

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/238747890>

# Cáncer de mama: HER2/neu, métodos diagnósticos y consideraciones clínicas

## HER2/neu and Breast Cancer: Diagnosis and Clinical Issues

### Article

CITATIONS

4

READS

2,251

3 authors, including:



[Leonel ANDRES Gonzalez](#)

DINAMICA IPS

14 PUBLICATIONS 7 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



HIV diagnostic [View project](#)

# Cáncer de mama: HER2/neu, métodos diagnósticos y consideraciones clínicas

## HER2/neu and Breast Cancer: Diagnosis and Clinical Issues

Leonel Andrés González Niño<sup>1</sup>, Andrés Ávila Garavito<sup>2</sup>, Carolina Echeverri Jaramillo<sup>3</sup>, Sergio Jaramillo Velásquez<sup>4</sup>, Rubén Darío Salazar Corcho<sup>5</sup>, Beatriz H. Aristizábal Bernal<sup>6</sup>

- 1 Bacteriólogo, ex becario de la Unidad de Diagnóstico Molecular de Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín. Magíster en biología molecular de la Universidad de Pamplona, Pamplona, Colombia.
- 2 Médico Internista, hematooncólogo. Clínica Astorga, Medellín, Colombia.
- 3 Médica Patóloga, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia.
- 4 Médico, jefe del Laboratorio Clínico y de Patología del Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia.
- 5 Médico internista, hematooncólogo, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia.
- 6 Bacterióloga, magíster en inmunología, PhD en biología molecular, Pdf. Unidad de Diagnóstico Molecular del Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia.

## Resumen

El cáncer de mama es una de las primeras causas de muerte de mujeres en el mundo. En Colombia, es la segunda causa de muerte de mujeres por cáncer, después del cáncer de cuello uterino. Aunque no se ha establecido una causa específica para el desarrollo del cáncer, se sabe que el cáncer de mama es el resultado de la acumulación de daños en el ácido desoxirribonucleico (DNA) de las células del tejido mamario. Se han identificado numerosos genes cuyas alteraciones afectan el crecimiento normal de la célula, llevándola al desarrollo y progresión del cáncer de mama. Uno de estos genes es el HER2/neu. La proteína codificada por el gen HER2/neu se encuentra sobreexpresada en un 25%-30% de los cánceres de mama; así, el HER2/neu es el oncogén de más alta incidencia en esta enfermedad. Actualmente, existen diferentes métodos moleculares para identificar la amplificación de este gen o la expresión de su producto. Aunque sólo dos de estos métodos diagnósticos (la inmunohistoquímica y la hibridación fluorescente in situ) se encuentran aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real y la hibridación cromogénica in situ prometen ser los métodos diagnósticos del futuro. La importancia clínica de medir la amplificación del gen HER2/neu radica en que la sobreexpresión de la proteína HER2/neu indica peor pronóstico y, por lo tanto, cambio de tratamiento, como el empleo del anticuerpo monoclonal humanizado trastuzumab.

**Palabras clave:** cáncer de mama, gen HER2, reacción en cadena de la polimerasa, inmunohistoquímica, hibridación fluorescente in situ, trastuzumab.

## Abstract

Breast cancer is one of the first causes of death in women on the world. In Colombia it is the second cause of death in women with cancer after the carcinoma of cervix uteri. Although the specific cause is not known, it is know that breast cancer is the result of the accumulation of damages in the DNA of the cells of the mammary tissue. Numerous genes have been identified whose alterations affect the normal growth of the cell, taking it to the development and progression of the breast cancer. One of these genes it is the HER2/neu. The protein codified by HER2/neu gene, is overexpressed in 25% to 30% of the breast cancer, the HER2/neu is the oncogen of higher incidence in the disease. At the present time different molecular methods exist to

Correspondencia:

Leonel Andrés González Niño, Hospital Pablo Tobón Uribe, Calle 78B N°69-240, Medellín, Colombia. Teléfono: (4) 445 9794.

