

Carcinomul mamar ductal invaziv fără tip histologic special: posedă oare o structură celulară omogenă?

Veaceslav Fulga^{1*†}, Vitalie Mazuru^{1†}, Valeriu David^{1†}, Lucian Rudico^{1†}, Lilian Saptefrați^{1†}

¹Catedra 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. Stefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004

e-mail: vmfulga@usmf.md

Invasive ductal breast carcinoma of no special type: does it have homogenous cell structure?

Veaceslav Fulga^{1*†}, Vitalie Mazuru^{1†}, Valeriu David^{1†}, Lucian Rudico^{1†}, Lilian Saptefrați^{1†}

¹Department of Histology, Cytology and Embryology, “Nicolae Testemițanu” State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova

Corresponding author:

Veaceslav Fulga, MD, PhD, Associate professor

Department of Histology, Cytology and Embryology

„Nicolae Testemițanu” State University of Medicine and Pharmacy

Ave. Stefan cel Mare si Sfânt 165, Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004

e-mail: vmfulga@usmf.md

Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

Cancerul mamar este o patologie cu un polimorfism etiologic binecunoscut, cu o evoluție clinică extrem de complexă și impact dramatic asupra structurii morbidității și mortalității oncologice. Clasificările histologice propuse de societățile morfologice internaționale reprezintă rezultatul realizărilor diagnostice clasice, însă cu un potențial prognostic limitat și oportunități clinice modeste. Această patologie manifestă particularități de rasă, areal geografic.

Ipoteza de cercetare

Arealul geografic, susținut de factori de mediu și stilul de viață, poate influența structura profilului molecular al carcinomului mamar.

Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Folosind metoda imunohistochimică, am determinat o eterogenitate celulară sporită a tipului ductal invaziv de carcinom mamar. În Republica Moldova se determină toate profilurile moleculare descrise în literatura de specialitate, iar grupul majoritar îl constituie formele moleculare luminale, caracterizate prin rată înaltă de proliferare.

What is not known yet, about the topic

Breast cancer represents a pathology with a well-known etiological polymorphism, with an extreme complex clinical evolution, and dramatic impact upon oncological morbidity and mortality. International morphology societies offer cancer classifications made on classic methods of diagnosis, but with a very low prognosis potential and few clinical options. This particular pathology has race and geographic features.

Research hypothesis

Geographic area, supported by environmental factors and life style can influence the molecular profile of breast carcinoma.

Article's added novelty on this scientific topic

Using the immunohistochemical method of diagnosis, an increased heterogeneity of invasive ductal breast carcinoma has been determined. All described molecular profiles are found in the Republic of Moldova, the most frequent one is the luminal molecular form, characterized by a high proliferation rate.

Rezumat

Introducere. În pofida faptului că în literatura de specialitate formele histologice de carcinom mamar sunt foarte bine descrise, mortalitatea feminină cauzată de această maladie este în continuă ascensiune. Scop: evaluarea caracterului populațiilor celulare în carcinomul mamar ductal invaziv fără

Abstract

Introduction. Despite the fact that histological types of breast cancer are very well described and a lot of markers are used, this type of cancer remains the main cause of death among women. Aim: the goal of this study was to evaluate cellular population of invasive breast carcinoma of no special

tip histologic special (NST) prin interpretarea expresiei markerilor surogate imunohistochimici, propuși pentru identificarea subtipurilor moleculare pe material morfologic colectat în Republica Moldova.

Material și metode. Materialul morfologic reprezintă tumori primare a 84 de paciente diagnosticate cu carcinom mamar ductal invaziv. Prin metoda imunohistochimică a fost studiată expresia receptorilor pentru estrogen (ER), progesteron (PR), factorul de creștere uman epidermal (HER2), citokeratinei bazală CK5 și proteinei nucleare Ki67.

Rezultate. În tipul NST de carcinom mamar, majoritatea cazurilor cercetate au prezentat fenotip molecular luminal (85%), în special, Luminal B (45 [54%] de cazuri). Analiza statistică a scos în evidență corelații semnificative între markerii surogate și subtipurile moleculare. Majoritatea tumorilor au avut un grad histologic de diferențiere G2 (45 [54%] de cazuri) și G3 (34 [40%] de cazuri) și au corelat statistic cu Ki67.

Concluzii. Formele NST de carcinom mamar ductal invaziv sunt caracterizate printr-o eterogenitate celulară marcată și multiple particularități moleculare. În materialul morfologic analizat, grupul majoritar l-au constituit formele moleculare luminale, cu rată înaltă de proliferare.

Cuvinte cheie: carcinom mamar tip NST, markeri surogate, Er, Pr, HER2, Ki67, CK5

Introducere

Carcinomul mamar este cea mai răspândită boală oncologică, care afectează, cu predilecție, populația feminină. Respectiva patologie este descrisă ca un grup de afecțiuni eterogene, diferite ca și evoluție clinică, aspect morfologic și sensibilitate terapeutică [1]. Morfologia clasică a separat carcinomul mamar în multiple grupuri. Baza acestei segregări a servit-o interacțiunea dintre ineficiența terapeutică și diversitatea morfologică, în rezultat constatându-se, că cele mai răspândite forme histologice de carcinom mamar sunt cele ductal invazive (75-85%).

Deoarece clasificările anterioare nu au putut satisface pe deplin necesitățile terapeutice, au fost dezvoltate metode mult mai fine, bazate pe interpretarea expresiei genelor ce determină evidențierea diferitor fenotipuri de carcinom mamar, prin intermediul statutului receptorilor hormonalni [2, 3]. În prezent, statutul receptorilor de estrogen, progesteron și HER2 în carcinoamele mamare poate fi determinat, aplicând markeri imunohistochimici surogate, astfel, cazurile de cancer mamar pot fi clasificate în cel puțin 5 subtipuri moleculare: Luminal A, Luminal B, *Basal-like*, 5-Negative phenotype (5-NP) și HER2 pozitiv.

Studiul profilului expresiei genice a dezvăluit eterogenitatea marcată a factorilor moleculari în structura carcinomului mamar ductal invaziv, care era asociat cu rezultate clinice variabile. Weighelt B. și coaut. (2008) consideră că formele NST de carcinom mamar ar putea include toate caracteristicile moleculare, descrise inițial de Perou C. și coaut. (2000), drept subtipuri intrinseci, spre deosebire de tipurile histologice speciale de carcinom mamar (cu excepția carcinomului apocrin), care sunt omogene și aparțin doar unui subtip molecular [2,

type (NST) by expression of main surrogate markers used to define molecular subtypes.

