

Prevalencia del HER2 en el Cáncer de Mama en Cuba

Rosa Irene Álvarez Goyanes¹, Xiomara Escobar Pérez¹, Rolando Camacho Rodríguez², Sonia Franco Odio³,
Maria de la Caridad de Armas Fernández⁴, Ramón Ropero Toirac¹, Fanny Briñis Sanchez⁴, Maryanis Mosquera Furones⁴, Cristina Rodríguez Padilla⁵

¹ Investigación Experimental. Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, Habana, Cuba

² Servicio de Mastología. Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, Habana, Cuba

³ Departamento de Anatomía Patológica. Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, Habana, Cuba

⁴ Departamento de Anatomía Patológica. Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas, Habana, Cuba

⁵ Departamento Inmunología y Virología. Facultad de Biología. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México

Abstract

Breast cancer is one of the most common cancer and cause of cancer mortality in the world. It is also one of the most studied clinical conditions because of the management of the disease, the prognosis and the therapeutic decisions are conditioned to the analysis of clinical parameters, sometimes essentials, as the hormonal receptor's evaluation (HR), and the human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2).

This paper presents the results of the HER2 expression in breast cancer tumours from 1509 Cuban women diagnosed in the period between the year 2000 and 2006. HER2 expression in tumour tissue was correlated with the clinical and morphologic prognostic factors evaluated as standard in the moment of the therapeutic decision.

HER2 was positive in 23,7 % of the analysed breast cancer tumours and over expressed in 16,8 % of the cases. HER2 expression shown significant statistical correlation with histological grade, nuclear grade, tumour size, lower expression of oestrogen receptor (ER) and the age at diagnosis ($p < 0,05$). Patients with higher expression of HER2 were mostly young (< 40 years) ($p = 0,042$). Simultaneous negative expression of ER, PR and HER2 was found in 19,9 % of the cases.

This is the first report of HER2 expression in Cuba and the results confirm HER2 association with the clinico - pathological parameters.

Key words: HER2, Hormonal receptors, Breast cancer, Prognostic factors.

Resumen

EL CÁNCER DE MAMA es uno de los tumores de mayor incidencia y mortalidad en la población a nivel mundial. Se ubica dentro del grupo de las entidades clínicas más estudiadas, donde el manejo de la enfermedad, establecer el pronóstico y la terapéutica, están condicionados por el análisis de los parámetros clínico-patológicos, entre los cuales resulta esencial, la evaluación de los receptores hormonales (RH) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER2).

En este trabajo se determinó la expresión del HER2 en 1,509 tumores de mujeres cubanas diagnosticadas con cáncer de mama entre los años 2000 y 2006 y se correlacionó su expresión tisular con los factores pronósticos morfológicos y clínicos, que se evalúan de manera estándar en el momento de la decisión terapéutica.

La positividad del HER2 encontrada en los tumores mamarios analizados fue 23,7% y su sobreexpresión de 16,8%. Las correlaciones realizadas entre el marcador tumoral y el grado nuclear e histológico, la dimensión mayor del tumor, la pérdida de los receptores de estrógeno (RE) y con la edad, mostraron significancia estadística ($p < 0,05$). El estudio en las pacientes menores de 40 años reveló una mayor expresión de este marcador ($p = 0,04$). Los tumores triple negativos constituyeron el 19,9% de la muestra.

Estos resultados constituyen el primer reporte de la expresión del HER2 en Cuba y confirman su asociación con los factores pronósticos clínico-anatomopatológicos.

Palabras Clave: HER2, Receptores hormonales, Factores pronósticos, Cáncer de mama.

Correspondencia:

Rosa Irene Álvarez Goyanes

Investigador Auxiliar. Sección Biología Celular y Banco de Tumores. Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología. Calle 29 entre E y F, Vedado 10400. Ciudad Habana, Cuba
e-Mail: ialvarez@infomed.sld.cu

Introducción

Los anticuerpos monoclonales (AcM) han resultado herramientas inmunológicas muy importantes para establecer el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento del cáncer (1-3). En la década de los 80's el empleo de estas moléculas biológicas marcó el inicio de una nueva modalidad terapéutica para los tumores malignos (4,5).

