

# Detección del receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (her2/neu): inmunohistoquímica en carcinomas de mama

## (Human epidermal growth factor receptor type 2 (her2/neu) immunohistochemical detection in breast carcinoma)

José Luis Quirós-Alpizar,<sup>1,2</sup> Isabel Arce-Jiménez<sup>1</sup>, Gabriel Torrealba-Acosta<sup>1</sup>, Ernesto Jiménez-Montero<sup>1,3</sup> y Raquel Barrientos-Cordero<sup>1</sup>

### Resumen

**Antecedentes:** la incidencia y mortalidad por cáncer de mama han presentado un aumento neto. Uno de los tipos de esta heterogénea enfermedad se caracteriza por la amplificación y alta expresión del gen *ERBB2*, que codifica el receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2). Este receptor estimula procesos oncogénicos y dichos tumores se asocian a un peor pronóstico. El objetivo del estudio fue analizar las características de tumores HER-2+ en un grupo de pacientes con carcinoma de mama.

**Métodos:** se estudió los casos de mujeres con biopsia diagnóstica de cáncer de mama registrados durante 2006 en los archivos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San Juan de Dios; entre los que contaban con estudios inmunohistoquímicos, se estudió la expresión de HER-2 y se realizó análisis estadísticos.

**Resultados:** se halló 34 tumores HER-2+ (15,7%), 24 con expresión fuerte (11,1%) y 10 con débil (4,6%). La edad media al diagnóstico de las pacientes con expresión fuerte fue de 46,9 años (42,5-51,1 IC 95%), y con expresión débil fue de 54,4 años (46,7-62,1 IC 95%); la edad promedio para los tumores HER-2- fue de 58,1 años (56,2-60,0 IC 95%). Las pacientes <50 años tuvieron un OR=3,477 de tener HER-2+. De 21 tumores, el 90,5% presentó un grado histológico alto, y de 16 casos, únicamente 3 tenían un tamaño <2 cm.

**Conclusión:** se encontró una asociación del tipo HER-2+ con pacientes jóvenes, tumores de mayor tamaño y alto grado histológico. Los datos encontrados en este primer reporte son similares a las últimas estimaciones mundiales.

**Descriptor:** cáncer de mama, receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2), inmunohistoquímica.

### Abstract

**Background:** The incidence and mortality due to breast cancer has suffered a net increase. One type of this heterogeneous disease is characterized by an amplification and higher expression of the *ERBB2* gene that codifies for human epidermal growth factor receptor type 2 (HER-2). This receptor mediates oncogenic processes and such tumors have been associated with a worse prognosis. The

**Trabajo realizado en:** el Servicio de Patología Hospital San Juan de Dios, Caja Costarricense de Seguro Social y Cátedra de Anatomía, Universidad de Costa Rica

**Afiliación de los autores:**

<sup>1</sup>Escuela de Medicina, Universidad de Costa Rica. <sup>2</sup>Anatomía Patológica, Hospital Max Peralta.

<sup>3</sup>Anatomía Patológica, Hospital San Juan de Dios

✉ dr.quiros@gmail.com

**Fuente de apoyo:** la investigación contó con el apoyo de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica. El equipo utilizado para el estudio de los resultados pertenece al Servicio de Patología del HSDJ, Caja Costarricense de Seguro Social.

aim of this study was to analyze the characteristics of HER-2+ tumors in a group of patients with breast cancer.

**Methods:** This study included cases of breast cancer diagnosed through biopsy, registered during 2006 in the archives of the Pathology Department of the San Juan de Dios Hospital. The HER-2 expression was studied and statistical analyses were performed in cases that had immunohistochemical studies.