Material and methods. The specimens of primary tumors of 84 patients were immunostained for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor (HER2), basal cytokeratin CK5 and nuclear protein Ki67.

Results. In the structure of breast carcinoma of NST type the Luminal group is dominating (84.52%) and the majority rate had Luminal B subtypes (45 cases [54%]). The statistical analysis revealed a significant correlation between surrogate markers and molecular subtypes. The majority of tumors had G2 (45 cases [54%]) and G3 grades (34 cases [40%]), and correlated statistically to Ki67 marker.

Conclusions. Ductal invasive carcinoma of no special type is a heterogeneous disease with many molecular features. The highest rate was determined in the Luminal group. The majority of tumors with such histological structure have a high rate of proliferation.

Keywords: breast cancer NST type, surrogate markers, Er, Pr, HER2, Ki67, CK5

Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide. It is described as a group of heterogeneous disease, different in clinical course, pathological aspects and therapeutic sensibility [1]. Classical pathology has segregated this carcinoma into multiple groups, based on their overall morphology. The most common type reported is invasive ductal carcinoma, not otherwise specified (75%-85%).

Because previous classifications could not fully capture the diversity of the disease, other classification system based on hormone receptor status and gene expression profiling of breast cancers has been developed [2, 3]. Nowadays, estrogen receptor, progesterone and HER2 receptor status of breast tumors can be determined by immunohistochemical markers and the breast cancer cases can be accordingly classified into at least five molecular subtypes including Luminal A, Luminal B, Basal-like, 5-Negative phenotype (5-NP) and HER2 positive.

Gene expression profiling has revealed a high degree of molecular heterogeneity in the structure of invasive ductal carcinoma, which is associated with variable clinical outcomes. Weighelt B. *et al.* (2008) consider that carcinoma of NOS type could have all molecular features described by Perou C. *et al.* (2000) as intrinsic subtypes, whereas histological special-type cancers, apart from apocrine carcinoma, are homogeneous and only belong to one molecular subtype [2, 4]. Contrary to the historical view of low-to-high grade tumor progression model, the recent data indicate that low-grade and high-grade of ductal carcinomas are different diseases, with distinct genetic alterations. But obtaining information of gene expression by microarray techniques it's quiet laborious and expensive, therefore Goldhirsch A. *et al.* (2011, 2013) pur-

4]. Contrar viziunilor istorice, bazate pe modelul progresiei stadiale a tumorilor, studiile recente au demonstrat faptul că, carcinoamele ductale cu grad înalt și cele cu grad scăzut de diferențiere sunt patologii diferite, cu modificări genetice distincte. Însă, obținerea informației privind expresia genelor prin tehnici *microarray* (tehnici bazate pe hibridizarea acizilor nucleici, l. engl. *microarray image processing*) este laborioasă și costisitoare. Din acest considerent, Goldhirsch A. și coaut. (2011, 2013), au propus stabilirea unui algoritm de standardizare al examenului imunohistochimic, ce ar servi la stabilirea diagnosticului molecular de cancer mamar și anume – imunomarcarea receptorilor hormonal pentru estrogen (ER), progesteron (PR), factorul de creștere uman epidermal (HER2) și a indicelui de proliferare Ki67 [5, 6].

Din cauza incidenței sporite a carcinomului mamar ductal invaziv, am considerat oportună descrierea acestui tip de cancer prin prisma clasificării moleculare, folosind markeri surrogat. În prezentul studiu, am determinat că structura celulară a carcinomului mamar invaziv de tip NST este eterogenă, grupul majoritar îl constituie formele moleculare luminale, caracterizate prin rată înaltă de proliferare.

Material și metode

Pacienți

În acest studiu retrospectiv, au fost cercetate tumori primare, colectate de la 84 de paciente diagnosticate cu cancer mamar, care nu au fost supuse tratamentului preoperatoriu chimio- și radioterapeutic, cu vârste cuprinse între 33-86 de ani. Gradul histologic de diferențiere a fost evaluat conform sistemului de gradare Scarff-Bloom-Richardson [7]. Toate cazurile selectate au fost diagnosticate de doi morfologi ca forme NST de carcinom mamar invaziv.

Procesarea primară, examenul imunohistochimic

Materialul biologic a fost fixat în formalină de 10%, neutră, tamponată, și ulterior – inclus în parafină (*Paraplast High Melt*, Leica Biosystems, Nußloch, Germania). Evaluarea

posed to use immunohistochemical definition of estrogen and progesterone receptor, the detection of overexpression of the human epidermal growth factor receptor 2 and Ki67 labeling index [5, 6].

Because the invasive ductal cancer is the most frequent breast tumor in oncology, we considered opportune to describe this type of cancer from molecular classification position by using surrogate markers. In the present work we found, that cellular structure of invasive breast cancer of no special type is not homogeneous. The highest rate in its structure has Luminal group and the majority of tumors with such histological structure had a high rate of proliferation.

Material and methods

Patients

In this retrospective study were analyzed primary breast carcinomas of 84 patients, aged 33-86 years old. In all cases no chemo- and radiotherapy were applied. Histological grade was scored by the Bloom-Richardson grading system. Histopathological diagnosis was assessed by two pathologists and cases suitable for immunohistochemistry were carefully selected. All selected cases have been diagnosed as invasive ductal carcinoma of NST (no special type) type.

Specimen processing and immunohistochemistry

The biological material was fixed in 10% phosphate buffered formalin and paraffin embedded (*Paraplast High Melt*, Leica Biosystems, Nußloch, Germany). The immunohistochemical assessment included 5 surrogate markers, for ER (Er/6F11), PR (Pr16), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2 polyclonal), marker of proliferation Ki67 (Ki67/K2), basal cytokeratin CK5 (CK5/XM26) (Table 1). Slides were processed automatically on Leica Bond-Max autostainer (*Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany*). Hematoxylin solution, Harris modified (HHS32, Sigma-Aldrich) was used for

Table 1

Anticorpii, metoda de demascare și sistemul de vizualizare

Receptor	Clona anticor-pului	Sursa/timpul de incubare/diluția	Metoda de demascare/timp	Sistemul de vizualizare/timp
ER PR	6F11 16	Leica Biosystem, Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK/15 min/RTU*	Bond Epitope Retrieval Solution 1, (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK)/20 min	Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK)/15 min
HER2	poli-clonal	Dako Glostrup Denmark/30 min/RTU*	Dako Target Retrieval Solution, pH6/20 min	EnVision-HER/30 min
Ki67 CK5	K2 XM26	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)/15min

Notă: * – gata de utilizare (l. engl. *ready to use*).

