

EXPRESIA ESTROGEN RECEPTORULUI ERA ÎN DEPENDENȚĂ DE TIPUL MORFOLOGIC AL CARCINOMULUI MAMAR

Veaceslav Fulga^{1,2} – conf. univ., dr. șt. med.,
Valeriu David^{1,2} – conf. univ., dr. șt. med.,
Lucian Rudico^{1,2} – asist. univ., cercet. șt.,
Lilian Șaptefrați¹ – conf. univ., dr. hab. șt. med.

¹Catedra de histologie, citologie și embriologie,

²Laboratorul de morfologie,

IP USMF „Nicolae Testemițanu”

tel.: +373 22 205229, vmfulga@usmf.md

Rezumat

Unul din markerii utilizați cu succes în definirea subtipurilor moleculare, cu impact direct în tratamentul formelor hormon-dependente de carcinom mamar este receptorul pentru estrogeni ERα. Scopul lucrării date a constat în evaluarea comparativă a expresiei receptorului ERα în dependență de tipul histologic al tumorii, ductal sau lobular. *Material și metode.* Histologic și imunohistochimic (clona Er/6F11) au fost procesate 143 cazuri de carcinom invaziv ductal de tip NOS (*not otherwise specified*) și 18 cazuri de carcinom lobular invaziv. *Rezultate.* Expresia ERα nu este în funcție de tipul histologic al tumorii mamare. *Concluzii.* Carcinoamele mamare invazive de tip ductal NOS și lobular în majoritatea cazurilor au un grad G2 și G3 de diferențiere. Odată cu înaintarea în vârstă scade gradul de diferențiere al carcinoamelor mamare. Aceste tumori în majoritatea cazurilor sunt estrogen pozitive. Valoarea expresiei ER nu este în funcție de tipul și gradul histologic al tumorii și nu este influențat de vârstă pacientelor.

Cuvinte-cheie: cancer mamar ductal, lobular invaziv, ER

Summary. The ERα estrogen receptor expression in morphologically different types of breast cancer

One of the markers used successfully in defining molecular carcinoma subtypes, which has a direct impact in hormone-dependent types of treatment, is estrogen receptor ERα. *The purpose* aim of this study was a comparative evaluation of ERα receptor expression in histologically different types of mammary tumors, ductal or lobular. *Material and methods.* 143 cases of invasive ductal carcinomas NOS type and 16 invasive lobular carcinomas were processed histologically and immunohistochemically (clone Er/6F11) *Results.* The ERα expression is not influenced by histological type of mammary tumor. *Conclusions.* The majority of invasive ductal (type NOS) and lobular carcinomas have a G2 and G3 grade of differentiation. The histological grade of differentiation of breast carcinomas is diminishing with ages. Lobular and ductal invasive carcinomas are estrogen positive in majority of cases. The value of ER expression is not influenced by the histological type and grade of tumor and does not depend on patients' age.

Key words: invasive ductal, lobular breast cancer, ER

Резюме. Экспрессия ERα эстроген рецептора в зависимости от морфологического типа рака молочной железы

Рецептор эстрогенов ERα является одним из успешно используемых маркеров в определении молекулярных подвидов, с непосредственным использованием в качестве мишени при гормонально-зависимых формах рака молочной железы. Целью данного исследования являлось сравнительный анализ экспрессии ERα рецептора в зависимости от гистологического вида опухоли, протоковый или дольковый. Материал и методы. Были изучены гистологическим и иммуногистохимическим методами (клон Er/6F11) 143 случаев инвазивного протокового рака тип NOS (*not otherwise specified*) и 18 случаев инфильтрирующей дольковой карциномы. Результаты. Экспрессия ERα не зависит от гистологического вида опухоли молочной железы. Выводы. Инвазивные протоковые (тип NOS) и дольковые карциномы молочной железы в большинстве случаев имеют G2 и G3 степени дифференциации. С возрастом, степень дифференциации рака молочной железы уменьшается. Данные опухоли в большинстве случаев являются эстроген положительными. Экспрессия ER не зависит от гистологического типа и степени дифференциации опухоли, а также от возраста пациенток.