Correo electrónico: leagoni@gmail.com.

Fecha de recepción: 12 de febrero de 2007. Fecha de aprobación: 24 de abril de 2007.

identify the amplification of this gene or the expression of their product. Although only two of these diagnostic methods (the Immunohistochemistry and the fluorescence *in situ* hybridization) they are approved by the Administration of Drugs and Foods of the United States of America (FDA), the polymerase chain reaction in real time and the chromogenic *in situ* hybridization, not yet approved by the FDA, promise to be the methods to be used to in the future diagnoses, due to his high sensitivity, specificity, easy handling and low costs. The clinical importance to measure the amplification of the HER2/neu gene is in which overexpression of the HER2/neu protein indicates worse prognosis, and therefore the change of treatment, like the use of the monoclonal antibody humanized trastuzumab.

**Keywords:** Breast cancer, HER2 gen, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, fluorescence *in situ* hybridization, trastuzumab.

## Introducción

El cáncer es el crecimiento tisular patológico originado por una proliferación continua de células anormales, que produce una enfermedad por su capacidad para elaborar sustancias con actividad biológica nociva, por su capacidad de expansión local o por su potencial de invasión y destrucción de los tejidos adyacentes o a distancia. El cáncer de mama ocurre cuando las células mamarias crecen sin control. Es decir, crecen juntas y forman un tumor maligno. Los carcinomas de mama exhiben un amplio rango de fenotipos morfológicos y tipos histológicos específicos que tienen unas características clínicas y un pronóstico en particular. Los más frecuentes son: el carcinoma lobular y el carcinoma ductal, los cuales se originan en las unidades lobulares/ductales terminales (1).

En Colombia, el cáncer de mama es la causa de muerte de, aproximadamente, 1.700 mujeres cada año; ésta es la segunda neoplasia maligna más frecuente en mujeres, con una tasa de incidencia estimada de 30 por cada 100.000 mujeres, similar a la del cáncer de cuello uterino, que es de 33 por cada 100.000 mujeres (2,3). En los últimos diez años en Colombia, la mortalidad por cáncer de mama ha ido en aumento, convirtiéndose en un gran problema nacional. Desde el 2000 hasta el 2002, las muertes por cáncer de mama en Antioquia aumentaron de 1.541 a 1.716, lo que representa más de 100 víctimas adicionales por año (2). En el Hospital Pablo Tobón Uribe de Medellín, en el año 2005 se diagnosticaron 700 pacientes con cáncer, de los cuales 78 correspondieron a cáncer de mama, ubicándose en el segundo lugar de egresos de pacientes con tumores malignos, después del cáncer de pulmón (4).

Debido a esta situación, la identificación del cáncer de mama requiere valorar una estrategia de detección temprana y de factores pronósticos y

de tratamiento, como es el caso de los marcadores moleculares que permiten disminuir la muerte por esta enfermedad (5).

El cáncer de mama y otras neoplasias humanas son el resultado de diferentes alteraciones genéticas que involucran múltiples pasos, los cuales incluyen alteraciones secuenciales en la estructura o actividad de los genes que controlan los procesos de proliferación y diferenciación, llamados *protooncogenes* (activación), y en los genes encargados de los procesos de reparación del ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés), diferenciación celular y apoptosis, llamados *genes supresores de tumores* (inactivación). Las alteraciones en cualquiera de estos dos tipos de genes pueden contribuir al desarrollo o progresión del fenotipo maligno (6).

Las mutaciones en los protooncogenes pueden resultar en variantes alteradas u oncogenes que codifican para proteínas que desencadenan señales positivas de proliferación, lo que contribuye al desarrollo del cáncer. Los mecanismos de activación de los oncogenes y el tiempo del curso de los eventos varían entre los diferentes tipos de tumores. En tejidos sólidos, cinco o seis eventos mutacionales independientes pueden contribuir a la formación del tumor, a diferencia de las leucemias, donde sólo tres o cuatro eventos mutacionales son necesarios, presumiblemente, involucrando diferentes genes (7).