Durante los años 1987-89, los estudios de Slamon y cols reportaron la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER2) en el 20 al 30% de los cánceres de mama humanos y su valor para establecer el pronóstico de la enfermedad (6,7). Estos estudios fueron el punto de partida de una extensa serie de publicaciones que asocian la expresión de esta molécula con una mayor agresividad del tumor y la ubican como un predictor de respuesta a diferentes esquemas de tratamiento, especialmente al utilizar el Trastuzumab (8-11). Este anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce el dominio extracelular del HER2, fue aprobado en 1998 por la FDA (Food and Drug Administration) para su utilización en el tratamiento del cáncer de mama metastásico. Desde entonces y hasta la fecha, los resultados clínicos han sido muy significativos (6,7,12,13), determinando que el conocimiento de la expresión de HER2 en los tumores mamarios al momento del diagnóstico, se haya convertido en un procedimiento estandar en la práctica clínica en cáncer de mama.

En Cuba, el cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia (excluyendo los tumores de la piel) y el segundo en mortalidad por cáncer en la mujer (14). Esta localización tumoral es uno de los principales problemas de salud en nuestra población, en el que se trabaja intensamente. La introducción en la guía nacional para el manejo del cáncer de mama de la localización tisular del HER2 en los tumores se produjo en el año 2000. El objetivo principal de este estudio fue establecer la prevalencia del HER2 en los tumores mamarios malignos de las mujeres cubanas, utilizando técnicas de inmunohistoquímica (IHQ), y describir su comportamiento en Cuba.

Pacientes y Métodos

Entre los años 2000 y 2006, se recibieron 1,509 muestras de tumores mamarios de pacientes operadas en 21 centros hospitalarios ubicados en 11 de las 14 provincias de Cuba. Las muestras se acompañaron de una ficha de datos, que recogía la información clínico- patológica de la paciente y del tumor.

La determinación de la expresión tisular del HER2, se realizó por inmunohistoquímica (IHQ), empleando el Hercep Test™ (Dako, Glostrup, Denmark), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En cada experimento se incluyeron los controles positivos apropiados. Se empleó la lámina suministrada en el Hercep Test™, y también se utilizaron tumores con expresión HER2 conocida, como controles alternativos.

La inmunoreacción tisular fue evaluada independientemente por dos patólogos, experimentados. En caso de discrepancia en el diagnóstico emitido, se consultó a un experto externo. Se localizó el marcaje en la membrana celular, y se gradificó según las indicaciones recomendadas en la guía suministrada: Negativos (0 y 1+), con ausencia de coloración en toda la membrana citoplasmática o con una fina barrera de coloración distribuida en porciones de la membrana en un número de células menor o igual al 10%; los que presentan una fuerte coloración que delimita toda la membrana son los indiscutiblemente positivos (3+), en tanto que los casos llamados discordantes (2+) se presentan con una coloración continua en toda la membrana citoplasmática, pero con una intensidad que puede catalogarse de moderada.

Se consideró como criterio de positividad para este marcador, un número de células tumorales inmunomarcadas igual ó mayor al 10%

Análisis Estadístico

Se correlacionó la expresión del HER2 en diferentes regiones del país y con las variables clínico-patológicas; edad, dimensión mayor del tumor, ganglios metastásicos, grado nuclear e histológico y el estadio

clínico, empleando el test Chi- cuadrado, considerándose el nivel de significación estadística en $p \leq 0.05$.

Para la correlación entre el HER2 y el RE, se aplicó el test de Spearman, donde la obtención del coeficiente rho (r) de valor negativo, indica una relación inversa.

Resultados

Se analizaron 1,509 tumores de mama, de los cuales solo 1,483 (98.2%) resultaron útiles para este marcador tumoral. La distribución de la expresión del HER2, se correspondió con un 76.3% de tumores negativos (0 y 1+), y un 23.7% de tumores positivos (2+ y 3+). El 16.8% de los tumores mostraron niveles de sobreexpresión (3+) de este marcador (*Cuadro 1*).

La expresión del HER2 se reanalizó según las regiones geográficas de procedencia de los tumores mamarios. Al Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR) se le consideró como una región independiente. Los porcentajes de positividad se ubicaron en el rango comprendido entre 20 y 30, en todas las regiones del país y en el INOR. En los tumores del INOR se obtiene la expresión más alta de positividad (25.7 %), aunque sin alcanzar niveles de significación estadística (*Cuadro 2*).

