în tumora primară și 71.59% în LNM) (Tabelul 6). Rata subtipului Luminal B a fost ușor superioară în tumora primară – 10.23% față de 7.95% în LNM.

Tabelul 5

Distribuția markerului Her2/neu: numărul de cazuri, procentaj în dependență de grad

Gradul	Tumora primară		Metastaze limfonodale	
	Nr cazuri	%	Nr cazuri	%
0	69	78.41	74	84.09
1	8	9.09	3	3.41
2	5	5.68	6	6.82
3	6	6.82	5	5.68

O incidență sporită a subtipului Basal Like a fost determinat în LNM –15.91% (și 10.23% în tumora primară). Distribuție similară, superior în LNM s-au determinat cazurile Her2/neu-supraexpresate – 4.55% (respectiv, 2.27% în situs-ul primar).

Tabelul 6

Subtipuri moleculare: numărul de cazuri în tumora primară și metastazele limfonodale (LNM)

Subtipul	Tumora primară		LNM	
	Nr cazuri	%	Nr cazuri	%
Luminal A	68	77.27	63	71.59
Basal Like	9	10.23	14	15.91
Luminal B	9	10.23	7	7.95
Her2+	2	2.27	4	4.55
	88	100	88	100

Apoi, am comparat subtipul molecular din tumora primară și LNM (Tabelul 7). Astfel, în 78.41% cazuri metastazele au păstrat același fenotip ca și tumora primară, iar în 21.59% subtipul molecular a fost unul diferit. În lotul de 21.59%, rata cea mai înaltă a înregistrat tranziția Luminal A – Basal Like – 9.09%. Și viceversa, am determinat 3 cazuri (3.41%) unde tumora Basal Like a continuat în metastază cu fenotip Luminal A.

Tabelul 7

Evoluția profilurilor moleculare: din tumora primară spre metastazele limfonodale (LNM)

	Tumora primară	LNM	Nr cazuri	%
1	Luminal A	Luminal A	58	65.91
2	Luminal B	Luminal B	5	5.68
3	Basal Like	Basal Like	5	5.68
4	Her2+	Her2+	1	1.14
5	Luminal A	Basal Like	8	9.09
6	Luminal A	Luminal B	2	2.27
7	Luminal B	Her2+	2	2.27
8	Luminal B	Luminal A	2	2.27
9	Her2+	Basal Like	1	1.14
10	Basal Like	Luminal A	3	3.41
11	Basal Like	Her2+	1	1.14
			88	100

mined in LNM – 15.91% (and 10.23% in primary tumor). The same, increased in LNM were the Her2/neu-overexpressed cases – 4.55% (2.27% respectively in primary situs).

Table 5

Her2/neu distribution: number of cases, percentage in accordance with Her2/neu grading

Grade	Primary tumor		Lymph node metastasis	
	number of cases	%	number of cases	%
0	69	78.41	74	84.09
1	8	9.09	3	3.41
2	5	5.68	6	6.82

Table 6

Molecular subtypes: number of cases and percentage in primary tumor and lymph node metastasis (LNM)

Subtype	Primary tumor		LNM	
	number of cases	%	number of cases	%
Luminal A	68	77.27	63	71.59
Basal Like	9	10.23	14	15.91
Luminal B	9	10.23	7	7.95
Her2+	2	2.27	4	4.55
	88	100	88	100

After, we cross-linked and compared the molecular subtype evolution from primary tumor to LNM (Table 7).

So, in 78.41% the metastasis preserve the same phenotype as the primary tumor and in 21.59% the molecular subtype was another one. In the group of 21.59%, the highest rate had transition from Luminal A to Basal like-9.09%. And vice versa, we had 3 cases (3.41%) where Basal Like tumor was followed by Luminal A phenotype metastasis.

Table 7

The molecular profiles evolution: from primary tumor to lymph node metastasis (LNM)

	Primary tumor	LNM	Number of cases	%
1	Luminal A	Luminal A	58	65.91
2	Luminal B	Luminal B	5	5.68
3	Basal Like	Basal Like	5	5.68
4	Her2+	Her2+	1	1.14
5	Luminal A	Basal Like	8	9.09
6	Luminal A	Luminal B	2	2.27
7	Luminal B	Her2+	2	2.27
8	Luminal B	Luminal A	2	2.27
9	Her2+	Basal Like	1	1.14
10	Basal Like	Luminal A	3	3.41
11	Basal Like	Her2+	1	1.14
			88	100

Discuții

Weigelt et al. (2003) studiind profilul genic afirmă că, tumorile mamare primare sunt similare metastazelor la distanță la acelaș pacient (plămân, ovar, piele, nod limfatic) [18]. Autorii consideră că, capacitatea de metastazare a carcinomului mamar este o proprietate inerentă, stabilă și nu are la bază selecția clonală. Această afirmație susține rezultatele lui van der Vijver et al., (2002) care consideră capacitatea metastatică a tumorii drept pre-programată de la bun început [19]. Date similare au fost publicate de Bernards et al. (2002), care afirmă că proprietățile metastatice sunt determinate de procese înfăptuite în dezvoltarea incipientă a tumorii și nu sunt influențate de evenimentele petrecute ani, decade mai târziu la punctul culminant al progresiei tumorale [20]. Mai mult, s-a demonstrat că profilurile moleculare expresate au un rol predictoriu în ceea ce privește riscul de dezvoltare a metastazelor la distanță, chiar și la tumori primare de dimensiuni mici [19, 30].