Los principales mecanismos mediante los cuales estos genes participan en la carcinogénesis son la amplificación y la sobreexpresión de los oncogenes y sus productos. La amplificación puede implicar pequeñas regiones en los brazos de los cromosomas e involucrar centenares de genes, o los cromosomas enteros (8).

En la identificación y caracterización de las mutaciones que ocurren con mayor frecuencia durante la evolución primaria del cáncer de mama se han caracterizado numerosos oncogenes, pero sólo unos cuantos se relacionan con la progresión de la enfermedad (9). Algunos genes usados como marcadores moleculares sirven como factor pronóstico de evolución y tratamiento del cáncer de mama; dentro de estos marcadores se encuentra el gen HER2/neu (10).

La importancia clínica de medir la amplificación o expresión de HER2/neu radica en que aquellas pacientes que tienen cáncer de mama y que además tienen amplificación de HER2/neu presentan una mayor resistencia a los tratamientos convencionales de quimioterapia y terapia hormonal, y, por ende, una menor tasa de supervivencia. Sin embargo, responden mejor al tratamiento combinado de quimioterapia con trastuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado que se dirige contra el dominio extracelular del receptor HER2/neu, y aumenta la tasa de supervivencia de las pacientes (11).

Hoy en día se emplean diferentes métodos diagnósticos para la detección y cuantificación de la expresión del gen HER2/neu en cáncer de mama. Entre los métodos comunes de detección se encuentran: la inmunohistoquímica (IHQ), por ejemplo, la basada en el Herceptest (detección de la sobreexpresión de la proteína), y la hibridación fluorescente in situ (FISH, por sus siglas en inglés), de PathVysion e INFORM (detección de la amplificación del gen); ambas metodologías han sido aprobadas por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) (12).

Existen otras metodologías que aún no han sido aprobadas por la FDA, como la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (PCR *real time*, por sus siglas en inglés) y la hibridación cromogénica in situ (CISH). Estas dos técnicas, según la literatura, han mostrado tener buena sensibilidad y especificidad, no requieren equipos costosos y pueden ser fácilmente realizadas, por lo que podrían ser utilizadas como métodos diagnósticos de rutina (13,14,15).

Actualmente en el mundo, varios estudios están encaminados a las bases moleculares de la enfermedad y al desarrollo de nuevos procedimientos diagnósticos que ayuden al hallazgo temprano y que

den claridad sobre el estadio tumoral y pronóstico del cáncer de mama, para poder proporcionar un manejo terapéutico apropiado que disminuya la morbimortalidad por esta neoplasia (16).

El objetivo de esta revisión es describir el gen HER2/neu, uno de los genes de mayor importancia clínica y terapéutica en la actualidad, involucrado en el desarrollo y evolución del cáncer de mama.

## Descripción del gen HER2/neu

Los avances en la biología molecular han aportado nuevos blancos terapéuticos para el diagnóstico y tratamiento del cáncer, ejemplo de esto es el gen HER2/neu en cáncer de mama. El crecimiento de las células de cáncer de mama está regulado por la estimulación autocrina o paracrina de receptores de factores de crecimiento; así, los receptores de tirosina quinasa (TK), localizados en la membrana plasmática, son los mejor caracterizados (17).