Ключевые слова: инвазивный протоковый, дольковый рак молочной железы, эстроген ER

Introducere. Cancerul mamar este lider mondial la capitolul morbiditatea și mortalitatea feminină. Definirea progresiei tumorale n-a fost posibilă pentru lung timp datorită absenței markerilor ce ar delimita clar hiperplazia tipică și atipică de o tumoră malignă. Carcinomul mamar a fost clasificat în subgrupe având ca bază tipul și gradul histologic [1]. Această tumoră

posedă multiple expresii morfologice, diversificate în subtipuri după gradul histologic și expresia receptorilor, ceea ce presupune după Weigelt și coaut. etiologia diferită a acestor entități [2].

Adenocarcinoamele mamare sunt caracterizate printr-o largă diversitate histologică. Inițial au fost definite 2 grupe de carcinom mamar: “in situ” și in-

vaziv. Diferența dintre aceste grupe ține de integritatea membranei bazale, iar în cazul carcinomului invaziv celulele tumorale devastând-o. Tipurile invazive clasice, frecvent diagnosticate și studiate sunt carcinomul invaziv ductal (50-80%) de tip NOS (not otherwise specified), și lobular (5-15%) [3]. Este de menționat, că inițial prin termenii de carcinom ductal și lobular s-a subînțeles histogeneza sau punctul de origine al tumorii în sistemul ductal mamar. Ipoteza potrivit căreia tipurile morfologice de cancer mamar au drept sursă domenii microanatomice distincte ale glandei mamare a fost contestată de Wellings și Jensen, care a demonstrat că vasta majoritate a cancerelor de sân invazive, precum și precursorii "in situ", au origine în unitatea terminală ductal-lobulară, indiferent de tipul histologic [4].

Studiile de amploare au pus în evidență, că din toate particularitățile histologice ale carcinomului mamar au importanță clinică doar gradul de diferențiere al tumorii, prezența invaziei limfo-vasculare și a metastazei nodale [5]. În lumina ultimelor realizări, însă unicul factor histologic, descris cu valoare prognostică unanim recunoscută este gradul de diferențiere a tumorii [6]. Drept exemplu, identificarea gradului histologic G3 servește drept recomandare pentru chimioterapie. Prin urmare, descifrarea tabloului morfologic al carcinomului mamar nu are o valoare prognostică și predictivă, iar terapia toxică este indicată încă multor femei cărora, probabil le-ar fi fost mai bine fără tratament și sunt încă multe pacienți la care în pofida tratamentului realizat se dezvoltă recurențe [7].

Tipurile histologice ale carcinomului mamar au fost definite în baza paternului arhitectural distinct, trăsăturilor celulare și în plus, de ultimă oră a profilului genetic și imunohistochimic. Unul din markerii utilizați cu succes în definirea subtipurilor moleculare, cu impact direct în tratamentul formelor hormon-dependente s-a dovedit a fi receptorul pentru estrogeni (ER). În cadrul acestui studiu am analizat expresia receptorului ER α în dependență de tipul histologic al tumorii, ductal sau lobular. În consecință am stabilit că expresia ER nu este în funcție de morfologia carcinomului mamar.

Material și metode. În studiu au fost incluse 143 tumori descifrate histologic ca carcinoame invazive ductale de tip NOS (*not otherwise specified*) și 18 cazuri de carcinom lobular invaziv. Procesarea primară a materialului biologic a fost identică la toate speciile. Țesuturile prelevate au fost fixate timp de 24-48 ore în formalină tamponată 10%, PH 7,2-7,4. Materialul a fost inclus în *Paraplast High Melt* (Leica Biosystems). Secțiunile seriate (realizate cu

microtomul *Shandon, HM355S Automatic Microtome*, Thermo Scientific, USA) cu grosimea de 3-5 microni au fost etalate pe lame silanate (S3003, Dako, Denmark).