Según la clasificación histológica de los tumores (15), la muestra incluyó un 85.2% de carcinomas ductales invasivos (CDI), en tanto que el 14.8% restante se distribuyó en 9.5% de carcinomas lobulillares invasivos (CLI), 4.2% de carcinomas invasivos tipos especiales y 1.1% de variedades clínicas especiales, como el carcinoma inflamatorio y la enfermedad de Paget. La expresión de HER2 según el tipo histológico, mostró al carcinoma ductal invasivo con una mayor positividad de este marcador.

La relación del HER2 con el resto de los factores pronósticos morfológicos y clínicos, estableció que el aumento del grado nuclear y del grado histológico iba aparejado con una mayor expresión de este marcador tumoral ($p=0.0006$, $p=0.0035$), lo mismo ocurrió al aumentar la dimensión mayor del tumor ($p=0.0002$). Por otra parte, se observó que los tumores

Cuadro 1 ■
Distribución de la expresión del HER2 en la muestra de tumores mamarios estudiada

Muestra		Intensidad del Marcaje	
útil n (%)	no útil n (%)	n	(%)
1509			
1 483 (98.2)	26 (1.8)	0	748 (50.4)
		1+	384 (25.9)
		2+	102 (6.9)
		3+	249 (16.8)

Cuadro 2 ■
Distribución de la expresión del HER2 en los tumores mamarios según Regiones Geográficas

Región	Expresión de HER2		Total
	0/1+	2+/3+	
INOR	658 (74.3 %)	227 (25.7%)	885
Occidente	170 (80.1%)	42 (19.9%)	212
Centro	187 (80.0%)	48 (20.4%)	235
Oriente	116 (76.8%)	35 (23.1%)	151
Total	1131 (76.3%)	352 (23.7%)	1483

$p=0.0611$

de las mujeres menores de 40 años de edad, presentaban mayor expresión de esta molécula ($p=0.04$). La correlación con el estadio clínico y con el número de ganglios axilares metastásicos, no alcanzó niveles de significancia estadística ($p > 0.05$) (*Cuadro 3*).

La expresión de los RH de esta serie, establecida en un estudio anterior (16), se distribuyó en 53 y 49% para el RE y el RP respectivamente. Al correlacionar la expresión del HER2 con la del RE, la combinación RE+/HER2- fue la de mayor frecuencia (43%), a continuación se ubicó la no expresión de ambos receptores (33.4%), le siguió la relación de RE-/HER2+ (13.6%) y por último, la de más baja frecuencia (9.9%) correspondió con la positividad de ambos receptores en las células tumorales. En 527 tumores, el 35.5% de la muestra total, se analizó la expresión de los tres marcadores (RE, RP y HER2), la frecuencia de triples negativos encontrada fue de 19.9%.

La expresión del HER2 se asoció inversamente con el RE ($p=0.01$) ($r = -0.121$), confirmándose la asociación negativa entre ambos marcadores.

Discusión

El comportamiento clínico altamente heterogéneo del cáncer de mama, hace que el análisis de los facto-

Cuadro 3

Expresión del HER2 en relación a los Factores Pronósticos morfológicos y clínicos relacionados con el tumor y con el paciente

Factores Pronósticos (n)	HER2		p
	Negativo (0 /1+) n (%)	Positivo (2+ / 3+) n (%)	
Edad (años) (1181)			
< 40	134 (70.1)	57 (29.8)	0.0424*
≥40	763 (77.1)	227 (22.9)	
Diámetro Mayor del Tumor (mm) (851)			0.0002*
< 20	326 (83.8)	63 (16.1)	
21- 49	281 (72.6)	106 (27.3)	
50 y más	52 (69.4)	23 (30.6)	
Ganglios Metastásicos (917)			0.2716
0	304 (73.7)	108 (26.2)	
1-3	195 (79.6)	50 (20.4)	
4-9	137 (78.7)	37 (21.2)	
10 y más	63 (73.2)	23 (26.7)	
Grado Histológico (913)			0.0035*
I	106 (83.4)	21 (16.5)	
II	392 (77.3)	115 (22.6)	
III	193 (69.2)	86 (30.8)	
Grado Nuclear (989)			0.0006*
I	161(77.7)	46 (22.2)	
II	391 (78.3)	108 (21.6)	
III	188 (66.4)	95 (33.5)	
Estadio Clínico (978)			0.6852
I	175 (79.2)	46 (20.8)	
II	444 (76.5)	136 (23.4)	
III	120 (74.1)	42 (25.9)	
IV	12 (75.0)	3 (18.8)	

* p≤ 0.05

res pronósticos y predictivos de respuesta sea extremadamente importante para orientar el manejo y el tratamiento de esta enfermedad. La búsqueda de nuevos factores pronósticos y predictivos de respuesta terapéutica, ha sido y es uno de los principales temas de investigación científica (17). Sin embargo, los factores pronósticos validados continúan siendo: el tamaño de tumor, el estado ganglionar, la expresión de los RH, el grado nuclear e histológico y la edad (18,19). Como factores predictivos se mantienen los RH y más recientemente se ha incluido a HER2 (20).