**Results:** Thirty-four HER-2+ tumors were found (15.7 %), 24 with a strong expression (11.1%) and 10 with a weak expression (4.6%). The average age at diagnosis of patients with a strong expression was 46.9 years (42.5-51.1 IC 95%) and in those with a weak expression, 54.4 years (46.7-62.1 IC 95%). In the case of HER-2- tumors, the mean age at diagnosis was 58.1 years (56.2-60.0 IC 95%). Patients <50 years had an OR=3.477 of having HER-2+. Out of 21 tumors, 90.5% showed a high histologic grade and out of 16 cases, only 3 measured <2 cm.

**Conclusion:** The data found is similar to the latest global statistics. An association was found between HER-2+ type tumor and young patients, larger size tumors and higher histologic grade.

**Keywords:** breast cancer, human epidermal growth factor receptor type 2 (HER-2), immunohistochemistry.

**Fecha recibido:** 21 de noviembre de 2014

**Fecha aprobado:** 13 de noviembre de 2014

A finales del siglo XIX, en el Instituto Robert Koch de Berlín, un joven médico intentaba utilizar la química para curar enfermedades. Específicamente, imaginaba una sustancia que en lugar de fijarse en los tejidos, se uniera de forma directa al agente patógeno y lo combatiera; a dicha sustancia la nombró “la bala mágica”. Con este fin, transcurrió años modificando una molécula de arsénico unida a un anillo de benceno, hasta que creó el compuesto 606: Pablo Ehrlich había descubierto el Salvarsán, la primera estructura molecular modificada deliberadamente por el hombre para curar una enfermedad.<sup>1</sup>

Las modernas balas mágicas son anticuerpos monoclonales, diseñados para interrumpir vías de señalización determinadas, al unirse a moléculas clave. En el campo de la oncología, existe una intensa investigación dirigida a desarrollar innovadores tratamientos basados en el ataque selectivo del sistema de receptores, el cual en muchos casos media el crecimiento desproporcionado y supervivencia de las células tumorales.

El carcinoma de mama es una enfermedad heterogénea, de la cual existen 4 subtipos moleculares principales:<sup>2</sup>

- Basaloide (*Basal-like*): corresponden en su mayoría a tumores negativos para los receptores de estrógeno, progesterona y receptores del factor de crecimiento epidérmico humano-2 (HER-2), conocidos como “triple negativos”.
- Luminal-A: en su mayoría son positivos para receptores de estrógeno y progesterona, de bajo grado histológico.
- Luminal-B: también son positivos para receptores de estrógeno y progesterona, pero los expresan en menor cantidad; suelen ser de alto grado.
- HER2 positivos: tienen amplificación y alta expresión del gen ERBB2.

El primero de estos anticuerpos monoclonales fue el trastuzumab, un anticuerpo anti-HER-2. El HER2 es un receptor transmembrana miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (HER).<sup>3,4</sup> Posee una actividad tirosín-quinasa intracelular, mediante la cual estimula vías de señalización involucradas en la regulación de procesos celulares oncogénicos: proliferación, supervivencia, movilidad celular y angiogénesis.<sup>5,6</sup> La amplificación del gen *ERBB2* resulta en la sobreexpresión del HER2, el cual permanece activado en forma constitutiva.<sup>7</sup> La sobreexpresión de esta proteína puede ser determinada mediante inmunohistoquímica.

En consecuencia, los tumores HER2 positivos tienen una peor evolución clínica que los HER2 negativos.<sup>8-10</sup> Suelen ser tumores de alto grado, pobremente diferenciados, con altas tasas de proliferación celular, afectación de ganglios linfáticos y mayor potencial metastásico.<sup>4,11</sup> También son algo resistentes a algunas formas de quimioterapia, como el tamoxifeno, paclitaxel, docetaxel, doxorubicina, 5-fluorouracilo y etopósido.<sup>12</sup> En el caso del tamoxifeno, esto se explica por una menor cantidad de receptores de hormonas esteroideas en comparación con los tumores HER-2(-).<sup>13,14</sup>

En Costa Rica, el informe de incidencia y mortalidad del cáncer publicado en 2007<sup>15</sup> por el Ministerio de Salud, revela que el cáncer de mama ha tenido un crecimiento neto a lo largo de la década de los 90. En 2000, alcanzó el primer lugar en incidencia de tumores malignos en la mujer, superando por primera vez a las neoplasias dermatológicas. Para 2003, también por primera vez ocupó el primer lugar en mortalidad, por encima del cáncer de estómago.<sup>15</sup> Ante este panorama aparentemente sombrío, los nuevos avances en terapéutica y diagnóstico oncológico arrojan una luz de esperanza.