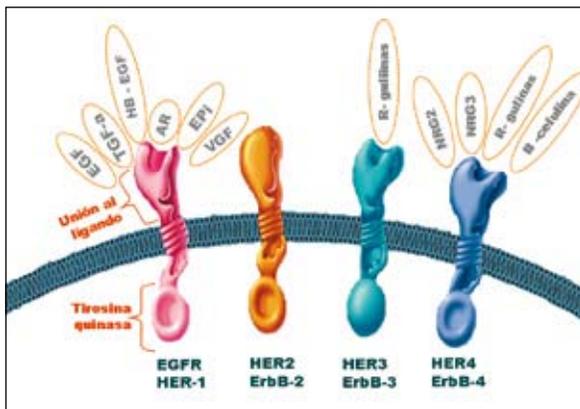
El gen HER2/neu (receptor del factor de crecimiento epidermal humano 2, también conocido como HER2/neu o c-ErbB-2) se encuentra localizado en el cromosoma 17, en la posición 17q21, que codifica para una glicoproteína de transmembrana de 185 kDa (P185<sup>HER-2</sup>), con actividad intrínseca tirosina quinasa, llamada también HER2/neu (18). Es un miembro de la familia de los receptores del factor de crecimiento epidermal, EGFR o ErbB. Esta familia de proteínas consiste en cuatro grupos de receptores relacionados: ErbB (HER-1), ErbB-2 (HER2/neu) —que es el más importante—, ErbB-3 (HER-3) y ErbB-4 (HER-4), cada uno con afinidad por ligandos de activación específicos (19) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Ligandos de la familia de receptores del factor de crecimiento epidermal (EGFR/HER)\*

Tipo de receptor de factor de crecimiento	Ligando
HER1 (ErbB1 o EGFR)	EGF, TGF- $\alpha$ , HB-EGF, AR, Epi, VGF
HER2/neu (ErbB-2)	Receptor huérfano
HER3 (ErbB-3)	Herregulinas
HER4 (ErbB-4)	NRG2, NRG3, herregulinas, $\beta$ -celulinas

\* *Abreviaturas:* EGF: factor de crecimiento epidermal; TGF- $\alpha$ : factor de transformación de crecimiento alfa; HB-EGF: unión a heparina EGF; AR: anfregulina; Epi: epinefrina; VGF: factor de crecimiento vascular; NRG2: neurogulina 2; NRG3: neurogulina 3;  $\beta$ -celulinas: betacelulinas.

Esta familia de receptores se encuentra localizada en la membrana plasmática celular y cada uno de ellos está compuesto por un dominio extracelular (rico en cisteína) de unión al ligando o a sustancias circulantes que se unen al receptor y lo activan, un segmento lipofílico transmembrana de anclaje y un dominio intracelular catalítico que constituye el segmento carboxiterminal con actividad TK (excepto HER-3), susceptible de fosforilarse por degradación del ATP y de transmitir una señal hacia el interior de la célula a través de cascadas de señalización (19,20) (Figura 1).



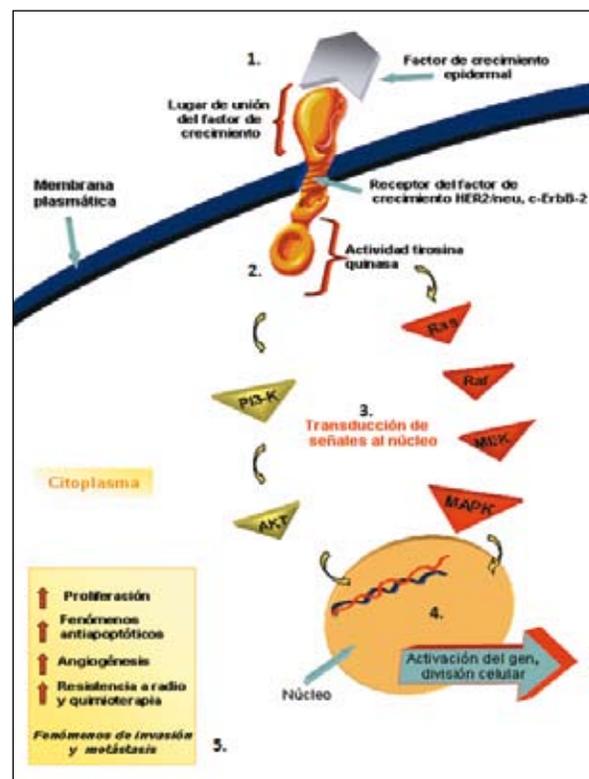
**Figura 1.** Familia de receptores del factor de crecimiento epidural. EGFR/HER