Metoda histologică. Toate secțiunile au fost colorate inițial prin metoda clasică, cu hematoxină-eozină utilizând hematoxină *Harris* (HHS32, SigmaAldrich) și eozină *CS701* (Dako, Denmark). Gradarea histopatologică am realizat-o în corespundere cu sistemul Scarff-Bloom-Richardson, care include:

A. formarea structurilor tubulare (ca expresie a diferențierii glandulare):

1. în majoritatea tumorii (>75%) – 1 punct;
2. în 10-75% suprafață – 2 puncte;
3. mai puțin de 10% sau absent – 3 puncte.

B. Pleomorfismul nuclear:

1. nucleii mici, cu variații minime de formă și mărime – 1 punct;
2. nucleii cu variație moderată de mărime și formă – 2 puncte;
3. nucleii cu variație marcată de mărime și formă – 3 puncte.

C. Figuri mitotice (la obiectiv Plan Fluor 40x/0,75 WD-0,44) - media calculată la 10 câmpuri:

1. până la 5 mitoze în câmpul de vedere – 1 punct;
2. 6-10 mitoze – 2 puncte;
3. mai mult de 11 mitoze – 3 puncte.

Gradarea carcinomului (suma A+B+C). G1 (tumoră înalt diferențiată) – 3-5; G2 (tumoră cu grad mediu de diferențiere) – 6-7; G3 (tumoră slab diferențiată) – 8-9.

Metoda imunohistochimică. Toate procedeele de deparafinare, demascare și vizualizare s-au efectuat în regim automat, utilizând *Leica Bond-Max* (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) *autostainer*-ul: deparafinarea în 2 băi de *Bond Dewax Solution* (cod AR9222) a 5 minute fiecare, urmată de 3 băi în alcool de 100%, 90% și 70% de 2 minute fiecare, finisate cu rehidratare de 5 minute în apă. Pentru blocarea activității peroxidazei endogene secțiunile au fost tratate timp de 5 minute cu Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution (S2023, Dako).

Receptorul pentru ER a fost pus în evidență prin metoda imunohistochimică utilizând anticorpi de clonă Er/6F11 (cod PA0151), timp de 15 minute (Ready-to-use, Leica Biosystems). În calitate de sistem de demascare am folosit Bond Epitope Retrieval Solution 1 (20 minute, Ready-to-use, Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK). Pentru vizualizare am utilizat sistemul Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems). Contracolorarea nucleilor s-a efectuat cu hematoxină *Mayer*, modificată după *Lille* (HMM500, ScyTek Laboratories, Inc.). Ulteri-

or piesele histologice au fost deshidratate manual în serii crescute de alcool etilic (70-100%), clarificate cu xilen și montate. Pentru montarea pieselor am folosit soluția *Leica CV Mount* (Leica Biosystems, cod 14046430011).

Metode de cuantificare. Cuantificarea celulelor marcate cu ER s-a efectuat în baza metodei semiautomate propuse de Suciș și coaut [8]. Această metodă constă în cuantificarea a cel puțin 10 câmpuri la obiectiv x40 cu cel mai înalt număr de celule tumorale marcate (sau cel puțin 1000 celule tumorale total), finalizată prin evaluarea mediei în procente. Întru ușurarea evaluării numerice, câmpurile tumorale s-au fotografiat, iar imaginile au fost invertate în programul *NIS-elements D2.30* (Nikon Instruments Europe BV). Evaluarea numerică a markerului hormonal pentru ER s-a finalizat prin calcularea scorului Allred, care a inclus combinarea procentului de celule imunomarcate cu intensitatea colorării nucleare [9].