Slamon y cols establecieron la sobreexpresión del HER2 en los tumores mamarios como un factor de mal pronóstico (6,7), creando la necesidad de su evaluación en el cáncer de mama. Se añadió su valor como predictor de respuesta terapéutica, con los resultados de la aplicación del Trastuzumab en el cáncer de mama metastásico (12) y en tiempos más recientes en la adyuvancia (21). Se constituyó como un indicador de resistencia a los esquemas de tratamiento que no contienen antraciclinas, como el CMF (Ciclofosfamida, Metotrexate, 5 Fluoracilo) y de mejor respuesta a los inhibidores de aromatasas que al tamoxifen (22-24), lo cual refuerza la necesidad de su determinación en el cáncer de mama.

El conocimiento de la sobreexpresión de HER2 en los tumores mamarios, reagrupa a las pacientes como de peor pronóstico y tributarias de una oncoterapia más personalizada. Los niveles de positividad/ sobreexpresión encontrados en este estudio, corresponden con los reportados en series de otros países con diferentes niveles de desarrollo socioeconómico, etnias y áreas geográficas (25-30).

Están definidas las recomendaciones para los laboratorios, con el fin de obtener resultados confiables que garanticen la expresión real del HER2 a nivel tisular (31-34). Es necesario que desde el inicio del procesamiento del tejido para los estudios de anatomía patológica estándar, se garantice la calidad de todo el proceso. El tipo de fijador que se haya utilizado, el tiempo de la fijación y el tamaño del fragmento de tejido seleccionado, son los primeros parámetros que inciden en la variabilidad de la expresión antigénica obtenida en el estudio por inmunohistoquímica. Algunos autores describen variaciones significativas relacionadas al día de la cirugía y al hospital donde se realizó (34). Todos estos parámetros quedaron fuera de control en este estudio, por la disímil procedencia de las muestras tumorales analizadas. Sin embargo esto no determinó una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de HER2 según la región de procedencia del tumor. Llama la atención que el grupo de las muestras procedentes del INOR, centro de

referencia nacional del tercer nivel de atención, alcanzó el mayor porcentaje de expresión de HER2.

Resultó interesante no solo estimar el rango de positividad/sobreexpresión de este marcador en Cuba, sino también conocerlo en las diferentes regiones del país.

Al correlacionar este marcador con los factores pronósticos anatomopatológicos que se evalúan en la práctica clínica para estatificar a las pacientes (35), sólo el número de ganglios axilares metastásicos, no se asoció con la expresión de HER2 a nivel tisular.

Está confirmado el valor pronóstico independiente de los ganglios metastásicos. Más del 50% de estas pacientes, presentan tumores recurrentes en 10 años, observándose una menor supervivencia libre de eventos y menor supervivencia global (36-40). Otros autores también han reportado la no asociación de la expresión de HER2 con la presencia de ganglios metastásicos (27,41,42).

El tipo histológico del tumor, carcinoma ductal invasivo, al igual que en muchos otros estudios (43-45), está relacionado con una mayor expresión del HER2.

El grado histológico y el grado nuclear, son factores pronósticos que juegan un papel importante para el manejo clínico de los tumores mamarios. Su aumento se encuentra directamente asociado a un peor pronóstico y a una menor supervivencia global (46). En este estudio se confirma su relación con el HER2.

La edad se ha definido como un factor pronóstico independiente. A pesar de la uniformidad en la medición de los factores de pronóstico y en el empleo de los tratamientos oncoespecíficos, se ha encontrado una menor supervivencia libre de eventos y supervivencia global, en el grupo de mujeres más jóvenes en relación con las de mayor edad (47-54).

En estudios que involucran grandes series de pacientes, se ha observado que las mujeres con cáncer de mama menores de 40 años de edad, generalmente presentan mayor riesgo de recidiva local (55,56) y

de aparición de metástasis (49), desarrollan tumores menos diferenciados y muestran una menor expresión de receptores hormonales (52).