Table 1

Antibodies, systems of retrieval and detection used for immunohistochemical assays

Receptor	Anti-body clone	Source/incubation time/ dilution	Retrieval system/ time	Detection/time
ER PR	6F11 16	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
HER2	poly-clonal	Dako Glostrup Denmark/30 min/RTU	Dako Target Retrieval Solution, pH6/20 min	EnVision-HER/30 min
Ki67 CK5	K2 XM26	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

Note: * – ready to use.

imunohistochimică a inclus 5 markeri surogati: pentru ER (Er/6F11), PR (Pr16), factorul de creștere uman epidermal-2 (HER2 policlonal), markerul proliferării celulare Ki67 (Ki67/K2), citokeratina bazală CK5 (CK5/XM26) (Tabelul 1). Lamele au fost procesate automat, utilizând Leica Bond-Max autostainer (*Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germania*). Pentru contracolorarea nucleelor, a fost folosită hematoxină modificată după Harris (*HHS32, Sigma-Aldrich*) (Fig. 1).

Evaluarea microscopică

Receptorii hormonalni au fost cuantificați în funcție de procentaj. S-a evaluat reacția nucleară pozitivă la cel puțin 1000 de celule tumorale în 10 câmpuri de vedere. Am folosit ghidul de evaluare al rezultatelor, propus de Allred D. și coaut. (1998), care combină procentajul celulelor pozitive cu intensitatea expresiei nucleare [8]. Cazurile evaluate cu [+1] – [+3] au fost considerate pozitive. Pragul minim acceptat pentru interpretarea pozitivă a reacției a fost de 10%.

Pentru evaluarea markerului HER2, a fost utilizat sistemul Leica Bond Oracle HER2 IHC System (*Leica Biosystems, Nußloch, Germania*). Statutul HER2 a fost interpretat în conformitate cu recomandările Societății Americane de Oncologie Clinică (Tabelul 2) [9]. Cazurile interpretate cu [+2] și [+3] au fost considerate pozitive.

Tabelul 2

Evaluarea markerului HER2 în conformitate cu recomandările Societății Americane de Oncologie Clinică [9]

Scor HER2	Expresie membranară (pattern circumferențial și intensitate)	Celule tumorale colorate, %
0	-/+	<10
+1	-/+	>10
+2	++/+++	>10
+3	++++	>10

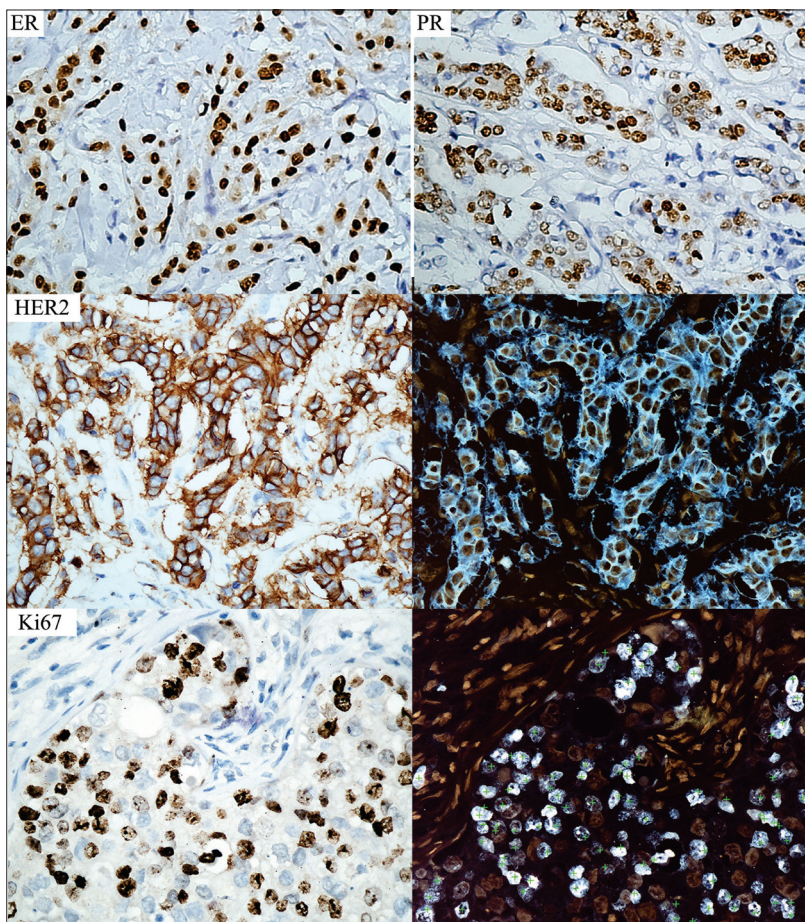


Fig. 1 Imagini reprezentative ale expresiei ER, PR, HER2, Ki67, colorate prin metoda imunohistochimică (carcinom mamar, tumora primară). Imagine-negativ, interpretată cantitativ folosind soft-ul *Nis-elements BR 2.30* (×400), pentru evaluarea expresiei HER2 și Ki67.

Fig. 1 Representative images of ER, PR, HER2, Ki67, immunohistochemical staining in primary breast carcinomas. Cases evaluated for HER2 and Ki67 were inverted and counted by *Nis-elements BR 2.30* software (×400).

counterstaining the nucleus (Fig. 1).

Microscopic evaluation

The hormonal receptors were scored depending on the percentage of stained cells. Was evaluated positive nuclear reaction for at least 1000 tumor cells in 10 fields of view. We followed the guidelines suggested by Allred D. *et al.* (1998), which are combining the percentage of positive cells with intensity of nuclear staining [7]. Cases scored [+1] – [+3] were considered positive. The threshold of positivity was 10%.

The HER2 assessments were made on Leica Bond Oracle HER2 IHC System (*LeicaBiosystem, Nußloch, Germany*). The HER2 status was interpreted in accordance with American Society of Clinical Oncology recommendations (Table 2) [9]. Cases interpreted as [+2] and [+3] were considered positive.

Ki67 marker was counted using a semi-quantitative method performed by Suciuc *et al.* (2014) [10]. A 14% threshold was used based

on Goldhirsch A. *et al.* (2013) recommendation [6].

CK5 cyokeratin was interpreted in accordance with Azoulay S. *et al.* (2005) (Table 3). Cases evaluated as [+1] – [+3] were considered positive (Fig. 2).

