

PARTICULARITĂȚILE BIOLOGICE ALE TUMORII CA FACTORI DECISIVI ÎN TRATAMENTUL COMPLEX AL CANCERULUI GLANDEI MAMARE

Larisa SOFRONI, Vasile JOVMIR, Vitalie MACHIDON,
Diana SOCHIRCĂ, Alexandru COTRUȚĂ, Elena CUDINA

IMSP Institutul Oncologic, Republica Moldova
Laboratorul Științific Tumorile Organelor Reproductive

Rezumat

Datorită incidenței în continuă creștere cancerul glandei mamare (CGM) a atras atenția cercetătorilor prin diferite aspecte: clinice, diagnostice, morfologice și de tratament. Tratamentul contemporan al cancerului mamar este greu de imaginat fără studierea particularităților biologice ale tumorii - factori decisivi în tratamentul pacientelor. De aceea, oncologia modernă este în căutarea unor noi soluții, a unui tratament personalizat care ar fi îndreptat spre studierea determinismului biologic, inclusiv imunohistochimic (IHC) al tumorii maligne.

În studiu au fost incluse 240 paciente cu CGM la care s-au apreciat indicii IHC: ReEs, RePg, HER 2/neu, Ki-67. Ne-am propus ca scop de a aprecia indicii sus-numiți maximal în perioada preoperatorie, utilizând metoda de trepan biopsie. Acest fapt ne-a permis de a selecta pacientele care necesită la I –a etapă intervenție chirurgicală, mai mult ca atât, am argumentat indicațiile către mastectomie sau operație organomenajantă. O înțelegere mai bună a semnalelor moleculare reciproce ce apar între celulele epiteliale neoplazice, poate duce la identificarea de noi metode de tratament și prevenție pentru cancerul de sân.

Cuvinte-cheie: cancer mamar, receptor, estrogen, progesteron, factor de proliferare, hormonoterapie, mastectomie.

Summary. The biological particularities of tumor decisive factors in the complex treatment of breast cancer

Due to the increasing incidence, breast cancer has gained the attention of researchers, through different aspects: clinical, diagnostic, morphological and treatment. The contemporary therapy of breast cancer is difficult to imagine without studying the biological particularities of the tumor - decisive factors in the treatment of patients. Therefore, modern oncology is in search of new solutions for personalized treatment, which would be aimed at studying biological determinism, including immunohistochemistry (IHC) of the malignant tumor. In the study were included 240 patients with breast cancer who was evaluated, preoperatively, with the help of ReEs, RePg, HER 2/neu protein. We aimed to assess the aforementioned indices during the preoperative period, using the core-biopsy method. This fact will allow us to select the patients who need the surgery at the first step, more than that we can argue the indications for mastectomy or organ preserving surgery. A better understanding of the mutual molecular signals that occur between neoplastic epithelial cells can lead to the identification of new methods of treatment and prevention for breast cancer.

Key-words: receptors, breast cancer, estrogen, progesterone, proliferation index, hormonal therapy, mastectomy.

Резюме: Биологические особенности опухоли решительные факторы в комплексном лечении рака молочной железы.

Высокая заболеваемость рака молочной железы (РМЖ) привлекла внимание исследователей данной проблемы по различным аспектам: клинических, диагностических, морфологических и терапевтических. Современное лечение рака молочной железы сложно представить без изучения биологических особенностей опухоли, которые являются решающим фактором в выработке тактики лечения пациентов. Поэтому современная онкология находится в поиске новых решений для персонализированного лечения РМЖ, которое будет основано на изучение и

применение биологического детерминизма, включая иммуногистохимическое исследование характеристик злокачественной опухоли.

В исследование были включены 240 пациенток РМЖ, которым были выполнены исследования: рецепторы эстрогена и прогестерона, HER2/neu и фактор пролиферации Ki-67. У 52 больных материал для исследования был получен методом трепан биопсии опухоли, что позволило выбрать оптимальную тактику на первом этапе лечения: хирургическое или химиотерапия. Полученные результаты послужили основой для определения оптимального объема оперативного вмешательства: мастэктомия или органосохраняющая операция. Лучшее понимание биологических характеристик злокачественной опухоли позволят вырабатывать новые методы лечения и профилактики рака молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы, рецептор, эстроген, прогестерон, фактор пролиферации, гормонотерапия, мастэктомия.