Para esta serie, la significancia estadística en cuanto a la distribución según la edad en relación a los RH, se alcanzó cuando se utilizó la edad de 50 años para dividir la muestra en dos grupos (16). Las mujeres mayores de 50 años presentaron mayor expresión de los RH, evidenciando la relación entre el estatus menstrual y la dependencia hormonal del tumor. Sin embargo, para el HER2, al utilizar esa edad no se obtuvo igual resultado ($p=0.075$). Fue la edad de 40 años, la que permitió dividir las pacientes en dos grupos que mostraran una diferencia estadísticamente significativa en la expresión del marcador.

Los resultados de esta serie, coinciden con numerosos estudios que reflejan una correlación inversa entre el HER2 y los RH, especialmente con el RE (57-62). Asociando el papel de los estrógenos en la supresión del HER2 (63-66), lo que explica la pérdida de la expresión de los RE en las mujeres con cáncer de mama HER2 positivos, el crecimiento del tumor y las pobres respuestas clínicas a los tratamientos con Tamoxifen.

Este trabajo realizado con técnicas de IHQ sobre tumores mamarios de una muestra representativa de las mujeres de todo el país, constituye el primer reporte de la expresión de HER2 en Cuba.

Referencias

1. Dillman D.O. Monoclonal antibody for treating cancer. *Ann Intern Med* 1989; 111: 592-603 ▪
2. Dillman R.O. Magig bullets at least! Finally- aproval of a monoclonal antibody for the treatment of cancer!!! *Cancer Biother Radiopharm* 1997; 12: 223-225 ▪
3. Huhn D., vonSchiling C., Wilhelm M., et al. Rituximab therapy of patients with B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 98:1326-31 ▪
4. Nadler L.M., Stashenko P., Hardy R., et al. Serotherapy of a patient with a monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen. *Cancer Res* 1980; 40: 3147-3154 ▪
5. Ritz J., Schlossman S.F. Utilization of monoclonal antibodies in treatment of leukemia and lymphoma. *Blood* 1982; 59: 1-11 ▪