El objetivo del presente estudio fue establecer la frecuencia de tumores de mama con expresión inmunohistoquímica de

HER-2 entre todos los carcinomas de mama diagnosticados en el Hospital San Juan de Dios, del 1 de enero de 2006 al 31 de diciembre de 2006. Además, se detallaron algunas características de los tumores HER2 positivo encontrados.

## Métodos

Se estudiaron todos los casos de pacientes femeninas con biopsias diagnósticas de carcinomas invasores de la glándula mamaria, registrados entre el 1 de enero y el 31 de diciembre de 2006 en los archivos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica. Las biopsias se revisaron mediante tinción con hematoxilina-eosina.

Las variables estudiadas para la investigación en cada caso fueron: edad, estado de receptores HER2, tipo histológico, grado histológico, tamaño del tumor y metástasis ganglionar. El tipo histológico se determinó según la clasificación de la OMS, y el grado histológico, según la escala de Bloom y Richardson modificada y el estado del receptor HER2.<sup>16</sup>

En el estudio de los datos recolectados, para el análisis y descripción de las variables cuantitativas se estimó las medidas de tendencia central y de dispersión, así como se determinó las frecuencias y proporciones para las variables cualitativas. Al evaluar la asociación entre las variables de edad y estado del receptor HER2, se utilizó una prueba de hipótesis de igualdad de medias, una prueba de Chi-cuadrado y una regresión logística binomial.

Se define 0,05 como punto crítico estadísticamente significativo para todas las pruebas. Los cálculos estadísticos se realizaron por medio del paquete estadístico SPSS. El protocolo del estudio cumplió con los requerimientos del Comité Local de Bioética en Investigación del Hospital San Juan de Dios (CLOBI-HSJD-023-2008) y en todo momento se protegió la confidencialidad de los datos.

## Resultados

De 216 casos que cumplían con los criterios de inclusión para el estudio, se halló 34 tumores con expresión positiva (fuerte o débil) del receptor HER2, correspondiente al 15,7%. Del total de casos (n=216), 24 contaban con expresión fuerte (+++) correspondiente al 11,1%, y débil, 10 casos (4,6%). Respecto al estado del receptor HER2 y la edad de presentación del cáncer, se encontró que la edad media al diagnóstico es menor en las pacientes con expresión positiva (en algún grado) de HER2, que en las pacientes con tumores HER2(-) (58,1 años; IC 95%56,2-60,0), siendo esta diferencia estadísticamente significativa,  $p < 0,0001$ . Esta relación es aun más marcada en tumores que presentan expresión fuerte de HER2, los cuales tienen una edad media al diagnóstico de 46,9 años (IC 95%42,5-51,1), mientras que en los tumores HER2 positivo débil, la media fue de 54,4 años (IC 95%46,7-62,1).

Asimismo, al agrupar los casos según edad entre mayores y menores de 50 años (Cuadro 1), se encontró que un 27,4% de los casos en mujeres menores de 50 años, tenían algún grado de expresión positiva de HER2. Por otra parte, esta proporción baja al 9,8% en el grupo de mujeres de 50 años o más, para una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

Al realizar un modelo de regresión binomial, se demostró que para las mujeres menores de 50 años, el OR de expresión HER positivo respecto a HER2 negativo es de 0,109. Asimismo, se observó que tener menos de 50 años triplica (OR= 3,477) la razón de tener la expresión HER2 positivo, en comparación con las mujeres mayores de 50 años.