Introducere

Cancerul glandei mamare (CGM) actualmente reprezintă cea mai frecventă formă de neoplazii la femei, constituind o problemă majoră cu impact global, cauzată de morbiditate și mortalitate înaltă.

Neoplasmul mamar continuă să fie o problemă de mare actualitate în oncologie luând în considerație faptul că morbiditatea și mortalitatea prin această localizare se menține la un nivel foarte înalt.

Potrivit datelor statistice, în Republica Moldova CGM ocupă primul loc în structura morbidității prin tumori maligne la femei, înregistrându-se anual în jur de 1000 de paciente cu această maladie, reprezentând 22% din morbiditatea oncologică anuală.

Conform ultimelor date statistice prezentate de *Cancer Registru* al IMSP Institutul Oncologic, incidența tumorilor maligne ale glandelor mamare crește din an în an. Prevalența cancerului glandei mamare în anul 2018 a fost cea mai înaltă și a constituit 522,5 la 100 mii populație, față de anul 2016 – 474,6 la 100 mii populație. Se estimează că una din 9 femei pe parcursul vieții vor fi afectate de această groaznică maladie.

De la începutul anului 2019 au fost deja luate la evidență în *Cancer Registru* al IMSP IO 924 paciente cu cancer mamar, dintre care practic fiecare al treilea caz a fost depistat în stadii avansate - III și IV. Cu părere de rău, rezultatele sunt alarmante, deoarece aceste paciente deseori nu pot beneficia de un tratament specific radical, iar rezultatele acestuia nu oferă un prognostic favorabil.

Datele reflectate anterior sunt un argument forte pentru acțiuni prompte în ameliorarea situației actuale. La moment, apare necesitatea unui șir de acțiuni concrete cu privire nu numai la diagnosticul precoce al cancerului mamar în RM, ci și a unui tratament oportun, bazat pe rezultate sigure și de durată. Tratatamentul contemporan al CGM este greu de imaginat fără studierea particularităților biologice ale tumorii - factori decisivi în tratamentul pacientelor. De aceea, oncologia modernă este în căutarea unor noi soluții a unui tratament personalizat, care ar fi îndreptat spre

studierea determinismului biologic, inclusiv imuno-histochemic (IHC) al tumorii maligne.

IHC este un proces de detectare a antigenilor (proteinelor), prin exploatarea principiului legăturii dintre anticorpi, în mod special în cazul anticorpilor prezenți în țesuturile biologice. IHC este utilizată și în cercetările fundamentale realizate pentru înțelegerea distribuției și localizării biomarkerilor și a diferențierii proteinelor din diferite părți ale țesutului biologic, care pune în evidență caracterele de agresivitate, evoluție și modulare terapeutică.

Prognosticul pacientelor cu CGM în bună parte depinde de vârstă, diametrul și tipul tumorii, gradul histologic, statutul ganglionilor axilari, expresia ReEs, RePg, a proteinei HER2/neu și a indicelui de proliferare Ki-67 etc. Studiarea IHC a markerilor biologici are avantajul impactului imediat în strategia terapeutică: prezența receptorilor hormoni asigură selectarea pacientelor care vor beneficia de terapie hormonală, iar statutul Her2/neu devine o opțiune terapeutică importantă pentru pacientele cu CGM care prezintă supraexpresia genei în cauză.

CGM la nivel molecular se grupează în 3 subtipuri de cancer: tipul luminal (tipul A și B), HER2/neu și tipul bazal. CGM de tip luminal exprimă ReEs și gene înrudite și pot fi sensibile la terapii hormonale.

Cancerul mai puțin agresiv (tipul A) poate fi mai sensibil la hormonoterapie decât tipul B. Cancerul HER2 pozitiv poate fi „țintit” cu anticorpii monoclonali Trastuzumab și poate fi sensibil la chimioterapie. Se consideră că CGM HER2 pozitiv este mai agresiv fiind caracterizat prin prognostic nefavorabil. Aproape jumătate din cancerele pozitive HER2 exprimă și ReEs. Cancerurile de tip bazal nu exprimă, de obicei, receptori pentru nici unul dintre hormoni sau supraexprimă receptorul HER2, un fenotip denumit „triplu negativ” (tip bazal). Cancerurile de tip bazal sunt înalt proliferative și au un prognostic prost, deși multe dintre ele sunt foarte sensibile la chimioterapie. Nu există nici o terapie țintită pentru fiecare subtip.