6. Slamon DJ, Clark G.M, Wong S.G, Levin W.J, Ullrich A, McGuire W.L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the Her-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-182 ▪
7. Slamon DJ, Godolphin W, Jones L.A, et al. Studies of the Her-2/neu proto oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707-712 ▪
8. Pegram M.D., Konecny G.E., O' Callaghan C., et al. Rational combinations of Trastuzumab with chemotherapeutic drugs used in the treatment of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:739-740 ▪
9. Jahanzeb M., Mortimer J.E., Yunus F., et al. Phase II trial of weekly vinorelbine and trastuzumab as first-line therapy in patients with HER2 (+) metastatic breast cancer. *Oncologist* 2002; 7: 410-417 ▪
10. Piccart-Gebhart M.J., Procter M., Leyland-Jones B., et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2 positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 1573-1584 ▪
11. Joensuu H., Kellokumpu-Lehtinen P.L., Bono P., et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with and without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 354: 809-820 ▪
12. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Balsega J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344:783-792 ▪
13. Burstein H.J., Harris L.N., Marcom P.K., et al. Trastuzumab and vinorelbine as first-line therapy for HER2 overexpressing metastatic breast cancer: multicenter phase II trial with clinical outcomes, analysis of serum tumor markers as predictive factors, and cardiac surveillance algorithm. *J Clin Oncol* 2003; 21:2889-2895 ▪
14. Reporte del Registro Nacional de Cáncer y del Anuario Estadístico. Cuba, 2006 ▪
15. Tavassoli, F. A. and Devilee, P. (eds) World Health Organization. Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press; Lyon, 2003 ▪
16. Alvarez R. I., Escobar X., Camacho R., et al. Receptores Hormonales y otros factores pronósticos en Cáncer de mama en Cuba. *Cancerología* 2008; 3:19-27 ▪
17. Colozza M., Azambuja E., Cardoso F., et al. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now?. *Ann Oncol* 2005; 15: 1723-1739 ▪
18. Goldhirsch A., Wood W. C., Gelber R. D., et al Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary of Early Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3357-65 ▪
19. van Diest P. J., van der Wall E., Baak J. P., et al. Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. *J Clin Pathol* 2004; 57: 675-681 ▪
20. Bast R. C., Jr, Ravdin P., Hayes D. F., et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1865-78 ▪
21. Piccart-Gebhart M.J., Procter M., Leyland-Jones B. et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2 positive Breast Cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 1659-1672 ▪
22. Menard S., Valagussa P., Pilotti S., et al. Response to cyclophosphamide, metotrexate, and fluorouracil in Lymph node-positive Breast Cancer according to HER2 overexpression and other tumor biological variables. *J Clin Oncol* 2001; 19: 329-335 ▪
23. Ellis M.J., Coop A., Sigh B., et al. Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for erb B-1 and/or erb B-2 positive, estrogen receptor-positive primary breast Cancer. Evidence of Phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3808-3816 ▪
24. Pegram M.D., Lipton A., Hayes D.F., et al. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185 Her-2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2659-2671 ▪
25. Shak S. Overview of the Trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2 overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group. Review. *Semin Oncol* 1999; 12(4 Suppl): 71-77 ▪
26. el-A Helal T., Khalifa A., Kamel A. F. Immunohistochemical expression of p53 and c-erbB2 proteins in breast Cancer in Egypt. *Anti-cancer Res* 2000; 20: 2145-2150 ▪
27. Taucher S., Rudas M., Mader R.M., et al. Do we need HER-2/neu Testing for all patients with primary Breast Carcinoma?. *Cancer* 2003; 98: 2547-2553 ▪
28. Abadjian G., Antoun R. Breast carcinoma: Evaluation of hormone receptors and pS2, erb-B2, p-glycoprotein and Ki-67 markers. *J Med Liban* 1996; 44: 10-15 ▪
29. Sughayer M. A., Al-Khawaja M.M., Massarweh S., et al. Prevalence of hormone receptors and HER2/neu in breast cancer in Jordan. *Path Oncol Res* 2006; 12: 83-86 ▪
30. Ayadi L., Khabir A., Amori H., et al. Correlation of HER-2 overexpression with clinical-pathological parameters in Tunisian breast carcinoma. *WJ Surg Oncol* 2008; 6: 100-112 ▪
31. Hammond M.E., Taube S.E. Issues and barriers to development of clinically useful tumor markers: a development pathway proposal. *Semin Oncol*. 2002; 29: 213-221 ▪
32. Hammond M.E., Baker P., Taube S., et al. Standard reference material for HER2 testing: report of a national Institute of Standards and Technology-sponsored Consensus Workshop. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003; 11: 103-106 ▪
33. Nkoy F. L., Hammond E., Rees W., et al. Day of surgery affects estrogen receptor test results in women with breast cancer (abstract 5107). 28th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium; December 10, 2005, San Antonio, TX ▪
34. Bloom K. Data presented at: United States and Canadian Academy of Pathology 2006. Annual Meeting; February 11-17, 2006 Atlanta, GA ▪