En el estudio se observó que 21 tumores HER2 positivo contaban con los datos de grado histológico, de los cuales 19 presentaban un grado histológico alto (grado 2 o 3), siendo 13 de grado 2 y 6 de grado 3. De los tumores HER2 positivo cuyo tamaño se conocía (n=16), resalta que 7 medían 2-5 cm, 6 eran >5 cm y solamente 3 tumores eran < 2cm. Al observar la distribución de los tumores HER2 positivos según su tipo histológico, se observa que predomina el carcinoma ductal infiltrante. En un 28,6% (n=10) de los tumores HER2 positivos se documentó invasión ganglionar axilar.

## Discusión

A finales de la década de los 80 se emprende el estudio de la sobreexpresión de HER2 como factor pronóstico en tumores de mama. El proyecto fue motivado por 2 estudios (Slamon *et al* 1987 y 1989) que asociaron significativamente este subtipo de carcinoma a un menor tiempo de recurrencia de enfermedad y sobrevida.<sup>17,18</sup> Con base en estas variables, se puso en evidencia su potencial factor pronóstico, independiente tanto a nivel univariable como multivariable, siendo este superior a la presencia de receptor de progesterona (RP) y receptor de estrógenos (RE), y equivalente a la presencia de ganglios linfáticos positivos.<sup>17,18</sup>

Las primeras 2 series de pacientes en este tema, publicadas por Slamon *et al*, reportan una frecuencia del subtipo HER2 del 27% y del 28%.<sup>17,18</sup> No obstante, investigaciones posteriores ampliaron dramáticamente este intervalo de frecuencia, señalando que este subtipo se presenta más bien entre un 4-30% de los carcinomas de mama.<sup>3,8,19</sup> Se ha delimitado una incidencia

**Cuadro 1. Distribución de grupos de pacientes con cáncer de mama, según expresión del receptor HER-2. Hospital San Juan de Dios, 2006**

Expresión de HER-2	Edad en grupos		Total (%)
	< 50 años (%)	> 50 años (%)	
HER-2(-)	53 (72,6)	129 (90,2)	182 (100)
HER-2(+)	20 (27,4)	14 (9,8)	34 (100)
Total	73 (100)	143 (100)	216 (100)

próxima al 15%,<sup>12</sup> y este estudio respalda tal tendencia, al reportar una sobreexpresión (positivo fuerte) de HER2 en el 11,1% de los casos analizados. Cabe agregar que esta es la primera serie de pacientes que investiga la sobreexpresión de HER2 en costarricenses, por lo que aun no es posible delimitar el comportamiento de la población nacional.

Para explicar el amplio rango de variación, se ha propuesto que existan diferencias propias de los grupos étnicos que condicionan patrones específicos de expresión molecular.<sup>20</sup> Estudios iniciales como el de Kwan *et al*,<sup>21</sup> permitieron analizar la frecuencia del subtipo HER2 según grupos étnicos específicos, mostrando diferencias importantes entre estos. En este caso, a pesar de que se evidenció una prevalencia general baja (3,7%), se observó que en mujeres asiáticas e hispanas, se duplicaba la frecuencia de presentación, 6,4% y 6,6%, respectivamente. Además, la menor frecuencia se observó en mujeres blancas (3,1%) y afroamericanas (3,2%).<sup>21</sup>

Posteriormente, se publican 2 estudios<sup>22,23</sup> que surgen del California Cancer Registry (CCR), con 70000 pacientes. A pesar de que se observó una frecuencia general mayor de este subtipo (7,3%), se conservó la tendencia de mayor prevalencia de HER2 en mujeres no blancas. Cabe destacar que el valor reportado para las hispanas (9,7%) es similar al obtenido en el presente estudio en mujeres costarricenses.