Metode statistice. Analiza statistică s-a efectuat cu ajutorul soft-ului *Winstat 2012.1* (R. Fitch Software, Bad Krozingen, Germany). Statistica descriptivă a inclus determinarea mediei aritmetice (M) a expresiei ER și erorii standard (ES). Gradul de asociere dintre valorile ER și vârstă, gradul de diferențiere s-a efectuat prin testul de corelație a rangurilor (coeficient Spearman (r_s)). Diferența dintre 2 grupuri de variabile cantitative s-a efectuat prin testul t-Student. Valoarea de prag pentru rezultatele semnificativ statistice a fost stabilită la un $p \leq 0.05$.

Aspecte etice. Studiul a fost aprobat de către Comitetul de Etică a Cercetării al IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu", Chișinău, Republica Moldova (numărul de omologare 21/13/31.03.2014).

Rezultate

Carcinomul ductal invaziv de tip NOS. Vârsta pacientelor din grupul dat a variat între 33-86 ani, iar pentru studiul ulterior aceasta a fost divizată în 2 grupe: până la 49 ani (inclusiv) – 41 cazuri/28.7% și după 49 – 102 cazuri/71.3%.

Microscopic aceste tumori au fost caracterizate prin structuri maligne, de origine epitelială, dispuse sub formă de cordoane, plaje sincițiale, fie prezentând un caracter difuz infiltrativ.

Tabloul histologic a variat în funcție de proliferarea componentei epiteliale și infiltrarea componentei stromale. Aspectul invaziv a fost susținut de absența membranei bazale și celulelor mioepiteliale. Caracterul celulelor tumorale a fost dependent de caz, prezentând variații de activitate mitotică, cu pleomorfism nuclear și celular atenuat sau marcat.

Cazurile de carcinom mixt (ductal-lobular), pleiomorf și cu particularități melanotice nu au fost luate în calcul.

În raport cu gradul de diferențiere, 6 cazuri/4.2% (din 143) au fost cuantificate cu scor G1, 90 cazuri/62.9% cu G2 și 47 cazuri/32.9% cu G3 (Tabelul 1).

Tabelul 1
Repartizarea cazurilor după gradul de diferențiere și grupa de studiu

| Gradul de diferențiere | Grupa de vârstă | n | % | |
|------------------------|-----------------|-----|------|------|
| G1 | după 49 | 4 | 2.8 | 4.2 |
| G1 | până la 49 | 2 | 1.4 | |
| G2 | după 49 | 59 | 41.3 | 62.9 |
| G2 | până la 49 | 31 | 21.7 | |
| G3 | după 49 | 39 | 27.3 | 32.9 |
| G3 | până la 49 | 8 | 5.6 | |
| Total | | 143 | 100 | |

Gradul de diferențiere a fost repartizat după grupul de vârstă precum urmează:

- G1: până la 49 – 2 cazuri/1.4%, după 49 – 4 cazuri/2.8%;
- G2: până la 49 – 31 cazuri/21.7%, după 49 – 59 cazuri/41.3%;
- G3: până la 49 – 8 cazuri/5.6, după 49 – 39 cazuri/27.3%.

Stroma intratumorală atât după aspect, cât și compoziția celulară a variat în limite largi: de la dens conjunctivă, cu aspect hialin, cu cantitate variabilă de colagen și matrice extracelulară până la lax, mixoidă. Unele carcinoame au avut stromă uniform distribuită, altele s-au prezentat cu centre tumorale fibrotice și puține celule, acestea fiind concentrate la periferia centrelor de fibroză.

De asemenea s-au întâlnit focare de necroză, în special în cazul tumorilor cu pattern de creștere solid. Rareori s-au determinat focare de necroză extinsă, cu formare de pseudochisturi. O caracteristică histologică intra- și/sau peritumorală frecvent întâlnită a fost reacția limfoplasmocitară, care a variat în limite largi de la la minimă la marcată.