Actualmente, semnificația clinică a expresiei genetice sau a profilului IHC în subtipurile cancerului mamar

nu e studiată suficient. Tumori cu profiluri moleculare similare continuă să varieze în răspunsul la tratament și în evoluție. Mecanismele progresiei tumorale pot duce la definirea unui set mai important de gene predictive.

Deci, o studiere mai profundă a biologiei moleculare a tumorii maligne poate duce la identificarea de noi metode de tratament și prevenție în CGM.

Scopul studiului: Ameliorarea rezultatelor tratamentului chirurgical, chimioterapic și hormonal prin elaborarea schemelor optime de tratament pre- și post-operator în funcție de particularitățile biologice ale tumorii.

Ținând cont de scopul studiului ne-am propus următoarele obiective :

- determinarea receptorilor de estrogen, progesteron și a oncoproteinei Her2/neu, a indicelui de proliferare Ki-67 în tumorile maligne la pacientele cu CGM cu stabilirea tipului molecular;
- selectarea volumului optim al intervenției chirurgicale (mastectomie sau operație organomenajantă) în funcție de tipul molecular al cancerului;
- selectarea pacienților care vor administra tratament chimioterapic și hormonal în baza rezultatelor imunohistochimice obținute;
- elaborarea algoritmului de tratament al pacienților cu cancer mamar în dependență de particularitățile biologice ale tumorii maligne.

Material și metode de cercetare

Studiul a înrolat 240 paciente cu CGM, care au fost tratate în IMSP IO în anii 2015-2018, cu vârsta de la 25-75 ani.

Drept sursă principală de informație despre parametrii studiați au servit observațiile asupra pacienților, fișele medicale și datele din cartele de ambulator. În scopul procesării statistice au fost elaborate chestionare speciale cu codificarea datelor clinice și paraclinice ale pacienților.

Pentru examinarea pacienților incluse în studiu au fost utilizate metodele:

- *pentru aprecierea și confirmarea diagnosticului:* clinică, instrumentală (mamografia, USG GM, a organelor abdominale, bazinului mic, R-grafia cutiei toracice, tomografia mediastinului, scintigrafia sistemului osos), citologică, morfologică, imunohistochimică;
- *pentru stabilirea patologiilor concomitente:* clinică, instrumentală, de laborator;
- metoda imunohistochimică - pentru determinarea ReEs, RePg, HER2/neu, Ki-67;

- pentru prelucrarea statistică a datelor obținute s-a utilizat metoda interviuării standard și de analiză matematică și statistică, utilizând indicatorii relativi, media aritmetică și marja de eroare a acesteia;
- rezultatele evaluărilor cantitative ale valorilor parametrilor studiați au fost supuse analizei statistice după metoda cercetării selective, evaluând mediile aritmetice și erorile acestora.

Investigația profilului imunohistochimic al tumorilor maligne

Reacțiile imunohistochimice s-au realizat pe 7 secțiuni de 4 microni obținute din blocurile incluse la parafină, care au fost întinse pe lame de sticlă pretratate cu polilizină sau încărcate electric și au utilizat un panel bogat de anticorpi. Pentru receptorii de estrogen și progesteron au fost utilizați anticorpi monoclonali anti-Human Estrogen Receptor clona 1D5, anticorpii monoclonali anti-PR clona PR1A6, produși de firma Dako Cytomation – Danemarca.

Excesul HER2 va fi determinat utilizând o metodă imunohistochimică la nivelul blocurilor tumorale fixe, timidin fosforilaza este localizată în mare parte în celulele stromale ale tumorii. Pentru determinarea indicelui de proliferare Ki-67 s-au utilizat anticorpi Kit cu utilizarea unui complex peroxidază - biotină-avidină după marcarea antigenică.

Rezultate și discuții:

Pe parcursul derulării proiectului au fost investigate 240 paciente, câte 60 la fiecare etapă. Vârsta medie a pacienților a constituit 58,2 ani (vârsta minimă - 29 ani, vârsta maximă - 75 ani). Tuturor pacienților s-au efectuat investigațiile conform designului studiului.

Actualmente, este recunoscut faptul, că vârsta este un factor de risc nemodificabil în apariția CGM. Vârsta medie a pacienților a constituit 59,0±0,75 ani. Pacientele investigate au fost repartizate conform intervalului de vârstă (*tabelul 1*).