En mujeres blancas europeas la frecuencia del subtipo HER2 se ha reportado por debajo del 10% en la mayoría de estudios.<sup>24,27</sup> Con excepción de 2 estudios españoles y uno italiano, que describen frecuencias considerablemente mayores, Casar *et al* reportan un 21,6%,<sup>28</sup> el de Muñoz *et al*, un 13,63%,<sup>29</sup> y Sanpaolo *et al* describen un 17,3%.<sup>30</sup> En mujeres canadienses, 2 estudios describen frecuencias entre el 7-8%,<sup>31,32</sup> similares a los de otras mujeres blancas europeas y estadounidenses. Por otro lado, en América Latina solo se encontró reportada una serie de pacientes de Perú, que muestra una prevalencia del subtipo HER2 en el 16,2% de las pacientes evaluadas.<sup>33</sup> Este valor es de los más altos reportados para mujeres hispanas.

El caso asiático es especial, en cuanto la gran mayoría de los estudios encontró consistentemente frecuencias mayores del subtipo HER2 para esta población. En la población asiática residente en los Estados Unidos, el valor reportado en estudios como el de Telli *et al* alcanza una frecuencia del 21%,<sup>34</sup> mostrando inclusive algunas variaciones de acuerdo con la nacionalidad de las pacientes. Las investigaciones realizadas en Asia parecen respaldar esa tendencia.<sup>35-41</sup>

En cuanto a África, se encontró 3 series de pacientes; en 2 de ellas se reporta una frecuencia de HER2 del 15% y 14,5%,<sup>42,43</sup> siendo esto mayor a lo descrito en la población afroamericana de EE UU.<sup>22,34</sup> La tercera serie describe un porcentaje de HER2 considerablemente menor, 4,0%, y más semejante a los valores reportados en mujeres blancas; no obstante, el estudio mostró debilidad estadística.<sup>44</sup>

En el presente estudio, el subtipo HER2 se asoció estadísticamente con mujeres menores de 50 años. Otros estudios a nivel mundial que analizaron la relación con edad

y alcanzaron significancia estadística, no reproducen una tendencia tan firme y muestran un amplio rango de variación. Entre los estudios que mostraron un promedio de edad menor a 50 años, se encuentra el de Park *et al* en mujeres coreanas,<sup>45</sup> el de Su *et al*<sup>40</sup> y el de Wang *et al*,<sup>46</sup> ambos en mujeres chinas. Es interesante denotar que estas series son asiáticas en quienes, como se mencionó, la sobreexpresión de HER2 es más frecuente y se asocia a un fenotipo agresivo.

En los estudios estadounidenses que alcanzaron significancia estadística para esta variable, las series reportadas por Carey *et al*<sup>47</sup> y Kwan *et al*<sup>21</sup> establecieron una edad promedio menor a los 50 años. Entre estos se enfatiza el estudio de Keegan *et al*,<sup>48</sup> en el que se evaluó la incidencia de cáncer de mama en mujeres adolescentes y adultas jóvenes. Llama la atención que se encontró el subtipo HER2 en un 8,7% de las pacientes, con una tendencia hacia una mayor proporción en mujeres jóvenes y, predominantemente, en mujeres hispanas y de raza negra.<sup>48</sup> El estudio de Vallejos *et al* en pacientes de Perú, reporta un rango de edad entre los 50-69 años, lo cual no se asemeja a los datos en mujeres costarricenses.<sup>33</sup>

En su mayoría, otras investigaciones establecieron una edad promedio mayor a los 50 años;<sup>25,49-51</sup> no obstante, en múltiples estudios sí se observó este subtipo en mujeres más jóvenes, y lo mismo sucedió para otras series que no alcanzaron significancia estadística.<sup>27,42</sup> Resulta paradójica la serie de Lin *et al* en mujeres taiwanesas,<sup>35</sup> dado que invierte la tendencia de edad y presenta una mayor frecuencia en mujeres mayores de 50 años, que aumenta conforme la edad de la paciente.