Based on St. Gallen (2013) recommendation molecular subtypes we clustered, as follows: ER⁺ and/or PR⁺, HER2⁻, CK5⁻, Ki67<14% as Luminal A; ER⁺ and/or PR⁺, HER2⁺, CK5⁻ as Luminal B/HER2; ER⁺ and/or PR⁺, HER2⁻, CK5⁻, Ki67>14% as

Table 2

HER2 evaluation according to recommendations of American Society of Clinical Oncology [9]

HER2 score	Intensity and circumference (membranous expression)	Colored cancer cells, %
0	-/+	<10
+1	-/+	>10
+2	++/+++	>10
+3	++++	>10

Markerul Ki67 a fost cuantificat folosind metoda semi-cantitativă, propusă de Suciuc C. și coaut. (2014) [10]. În baza recomandărilor lui Goldhirsch A. și coaut. (2013), a fost folosit ca barem al pozitivității pragul de 14% [6].

Expresia citokeratinei CK5 a fost interpretată în conformitate cu recomandările lui Azoulay S. și coaut. (2005), Tabelul 3 [11]. Cazurile asociate cu [+1] și [+3] au fost considerate pozitive (Fig. 2).

Urmând recomandările consorțiului oncologilor de la St. Gallen (2013), subtipurile moleculare au fost grupate, după cum urmează: ER⁺ și/sau PR⁺, HER2⁻, CK5⁻, Ki67<14% – drept Luminal A; ER⁺ și/sau PR⁺, HER2⁺, CK5⁻ – drept Luminal B/HER2; ER⁺ și/sau PR⁺, HER2⁻, CK5⁻, Ki67>14% – drept Luminal B/Ki67; ER⁺ și/sau PR⁺, HER2⁺, CK5⁻, Ki67>14% – drept Luminal B/HER2/Ki67; ER⁻, PR⁻, HER2⁺, CK5⁻ – ca și HER2-supraexprimat; ER⁻, PR⁻, HER2⁻ și CK5⁺ – denumit *Basal-like*; ER⁻, PR⁻, HER2⁻ și CK5⁻ – ca și 5-NP (subtip 5 negativ) [6].

Tabelul 3

Evaluarea expresiei citokeratinei CK5 în baza recomandărilor lui Azoulay S. și coaut. (2005) [11]

Gradul expresiei	Celule tumorale pozitive, %
0	0
+1	<10
+2	10-50
+3	>50

Captarea imaginilor și analiza statistică

Evaluarea microscopică a fost efectuată folosind microscopul Nikon Eclipse 80i, înzestrat cu cameră Nikon DS-Fi1 și soft-ul de imagini Nis-elements BR 2.30 (Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Olanda). Pentru interpretarea statistică (media și eroarea standard a mediei) și corelarea Spearman a rezultatelor, a fost aplicat soft-ul WinStat 2012.1 (R. Fitch Software, Bad Krozingen, Germania). Valoarea $p < 0,05$ a fost considerată statistic semnificativă pentru toate rezultatele. Pentru evaluarea corelațiilor statistice, subtipul 5-NP a fost marcat cu „1”, *Basal-like* – cu „2”, HER2⁺ – cu „3”, Luminal B/HER2 – cu „4”, Luminal B/HER2/Ki67 – cu „5”, Luminal B/Ki67 – cu „6” și Luminal A – cu „7”.

Aspecte etice

Studiul a fost aprobat de către Comitetul de Etică a Cercetării al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova (proces-verbal nr. 21/13 din 31.03.2014, președinte CEC – Mihail Gavriliuc, dr. hab. șt. med., prof. univ.).

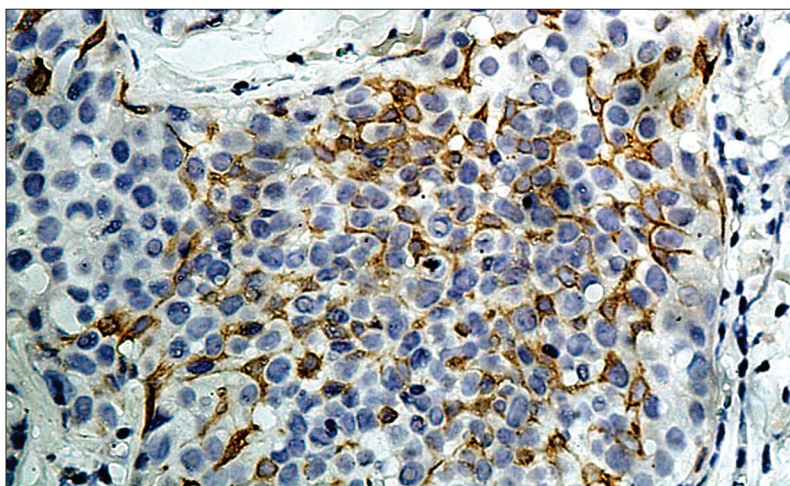


Fig. 2 Carcinom mamar ductal invaziv de tip NST, evaluat imunohistochimic pentru markerul CK5. Intensitatea expresiei cuantificată [+2] (×400).

Fig. 2 Breast carcinoma of NOS type evaluated immunohistochemically for CK5 as [+2] (×400).

Luminal B/Ki67; ER⁺ and/or PR⁺, HER2⁺, CK5⁻, Ki67>14% as Luminal B/HER2/Ki67; ER⁻, PR⁻, HER2⁺, CK5⁻ as HER2-overexpressed; ER⁻, PR⁻, HER2⁻ and CK5⁺ as *Basal-like*; ER⁻, PR⁻, HER2⁻ and CK5⁻ as 5-NP (five negative subtype) [6].

Image acquisition and statistical analysis

A Nikon Eclipse 80i microscope with Nikon DS-Fi1 camera and Nis-elements BR 2.30 imaging software were used for microscopic evaluation (Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Netherlands). For descriptive statistics (mean and standard error of the mean) and Spearman's correlation was used WinStat 2012.1 software (R. Fitch Software, Bad Krozingen, Germany). For all the tests a value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. In order to evaluate data correlation, the unclassified subtype (or 5-NP) was assigned as „1”, *Basal-like* as „2”, HER2⁺ as „3”, Luminal B/HER2- „4”, Luminal B/HER2/Ki67 – „5”, Luminal B/Ki67 – „6” and Luminal A was equated with „7”.