Date contradictorii însă au fost prezentate de Montel et al. (2005, 2006) care a demonstrat câteva diferențe în profilurile genice expresate de tumori derivate din linii celulare umane clonate, cu potențial metastatic slab/absent și sursele izogene, metastatice, a acestor clone colectate de la acelaș pacient [21, 22]. Studiile recente prezintă dovezi precum că, celulele tumorale individuale coexistă într-o anumită tumoră, dar diferă enorm după capacitatea metastatică și mai mult, unele din ele nu au proprietăți metastatice [23]. Astfel se pare că, cancerele primare conțin multe tipuri de celule tumorale, care diferă după receptorii expesați și activitatea metastatică. În plus, cu cât crește abilitatea metastatică a populației celulare se schimbă concomitent și expresia receptorilor [21, 22]. Aceasta în concluzie demonstrează că, fenotipul malign și semnătura moleculară nu sunt predeterminate și statice, dar continuă să evolueze în tumoră pe parcursul vieții sale [7].

După răspândire din situs-ul primar, metastazele se prezintă drept tumori solide în organe îndepărtate [24, 25, 29]. Dar micromediul tisular în care au ancorat este diferit de cel de origine și posibil acționează asupra acestor celule inducând dezvoltarea răspunsurilor adaptive, ce stimulează creșterea sub formă de tumoră. În plus, s-a demonstrat rolul componentelor matricei extracelulare în progresarea și metastazarea cancerului de sân [25].

La moment sunt puține date privind compararea profilului molecular al tumorii primare și metastazelor acesteia. Falck et al. (2010) nu au determinat o asimetrie statistic semnificativă prin compararea fracțiilor celulare ER, PR, Her2 [10] și Ki67 pozitive, deși au prezentat discordanțe între tumora primară și metastază în 7% pentru ER, 16% pentru PR și 3% pentru Her2. Aceași autori, un an mai târziu (2011) au prezentat diferențe semnificative dintre tumora primară și LNM la paciente cu carcinom mamar, utilizând multipli fenotipuri moleculare. Cele 16% de cazuri discordante prezentau tranziția subtipului Luminal A la un subtip cu prognostic mai rezervat. Similare sunt și rezultatele noastre. În 9.09% cazuri (Tabelul 7) subtipul Luminal A din tumorile primare a fost succedat cu Basal Like în LNM. Recent, Falck et al. (2013) au determinat că, atunci când are loc transfer de subtip dintre tumora primară și metastaza limfonodală,

Discussion

Weigelt et al. (2003) using gene expression profiling, affirm that human primary breast tumors are strikingly similar to the distant metastases (lung, ovary, skin, lymph node) of the same patient [18]. They consider that metastatic capability in breast cancer is an inherent feature and is not based on clonal selection. Such affirmation is in line with the results of van der Vijver et al. (2002), which consider that the metastatic proficiency of a tumor is pre-programmed from its beginning and sustain Bernards et al. (2002) results, that metastatic outcome is partly governed by events occurring early in the development of a tumor, rather than being dictated exclusively by events that occur many years or decades later at the culmination of tumor progression [20]. Furthermore, has been shown that expression profiles can predict the risk of development of distant metastases even for small primary tumors [19, 30].

By the other side Montel et al. (2005, 2006) demonstrated several differences in the expression signatures of tumors derived from cloned weakly/non-metastatic human cell lines and from their isogenic metastatic counterparts of the the same patient [21, 22]. Recent studies [23] have provided direct proof that individual cancer cells, co-existing within a given tumor, differ greatly in metastatic capability, moreover some of them are non-metastatic. It seems that primary cancers, contain many types of tumor cells, which can differ by expression profiles and their metastatic activity. Plus, as the metastatic ability of the cell population increases, the receptors profiles changes concomitantly [21, 22]. These are demonstrating conclusively that the malignant phenotype and its molecular signature are not pre-determined and static, but continue to evolve in a tumor throughout its life history [7].

After spreading from its primary situs, metastases arise as solid tumors in distant organs [24, 25, 29]. But the microenvironment of the tissue in which they have landed it's quite different from which they have originated and possibly creates a pressure on these cells requiring them to develop an adaptive responses which allow them to grow as a tumor in these nodes. Plus, it's demonstrated the role of extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis [25].