Receptorul pentru estrogeni (ER), a fost cuantificat drept negativ în 25 cazuri/17.5%. Restul cazurilor ER pozitive (118/82.5%) le-au fost atribuite următoarele scoruri Allred: +1 – 6 cazuri/5.1%, +2 – 15 cazuri/12.7%, +3 – 97 cazuri/82.2%. Tumorile ER- (25 cazuri) au manifestat toate 3 grade de diferențiere, cu următoarea repartizare: G1 – 2 cazuri/1.4%, G2 – 13 cazuri/9.1% și G3 – 10 cazuri/7% (Tabelul 2).

Tabelul 2
Repartizarea cazurilor după gradul de diferențiere și scorul Allred pentru ER

| ER (scorul Allred) | Gradul de diferențiere | n | % |
|--------------------|------------------------|-----|------|
| 0 | G1 | 2 | 1.4 |
| 0 | G2 | 13 | 9.1 |
| 0 | G3 | 10 | 7.0 |
| 1 | G2 | 2 | 1.4 |
| 1 | G3 | 4 | 2.8 |
| 2 | G2 | 10 | 7.0 |
| 2 | G3 | 5 | 3.5 |
| 3 | G1 | 4 | 2.8 |
| 3 | G2 | 65 | 45.5 |
| 3 | G3 | 28 | 19.6 |
| Total | | 143 | 100 |

De subliniat, că pentru scorul +1 și +2, nu s-au determinat cazuri cu grad G1, iar repartizarea în raport cu gradul de diferențiere a fost următoarea:

- Scor Allred +1: G2 – 2 cazuri/1.4% și G3 – 4 cazuri/2.8%;
- Scor Allred +2: G2 – 10 cazuri/7% și G3 – 5 cazuri/3.5%.
- Scor Allred +3: G1 – 4 cazuri/2.8%, G2 – 65 cazuri/45.5%, G3 – 28 cazuri/19.6%.

Analizând expresia receptorului ER în relație cu grupele de vârstă am determinat, că pentru fiecare scor Allred majoritatea au constituit-o cazurile ”după 49”, iar repartizarea detaliată a fost precum (Tabelul 3):

- Scor Allred 0: până la 49 – 8 cazuri/5.6%, după 49 – 17 cazuri/11.9%;
- Scor Allred +1: până la 49 – 2 cazuri/1.4%, după 49 – 4 cazuri/2.8%;
- Scor Allred +2: până la 49 – 4 cazuri/2.8%, după 49 – 11 cazuri/7.7%;
- Scor Allred +3: până la 49 – 27 cazuri/18.9%, după 49 – 70 cazuri/49%.

Tabelul 3
Repartizarea cazurilor după grupa de vârstă și scorul Allred pentru ER

| ER (scorul Allred) | Grupa de vârstă | n | % |
|--------------------|-----------------|-----|------|
| 0 | după 49 | 17 | 11.9 |
| 0 | până la 49 | 8 | 5.6 |
| 1 | după 49 | 4 | 2.8 |
| 1 | până la 49 | 2 | 1.4 |
| 2 | după 49 | 11 | 7.7 |
| 2 | până la 49 | 4 | 2.8 |
| 3 | după 49 | 70 | 49.0 |
| 3 | până la 49 | 27 | 18.9 |
| Total | | 143 | 100 |

În raport cu vârstă valoarea expresiei ER nu a manifestat sensibilitate statistic veridică ($r_s=0.1$, $p<0.15$).

Carcinomul lobular invaziv. În studiul dat au fost examinate 18 tumori de la paciente cu vârstă cuprinsă între 45-78 ani, la care histologic s-a stabilit diagnosticul de carcinom mamar lobular invaziv. Aceste tumori în majoritatea cazurilor au fost slab diferențiate, și repartizate după grad precum: G1 – 2 cazuri/11.1%, G2 – 6 cazuri/33.3%, G3 – 10 cazuri/55.6%. Din cele 18 tumori examinate, doar una sa referit la grupul de vârstă de până la 49 ani, fiind evaluată cu gradul G2 de diferențiere.