Evaluând vârsta pacienților din lotul de studiu am constatat, că cele mai multe paciente au fost depistate în intervalul cuprins între 51-60 ani, practic fiecare a treia pacientă (30,4 %), iar fiecare a patra pacientă (23,3 %) avea vârsta între 61-70 ani. Între 40-50 ani aveau 21,6% paciente, iar în alte perioade de vârstă frecvența depistării cancerului mamar a fost mai mică.

Examinarea morfopatologică a materialului biologic ne furnizează diagnosticul de certitudine, care include descrierea tipului morfologic al tumorii, gradul de diferențiere, gradul de patomorfază, starea țes-

Tabelul 1

Repartizarea pacienților incluse în studiu în funcție de vârstă

Pacientele cu CGM	Intervalul de vârstă					
	21-30 ani	31-40 ani	40-50 ani	51-60 ani	61-70 ani	71-75 ani
	11 (4,6%)	34 (14,2%)	52 (21,6%)	73 (30,4%)	56 (23,3%)	14 (5,9%)

Tabelul 2.

Caracteristica morfologică a tumorilor pacienților incluse în studiu

Paciente cu CGM	Forma morfologică							
	Ductal (NST)	Lobular	Ductal+ lobular	Medular	Mucinos	Tubular	Papilar	Pat- ză gr. IV
240	158 (65,8%)	47 (19,6%)	13 (5,4%)	5 (2,1%)	4 (1,7%)	5 (2,1%)	7 (2,9%)	1 (0,4%)

sutului tumoral adiacent, starea ganglionilor limfatici regionali etc.

Analizând caracteristica formelor morfopatologice ale CGM în lotul pacienților incluse în studiu , am obținut următoarele date: (tabelul 2)

Cancerul ductal sau nespecific a fost depistat cu frecvența cea mai înaltă: 158 paciente (65,8%), carcinomul lobular s-a depistat în 47 cazuri (19,6%), forma mixtă - carcinom ductal și lobular în 13 cazuri (5,4%), carcinomul medular și tubular s-au înregistrat în câte 5 cazuri (câte 2,1% de fiecare), carcinomul mucinos - la 4 (1,7%), iar cel papilar la 7 paciente (2,9%). Patomorfoza de gradul IV s-a înregistrat numai într-un singur caz.

Examenul imunohistochimic relevă tipul molecular al cancerului mamar, care reprezintă caracteristicile biologice de importanță ale tumorilor maligne. După cum s-a menționat, diagnosticul morfopatologic furnizează o serie de factori cu valoare prognostică, dar pe lângă acești factori, investigația imunohistochimică mai poate evalua factori cu valoare predictivă asupra tratamentului.

Cu scopul stabilirii particularităților biologice ale tumorilor, procedeu obligatoriu în individualizarea tratamentului, pacienților lotului de studiu s-au apreciat ReEs, RePg, proteina HER2/neu și indicele de proliferare Ki-67. Pentru repartizarea pacienților conform profilului imunohistochimic am utilizat clasificarea moleculară a cancerului glandei mamare.

- 1. RE+/RP+/ HER2/neu – negativ (tip luminal A)
- 2. RE+/RP+/ HER2/neu + pozitiv (tip luminal B)
- 3. Tipul Her2/neu + pozitiv (Her2/neu + pozitiv)

- 4. Tipul RE– /RP–/ HER2/neu –negativ (triplu negativ).

Tipul luminal A (RE+, RP+, HER2/neu –) este depistat mai frecvent în postmenopauză, tumori bine diferențiate (G1), cu indice de proliferare scăzut, care sunt eficiente la HT, cu prognostic favorabil.

Tipul luminal B (RE+, RP+, HER2/neu+) include tumori care nu evoluează bine sub Tamoxifen, ci sub inhibitori de aromatază, și pot beneficia și de terapie antineoplazică paralel cu hormonoterapia.

Tipul HER2/neu + pozitiv - vor beneficia de terapie „țintită” cu Trastuzumab.

Triplu negativ (tipul RE– /RP– / HER2/neu –), cancerul de tip bazal – depistat în premenopauză, tumori cu grad de diferențiere redus (G3), indice de proliferare crescut, rezistente la taxani, Trastuzumab și endocrinoterapie; sunt considerate actual de prognostic nefavorabil și sunt propuse pentru tratament cu chimioterapie.