35. Sobin LH, Wittekind CH. TNM Classification of Malignant Tumours, 7th ed : A John Wiley and Sons INC, Publication 1997:123-130 ▪
36. Veronesi U, Galimberti V, Zurrada S, et al. Prognostic significance of number and level of axillary nodal metastasis in Breast cancer. *Breast* 1993; 2: 224-228 ▪
37. Jatoi L, Hilsenbeck S G., Clark GM., et al. Significance of axillary lymph node metastasis in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2334-2340 ▪
38. Taucher S., Rudas M., Mader R. M., et al Do we need HER2/neu Testing for All patients with Primary Breast Carcinoma? *Cancer*, 2003; 98: 2547-2553 ▪
39. Cutler S. J., Zipin C., Asire A. J. The prognostic significance of palpable Lymph nodes in cancer of the breast. *Cancer*, 1999; 23:243-250 ▪
40. Hayes D. F. Prognostic and predictive factors revisited. *The breast*, 2005; 14: 493-499 ▪
41. Goldhirsch A., Glick J. H., Gelber R. D., et al. Meeting highlights: international Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast cancer. Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast cancer. *J Clin Oncol*. 2001;19: 3817-3827 ▪
42. Almasri N.M., Al Hamad M. Immunohistochemical evaluation of human epidermal growth factor receptor 2 and estrogen and progesterone receptors in breast carcinoma in Jordan. *Breast Cancer Res* 2005;7: 598-604 ▪
43. Hanna W.M., Kahn H.J., Pienkowska M., et al. Defining a test for HER-2/neu evaluation in breast cancer in the diagnostic setting. *Mod Pathol*. 2001; 14: 677-685 ▪
44. Verdú M., Colomer A., Román R., et al. Protocolo del estudio molecular del oncogén HER2/neu en el carcinoma de mama. *Clin Transl Oncol*, 2005; 7(11): 504-11.
45. Masood S., Bui M. M. Prognostic and predictive value of HER2/neu oncogene in breast cancer. *Microsc Res Tech*, 2002; 59: 102-108 ▪
46. White J., Morrow, M., Moughan, J., et al. Compliance with breast conservation standards for patients with early stage breast carcinoma. *Cancer* 2003; 97: 893-904 ▪
47. Nixon A.J. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 1994;12: 888 ▪
48. SEER. Incidence and Mortality Age-Specific Rates by Race FROM 2000-2004. www.seercancer.gov, 2008 ▪
49. Voogd A.C., Nielsen M., Peterse J.L., et al Differences in risk factors for local and distant recurrence after breast-conserving therapy or mastectomy for stage I and II breast cancer: pooled results of two large European randomized trials. *J Clin Oncol*. 2001;19(6): 1688-1697 ▪
50. Jmor S., Al-Sayer H., Heys S.D., et al. Breast cancer in women aged 35 and under: prognosis and survival. *J R Coll Surg Edinb* 2002; 47(5): 693-699 ▪
51. Sundquist M., Thorstenson S., Brudin L., et al. Incidence and prognosis in early onset breast cancer. *Breast*. 2002; 11(1): 30-35 ▪
52. Maggard M.A., O'Connell J.B., Lane K.E., et al. Do young breast cancer patients have worse outcomes? *J Surg Res*. 2003;113(1):109-113 ▪
53. Foo C.S., Su D., Chong C.K., et al. Breast cancer in young Asian women: study on survival. *ANZ J Surg*. 2005; 75(7): 566-572 ▪
54. Han W., Kim S.W., Park I.A., et al. Young age: an independent risk factor for disease-free survival in women with operable breast cancer. *BMC Cancer*. 2004; 4: 82 ▪
55. Zhou P., Gautam S., Recht A. Factors affecting outcome for young women with early stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2007; 101(1): 51-57 ▪
56. Bollet M.A., Sigal-Zafrani B., Mazeau V., et al. Age remains the first prognostic factor for loco-regional breast cancer recurrence in young (<40 years) women treated with breast conserving surgery first. *Radiother Oncol*. 2007; 82(3): 272-280 ▪
57. Sjogren S., Inganas M., Lindgren A., et al. Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. *J Clin Oncol* 1998; 16 : 462-469 ▪
58. Pinto A.E., Andre S., Pareira T., et al. C-erbB-2 oncoprotein overexpression identifies a subgroup of estrogen receptor positive (RE+) breast cancer patients with poor prognosis. *Ann Oncol* 2001; 125: 25-33 ▪
59. Konecny G., Pauletti G., Pegram M., et al. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95 : 142-153 ▪
60. Huang H.J., Neven P., Drijckoningen M., et al. Association between tumor characteristics and HER2/neu by immunohistochemistry in 1362 women with primary operable breast cancer. *J Clin Pathol* 2005; 58: 611-616 ▪
61. Selvarajan S., Wong K.Y., Khoo K. S., et al. Overexpression of c-erbB2 correlates with nuclear morphometry and prognosis in breast carcinoma in Asian woman. *Pathology* 2006; 38: 528-533 ▪
62. Traina A., Agostara B., Marasá L., et al. HER2/neu expression in relation to clinicopathologic features of breast cancer patients. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1089: 159-167 ▪
63. Pietras R.J., Arboleda J., Reese D.M., et al. HER-2 tyrosine kinase pathway target estrogen receptors and promotes hormone independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* 1995; 10: 2435-2446 ▪
64. Dowsett M. Overexpression of HER-2 as a resistance mechanism to hormonal therapy for breast cancer. *Endocr Related Cancer* 2001;8:191-195 ▪
65. Chung Y, Sheu M, Yang S, Lin C, Yen S. Resistance to tamoxifen-induced apoptosis is associated with direct interaction between HER-2/neu and cell membrane estrogen receptor in breast cancer. *Int J Cancer* 2002;97:306-312 ▪
66. Pietras R. J. Interactions Between Estrogen and Growth Factor Receptors in Human Breast Cancers and the Tumor- Associated Vasculature. *The Breast Journal* 2003; 9(5): 361-373 ▪