Table 3

Evaluation of CK5 expression according to Azoulay S. et al. (2005) recommendations [11]

Degree of expression	Positive cancer cells, %
0	0
+1	<10
+2	10-50
+3	>50

Ethical issues

This study was approved by the Ethics Committee of the “Nicolae Testemițanu” State University of Medicine and Pharmacy from Chisinau, Republic of Moldova (approval number 21/13/31.03.2014, president of EC – Mihail Gavriliuc, MD, PhD, University professor).

Results

In our study the majority of tumors were graded G2 (45 cases [54%]) and G3 (34 cases [40%]). Respectively, G1 grade was a rare one, determined in 5 cases (6%) only.

ER receptor was determined positive in 68 cases, from which the majority was scored as [+3] (56 cases). PR marker was positive in 58 cases, HER2 in 18 cases and CK5/6, respectively in 11 cases. In accordance to Ki67 marker positivity, tu-

Rezultate

În acest studiu, majoritatea tumorilor au fost evaluate cu gradul de diferențiere celulară G2 (45 cazuri [54%]) și G3 (34 cazuri [40%]). Respectiv, G1 a fost rar întâlnit, determinat doar în 5 cazuri, ceea ce a constituit 6% din lotul studiat.

Receptorul ER a fost evaluat pozitiv în 68 de cazuri, dintre care majoritatea au fost cuantificate ca [+3] (56 cazuri). Markerul PR a fost pozitiv în 58 de cazuri, HER2 – în 18 cazuri și respectiv, CK5 – în 11 cazuri. Evaluând expresia markerului Ki67, am determinat tumori cu grad înalt de proliferare (>14% din celule pozitive) în 48 de cazuri.

În urma analizei frecvenței subtipurilor moleculare, s-a determinat că grupul luminal este dominant, iar cota majoritară i-a revenit subtipului Luminal B (45 cazuri [54%]) (Tabelul 4).

În relație cu gradul histologic de diferențiere, am realizat că G1 este comun doar pentru grupul molecular luminal (Tabelul 5).

Tabelul 4

Frecvența subtipurilor moleculare în carcinomul mamar ductal invaziv de tip NST

Grupul	Subtip	n	%	%
Bazal, hormon-independent	5-NP	3	3,57	
	<i>Basal-like</i>	2	2,38	15,48
	HER2	8	9,53	
Luminal, hormon-dependent	Luminal A	26	30,95	
	Luminal B/HER2	3	3,57	
	Luminal B/HER2/Ki67	7	8,33	84,52
	Luminal B/Ki67	35	41,67	

Tabelul 5

Frecvența subtipurilor moleculare în relație cu gradul histologic de diferențiere.

Subtip	Grad	n	%
5-NP	G2	2	2,38
5-NP	G3	1	1,19
<i>Basal-like</i>	G3	2	2,38
HER2	G2	3	3,57
HER2	G3	5	5,95
Luminal A	G1	3	3,57
Luminal A	G2	15	17,87
Luminal A	G3	8	9,52
Luminal B/HER2	G2	3	3,57
Luminal B/HER2/Ki67	G1	1	1,19
Luminal B/HER2/Ki67	G2	5	5,95
Luminal B/HER2/Ki67	G3	1	1,19
Luminal B/Ki67	G1	1	1,19
Luminal B/Ki67	G2	17	20,24
Luminal B/Ki67	G3	17	20,24
Total		84	100

mors were considered as a high proliferative one (more than 14% of positive cells) in 48 cases.

By analyzing the frequency of subtypes we determined that Luminal group is dominating and the majority rate had Luminal B subtypes (45 cases [54%]) (Table 4).

Table 4

Molecular subtypes frequency in invasive ductal carcinoma of NST type.

Group	Subtype	n	%	%
Basal, hormone-negative	5NP	3	3.57	
	Basal-like	2	2.38	15.48
	HER2	8	9.53	
Luminal, hormone-positive	Luminal A	26	30.95	
	Luminal B/HER2	3	3.57	
	Luminal B/HER2/Ki67	7	8.33	84.52
	Luminal B/Ki67	35	41.67	

In correlation to histological grade we realized that G1 is common only for Luminal group (Table 5).

Table 5

The frequency of molecular subtypes in correlation to histological grade

Subtype	Grade	n	%
5NP	G2	2	2.38
5NP	G3	1	1.19
Basal-like	G3	2	2.38
HER2	G2	3	3.57
HER2	G3	5	5.95
Luminal A	G1	3	3.57
Luminal A	G2	15	17.87
Luminal A	G3	8	9.52
Luminal B/HER2	G2	3	3.57
Luminal B/HER2/Ki67	G1	1	1.19
Luminal B/HER2/Ki67	G2	5	5.95
Luminal B/HER2/Ki67	G3	1	1.19
Luminal B/Ki67	G1	1	1.19
Luminal B/Ki67	G2	17	20.24
Luminal B/Ki67	G3	17	20.24
<i>Total</i>		84	100

The statistical analysis revealed a significant correlation between surrogate markers and subtypes (Table 6). Histological grade had a single significant value in correlation to Ki67 marker.

Tabelul 6

Markerii surogate raportați la subtipul molecular și gradul histologic de diferențiere

	ER*	PR [†]	HER2 [‡]	Ki67 [§]	CK5 [#]	Subtip [§]	Grad
ER							
r		0,56	-0,35	-0,22	-0,38	0,58	-0,14
p		0,0001	0,001	0,022	0,0001	0,0001	0,102
PR							
r	0,56		-0,25	-0,09	-0,36	0,39	-0,15
p	0,0001		0,011	0,207	0,0001	0,0001	0,085
HER2							
r	-0,35	-0,25		0,02	0,19	-0,60	-0,05
p	0,001	0,011		0,444	0,038	0,0001	0,329
Ki67							
r	-0,22	-0,09	0,02		0,34	-0,51	0,23
p	0,022	0,21	0,44		0,001	0,0001	0,018
CK5							
r	-0,38	-0,36	0,19	0,34		-0,31	0,09
p	0,0001	0,0001	0,038	0,001		0,002	0,20
Subtip							
r	0,58	0,39	-0,60	-0,51	-0,31		-0,13
p	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,002		0,11
Grad							
r	-0,14	-0,15	-0,05	0,23	0,09	-0,13	
p	0,10	0,09	0,33	0,018	0,20	0,11	

Notă: * – receptor pentru estrogen; † – receptor pentru progesteron; ‡ – factorul de creștere uman epidermal 2; § – marker de proliferare; # – citokeratine bazale; § – subtip molecular; || – grad histologic de diferențiere; r – coeficient de corelație Spearman. Prag de semnificație statistică: p<0,05.