By the moment, are few data, which compared the molecular profiles of primary tumor and its metastasis. Falck et al. (2010) have not determined a statistically significant skewness by comparing the fraction of ER, PR, Her2 and Ki67 positive cells, but a fraction of 7% (ER), 16% (PR), 3% (Her2) discordant pairs were present [10]. The same authors, one year later (2011) showed discordance between primary tumors and lymph node metastasis in breast cancer patients according to a multiple molecular phenotype. The discordant 16% of cases were shifted from Luminal A to a subtype where survival analysis showed an impaired prognosis compared to this subgroup. Our results are of the same similarity. In 9.09% (Table 7) Luminal A from primary tumors was succeeded by a Basal Like subtype in lymph node metastasis. Recently Falck et al. (2013) determined that when a shift in subtype between primary tumour and metastatic lymph node is happened, the prognosis (for 10 years) seemed to follow the subtype of the lymph node. So, the prognostic information for individual patients appears

pronosticul pentru o perioadă de 10 ani corelează cu fenotipul molecular al metastazei [12]. Altfel spus, informația prognostică pentru fiecare pacient individual poate fi disponibilă prin analiza expresiei biomarkerilor în metastazele limfonodale sincrone. Autorii au concluzionat că, profilurile moleculare nu sunt stabile de-a lungul progresiei tumorale în carcinomul mamar.

Rezultate similare privind migrarea la un subtip cu pronostic mai rezervat, agresivitate înaltă a subtipurilor luminal și triplu negative de-a lungul progresiei tumorale au fost raportate de Castaneda et al. [26]. În plus, autorii au remarcat că tumorile cu subtip Her2 au un comportament agresiv, indiferent de localizare și dimensiunile primare.

Discordanțe semnificative privind statusul Her2, cu aplicație terapeutică a fost raportată de Santinelly A et al. [27]. În particular, s-au demonstrat diferențe dintre tumora primară și LNM sincrone în 6.7%, tumora primară și recurențele locale în 13.3%, tumora primară și metastazele metacrone îndepărtate în 28.6%. Conform rezultatelor noastre (Tabelul 7), subtipul Her2-supraexpresat s-a schimbat odată în Basal Like (1.14%). Rezultate similare a raportat Niikura N et al, unde din 40 cazuri Her2 pozitive (netratate) 4 metastaze au avut statut Her2 negativ [28]. Noi am înregistrat și transfer de fenotip spre Her2, precum: de la Luminal B în 2.27% (2 cazuri) și un caz (1.14%) din Basal Like. În 2 cazuri (2.27%) supraexpresia markerului Her2/neu a transferat subtipul Luminal A în Luminal B.

Similar nouă după structura experimentului este lucrarea publicată de Adamczyk et al., cu excepția faptului că, pacientele au fost supuse anterior chimioterapiei [13]. Autorii descriu doar divergențe în expresia markerului Her2 (4.5% cazuri) și valori similare a receptorilor ER, PR în tumora primară și LNM.

Dat fiind faptul că, laboratoarele folosesc un prag diferit de pozitivitate pentru markerii ER, PR am decis să micșorăm acest barem de la >30% la >1% celule pozitive, având la bază recomandările ASCO [1] (Tabelul 8). Rata cazurilor cu transfer de subtip a rămas oricum înaltă – 18.18%.

Tabelul 8

Evoluția profilurilor moleculare: din tumora primară spre metastazele limfonodale (LNM). Baremul de >1% pentru definirea cazurilor ER+, PR+ în baza recomandărilor ASCO.

	Tumora primară	LNM	Nr cazuri	%	
1	Luminal A	Luminal A	64	72.73	81.82
2	Luminal B	Luminal B	5	5.68	
3	Basal Like	Basal Like	2	2.27	
4	Her2+	Her2+	1	1.14	
5	Luminal A	Basal Like	5	5.68	18.18
6	Basal Like	Luminal A	3	3.41	
7	Luminal A	Luminal B	2	2.27	
8	Luminal B	Her2+	2	2.27	
9	Luminal B	Luminal A	2	2.27	
10	Basal Like	Her2+	1	1.14	
11	Luminal B	Basal Like	1	1.14	
			88	100	

Concluzii

Este important de a descrie profilul imunohistochimic (ER,

to be available from the analysis of biomarker expression in synchronous metastatic lymph nodes [12]. Authors concluded that molecular profiles are not stable throughout tumor progression in breast cancer. Similar results about migration to a poor prognosis subtype and increasing aggressiveness of luminal and triple-negative subtypes throughout tumor progression reported [26]. Plus, the authors remark that tumors belonging to the Her2 subtype behave aggressively regardless to the primary size.

A therapeutically significant Her2 status discordance was demonstrated and by Santinelly A et al. [27] between primary carcinoma and synchronous lymph node metastases (6.7%), local recurrence (13.3%) and metachronous distant metastases (28.6%). In our results (Table 7) Her2/neu shifted once (1.14%) to the Basal Like. Similar results received Niikura N et al. where from 40 Her2 positive cases (not treated) four metastasis convert to Her2 negative status [28]. We encountered and shifting from other phenotypes to Her2+ as follows: from Luminal B in 2.27% (2 cases) and in 1 case (1.14%) from Basal Like. In 2 cases (2.27%) over expression of Her2/neu shifted Luminal A to Luminal B.

Except the fact, that cases were drug treated, a similar by the experiment structure was reported an article in 2012 [13], in which authors reported a discrepancy only in Her2 expression in 4.5% cases and a high concordance in ER, PR receptors status between primary tumor and LNM.

