

CARCINOMUL MAMAR INVAZIV – EVOLUȚIA RECEPTORULUI FACTORULUI DE CREȘTERE EPIDERMALĂ ÎN PROCESUL METASTATIC

*^{1,2}Fulga V.^{1,2}, Rudico L.¹, Mazuru V.², David V.², Mazuru O.¹, Saptefrați L.¹

¹Catedra de histologie, citologie și embriologie, ²Laboratorul de morfologie
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova

*Corresponding author: vmfulga@usmf.md

Abstract

INVASIVE BREAST CARCINOMA – THE EGFR RECEPTOR EVOLUTION DURING METASTATIC PROCESS

Background: Mammary carcinoma possesses multiple morphological expressions, classified into subtypes based on histological grade and receptors expression. In spite of various screening and prevention programs implementation its incidence is still on the top among malignant diseases.

The aim: assessment of EGFR expression based on tumor's histological type and grade of differentiation and determining of this factor stability within the metastatic process.

Material and methods: there were examined primary tumors and ipsilateral axillary lymph node metastasis, collected from 85 patients with mammary ductal invasive carcinoma of NOS (not otherwise specified) type and 18 patients with lobular invasive carcinoma, using conventional histological and immunohistochemical (IHC) techniques. With the help of IHC has been determined the expression of receptor for Epidermal Growth Factor (EGFR).

Results: in ductal invasive carcinoma we obtained weak but statistically significant correlation between histological grade and age of patients ($r_s=0,23$, $p<0,03$). Comparing the values of EGFR expression in both locations, we obtained in 6 cases (15.8%) the expression's score transfer. All these transfers have been characterized by the loosing of positive pattern in lymph node microenvironment and were found in both age groups: “before 49 years” and “after 49 years”. In lobular invasive carcinoma also have been obtained statistically significant correlation between EGFR score of expression and patients age ($r_s=0,45$, $p<0,031$). The age correlated with the grade of differentiation, as well ($r_s=0,57$, $p<0,007$). Comparing the values of EGFR in both locations, we determined that the scores of EGFR are statistically different ($t=2,12$, with an $p<0,05$).

However the correlation test highlighted strong positive association between EGFR values in primary tumor and metastasis.

Conclusions: ductal invasive mammary carcinoma of NOS type could in an equal manner EGFR positive or negative. Histological grade of these tumors positively correlates with the patients' age. EGFR is unstable during the metastasizing, the cases of score's transfer being exclusively characterized by the loosing of this receptor within the lymph node microenvironment. Unstable cases have a low grade of histological differentiation. The tumors with high grade of differentiation represent negative EGFR pattern. In lobular invasive carcinoma, the most of the tumors are EGFR negative, not only in the primary tumor, but also in the lymph node metastases. In this type of tumors, the values of EGFR expression depend on location, however the EGFR' score in metastasis is directly dependent on its value in the primary tumor.

Key words: mammary duct carcinoma, lobular mammary carcinoma, metastases, EGFR.

Introducere

Carcinomul mamar posedă multiple expresii morfologice, diversificate în subtipuri după gradul histologic și expresia receptorilor, ceea ce presupune o etiologie diferită a acestor entități.

Implementarea programelor de screening și profilaxie, precum și a noilor scheme de tratament a micșorat mortalitatea cauzată de cancerul mamar, însă incidența actuală a morbidității oricum plasează acest tip de cancer în topul afecțiunilor maligne.

EGFR (sau HER1) este un receptor specific celulelor bazale/stem, și este frecvent utilizat de rând cu citokeratina bazală CK5 în definirea subtipului molecular Basal-Like.

Expresia frecventă a EGFR în tumorile mamare a încurajat dezvoltarea terapiei personalizate având EGFR drept “țintă” a Cetuximabului, un anticorp monoclonal umanizat, precum și a inhibitorilor de tirozin-kinază, Gefitinib și Erlotinib.

Însă datele privitor la specificitatea acestui receptor în funcție de gradul și tipul histologic al tumorii, precum și stabilitatea EGFR pe parcursul metastazării rămân a fi controversate.

Material și metode

Pacienți

În calitate de obiect de studiu a servit materialul biologic (tumora primară și metastaza limfonodală) prelevat postoperator în incinta IMSP Institutul Oncologic din RM pe parcursul anilor 2013-2014 de la pacienți cu vârsta cuprinsă între 37-85 ani.

Au fost selectate 65 cazuri diagnosticate cu carcinom mamar invaziv de tip ductal NOS (not otherwise specified) și 18 cazuri de carcinom lobular, fără chimio- sau radioterapie premergătoare.