Histologic aceste tumori au fost reprezentate de celule solitare dispersate sau aranjate într-o singură linie în stroma intens fibrozată. Aceste cordoane lineare deseori au fost localizate în jurul ductelor normale. Celulele tumorale au prezentat nucleu rotund-oval, rareori cu aspect denticulat, cu puțină citoplasmă în jur. În studiu au fost selectate cazurile clasice și nu au fost incluse tumorile cu patern alveolar, solid, pleomorfic și tubular.

Receptorul pentru ER a avut o expresie negativă în 4 cazuri/22.2% și pozitivă în 14 cazuri/77.8%, cu următoarea repartizare după scorul Allred: +2 – în 3 cazuri/16.7%, +3 – 11 cazuri/61.1% (Tabelul 4).

Tabelul 4
Expresia ER vs gradul de diferențiere al tumorii lobular invazive

| ER (scorul Allred) | Gradul de diferențiere | Cazuri | |
|--------------------|------------------------|--------|------|
| | | n | % |
| 0 | G2 | 2 | 11.1 |
| 0 | G3 | 2 | 11.1 |
| 2 | G1 | 1 | 5.6 |
| 2 | G2 | 1 | 5.6 |
| 2 | G3 | 1 | 5.6 |
| 3 | G1 | 1 | 5.6 |
| 3 | G2 | 3 | 16.7 |
| 3 | G3 | 7 | 38.9 |
| Total | | 18 | 100 |

Gradul de diferențiere a fost repartizat după scorul Allred pentru ER în felul următor:

- Scor Allred 0: G2 – 2 cazuri/11.1%, G3 – 2 cazuri/11.1%;
- Scor Allred +2: 3 tumori, fiecare cu grad aparte de diferențiere, G1, G2, G3 (în final 5.6% fiecare);
- Scor Allred +3: G1 – 1 caz/5.6%, G2 – 13 cazuri/16.7%, G3 – 7 cazuri/38.9%.

De menționat, că scorul +1 nu a fost atribuit nici unui caz. Unicul caz cu vârstă cuprinsă de până la 49 ani, a fost evaluat cu scorul +2 (Tabel).

Diferențele statistice după expresia ER dintre tipul ductal și lobular de carcinom mamar invaziv.

Deși valorile medii de expresie al acestor receptori par a fi diferite pentru carcinomul ductal (2.29 ± 0.097) și lobular (2.17 ± 0.294), prin efectuarea testului t-Student nu am constatat diferențe semnificativ statistice dintre valorile ER în funcție de tipul histologic ($t=0.62$; $p=0.09$).

Discuții. În pofida faptului că tipurile histologice de carcinom mamar au fost foarte bine descrise acest tip de cancer rămâne a fi principala cauză a mortalității în rândul populației feminine. Particularitățile histologice ale tumorii precum tipul morfologic, gradul și invazia limfovaculară, au fost utilizați ca markeri prognostici ai evoluției tumorale, fără careva aplicație cu efect predictiv. Callagy și coautorii au determinat, că gradul histologic poate avea valoare prognostică și predictivă doar în asocieri cu gradul de invazie a nozilor limfatici, dimensiunile tumorii, combinație cunoscută drept Nottingham Prognostic Index (NPI) [10]. Până în prezent, eseele terapeutice aplicate acționau după standardul tradițional de tratament „o doză pentru toți”. Această abordare însă nu lua în calcul toate riscurile potențiale ale toxicității citostaticelor și implicit determina apriori, eșecul tratamentului adjuvant.

Cheia succesului în tratamentul personalizat îl reprezintă punerea în evidență a markerilor moleculari, responsabili de variabilitatea evoluției clinice în fiecare caz aparte și răspunsul individual la acest tratament [11].

Obținerea profilului genetic prin tehnici microarray s-a dovedit a fi costisitor, motiv pentru care Goldhirsch și coautorii au propus identificarea imunohistochimică a receptorilor pentru estrogen și progesteron, detecția supraexpresiei receptorului HER2 și evaluarea indexului Ki67 [6].