Due to fact, that laboratories are using a different cut-off for ER, PR markers we decided to decrease it from >30% to >1% positive cells, followed the ASCO recommendations [1] (Table 8). The rate of shifted cases remained anyway high – 18.18%.

Table 8

The molecular profiles evolution from primary tumor to lymph node metastasis (LNM). The cut-off >1% used for ER+, PR+ cases, in accordance with ASCO recommendations

	Primary tumor	LNM	Number of cases	%	
1	Luminal A	Luminal A	64	72.73	81.82
2	Luminal B	Luminal B	5	5.68	
3	Basal Like	Basal Like	2	2.27	
4	Her2+	Her2+	1	1.14	
5	Luminal A	Basal Like	5	5.68	18.18
6	Basal Like	Luminal A	3	3.41	
7	Luminal A	Luminal B	2	2.27	
8	Luminal B	Her2+	2	2.27	
9	Luminal B	Luminal A	2	2.27	
10	Basal Like	Her2+	1	1.14	
11	Luminal B	Basal Like	1	1.14	
			88	100	

Conclusions

It's important to describe the immunohistochemical profile (ER, PR, Her2, CK5, Ki67) at the lymph nodes metastasis level. The molecular subtypes determined by immunohistochemical assay are not stable during tumor progression. The

PR, Her2, CK5, Ki67) la nivelul metastazelor limfonodale. Subtipurile moleculare determinate prin procedee imunohistochemice nu sunt stabile de-a lungul progresiei tumorale. Rata cea mai înaltă de transfer a fost înregistrată de la fenotip luminal la triplu negativ.

Conflict de interese

Autorul nu a raportat nici un conflict de interese.

Mulțumiri

Autorul este recunoscător domnului Profesor Marius Raica și întregii echipe de la Departamentul de Morfologie/Histologie microscopică, Centrul de Cercetări în Angiogeneză, Universitatea de Medicină și Farmacie "Victor Babeș", Timișoara, România, cu suportul enorm al cărora această lucrare a fost efectuată. Această cercetare a fost susținută de grantul 13.820.09.08/RoF de Cooperare bilaterală Romania-Moldova a Academiei de Științe a Moldovei.

Bibliografie/ References

- Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*, 2013;24(9):2206-23.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011; 61(2):69-90.
- Cummings SR, Tice JA, Bauer S, Browner WS, Cuzick J, Ziv E, Vogel V, Shepherd J, Vachon C, Smith-Bindman R, Kerlikowske K. Prevention of breast cancer in postmenopausal women: Approaches to estimating and reducing risk. *J Natl Cancer Inst*, 2009;101:384-98.
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*, 2000; 406: 747-752.
- Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*, 2011; 5 (1): 5-23.
- Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiva S, Yuan Y, Gräf S, Ha G, Haffari G, Bashashati A, Russell R, McKinney S; METABRIC Group, Langerød A, Green A, Provenzano E, Wishart G, Pinder S, Watson P, Markowitz F, Murphy L, Ellis I, Purushotham A, Børresen-Dale AL, Brenton JD, Tavaré S, Caldas C, Aparicio S. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 2012; 486(7403):346-52.
- Suzuki M, and Tarin D. Gene expression profiling of human lymph node metastases and matched primary breast carcinomas: Clinical implications. *Molecular Oncology*, 2007; 1, 172-180.
- Hao X, Sun B, Hu L, Lähdesmäki H, Dunmire V, Feng Y, Zhang SW, Wang H, Wu C, Wang H, Fuller GN, Symmans WF, Shmulevich I, Zhang W. Differential gene and protein expression in primary breast malignancies and their lymph node metastases as revealed by combined cDNA microarray and tissue microarray analysis. *Cancer*, 2004; 100 (6), 1110-1122.
- Feng Y, Sun B, Li X, Zhang L, Niu Y, Xiao C, Ning L, Fang Z, Wang Y, Zhang L, Cheng J, Zhang W, Hao X. Differentially expressed genes between primary cancer and paired lymph node metastases predict clinical outcome of node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat*, 2007; 103(3):319-29.
- Falck AK, Fernö M, Bendahl PO, Ryden L. Does Analysis of Biomarkers in Tumor Cells in Lymph Node Metastases Give Additional Prognostic Information in Primary Breast Cancer? *World J Surg*, 2010; 34:1434-1441.
- Falck AK, Fernö M, Bendahl PO, Ryden L. Molecular Classification in Primary Breast Cancer and Corresponding Lymph Node Metastasis Show Impaired Prognostic Profile in the Metastatic Node. *Cancer Res*, 2011; 71(24), 566s-67s.
- Falck AK, Bendahl PO, Chebil G, Olsson H, Fernö M, Ryden L. Biomarker expression and St Gallen molecular subtype classification in primary tumours, synchronous lymph node metastases and asynchronous relapses in primary breast cancer patients with 10 years' follow-up. *Breast cancer Res Treat*, 2013;140(1):93-104.
- Adamczyk A, Niemiec J, Ambicka A, Małecki K, Wysocki WH, Mituś J, Ryś J. Expression of ER/PR/HER2, basal markers and adhesion molecules in primary breast cancer and in lymph nodes metastases: a comparative immunohistochemical analysis. *Pol J Pathol*, 2012; 63: 228-234.
- Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*, 2013; 31(31):3997-4013.
- Azoulay S, Laé M, Fréneaux P, Merle S, Al Ghuzlan A, Chnecker C, Rosty C, Klijanienko J, Sigal-Zafrani B, Salmon R, Fourquet A, Sastre-Garau X, Vincent-Salomon A. KIT is highly expressed in adenoid cystic carcinoma of the breast, a basal-like carcinoma associated with a favorable outcome. *Mod Pathol*, 2005; 18:1623-31.
- Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Ann Oncol*, 2011; 22(8):1736-47.
- Suciu C, Muresan AM, Cornea R, Suciu O, Dema A, Raica M. Semi automated evaluation of Ki 67 index in invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncol Lett*, 2014; 7: 107-114.
- Weigelt B., Glas AM, Wessels LF, Witteveen AT, Peterse JL, van't Veer LJ. Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003;100(26):15901-15905.
- van der Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards RA. Gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*, 2002; 347, 1999-2009.
- Bernards R, Weinberg R. A progression puzzle. *Nature*, 2002; 418(6900):823.
- Montel V, Huang TY, Mose E, Pestonjamas K, Tarin D. Expression profiling of primary tumors and matched lymphatic and lung metastases in a xenogeneic breast cancer model. *Am Pathol*, 2005; 166 (5), 1565-1579.
- Montel V, Mose ES, Tarin D. Tumor-stromal interactions reciprocally modulate gene expression patterns during carcinogenesis and metastasis. *Int J Cancer*, 2006; 119(2):251-63.