Procesarea primară

Procesarea primară a materialului a fost identică indiferent de grupul de studiu. Țesuturile prelevate au fost fixate timp de 24-48 ore în formalină tamponată 10%, PH 7,2-7,4 și incluse în parafină după metoda tradițională. Intru evitarea divergențelor posibile legate de procesarea materialului, tumora primară și metastaza limfonodală au fost incluse în același bloc.

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). În lotul cu patologii mamară s-a determinat tipul și gradul histologic al carcinomului, prezența metastazelor în noduri limfatici axilari, ipsilaterali. Gradarea histopatologică am realizat-o folosind sistemul Scarff-Bloom-Richardson, Nottingham modificat, recomandat de Organizația Mondială a Sănătății [1].

Metoda imunohistochimică

Toate procedeele de deparafinare, demascare și vizualizare s-au efectuat automat, utilizând *Leica Bond-Max* (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) autostainer: 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). Contracolorarea nucleilor s-a efectuat cu hematoxină *Mayer*, modificată după *Lille* (HMM500, ScyTek Laboratories, Inc.). Ulterior piesele histologice au fost dehidratate 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). Receptorul pentru EGFR a fost pus în evidență cu markerul EGFR/EGFR.25 (Novocastra, Newcastle Upon Tyne, UK, ready-to-use, cod EGFR-384-R-7-CE) cu incubare timp de 15 minute. S-a utilizat prealabil sistemul *Bond Epitope Retrieval Solution1* (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK, cod AR9961), un sistem de demascare prin încălzire 20 minute, având la bază tampon citrat cu pH6.0. Pentru vizualizarea markerului am utilizat 15 minute *Bond Polymer Refine Detection System* (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK, cod DS9800), un sistem polimeric complex de vizualizare, care include DAB (3,3'-diaminobenzidină tetrahidroclorid hidrat) în calitate de cromogen.

Evaluarea microscopică

Expresia receptorului EGFR a fost evaluată în corespundere cu ghidul Dako, EGFR PharmDX™ (Dako, Denmark) la microscopul *Nikon Eclipse 80i*, cu cameră video ajustată *Nikon DS-Fi1* (Nikon Instruments Europe BV). În baza acestor recomandări sa acceptat orice cantitate numerică de celule tumorale, colorate membranar sau membranar și citoplasmatic, scorul fiind apreciat după comparare cu liniile celulare de control cu scor EGFR pre-determinat (Dako, Denmark).

Astfel s-au determinat cazuri cu intensitate joasă (+1), moderată (+2) și puternică (+3) de expresie a receptorului EGFR sau absența acestuia. Celulele epiteliale normale colorate au servit în calitate de control pozitiv intern.

Metode statistice

Rezultatele studiului au fost stocate și grupate în baza de date MS Access 2007 (Microsoft Office 2007). Analiza statistică s-a efectuat cu ajutorul soft-ului Winstat 2012.1 (R. Fitch Software, Bad Krozingen, Germany). Diferența dintre 2 grupuri de variabile cantitative s-a efectuat prin testul t-Student. Pentru evidențierea gradului de asociere dintre valorile analizate în studiu am efectuat teste de corelație a rangurilor (coeficientul Spearman (r_s)). Gradul asocierii a fost analizat în corespundere cu recomandările lui Evans JD (1996): 0-0.19 drept corelație foarte slabă; 0.20-0.39 –“corelație slabă”; 0.40-0.59 –“corelație rezonabilă”; 0.60-0.79 –“corelație înaltă”; 0.80-1.0 drept “corelație foarte înaltă [2]. Valoarea de prag pentru rezultatele semnificativ statistice a fost stabilită la un $p \leq 0,05$.

Rezultate

Carcinomul mamar ductal invaziv de tip NOS, tumora primară. În acest studiu au fost examinate 65 de tumori, dintre care 36 cazuri/55,4% au fost evaluate ca EGFR negative. Cazurile pozitive au fost repartizate după scor precum urmează: scor +1 – 10 cazuri/15,4%, +2 – 15 cazuri/23,1% și +3 – 4 cazuri/6,2%. Cazurile selectate au fost gradate histologic și numeric au constituit: G1 – 2 cazuri/3,08%, G2 – 35 cazuri/53,85% și G3 – 28 cazuri/43,07%.

De remarcat că ambele cazuri G1 au fost EGFR negative.

Grupul de vârstă ”după 49” a fost majoritar în ambele cohorte, EGFR pozitivă și negativă (Tabelul 1).