Esta familia de receptores está involucrada en la división y proliferación celular, primordialmente en la comunicación célula-célula y célula-estroma, proceso conocido como *transducción de señal*, en el cual factores de crecimiento externos, o ligandos, afectan la transcripción de varios genes por fosforilación o desfosforilación. La activación del receptor requiere tres variables: un ligando, un receptor y un compañero dimerizado.

Los receptores de la familia ErbB son activados por dimerización, que puede darse entre dos receptores idénticos (homodimerización) o entre diferentes miembros de la misma familia (heterodimerización). Los mecanismos que provocan la dimerización son:

1. La unión del ligando (factor de crecimiento).
2. La sobreexpresión del receptor.
3. La transactivación por un receptor homólogo (heterodimerización).

Tras la dimerización se produce una activación de la función tirosina-quinasa de la porción intracelular del receptor; éste es el suceso clave que inicia la cascada de señales de transducción intracelulares, estimuladoras de la actividad mitogénica, como Ras/Raf/MEK/MAPK o PI3K/Akt. Estas proteínas con actividad TK regulan la proliferación, diferenciación, supervivencia celular y angiogénesis. La estimulación constitutiva de estas vías, por medio de mecanismos autocrinos o de otros mecanismos, se asocia con varios tipos de cáncer humano, donde se induce la proliferación celular, la resistencia a radioterapia y quimioterapia, se provocan fenómenos antiapoptóticos, de angiogénesis y los fenómenos de invasión y metástasis (13,20-23) (Figura 2).



**Figura 2.** Vía de transducción de las señales del receptor HER2/neu

1. Unión del factor de crecimiento epidural a su receptor, la proteína HER2/neu.
2. Activación de la actividad tirosina-quinasa.
3. Inicio de la cascada de señales al núcleo.
4. Activación de la división celular.
5. Inicio de los fenómenos de invasión y metástasis

El gen HER2/neu está amplificado a bajos niveles en muchos tejidos normales, incluyendo el tejido mamario sano, y se cree que regula el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular (24).

La sobreexpresión de la proteína HER2/neu es el resultado de anomalías en la amplificación del gen HER2/neu (incremento en el número de copias), en el 90% a 95% de los casos. La proteína HER-2/neu se encuentra sobreexpresada entre un 25% a 30% de los cánceres de mama; así, el oncogén HER2/neu es el más frecuentemente amplificado en el cáncer de mama y está directamente asociado con la transformación de las células epiteliales hacia la malignidad (25). Se estima que las células epiteliales normales tienen entre 20.000 y 50.000 receptores HER2/neu de membrana, mientras que las células tumorales en cáncer de mama que sobreexpresan el HER2/neu pueden llegar a tener hasta 2 millones de receptores en su membrana (26).

Los cánceres de mama con sobreexpresión de HER2/neu suelen tener un fenotipo de tumor agresivo y unas características histológicas particulares, como son: alto grado nuclear, actividad mitótica aumentada (alta fracción de la fase S) y ausencia de receptores hormonales (11). Este es un cáncer con aumento del número de recaídas y disminución del tiempo de supervivencia del paciente, sin importar el tipo de tratamiento que se suministre. Se considera la sobreexpresión de HER2/neu como un marcador de mal pronóstico y de potencial utilización como diana terapéutica, válida para el tratamiento de esta enfermedad con el uso de anticuerpos monoclonales específicos que se unen al dominio extracelular del receptor, como el trastuzumab (11).

En mujeres jóvenes son más frecuentes los cánceres de mama que sobreexpresan el gen HER2/neu, y tienden a ser tumores de alto grado de malignidad. El HER2/neu se sobreexpresa con mayor frecuencia en carcinoma ductal in situ (DICS, por sus siglas en inglés) (por encima del 60% de los casos), especialmente en los DICS de alto grado (27).