highest rate of shifting has been reported from luminal to triple negative phenotype.

Authors' disclosures of potential conflicts of interest

The author indicated no potential conflicts of interest.

Acknowledgements

The author is thankful to Professor Marius Raica and entire team from the Department of Microscopic Morphology/Histology, Angiogenesis Research Center, "Victor Babeș" University of Medicine and Pharmacy Timisoara, Romania, by whose enormous support this work could be done. This work was sustained by Bilateral Cooperation Romania-Moldova grant 13.820.09.08/RoF of Academy of Sciences of Moldova.

23. Urquidi V, Sloan D, Kawai K, Agarwal D, Woodman AC, Tarin D, Goodison S. Contrasting expression of thrombospondin-1 and osteopontin correlates with absence or presence of metastatic phenotype in an isogenic model of spontaneous human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res*, 2002; 8 (1), 61-74.
24. Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. in *Diseases of the Breast*, ed. Freeman, S. (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia), 2000, 749-751.
25. Oskarsson T. Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. *Breast*, 2013;22 Suppl 2:S66-72.
26. Castaneda C, Andrés E, Barcena C, Gómez HL, Cortés-Funés H, Ciruelos E. Behaviour of breast cancer molecular subtypes through tumour progression. *Clin Transl Oncol*, 2012; 14(6):481-5.
27. Santinelli A, Pisa E, Stramazzotti D, Fabris G. HER-2 status discrepancy between primary breast cancer and metastatic sites. Impact on target therapy. *Int J Cancer*, 2008; 122: 999-1004.
28. Niikura N, Liu J, Hayashi N, Mittendorf EA, Gong Y, Palla SL, Tokuda Y, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, Ueno NT. Loss of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression in metastatic sites of HER2-overexpressing primary breast tumors. *J Clin Oncol*, 2012; 30: 593-599.
29. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2002; 2(8), 563-572.
30. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 2002; 415(6871):530-6.