Korsching și coautorii au dezvoltat ideea precum că în tumorile glandei mamare co-există diferite celule maligne ce determină apariția subtipurilor de carcinom mamar, caracterizate prin expresia diferitor clustere proteice și alterări ale paternului citogenetic [12]. La moment, profilul expresiei genice relevă un grad înalt de eterogenitate moleculară în structura aceluiași tip histologic de carcinom mamar. Această eterogenitate s-a exprimat și prin variabilitatea evoluției clinice. Totuși, aproximativ 80% din paciente dezvoltă tumori hormon-pozitive [13]. Aceste date corespund rezultatelor obținute de noi, unde majoritatea cazurilor, indiferent de tipul histologic au prezentat receptorul ER.

Printre trăsăturile distinctive ale tumorilor analizate au fost menționate în literatura de specialitate metastazarea timpurie și tropismul selectiv al carci-

nomului lobular invaziv pentru oase și creier. Aceste particularități sunt pe larg discutate și atribuite defecțiunii markerului de adezivitate intercelulară, E-cadherina. În studiul de față am determinat că expresia ER nu depinde de tipul histologic al carcinomului mamar. Deoarece ambele tipuri de carcinom sunt mai frecvent ER pozitive, spre fericirea pacientelor în ambele cazuri poate fi aplicat tratamentul personalizat, ERα țintit.

Concluzii

Carcinoamele mamare invazive de tip ductal NOS și lobular în majoritatea cazurilor au un grad G2 și G3 de diferențiere. Odată cu înaintarea în vârstă scade gradul de diferențiere al carcinoamelor mamare. Aceste tumori în majoritatea cazurilor sunt estrogen pozitive. Valoarea expresiei ER nu este în funcție de tipul și gradul histologic al tumorii și nu este influențat de vârstă pacientelor.

Bibliografie

1. Malhotra G.K., Zhao X., Band H., Band V., *Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers*, Cancer Biol Ther, 2010; 10(10), p. 955–960.
2. Weigelt B., Geyer F.C., Reis-Filho J.S., *Histological types of breast cancer: how special are they?* Mol Oncol, 2010; 4(3), p.192-208.
3. Li C.I., Uribe D.J., Daling J.R., *Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer*, Br J Cancer, 2005; 93, p. 1046-52.
4. Wellings S.R., Jensen H.M., *On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast*, J Natl Cancer Inst, 1973; 50, p. 1111–1118.
5. Lønning P. E., *Breast cancer prognostication and prediction: are we making progress?* Ann Oncol, 2007;18 Suppl 8, p. 3-7.
6. Goldhirsch A., Wood W.C., Coates A.S., Gelber R.D., Thürlimann B., Senn H.J.; 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), p. 1736-47.
7. Cianfrocca M., Goldstein L.J., *Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer*, Oncologist, 2004; 9(6):606-16.
8. Suciuc C., Muresan A.M., Cornea R., Suciuc O., Dema A., Raica M., *Semiautomated evaluation of Ki67 index in invasive ductal carcinoma of the breast*, Oncol Lett, 2014; 7, p. 107-114.
9. Allred D.C., Harvey J.M., Berardo M., Clark G.M., *Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis*. Mod Pathol, 1998; 11, p. 155-168.
10. Callagy G.M., Pharoah P.D., Pinder S.E., Hsu F.D., Nielsen T.O., Ragaz J., Ellis I.O., 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), p. 2468–2475.
11. Spear B.B., Heath-Chiozzi M., Huff J., *Clinical application of pharmacogenetics*, Trends Mol Med, 2001; 7, p. 201–204.

12. Korsching E., Packeisen J., Agelopoulos K., Eisenacher M., Voss R., Isola J., van Diest P.J., Brandt B., Boecker W., Buerger H., *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), p. 1525-33.
13. Engstrøm M.J., Opdahl S., Hagen A.I., Romundstad P.R., Akslen L.A., Haugen O.A., Vatten L.J., Bofin A.M., *Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat, 2013; 140(3), p. 463-73.