Eseul statistic a determinat o corelație slabă, dar statistic semnificativă dintre gradul histologic și vârsta pacientelor incluse în studiu ($r_s=0,23$, $p<0,03$). EGFR raportat la vârstă ($r_s= -0,04$, $p<0,36$) și gradul histologic ($r_s=0,13$, $p<0,14$) însă nu a determinat corelații semnificativ statistice.

Carcinomul mamar ductal invaziv de tip NOS, metastaza limfonodală. Studiului comparativ, tumoare primară-metastază au fost supuse 38 cazuri, repartizate după gradul de diferențiere în G1 – 1 caz/2,6%, G2 – 16 cazuri/42,1% și G3 – 21 cazuri/55,3%. Tumorile au fost prelevate de la paciente din următoarele grupe de vârstă: „până la 49” – 10 cazuri/26,3% și „după 49” – 28 cazuri/73,7%.

Majoritatea tumorilor de grupă ”până la 49” – 8 cazuri/21,1%, au fost evaluate cu scor EGFR negativ (Tabelul 1).

Testul t-Student nu a identificat diferențe statistic veridice dintre valoarea EGFR din tumora primară (EGFR_{tm}) vs metastază (EGFR_{mt}) ($t= -1,96$, $p<0,06$).

La compararea valorilor EGFR de ambele localizări am determinat 6 cazuri/15,8% cu transfer de scor.

De menționat, că toate aceste transferuri au ținut de pierderea paternului pozitiv în microambianța limfonodală și au fost repartizate egal după categoriile de vârstă (Tabelul 1).

Carcinomul mamar lobular invaziv, tumora primară. În acest studiu au fost incluse 18 cazuri, din care majoritatea au constituit-o tumorile EGFR negative (13 cazuri/72,2%), iar cazurile cu expresie pozitivă au fost grupate după scor precum: +1 – 1 caz/5,6%, +2 – 2 cazuri/11,1% și +3 – 2 cazuri/11,1%. Cu excepția unui caz cu scor negativ și vârstă “până la 49”, restul au fost incluse în categoria de vârstă de ”după 49”.

În relație cu gradul de diferențiere am determinat că majoritatea tumorilor (16 cazuri/88,9%) au grad G2 și G3, și doar 2 tumori/11,1%, EGFR negative au avut grad G1 (Tabelul 3).

Eseul statistic de corelație a determinat o asociere pozitivă, de talie rezonabilă a scorului EGFR cu vârsta pacientelor ($r_s=0,45$, $p<0,031$) (Tabelul 4).

Încă o corelație de aceeași semnificație s-a determinat la asocierea vârstei și gradului de diferențiere ($r_s=0,57$, $p<0,007$).

Carcinomul mamar lobular invaziv, metastaza limfonodală. Majoritatea tumorilor la nivel metastatic au fost evaluate cu scor EGFR zero – 15 cazuri/83,3% (Tabelul 3). Majoritatea cazurilor au fost grupate în categoria de vârstă ”după 49”, cu excepția unui caz/5,6%, EGFR negativ și vârstă ”până la 49”.

La compararea valorilor EGFR de ambele localizări am determinat că scorurile EGFR sunt statistic diferite ($t=2,12$, la un $p<0,05$). Însă testul de corelație a evidențiat o asociere pozitivă, puternică dintre valorile EGFR din tumora primară și metastază (Tabelul 4).

Tabelul 1

Scorul EGFR în dependență de localizare, grupa de vârstă și gradul histologic al carcinomului mamar ductal invaziv

Expresia (după EGFRtm)	EGFR tm	EGFR mt	Gradul de diferențiere	Grupa de vârstă	n	%	% cazurilor de transfer
Negativă	0	0	G1	până la 49	1	2,6	-
	0	0	G2	după 49	6	15,8	
	0	0	G2	până la 49	4	10,5	
	0	0	G3	după 49	11	28,9	
Pozitivă	1	0	G3	până la 49	1	2,6*	6 cazuri / 15,8%
	2	0	G2	până la 49	1	2,6*	
	2	0	G3	după 49	2	5,3*	
	2	0	G3	până la 49	1	2,6*	
	3	0	G3	după 49	1	2,6*	
	1	1	G2	după 49	1	2,6	
	1	1	G2	până la 49	1	2,6	
	1	2	G3	după 49	1	2,6	
	2	2	G2	după 49	1	2,6	
	2	2	G2	până la 49	1	2,6	
	2	2	G3	după 49	3	7,9	
	2	3	G2	după 49	1	2,6	
Total					38	100,0	

Prin * sunt selectate cazurile cu transfer de scor.