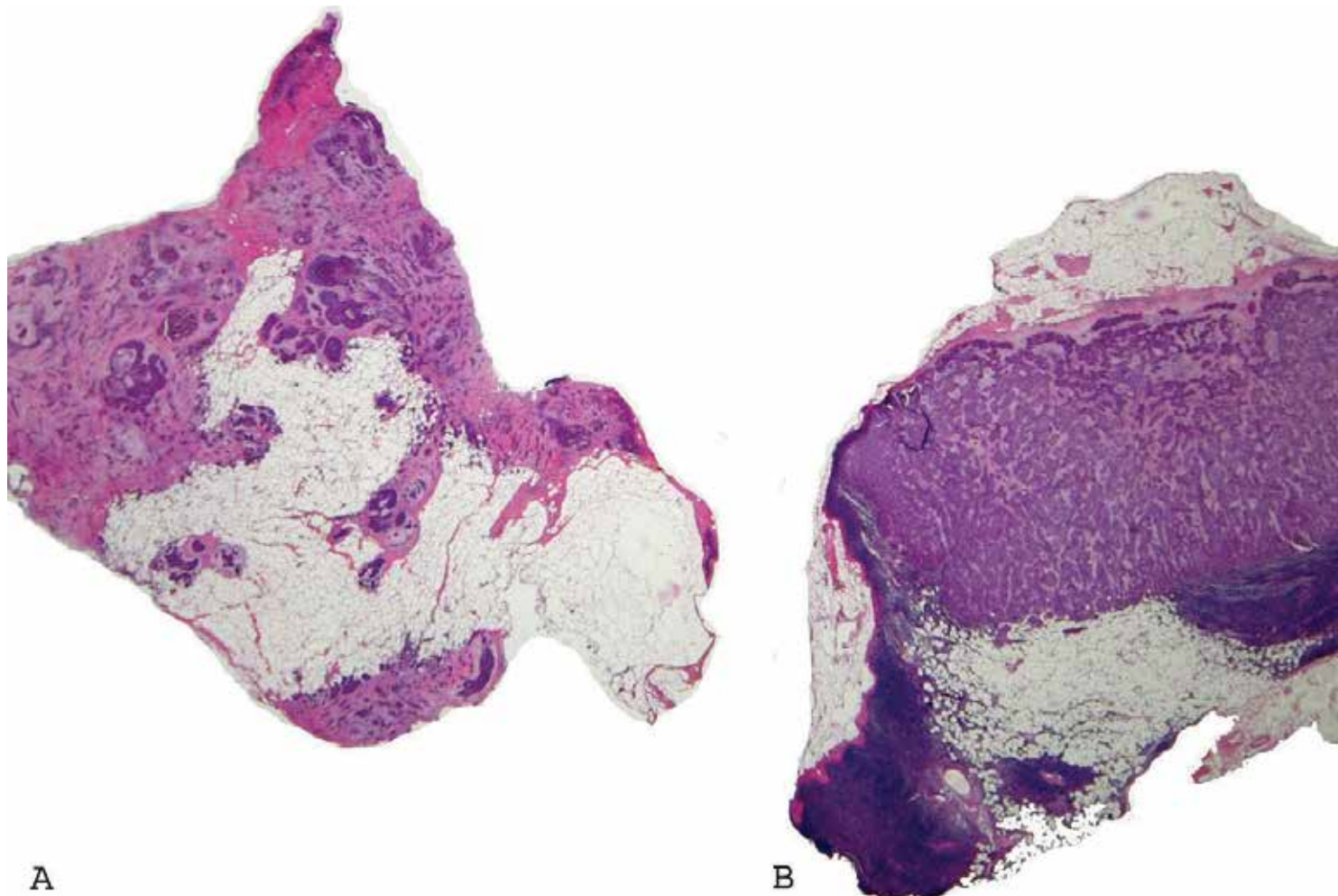


Fig. 1

Carcinom mamar invaziv de tip NOS. Tumora primară (A) și LNM (B) procesate pe aceeași lamă histologică. HE, x10

Breast carcinoma NOS type. Primary tumor (A) and its LNM (B) processed on the same slide. HE, x10