Analiza statistică a scos în evidență corelații semnificative între markerii surogate utilizați și subtipurile moleculare (Tabelul 6). Gradul histologic de diferențiere a corelat semnificativ doar cu markerul Ki67.

Discuții

În pofida faptului că tipurile histologice de carcinom mamar sunt foarte bine descrise și mulți markeri sunt propuși spre utilizare, acest tip de cancer rămâne a fi principala cauză de mortalitate în rândul populației feminine. Particularitățile histologice ale tumorii, precum tipul morfologic, gradul și invazia limfo-vasculară, sunt utilizați ca markeri de prognostic ai evoluției tumorale, fără a influența răspunsul terapeutic. Callagy G. și coaut. (2006), consideră că gradul histologic devine util ca valoare prognostică și predictivă în asociere cu gradul de invazie a nodulilor limfatici, gradul și dimensiunile tumorii – combinație cunoscută drept *Nottingham Prognostic Index* (NPI) [12]. Autorii consideră că NPI reprezintă un puternic factor independent de predicție al evoluției neoplasmului mamar, capabil de a oferi un scor prognostic individualizat fiecărui pacient în parte. Ținem să menționăm că, în lotul nostru, majoritatea tumorilor erau slab diferențiate, iar gradul histologic a corelat statistic semnificativ doar cu marker-ul Ki67.

În prezent, tot mai multe rezultate pledează în defavo-

Table 6

Surrogate markers reported to molecular subtypes and histological grade

	ER*	PR [†]	HER2 [‡]	Ki67 [§]	CK5/6 [#]	Subtype ^{&}	Grade
ER							
r		0.56	-0.35	-0.22	-0.38	0.58	-0.14
p		0.000	0.001	0.022	0.000	0.000	0.102
PR							
r	0.56		-0.25	-0.09	-0.36	0.39	-0.15
p	0.000		0.011	0.207	0.000	0.000	0.085
HER2							
r	-0.35	-0.25		0.02	0.19	-0.60	-0.05
p	0.001	0.011		0.444	0.038	0.000	0.329
Ki67							
r	-0.22	-0.09	0.02		0.34	-0.51	0.23
p	0.022	0.21	0.44		0.001	0.000	0.018
CK5/6							
r	-0.38	-0.36	0.19	0.34		-0.31	0.09
p	0.000	0.000	0.038	0.001		0.002	0.20
Subtype							
r	0.58	0.39	-0.60	-0.51	-0.31		-0.13
p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002		0.11
Grade							
r	-0.14	-0.15	-0.05	0.23	0.09	-0.13	
p	0.10	0.09	0.33	0.018	0.20	0.11	

Note: * – estrogen receptor; † – progesterone receptor; ‡ – human epidermal growth factor receptor 2; § – marker of proliferation; # – basal cytokeratin; & – molecular subtype; || – histological grade; r – Spearman rank. Significance level: p<0.05.

Discussion

Despite the fact that histological types of breast cancer are very well described and a lot of markers are used, this type of cancer remains the main cause of death among women. Histological features of the tumor, such as morphological type and grade, lymphovascular invasion are used as prognostic markers, which provide information about the patients' overall cancer outcome regardless of the therapeutic response. Callagy G. *et al.* (2006) consider that the histological grade becomes more useful if associated with lymph node stage, tumor grade and tumor size, combination known as *Nottingham Prognostic Index* (NPI) [12]. Authors consider that NPI remain the strongest independent predictors of outcome, to give an individualized prognostic score for each patient. We have to mention that in our assays the majority of tumors tend to have a poor differentiation and the histological grade had a statistical significant correlation only in relation to Ki67 marker.

Nowadays it seems that the traditional standard of treatment "one-dose-fits-all" it is ineffective, as it incurs all risks of subsequent drug toxicities and treatment failures. The key to success in personalized medicine is to uncover molecular biomarkers that drive individual variability in clinical outcomes or drug responses [13].

In order to personalize the treatment, Perou C. *et al.* (2000)

rea standardului tradițional de tratament „o doză pentru toți”, deoarece această abordare nu ia în calcul toate riscurile potențiale ale toxicității citostatice și, implicit, eșecul tratamentului adjuvant. Cheia succesului în tratamentul personalizat îl reprezintă punerea în evidență a markerilor moleculari, responsabili de variabilitatea individuală a evoluției clinice și răspunsul față de citostatice [13].

Pentru a personaliza tratamentul, Perou C. și coaut. (2000) propune de a determina profilul molecular al tumorilor mamare [2]. Însă, obținerea profilului genetic prin tehnici *microarray* este foarte costisitoare, motiv pentru care Goldhirsch A. și coaut. (2013) au propus identificarea imunohistochimică a receptorilor pentru estrogen și progesteron, detecția supraexpresiei receptorului HER2 și evaluarea indexului Ki67 [6].

Korsching E. și coaut. (2002) consideră că în tumorile glandei mamare coexistă diferite celule maligne, ce determină apariția subgrupelor de carcinom mamar, caracterizate prin expresia diferitor clustere proteice și alterări ale pattern-ului citogenetic [14]. Unele studii aduc argumente certe în favoarea existenței celulelor canceroase, ce poartă caracter individual și co-există într-o anumită tumoare, respectiv, diferă în aspectul abilității de metastazare. Mai mult, unele celule tumorale sunt non-metastatice [15]. La moment, profilul expresiei genice relevă un grad înalt de eterogenitate moleculară în structura carcinomului mamar ductal invaziv, asociat cu variabilitatea evoluției clinice. Aproximativ 80% dintre paciente dezvoltă tumori hormon-pozitive [16]. Aceste date corespund rezultatelor obținute de noi, unde majoritatea cazurilor au fost clasate drept grup molecular luminal.

Statutul ER este utilizat pentru a identifica tumorile sensibile la tratamentul hormonal. Pe de altă parte, statutul PR, care în linii generale corelează cu cel al ER, are un impact clinic mai puțin semnificativ, de o importanță predictivă relativă și nu presupune existența beneficiilor terapeutice în urma tratamentului hormonal. În plus, cazurile evaluate ca ER și PR pozitive nu presupun careva beneficii pentru tratamentul hormonal în comparație cu cazurile ER pozitive/PR negative [17, 18]. Acest grup a inclus, de la bun început, formele moleculare Luminal A și B [3]. Tumorile Luminal A sunt caracterizate prin expresia marcată a genelor estrogen-reglatoare și markerilor moleculari ai receptorilor de ER, în asocieră cu celulele diferențiate ale epitelului mamar. Aceste trăsături sunt mai puțin specifice pentru subtipul Luminal B și improprie pentru grupul hormon-negativ, caracterizat prin expresie marcată a genelor ce determină amplificarea proliferării celulare și, respectiv, presupun un prognostic rezervat. Rezultatele studiului nostru demonstrează predominarea tumorilor cu fenotip Luminal B. Tumori de acest subtip au fost cele mai frecvente și în datele prezentate de El Fatemi H. și coaut. (2012) [19].