Con respecto al tamaño tumoral, en este estudio se apreció una tendencia a asociar el subtipo HER2 con tamaños tumorales mayores. La investigación a nivel mundial parece concordar suficiente en asociar estadísticamente el subtipo HER2 a tamaños tumorales mayores a los 2 cm, con promedios superiores a los 3cm.<sup>38,40,43,45,46</sup>

Respecto al grado histológico, con pocas excepciones, Zhao *et al*,<sup>38</sup> Casar *et al*<sup>28</sup> y Sanpaolo *et al*,<sup>30</sup> la investigación exhaustivamente ha mostrado que los tumores HER2 positivo se corresponden con un grado histológico alto en la mayoría de las series, lo que demuestra una clara diferencia estadística.<sup>25,33,41,52-54</sup> La investigación también corrobora esta asociación, dado que se observó en los casos estudiados un 90,5% de pacientes con tumores de alto grado histológico.

Con respecto al pronóstico, las series que lo analizaron confirman lo esperado si se analiza las funciones celulares de este receptor: un peor pronóstico. Consistentemente se ha reportado una menor sobrevida general y libre de progresión, mayor riesgo de muerte, mayor riesgo de recurrencia local y regional y mayor riesgo de diseminación a ganglios linfático y metástasis a distancia.<sup>17,18,25,38,54</sup>

Este es el primer reporte de prevalencia del subtipo HER2 en tumores de mama de pacientes de Costa Rica. Se encuentra una frecuencia del subtipo HER2 positivo similar a las últimas estimaciones realizadas con base en la investigación mundial. El estudio muestra una clara asociación de este subtipo más

agresivo en pacientes menores de 50 años en Costa Rica. A pesar de que este corte de edad es arbitrario y no ha sido tan firme en otras investigaciones, se reproduce siempre la tendencia a encontrar este subtipo en pacientes más jóvenes. El estudio también sustenta la evidente y preocupante conexión de este subtipo a tumores de mayor tamaño y grado histológico alto. Si bien no se evaluó pronóstico ni sobrevida, las características del tumor potencialmente justifican este mismo comportamiento. No obstante, resultará beneficioso investigar esta tendencia en la población costarricense.

Otro aspecto que resalta es la tendencia a la disminución en el porcentaje de casos, sobre todo en las series de los Estados Unidos y Europa, aspecto que posiblemente se encuentra asociado al mejoramiento en la técnica y criterios de diagnósticos. Las diferencias entre razas aun no están claras, y se requerirá estudios interpopulacionales para entender mejor este punto, por lo que se tendrá que utilizar las mismas técnicas y laboratorio para disminuir el sesgo entre diversos centros de investigación.

**Conflicto de intereses:** ninguno de los autores tiene relación con alguna entidad que pudiese generar conflicto de intereses.