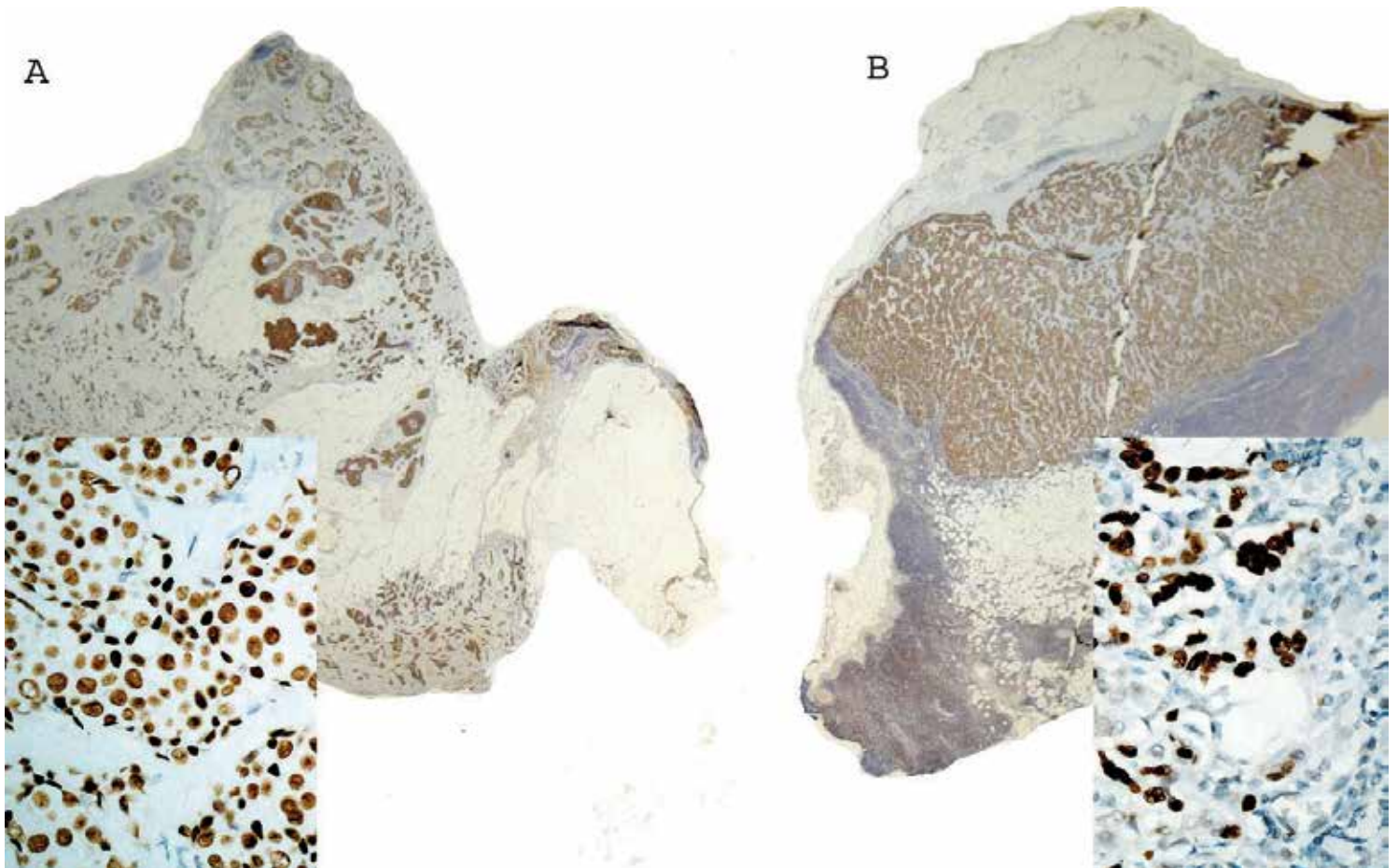


Fig. 2

Carcinom mamar invaziv de tip NOS, G2. Tumora primară (A) și LNM (B) marcate cu anticorp ER/6F11 pe aceeași lamă; x10 și x400 (colțuri jos). Tumoarea a fost evaluată drept ER+ în ambele localizări.

Breast carcinoma NOS type, G2. Primary tumor (A) and its LNM (B) marked with ER/6F11 antibody on the same slide; x10 and x400 (bottom corners). Tumor was considered as ER+ at both sites.

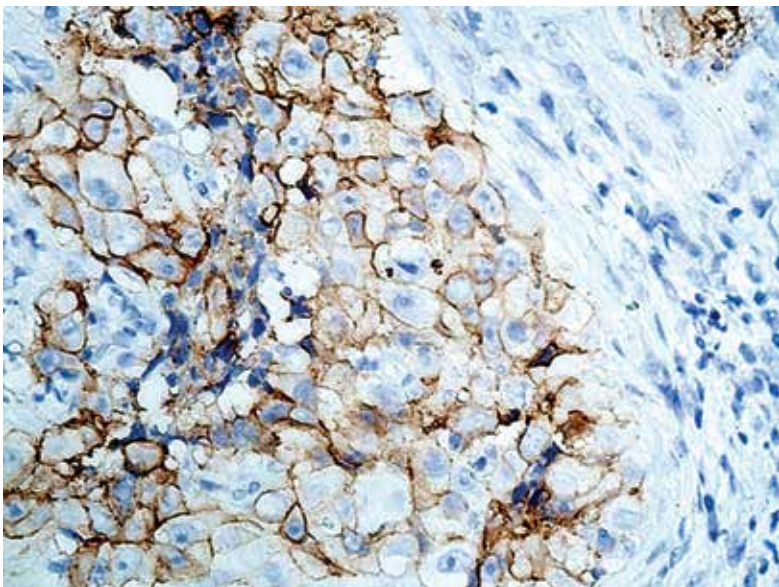


Fig. 3

Carcinom mamar invaziv de tip NOS, G3, scor "+3" pentru markerul Her2/neu, x400.

Invasive breast carcinoma, NOS type, G3, scored as "+3" for Her2/neu marker, x400.