În rezultatul studiului IHC efectuat, am stabilit, că cel mai frecvent a fost depistat tipul luminal A - la 95 paciente (39,6%), tipul luminal B a fost stabilit în 68 cazuri (28,3%), iar tipul HER2/neu + pozitiv a fost depistat la 42 persoane (17,5 %). Tipul triplu negativ a fost stabilit în 35 cazuri - (14,6%), (tabelul 3).

Este foarte important de a aprecia indicii sus-numiți anume în perioada preoperatorie, utilizând metoda de trepan-biopsie. Din numărul total de paciente investigate - 240, la 52 paciente (21,6%) parametrii biologici ai tumorii au fost stabiliți preoperator, prin metoda de trepan biopsie. Aceasta ne-a permis:

Tabelul 3.

Repartizarea pacienților conform claselor moleculare ale cancerului mamar

Lotul de pacienți	Clasele moleculare ale cancerului mamar			
	Tipul luminal A	Tipul luminal B	HER2/neu pozitiv	Triplu negativ
	95 (39,6%)	68 (28,3 %)	42 (17,5 %)	35 (14,6%)

Tabelul 4.

Selectarea volumului chirurgical în dependență de tipul IHC al tumorii

Lotul pacienților	Mastectomii de diferite tipuri			Operație organomenajantă	Rezecție sectorială
	Pirogov	Madden	Halsted		
52	1 (1, 9%)	40 (76, 9%)	1 (1, 9%)	9 (17, 3%)	1 (1, 9%)

- selectarea pacienților care necesită intervenție chirurgicală la I-a etapă;
- argumentarea indicațiilor către mastectomie sau operație organomenajantă;
- individualizarea indicațiilor pentru chimioterapie sau/și hormonoterapie

În selectarea volumului intervențiilor chirurgicale ne-am condus de vârsta pacientei, de răspândirea procesului malign, de localizarea acestuia, de tratamentul administrat anterior, de rezultatele analizei IHC, de dorința pacientei, etc.

Cea mai mare parte a pacienților - (76,9%) au fost supuse mastectomiilor radicale de tip Madden, 9 din ele (17,3%) au beneficiat de operații organomenajante, iar 2 pacienți (câte 1,9%) au suportat mastectomii de tip Pirogov și Halsted. La o pacientă (1,9%) din cauza patologiei concomitente decompensate i s-a efectuat rezecția sectorială simplă.

Concluzii

1. Studiarea particularităților IHC ale tumorii are avantajul impactului imediat în strategia terapeutică: prezența receptorilor hormonal asigură selectarea pacienților care vor beneficia de terapie hormonală, iar statusul HER2/neu devine o opțiune terapeutică importantă pentru paciențele cu CGM care prezintă supraexpresia genei în cauză.
2. Frecvența formelor morfologice ale tumorilor maligne denotă, că marea majoritate a pacienților au prezentat forme ductale ale cancerului - 158 pacienți (65,8%), carcinomul lobular s-a depistat în 47 cazuri (19,6%), forma mixtă - carcinom ductal și lobular în 13 cazuri (5,4%). Celelalte forme morfologice au fost depistate mai rar.

3. Repartizarea pacienților conform claselor moleculare ale cancerului mamar denotă că au prezentat forme hormonodependente - tipul luminal A și tipul B - mai mult de jumătate dintre pacienți – 163 (67,9%). În cadrul tratamentului aceste pacienți vor beneficia de terapie hormonală.
4. Supraexpresia genei HER2/neu a fost depistată la 42 pacienți (17,5%). Fiind procese cu un potențial mai agresiv și un prognostic nefavorabil, pacienților li se va propune tratament cu Trastuzumab.
5. Paciențele cu procese triplu negative – 35 (14,6%) care se caracterizează la fel cu evoluție mai agresivă și prognostic nefavorabil vor fi supuse unor scheme mai agresive de chimioterapie.
6. Studiarea particularităților IHC ale tumorii la paciențele cu cancer mamar urmează să influențeze benefic nu numai asupra calității vieții și a supraviețuirii pacienților, dar și asupra coeficientului „cost – calitate – eficacitate”.

Bibliografie

1. Zaha D.C., Lazăr E., Lăzureanu C. *Clinicopathologic features and five years survival analysis in molecular subtypes of breast cancer*. Rom J Morphol Embryol. 2015;51(1):85–9.