Datorită faptului că markerul Ki67 este considerat crucial în estimarea prognosticului pacientelor diagnosticate cu carcinom mamar, am considerat oportună evaluarea acestuia în structura subtipului Luminal B/HER2. În consecință, acest grup a fost subdivizat în 2 subgrupuri – cu activitate proliferativă intensă (Luminal B/HER2/Ki67 și Luminal B/Ki67) și slabă (Luminal B/HER2). În prezentul studiu am determinat că acest subtip tinde să aibă o activitate proliferativă intensă (42

purposed to determine molecular profile of breast tumors [2]. But, obtaining information of gene expression by microarray techniques is quiet laborious and expensive, therefore Goldhirsch A. *et al.* (2013) suggested to use immunohistochemical definition of estrogen and progesterone receptor, the detection of overexpression of the human epidermal growth factor receptor 2 and Ki-67 labeling index [6].

Korsching E. *et al.* (2002) consider that different tumor cells co-exist in the female breast which give rise to subgroups of breast carcinomas characterized with different protein expression and cytogenetic alteration patterns [14]. Some studies have provided direct proof that individual cancer cells, co-existing within a given tumor, differ greatly in metastatic capacity, moreover some of them are non-metastatic [15]. Nowadays gene expression profiling has revealed a high degree of molecular heterogeneity in the structure of invasive ductal carcinoma, which is associated with variable clinical outcomes. Approximately 80% of patients develop hormone positive tumors [16]. This data are in line with our results, where the majority of cases were considered as Luminal one too.

ER status is utilized to identify tumors sensitive to anti-estrogen, endocrine therapy. PR status, which generally correlated with ER status, has less clinical significance and seems not to predict relative benefit from specific types of endocrine therapy. Moreover, cases evaluated as ER and PR positive may not receive additional benefit from endocrine therapy compared with ER positive/PR negative cases [17, 18]. This group was subdivided into Luminal A and Luminal B [3]. Luminal A tumors are characterized by a greater expression of estrogen-regulated genes and markers associated with differentiated breast epithelial cells. Such features are less apparent in Luminal B tumors and are not characteristic for hormone-negative group, which have a greater expression of proliferation-associated genes and poorer prognosis. In our results Luminal B tumors had the majority part. Similar data was reported by El Fatemi H. *et al.* (2012) which determined Luminal B tumors to be the most frequent molecular subtype [19].

Because Ki67 is considered as a crucial marker in defining the patients' future, we considered opportune to describe its activity inside of Luminal B/HER2 cases too. That's why this group was subdivided in 2 subgroups, with low (Luminal B/HER2) and high activity of proliferation (Luminal B/HER2/Ki67 and Luminal B/Ki67). We determined that such subtype, unfortunately, has a high proliferative activity (42 out of 45 cases) (Table 5). Our results are in line and with Cheang's M. *et al.* (2009) data concerning high aggressiveness of Luminal B/HER2 subtype [20].

There are some limitations of our study. The tumors were classified in accordance according to ER, PR, Ki67, CK5 and HER2 status determined by IHC surrogates, which is only an approximation of the genotype-based breast cancer subtype. But, IHC assays are cost-effective and have been accepted as useful clinical tests by many scientific communities.

In accordance to Carey L. *et al.* (2006) the immunohistochemical definition of Basal-like subtype is “ER negative, PR

din 45 cazuri), ceea ce se răsfrânge dramatic asupra evoluției bolii și, respectiv, asupra speranței de viață a pacientei (Tabelul 5). Rezultatele obținute în acest studiu coincid cu cele relatate de Cheang M. și coaut. (2009), astfel încât se certifică gradul înalt de agresivitate al subtipului Luminal B/HER2 [20].

Studiul nostru are și câteva restricții. Tumorile au fost clasificate în concordanță cu statutul imunohistochimic al markerilor surogate pentru receptorii ER, PR, Ki67, CK5 și HER2, ceea ce reprezintă doar o aproximație a studiilor genetice de determinare a fenotipului de carcinom mamar. Însă testele IHC sunt atractive în aspect financiar și utilitatea lor în clinică a fost certificată de majoritatea specialiștilor în domeniu.

În concordanță cu Carey L. și coaut. (2006), subtipul *Basal-like* este definit prin următoarea combinație a markerilor surogate „ER negativ, PR negativ, HER2 negativ, citokeratina 5/6 pozitivă și/sau *HER1* pozitiv” [21]. Datorită faptului că în studiul nostru nu a fost folosit markerul pentru *HER1*, este posibil ca unele cazuri *5-NP*, *de facto*, să aparțină subtipului molecular *Basal-like*. Subtipul molecular negativ pentru toți 5 markeri s-a descris a fi mai puțin agresiv decât *Basal-like*, dar mult mai periculos în cazul evoluției bolii decât tumorile cu subtip Luminal A [21, 22]. Mai mult decât atât, e posibil ca alte subtipuri moleculare din grupurile non-luminale să fie cuantificate ca tumori *Basal-like*. Acestea sunt subtipurile *Claudin-low* (ce se referă histologic la cancerul mamar metaplastic, cu particularități genetice similare celui cu celule stem-linkat și prin tranziție epitelio-mezenchimală), precum și subtipul molecular apocrin, caracterizat prin reacție pozitivă la receptorii de androgeni [23, 24]. Oricum, la moment, nu este trasată o abordare standardizată a conduitei terapeutice pentru cazurile ER, PR și *HER2* negative, aceasta reprezentând un domeniu științific ce rămâne a fi explorat pe viitor.

Concluzii

Formele NST de carcinom mamar ductal invaziv sunt caracterizate printr-o eterogenitate celulară marcată și multiple particularități moleculare. În Republica Moldova se determină toate profilurile moleculare descrise în literatura de specialitate, iar grupul majoritar îl constituie formele moleculare luminal, cu rată înaltă de proliferare. Evaluarea imunohistochimică a subtipurilor moleculare de carcinom mamar aduce relevanță, selectivitate diagnostică și are o deosebită importanță în elaborarea unui tratament personalizat.