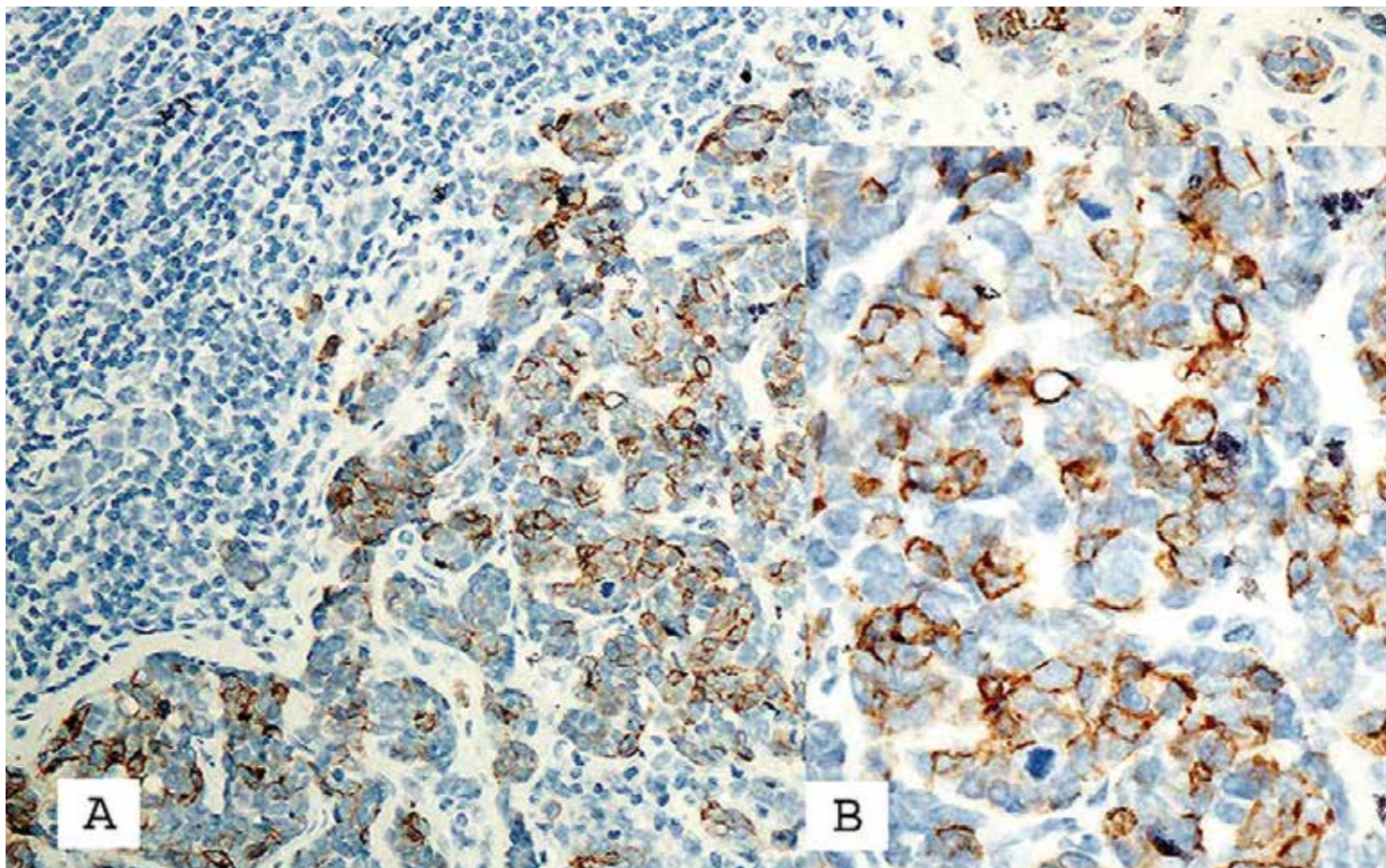


Fig. 4

Metastază limfonodală a carcinomului mamar invaziv de tip NOS, G3, colorat pentru identificarea citokeratinei bazale CK5/XM26. A, x100; B, x400. Tumora a fost evaluată ca "+3" pentru CK5.

Lymph node metastasis of invasive breast carcinoma NOS type, G3, stained for basal cytokeratin CK5/XM26. A, x100; B, x400. Tumor was evaluated as "+3" for CK5.

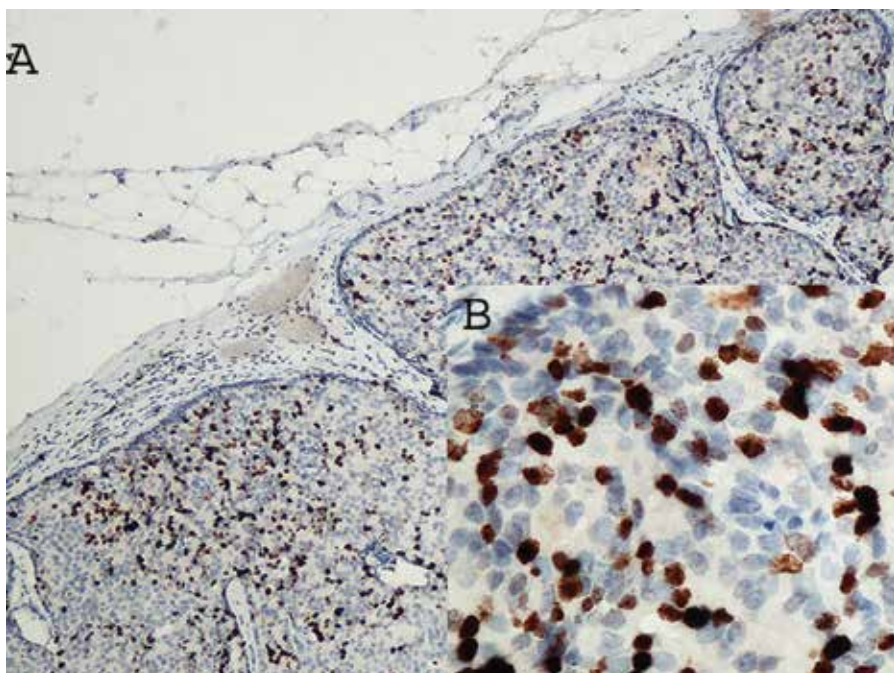


Fig. 5

Metastază limfonodală a carcinomului mamar invaziv de tip NOS, G2 marcată cu anticorp Ki67/K2, x100 (A) și x400 (B). Metastaza a fost evaluată drept una cu indice de proliferare înaltă (Ki67=30%).

Lymph node metastasis of breast carcinoma NOS type, G2, marked with Ki67/K2 antibody, x100 (A) and x400 (B). Metastasis was considered as a high proliferative one (Ki67>30%).