Tabelul 2

Forța de asociere a scorului EGFR de diversă localizare, cu gradul de diferențiere al tumorii și vârsta pacienților

	EGFR mt	EGFR tm	Grad	Vârsta
EGFR mt				
r_s		0,63	-0,04	0,20
p		0,0001	0,398	0,113
EGFR tm				
r_s	0,63		0,15	-0,02
p	0,0001		0,184	0,442
Grad				
r_s	-0,04	0,15		0,40
p	0,398	0,184		0,007
Vârsta				
r_s	0,20	-0,02	0,40	
p	0,113	0,442	0,007	

Grad – gradul de diferențiere al tumorii. Rezultatele semnificativ statistic (p) sunt selectate prin **Bold**. r_s – coeficientul de corelație Spearman.

Tabelul 3

Scorul EGFR în dependență de localizare, grupa de vârstă și gradul histologic al carcinomului mamar lobular invaziv

Expresia (după EGFR tm)	EGFR tm	EGFR mt	Grupa de vârstă	Gradul de diferențiere	n	%	% cazurilor cu transfer de scor
Negativă	0	0	după 49	G1	2	11,1	-
	0	0	după 49	G2	4	22,2	
	0	0	după 49	G3	6	33,3	
	0	0	până la 49	G2	1	5,6	
Pozitivă	1	1	după 49	G3	1	5,6	2 cazuri / 11,1%
	2	0	după 49	G2	1	5,6*	
	2	0	după 49	G3	1	5,6*	
	3	1	după 49	G3	1	5,6	
	3	2	după 49	G3	1	5,6	
Total					18	100,0	

Prin * sunt selectate cazurile cu transfer de scor.

Tabelul 4

Forța de asociere dintre EGFR de diversă localizare cu gradul histologic al tumorii și vârsta pacienților: corelație după Spearman

	EGFR tm	EGFR mt	Vârsta	Gradul de diferențiere
EGFR tm				
r_s	-	0,75	0,45	0,33
p	-	0,0001	0,031	0,091
EGFR mt				
r_s	0,75	-	0,14	0,39
p	0,0001	-	0,289	0,06
Vârsta				
r_s	0,45	0,14	-	0,57
p	0,031	0,289	-	0,007
Gradul de diferențiere				
r_s	0,33	0,39	0,57	-
p	0,091	0,057	0,007	-

r_s – coeficientul de corelație Spearman; p – semnificația statistică. Cu **Bold** sunt selectate cazurile cu semnificație statistică veridică ($p < 0,05$).

Diferențele statistice a expresiei receptorului EGFR dintre tipurile ductal și lobular de carcinom mamar invaziv. Prin compararea valorilor de expresie a EGFR în cele 2 tipuri de carcinom incluse în studiu nu am determinat diferențe semnificativ statistice. Astfel indicele t-Student a fost egalat cu $t = -0,41$ ($p < 0,66$) la compararea expresiei din tumorile primare și $t = -1,31$ la un $p < 0,26$ prin suprapunerea rezultatelor din metastazele limfonodale.

Discuții

Tendința oncologiei moderne ține de evidențierea factorilor moleculari cu funcție prognostică și predictivă. Descoperirea incitantă de către Perou CM et al. (2000) a subtipurilor moleculare a stimulat cercetările în acest domeniu [3].

HER2 (sau ERBB2) este unul din cei mai studiați factori la ziua de azi. Acesta are aplicație clinică sub formă de terapie țintită grație ratei de cca 25% a carcinoamelor mamare HER2 pozitive. Un alt receptor tirozin-kinazic din aceeași familie, HER1 (sau EGFR) a atras atenția cercetătorilor grație expresiei frecvente în carcinomul mamar. EGFR s-a adeverit drept un receptor specific celulelor bazale/stem și a fost propus de către Goldhirsch A et al. (2011) de rând cu citokeratina bazală CK5 în definirea subtipului molecular Basal-Like [4]. Mai mult incidența în creștere a expresiei pozitive a EGFR în tumorile mamare a încurajat dezvoltarea terapiei personalizate anti-EGFR fiind dezvoltate Cetuximabul, un anticorp monoclonal umanizat, precum și a inhibitorilor de tirozin-kinază, Gefitinibul și Erlotinibul.

Deși supraexpresia EGFR sa determinat în toate tipurile de carcinom mamar, studiile publicate de Rakha E.A. et al. (2007) și Burness ML et al. (2010) au demonstrat "afinitatea" acestui receptor față de subtipul triplu-negativ și carcinomul mamar inflamator [5, 6]. În baza studiilor Sainsbury JR et al. (1987) supraexpresia receptorului EGFR a fost direct proporțională cu dimensiunea tumorii și gradul de diferențiere, astfel sporind recurențele și micșorând perioada de supraviețuire [7]. În studiul nostru însă expresia EGFR nu a fost în funcție de gradul de diferențiere al tumorii, indiferent de tipul histologic studiat, lobular sau ductal. Mai mult, expresia EGFR nu a determinat afinitate față de tipul histologic și localizarea tumorii, primară sau metastatică.