Abrevieri și notații convenționale

NST – fără tip histologic special (l. engl. *no specific type*); ER – estrogen; PR – progesteron; HER2 – receptorul factorului de creștere uman epidermal; Ki67 – markerul nuclear de proliferare; CK5 – citokeratina bazală; 5-NP – fenotip 5 negativ; NPI – indice de prognostic Nottingham (l. engl. *Nottingham Prognostic Index*).

Declarația de conflict de interes

Autorii nu au indicat potențiale conflicte de interes.

Contribuția autorilor

VF a contribuit la *design*-ul studiului, colectarea și procesarea materialului primar, analiza statistică, scrierea articolului.

negative, HER2 negativ, cytokeratin 5/6 pozitiv and/or HER1 pozitiv” [21]. Because we did not use the last marker, HER1 it is possible that some of 5-NP cases in fact, could be Basal-like. The 5 negative phenotype molecular subtype (negative for all five markers) was proven to be less aggressive than Basal-like, but more aggressive in clinical outcome than Luminal A tumors [21, 22]. More than that, it is possible that other molecular subtypes within non-luminal group are included in our study as Basal-like. These is *Claudin-low* subtype (linked to metaplastic breast cancer, which shows similarity to stem cell-linked and epithelial-to-mesenchymal transition-linked signatures) and the molecular Apocrine subtype, which is displaying positivity for androgen receptor [23, 24]. Anyway, there is currently no standard targeted therapy for cases assessed as ER, PR and HER2 negative by IHC, although this represents an intensive area of further research.

Conclusions

Ductal invasive carcinoma of no special type is a heterogeneous disease with many molecular features. All described molecular profiles can be attested in the Republic of Moldova, but Luminal forms are the most common, having the highest rate of proliferation. Immunohistochemical evaluation of molecular subtypes of breast carcinoma has a particular high relevance in personalized therapy and selectiveness of diagnosis.

Abbreviations and conventional notations

NST – no specific type; ER – estrogen; PR – progesteron; HER2 – human epidermal growth factor receptor; Ki67 – marker of proliferation; CK5 – cytokeratin 5; 5-NP – five negative phenotype; NPI – Nottingham Prognostic Index.

Conflict of interests

Authors declare no financial or non-financial conflict of interests.

Authors' contribution

VF contributed to the design of the study, collected and processed the basic material, made the statistical analysis and wrote the article. VM, VD, LR participated in processing the data. LȘ conceived the research and contributed in writing the manuscript. The manuscript was read and approved by all authors.

VM, VD, LR au participat la procesarea datelor. LŞ a conceput studiul și a contribuit la redactarea manuscrisului. Materialul a fost citit și aprobat de către toți autorii.

Referințe / references

- Huber K., Carey L., Wazer D. Breast cancer molecular subtypes in patients with locally advanced disease: impact on prognosis, patterns of recurrence, and response to therapy. *Semin Radiat Oncol*, 2009; 19: 204-10.
- Perou C., Sorlie T., Eisen M., van de Rijn M., Jeffrey S., Rees C. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2000; 406(6797): 747-752.
- Prat A., Perou C. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology*, 2011; 5(1): 5-23.
- Weigelt B., Horlings H., Kreike B., Hayes M., Hauptmann M., Wessels L. *et al.* Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol*, 2008; 216(2): 141-50.
- Goldhirsch A., Wood W., Coates A., Gelber R., Thürlimann B., Senn H. 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.
- Goldhirsch A., Winer E., Coates A., Gelber R., Piccart-Gebhart M., Thürlimann B., Senn H. 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.
- Elston C., Ellis I. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 2002; 41(3A): 154-61.
- Allred D., Harvey J., Berardo M., Clark G. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*, 1998; 11: 155-168.
- Wolff A., Hammond M., Hicks D., Dowsett M., McShane L., Allison K. *et al.* 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.
- Suciu C., Muresan A., Cornea R., Suciu O., Dema A., Raica M. Semi-automated evaluation of Ki67 index in invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncol Lett*, 2014; 7: 107-114.
- Azoulay S., Laé M., Fréneaux P., Merle S., Al Ghuzlan 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(12): 1623-31.
- Callagy G., Pharoah P., Pinder S., Hsu F., Nielsen T., Ragaz J., Ellis I., Huntsman D., Caldas C. Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index. *Clin Cancer Res*, 2006; 12(8): 2468-2475.
- Spear B., Heath-Chiozzi M., Huff J. Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol Med*, 2001; 7: 201-204.
- Korsching E., Packeisen J., Agelopoulos K., Eisenacher M., Voss R., Isola J. *et al.* Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Lab Invest*, 2002; 82(11): 1525-33.
- Urquidí V., Sloan D., Kawai K., Agarwal D., Woodman A., 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.
- Engstrøm M., Opdahl S., Hagen A., Romundstad P., Akslen L., Haugen O., Vatten L., Bofin A. Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 2013; 140(3): 463-73.
- Stotter A., Walker R. Tumour markers predictive of successful treatment of breast cancer with primary endocrine therapy in patients over 70 years old: a prospective study. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2010; 75(3): 249-256.
- Bartlett J., Brookes C., Robson T., van de Velde C., Billingham L., Campbell F. *et al.* Estrogen receptor and progesterone receptor as predictive biomarkers of response to endocrine therapy: a prospectively powered pathology study in the Tamoxifen and Exemestane Adjuvant Multinational trial. *J Clin Oncol*, 2011; 29(12): 1531-1538.
- El Fatemi H., Chahbouni S., Jayi S., Mounna K., Melhouf M., Bannani A., Mesbahi O., Amarti A. Luminal B tumors are the most frequent molecular subtype in breast cancer of North African women: an immunohistochemical profile study from Morocco. *Diagn Pathol*, 2012; 7: 170.
- Cheang M., Chia S., Voduc D., Gao D., Leung S., Snider J. *et al.* Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2009; 101(10): 736-50.
- Carey L., Perou C., Livasy C., Dressler L., Cowan D., Conway K. *et al.* Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 2006; 295: 2492-2502.
- Huo D., Ikpat F., Khramtsov A., Dangou J., Nanda R., Dignam J. *et al.* Population differences in breast cancer: survey indigenous African women reveal over-representation of triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 2009; 27(27): 4515-21.
- 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; 24(29): 4660-4671.
- Hennesy B., Gonzalez-Angulo A., Stemke-Hale K., Gilcrease M., Krishnamurthy S., Lee J. *et al.* Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res*, 2009; 69(10): 4116-4124.