## Referencias

- De Kruijff P. Los cazadores de microbios. 7ma ed. México: Editorial Época; 1978.
- Perou C, Sorlie T, Eisen M, van de Rijn M, Jeffrey S, Rees C, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406:747-52.
- Dahabreh I, Linardou H, Siannis F, Fountzilias G, Murray S. Trastuzumab in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncologist*. 2008;13:620-30.
- Joerger A, Fersht A. Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene*. 2007;26:2226-42.
- Mukohara T. Role of HER2-targeted agents in adjuvant treatment for breast cancer. *Chemother Res Pract*. 2011;2011:730360.
- Moasser M. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26:6469-87.
- Sorlie T, Perou C, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10869-74.
- Ménard S, Fortis S, Castiglioni F, Agresti R, Balsari A. HER2 as a prognostic factor in breast cancer. *Oncology*. 2001;61:67-72.
- 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;101:736-50.
- Morrow P, Hortobagyi G. Management of breast cancer in the genome era. *Annu Rev Med*. 2009;60:153-65.
- Pfeifer G, Besaratinia A. Mutational spectra of human cancer. *Hum Genet*. 2009;125:493-506.
- Burstein H. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med*. 2005;353:1652-4.
- Nathanson K, Domchek S. Therapeutic approaches for women predisposed to breast cancer. *Annu Rev Med*. 2011;62:295-306.
- Rouzier R, Perou C, Symmans W, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, *et al.* Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005;11:5678-85.
- Vargas R, Ortiz A, Muñoz G. Incidencia y mortalidad del cáncer Costa Rica 1995-2005. Ministerio de Salud. 2007;17-29.
- Wolff A, Hammond M, Schwartz J, Hagerty K, Allred D, Cote R, *et al.* American Society of Clinical Oncology. College of american pathologist guideline recommendatios for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131:18-43.
- Slamon D, Clark G, Wong S, Levin W, Ullrich A, McGuire W. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235:177-82.
- Slamon D, Godolphin W, Jones L, Holt J, Wong S, Keith D, *et al.* Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989;244:707-12.
- Hudis C. Trastuzumab-mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*. 2007;357:39-51.
- Al Tamimi D, Shawarby M, Ahmed A, Hassan A, AlOdaini A. Protein expression profile and prevalence pattern of the molecular classes of breast cancer-a Saudi population based study. *BMC Cancer*. 2010;10:223.
- Kwan M, Kushi L, Weltzien E, Maring B, Kutner S, Fulton R, *et al.* Epidemiology of breast cancer subtypes in two prospective cohort studies of breast cancer survivors. *Breast Cancer Res*. 2009;11:R31.
- Parise C, Bauer K, Caggiano V. Variation in breast cancer subtypes with age and race/ethnicity. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010;76:44-52.
- Parise C, Bauer K, Brown M, Caggiano V. Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999-2004. *Breast J*. 2009;15:593-602.
- International drug monitoring: the role of national centres. *World Health OrganTech Rep Ser*. 1972;498:1-25.
- Spitale A, Mazzola P, Soldini D, Mazzucchelli L, Bordoni A. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. *Ann Oncol*. 2009;20:628-35.
- Irigoyen M, García F, Iturriagaitia A, Beroiz B, Martínez M, Grima F. Molecular subtypes of breast cancer: prognostic implications and clinical and immunohistochemical characteristics. *An Sist Sanit Navar*. 2011;34:219-33.
- Caldarella A, Crocetti E, Bianchi S, Vezzosi V, Urso C, Biancalani M, *et al.* Female breast cancer status according to ER, PR and HER2 expression: a population based analysis. *Pathol Oncol Res*. 2011;17:753-8.
- Del Casar J, Martín A, García C, CorteM, Alvarez A, Junquera S, *et al.* Characterization of breast cancer subtypes by quantitative assessment of biological parameters: relationship with clinicopathological characteristics, biological features and prognosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008;141:147-52.
- Muñoz M, Fernández-Aceñero M, Martín S, Schneider J. Prognostic significance of molecular classification of breast invasive ductal carcinoma. *Arch Gynecol Obstet*. 2009;280:43-8.
- Sanpaolo P, Barbieri V, Genovesi D. Prognostic value of breast cancer subtypes on breast cancer specific survival, distant metastases and local relapse rates in conservatively managed early stage breast cancer: a retrospective clinical study. *Eur J Surg Oncol*. 2011;37:876-82.
- Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang M, Voduc D, Speers C, *et al.* Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2010;28:3271-7.
- Voduc K, Cheang M, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen T, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*. 2010;28:1684-91.
- Vallejos C, Gómez H, Cruz W, Pinto J, Dyer R, Velarde R, *et al.* Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database. *Clin Breat Cancer*. 2010;10:294-300.
- Telli M, Chang E, Kurian A, Keegan T, McClure L, Lichteszatajn D, *et al.* Asian ethnicity and breast cancer subtypes: a study from the California Cancer Registry. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;127:471-8.
- Lin C, Liau J, Lu Y, Huan C, Lee W, Kuo K, *et al.* Molecular subtypes of breast cancer emerging in young women in Taiwan: evidence for more than just westernization as a reason for the disease in Asia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:1807-14.