Diferentes estudios sugieren una fuerte asociación con un alto riesgo de recurrencia en estados tempranos de cáncer de mama, un grado inferior de resistencia a la terapia hormonal (quizá más con tamoxifeno que con los inhibidores de la aromatasa, donde se observa un tumor pobremente diferenciado, usualmente con receptores hormonales negativos) y resistencia a terapias citotóxicas convencionales. Particularmente, con esquemas que

indiquen ciclofosfamida, metrotexato y fluoracilo. Y un aumento en la sensibilidad a la doxorubicina y a las terapias basadas en taxanos y antraciclinas. Por estos motivos, es muy importante hacer la medición de la amplificación de este gen o de la expresión de la proteína como factor predictivo de terapia (hormonoterapia y quimioterapia), y de pronóstico de supervivencia (28-31).

## Métodos de detección del gen HER2/neu

Existe un gran número de métodos disponibles para la detección y medición de la expresión de HER2/neu; unos se basan en la sobreexpresión de la proteína, con el uso de inmunohistoquímica, y otros evalúan la amplificación del gen con diferentes técnicas, como son: la FISH, la CISH y la PCR en tiempo real. Existe, también, la posibilidad de usar la técnica Elisa (*enzyme linked immunoabsorbent assay*) para medir el antígeno en el suero.

Los primeros estudios para la detección del HER2/neu fueron realizados a finales de la década de los ochenta (32). Se demostró concordancia entre la amplificación del gen y la sobreexpresión en el nivel del RNA mensajero y la proteína usando Southern, Northern y Western Blot, e inmunohistoquímica en tejido congelado (24).

Los tres primeros métodos tuvieron una buena correlación; sin embargo, estas técnicas son muy costosas, consumen gran cantidad de tiempo y requieren altos conocimientos técnicos, además, se corre el riesgo de diluir las células tumorales con el tejido estromal. La técnica de inmunohistoquímica en tejido congelado demostró ser un método confiable para la detección de sobreexpresión de la proteína. Tiene la ventaja de requerir pequeñas cantidades de muestra y preservar la arquitectura del tejido; de esta manera, se puede estar seguro de que se está evaluando el tejido tumoral y no el tejido benigno adyacente. La necesidad de tejido congelado es una limitante para la evaluación del HER2/neu en la práctica clínica, debido a que los tejidos en los laboratorios de patología, por lo general, se reciben inmersos en formol. Fue necesario desarrollar técnicas confiables para los pacientes de la práctica diaria fuera del contexto de laboratorios de investigación.

Aunque existe buena concordancia (98%) entre los diferentes métodos de FISH, Pathvysion e Inform, ésta es generalmente pobre entre FISH e IHQ (43,44%) (12). Otras pruebas que se pueden usar para medir la amplificación del gen o la expresión de la proteína HER2/neu es la PCR, especialmente en la plataforma de tiempo real (PCR real time), y la CISH. Aunque estas pruebas no han sido aprobadas por la FDA, existen varios reportes donde se demuestra su validez. Se sugiere que la PCR en tiempo real cuantitativa, usada para medir la expresión o amplificación de HER2/neu, puede ser clínicamente muy útil por su simplicidad y la habilidad para obtener resultados rápidos y confiables (12,13,15).