2. Kraft P., Haiman C.A. *GWAS identifies a common breast cancer risk allele among BRCA1 carriers*. Nat Genet. 2012;42(10):819–20.

3. Runnak M.A., Hazha M.A., Hemin H.A., Wasan A.A., Rekawt R.M., Michael H.D. *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.

4. Zubeda S., Kaipa P.R., Shaik N.A., Mohiuddin M.K., Vaidya S., Pavani B., et al. *HER-2/neu status: a neglected marker of prognostication and management of breast cancer patients*. Asian Pac J Cancer Prev. 2013;14(4):2231–5.
5. Yager J.D., Davidson N.E. *Estrogen carcinogenesis in breast cancer*. N Engl J Med. 2016;354(3):270–82.
6. Benson C.S., Babu S.D., Radhakrishna S., Selvamurugan N., Sankar B.R. *Grade Dependent Expression of Growth Factor Receptors and Signaling Molecules in Breast Cancer*. Journal of Cancer Therapy. 2013;4(07): 21.
7. Shou J., Massarweh S., Osborne C.K., Wakeling A.E., Ali S., Weiss H., et al. *Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer*. J Natl Cancer Inst. 2014;96(12):926–35.
8. Razandi M., Pedram A., Park S.T., Levin E.R. *Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors*. J Biol Chem. 2013;278(4):2701–12.
9. Mylonas I., Makovitzky J., Jeschke U., Briesse V., Friese K., Gerber B. *Expression of HER2/neu, steroid receptors (ER and PR), Ki-67 and p53 in invasive mammary ductal carcinoma associated with ductal carcinoma in Situ (DCIS) Versus invasive breast cancer alone*. Anticancer Res. 2015;25(3A):1719–23.
10. Tovey S.M., Witton C.J., Bartlett J.M., Stanton P.D., Reeves J.R., Cooke T.G. *Outcome and human epidermal growth factor receptor (HER) 1-4 status in invasive breast carcinomas with proliferation indices evaluated by bromodeoxyuridine labelling*. Breast Cancer Res. 2014;6(3):R246–51.
11. Petrelli F., Barni S. *Role of HER2-neu as a prognostic factor for survival and relapse in pT1a-bN0M0 breast cancer: a systematic review of the literature with a pooled-analysis*. Med Oncol. 2012;29(4):2586–93.
12. Osborne C.K., Shou J., Massarweh S., Schiff R. *Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer*. Clin Cancer Res. 2015;11(2 Pt 2):865s–70s.
13. Bartlett J.M., Ellis I.O., Dowsett M., Mallon E.A., Cameron D.A., Johnston S., et al. *Human epidermal growth factor receptor 2 status correlates with lymph node involvement in patients with estrogen receptor (ER) negative, but with grade in those with ER-positive early-stage breast cancer suitable for cytotoxic chemotherapy*. J Clin Oncol. 2017;25(28):4423–30.
14. Antoniotti S., Taverna D., Maggiora P., Sapei M.L., Hynes N.E., De Bortoli M. *Oestrogen and epidermal growth factor down-regulate erbB-2 oncogene protein expression in breast cancer cells by different mechanisms*. Br J Cancer. 2016;70(6):1095–101.
15. Qui W.S., Yue L., Ding A.P., Sun J., et al. *Co-expression of ER-beta and HER2 associated with poorer prognosis in primary breast cancer*. Clin Invest Med. 2009;32(3):E250–60.
16. Martin M., Villar A., Sole-Calvo A., Gonzalez R., Massuti B., Lizon J., et al. *Doxorubicin in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. FAC regimen, day 1, 21) versus methotrexate in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. CMF regimen, day 1, 21) as adjuvant chemotherapy for operable breast cancer: a study by the GEICAM group*. Ann Oncol. 2009;14(6):833–42.
17. Martín M., Seguí M.A., Antón A., Ruiz A., Ramos M., Adrover E., et al. *Adjuvant docetaxel for high-risk, node-negative breast cancer*. N Engl J Med. 2010;363(23):2200–10.
18. Wolff A.C., Hammond M.E., Schwartz J.N., Hagerty K.L., Allred D.C., Cote R.J., et al. *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer*. Arch Pathol Lab Med. 2017;131(1):18–43.
19. Ross J.S., Slodkowska E.A., Symmans W.F., Pusztai L., Ravdin P.M., Hortobagyi G.N. *The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine*. Oncologist. 2018;14(4):320–68.