36. Zhang H, Zhang B, Xuan L, Zhao P. Clinical characteristics and survival in the operable breast cancer patients with different molecular subtypes. *Zhonghua zhong liu za zhi*. 2009;31:447-51.
37. Zhang Q, Tang S, Liu H. Early stage triple negative and HER2 overexpression breast cancers have similar survivals in Chinese patients. *Breast J* 2012;18:286-8.
38. Zhao J, Liu H, Wang M, Gu L, Guo X, Gu F, *et al*. Characteristics and prognosis for molecular breast cancer subtypes in Chinese women. *J Surg Oncol* 2009;100:89-94.
39. Chen X, Ma C, Wu J, Yang W, Lu H, Wu J, *et al*. Molecular subtype approximated by quantitative estrogen receptor, progesterone receptor and Her2 can predict the prognosis of breast cancer. *Tumori*. 2010.
40. Su Y, Zheng Y, Zheng W, Gu K, Chen Z, Li G, *et al*. Distinct distribution and prognostic significance of molecular subtypes of breast cancer in Chinese women: a population-based cohort study. *BMC Cancer*. 2011;11:292.
41. Tamimi R, Baer H, Marotti J, Galan M, Galaburda L, Fu Y, *et al*. Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2008;10:R67.
42. Huo D, Ikpat F, Khramtsov A, Dangou J, Nanda R, Dignam J, *et al*. Population differences in breast cancer: survey in indigenous African women reveals over-representation of triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27:4515-21.
43. Abdelkrim S, Trabelsi A, Missaoui N, Barizig N, Bdioui A, Anjorin A, *et al*. Distribution of molecular breast cancer subtypes among Tunisian women and correlation with histopathological parameters: A study of 194 patients. *Pathol Res Pract*. 2010;206:772-5.
44. Adebamowo C, Famooto A, Ogundiran T, Aniagwu T, Nkwodimmah C, Akang E. Immunohistochemical and molecular subtypes of breast cancer in Nigeria. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;110:183-8.
45. Park S, Koo J, Kim M, Park H, Lee J, Lee J, *et al*. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *Breast*. 2012;21:50-7.
46. Wang Y, Yin Q, Yu Q, Zhang J, Liu Z, Wang S, *et al*. A retrospective study of breast cancer subtypes: the risk of relapse and the relations with treatments. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;130:489-98.
47. Carey L, Perou C, Livasy C. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006;295:2492-502.
48. Keegan T, DeRouen M, Press D, Kurian A, Clarke C. Occurrence of breast cancer subtypes in adolescent and young adult women. *Breast Cancer Res*. 2012;14:R55.
49. Ihemelandu C, Leffall L, Dewitty R, Naab T, Mezgebe H, Makambi K, *et al*. Molecular breast cancer subtypes in premenopausal and postmenopausal African-American women: age-specific prevalence and survival. *J Surg Res*. 2007;143:109-18.
50. Onitilo A, Engel J, Greenlee R, Mukesh B. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. *Clin Med Res*. 2009;7:4-13.
51. Bhargava R, Striebel J, Beriwal S. Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009;2:444-55.
52. Wiechmann L, Sampson M, Stempel M, Jacks L, Patil S, King T, *et al*. Presenting features of breast cancer differ by molecular subtype. *Ann Surg Oncol*. 2009;16:2705-10.
53. Runnak M, Hazha M, Hemin H, Wasan A, Rekawt R, Michael H. A population-based study of Kurdish breast cancer in northern Iraq: hormone receptor and HER2 status. A comparison with Arabic women and United States SEER data. *BMC Womens Health*. 2012;12:16.
54. Blows F, Driver K, Schmidt M, Broeks A, van Leeuwen F, Wesseling J, *et al*. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS medicine*. 2010;7.