### Inmunohistoquímica (IHQ)

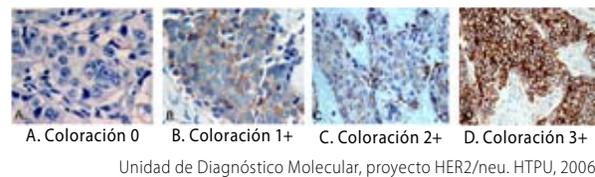
La IHQ es una técnica semicuantitativa usada para la cuantificación de la expresión de proteínas; revela diferentes *epitopes* de la proteína presentes en la superficie de la célula, y es la técnica más usada para detectar y cuantificar la proteína HER2/neu en primera instancia (23). Esta técnica detecta el receptor del HER2/neu sobre la membrana celular por medio de anticuerpos que se unen al receptor del HER2/neu. Este receptor es el blanco al cual se une el agente terapéutico trastuzumab, y, por lo tanto, la sobreexpresión de esta proteína debe predecir la respuesta a este agente. Son muchas las variables que afectan el resultado de la inmunohistoquímica: fijación, almacenamiento de los tejidos, recuperación antigénica, tipo de anticuerpo, sistema de medición y variabilidad de interpretación entre los observadores (33).

La fijación prolongada en formol ocasiona cambios en la configuración de las proteínas que lleva a enmascarar los sitios antigénicos y puede ocasionar falsos negativos. Se recomienda el uso de formol tamponado al 10% con un periodo de fijación de 6 a 12 horas (34). Debe tenerse en cuenta que el almacenamiento prolongado de los tejidos embebidos en parafina puede ocasionar falsos negativos, asociado a degradación de los antígenos.

Son varios los anticuerpos antiHER2/neu disponibles comercialmente, los cuales tienen distintas sensibilidades y especificidades (35-37). Los más comúnmente usados y reportados en la literatura son: los anticuerpos policlonales R60 (University of

California, Los Ángeles) y A0485 (Dako, usado solo o como parte del kit HercepTest), y los anticuerpos monoclonales CB11 (Ventana Medical Systems, solo o como parte del kit PATHWAY), TAB 250 (Zymed, San Francisco, California) y 10H8 (University of California, Los Ángeles).

La interpretación de los resultados de inmunohistoquímica se basa en la valoración de la intensidad de la coloración de las membranas celulares y el porcentaje de células tumorales positivas (Figura 3). Los resultados se reportan en una escala de 0 a 3+ (Tabla 2) (38).



**Figura 3.** Identificación de la proteína HER2/neu por IHQ

**Tabla 2.** Escala de interpretación de resultados de HER2/neu por inmunohistoquímica

Escala	Interpretación	Reporte
0	No hay coloración de la membrana	Negativo
1+	Coloración parcial y débil de las membranas en más del 30% de las células tumorales	Negativo
2+	Coloración débil a moderada de la membrana completa en más del 30% de las células tumorales	Débilmente positivo
3+	Coloración fuerte y completa de la membrana en más del 30% de las células tumorales	Fuertemente positivo

La falta de concordancia entre los observadores al interpretar las coloraciones de inmunohistoquímica está bien documentada en la literatura. Los puntajes 0 y 3+ tienen las mejores concordancias, sin embargo, la lectura de los niveles intermedios 1 y 2+ tienen variaciones significativas (36,39). Esta falta de concordancia se puede mejorar con el uso de guías de interpretación (38) y la ayuda de sistemas de análisis de imágenes (40,41).

El laboratorio que realiza inmunohistoquímica para HER2/neu debe hacer validación interna de su técnica y comparar los resultados con hibridación fluorescente in situ (FISH). Se debe demostrar

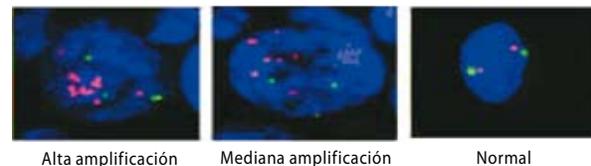
concordancia con FISH en más del 90% de los casos reportados como 0 (negativo) o 3+ (positivo). Para los casos leídos como 1+ la concordancia debe ser del 95% (ausencia de amplificación) (42). Debido a que los estudios han demostrado que entre un 15% y 25% de los casos leídos como 2+ tienen amplificación del gen, todos los casos 2+ deben ser llevados a FISH por protocolo. Algunos laboratorios han decidido corroborar con FISH los casos leídos como 1+ debido a la pobre concordancia. La IHQ basada en el Herceptest de DAKO para HER2/neu fue aprobada para iniciar tratamiento con trastuzumab en las mujeres con cáncer de mama, cuyos resultados sean altamente positivos 3+ (12).