O particularitate a tumorilor maligne este capacitatea de a invada țesuturile adiacente și răspândi la distanță prin sistemul circulator. Tradițional sunt descrise în detalii tumora primară fără a menționa profilul molecular al metastazelor limfonodale. La moment, în literatura de specialitate sunt doar câteva publicații privitor la studiul comparativ, molecular al tumorii primare și metastazei sale la același pacient [8-11].

Falck A.K. et al. (2010) au prezentat discordanțe cantitative dintre tumora primară și metastază în 7% pentru ER, 16% pentru PR și 3% pentru HER2 [8]. Aceeași autori, un an mai târziu (2011) au prezentat diferențe semnificative dintre tumora primară și metastază la paciente cu carcinom mamar, comparând subtipurile moleculare [9]. Cele 16% din cazuri discordante au prezentat tranziția subtipului Luminal A la un subtip cu prognostic mai rezervat. Adamczyk A et al. (2012) au descris valori similare a receptorilor ER, PR în tumora primară și metastază cu divergențe în expresie doar a markerului HER2 (4.5% cazuri) [11]. Similar markerului HER2, în studiul nostru EGFR a fost instabil pe parcursul metastazării. Aceste date suplinesc rezultatele publicate anterior de noi, în care am subliniat instabilitatea expresiei receptorilor pentru estrogen, progesteron, HER2, citokeratina bazală și Ki67 în procesul de metastazare a carcinomului mamar [12].

În ambele tipuri histologice de carcinom mamar studiate, cazurile de transfer s-au manifestat exclusiv cu pierderea acestui receptor în microambianța nodului limfatic. Mai mult, cazurile instabile au fost cuantificate cu grad histologic slab de diferențiere. Pe de altă parte, tumorile cu grad înalt de diferențiere au fost EGFR stabile la metastazare și au prezentat în exclusivitate patern EGFR negativ.

Concluzii

1. Carcinomul ductal invaziv tip NOS poate fi în egală măsură EGFR pozitiv sau negativ. Gradul histologic al acestor tumori corelează pozitiv cu vârsta pacientelor.
2. EGFR este instabil pe parcursul metastazării, iar cazurile de transfer implică exclusiv pierderea acestui receptor în microambianța nodului limfatic. Cazurile instabile au un grad histologic slab de diferențiere. Tumorile cu grad înalt de diferențiere prezintă în exclusivitate patern EGFR negativ.
3. În cazul carcinomului lobular invaziv majoritatea o constituie tumorile EGFR negative, atât la nivel primar, cât și metastatic.
4. În carcinomul lobular valorile EGFR sunt dependente de localizare, însă scorul EGFR din metastază este direct proporțional la valoarea acestuia în tumora primară.

Abrevieri și notații convenționale

NOS – not otherwise specified, EGFR – epidermal growth factor receptor.

Autorii nu au indicat potențiale conflicte de interese.

Mulțumiri. Autorii aduc sincere mulțumiri Dlui profesor Marius Raica și întregului colectiv al Centrului de Cercetare în Angiogeneză, UMF “Victor Babes”, Timișoara, Romania, cu spriginul enorm al cărora a fost elaborată această lucrare. Studiul dat a fost susținut de Academia de Științe a Moldovei, prin proiectul instituțional 15.817.04.09F, contract nr. 55 Inst din 06.03.2015.

Bibliografie

1. Tavassoli FA, Devillee P, editors. World Health Organisation Classification of tumours: pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. Lyon: IARC Press; 2003.
2. Evans JD Straightforward statistics for the behavioral sciences, Pacific Grove, CA: Brooks/Cole Publishing, 1996.
3. 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 tumours. *Nature*, 2000; 406(6797):747-52.
4. 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.
5. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*, 2007;109:25–32.
6. Burness ML, Grushko TA, Olopade OI. Epidermal growth factor receptor in triplenegative and basal-like breast cancer: promising clinical target or only a marker? *Cancer J*, 2010;16:23–32.
7. Sainsbury JR, Farndon JR, Needham GK, Malcolm AJ, Harris AL. Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet*, 1987;1:1398–1402.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Fulga V, Rudico L, Balica AR, Cimpean AM, Saptefrati L, Raica M. Invasive ductal carcinoma of no special type and its corresponding lymph node metastasis: do they have the same immunophenotypic profile? *Pol J Pathol*, 2015; 66 (1): 30-37.