### Hibridación fluorescente in situ (FISH)

La FISH es un método molecular citogenético que permite cuantificar el número de copias de un gen; es usada en la investigación de anomalías en genes y cromosomas, incluyendo traslocaciones, deleciones y reordenamientos, los cuales pueden estar asociados con leucemias, tumores sólidos y otros desórdenes genéticos (43). Una célula normal en reposo contiene dos copias de cada gen, sin embargo, cuando se está dividiendo puede tener cuatro copias de un mismo gen.

La FISH es considerada actualmente el estándar de oro para evaluar la amplificación del HER2/neu, debido a que los estudios del uso del trastuzumab muestran que la predicción de respuesta al tratamiento es superior usando FISH (44). Adicionalmente, la FISH tiene una sensibilidad y especificidad del 98% y 100%, respectivamente (45). El kit de PathVysion usado para medir el HER2/neu contiene dos sondas, una se une al *locus* del gen HER2/neu, localizado en el cromosoma 17q11.2-q12, y la segunda se une a la región centromérica del cromosoma 17. Este sistema de dos sondas permite detectar la posibilidad de polisomía del cromosoma 17 y, por lo tanto, el resultado se expresa como una proporción del total de señales HER2/neu sobre el número de señales detectadas del centrómero del cromosoma 17. Se deben contar 20 núcleos de células tumorales invasoras en interfase, si hay duda se deben contar más núcleos. Hasta hace unos meses se consideraba que existía amplificación del gen HER2/neu cuando la proporción era mayor o igual a 2.0 (46) (Figura 4). El kit INFORM determina el número absoluto

de señales HER2/neu; se consideraba que el gen estaba amplificado cuando el valor era mayor a 4.0 (47). Pero las últimas recomendaciones publicadas en enero de 2007 por la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO por sus siglas en inglés), determinan que para que un tumor sea positivo para la amplificación de HER2/neu por FISH de PathVysion, la proporción total de señales de amplificación cromosoma 17 / gen HER2/neu debe ser mayor de 2,2, y por FISH de INFORM el número total de señales debe ser mayor a 6,0. Los resultados con menos de 4,0 copias del gen HER2/neu por núcleo o una proporción total de señales menor a 1,8 es un resultado equivoco que requiere de una acción adicional para el reporte final (38).



**Figura 4.** Identificación del gen HER2/neu por FISH

Se observan las señales fluorescentes de los diferentes niveles de amplificación del gen HER2/neu en el cromosoma 17, usando la hibridación fluorescente in situ de PathVision. Cortesía: Laboratorio Clínica Las Américas - Medellín.

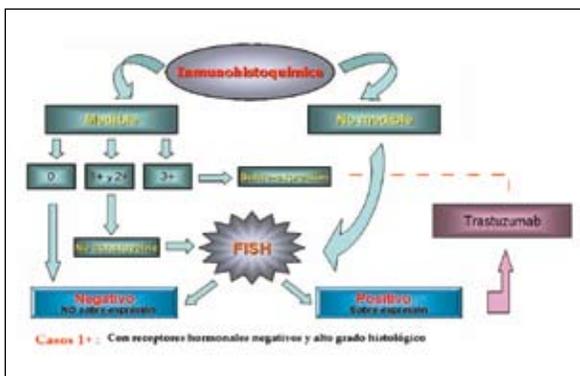
La hibridación fluorescente in situ ofrece muchas ventajas. Algunas de éstas son: poseer una buena sensibilidad y requerir sólo pequeñas muestras de tejido, las cuales pueden estar embebidas en parafina (48). Una de las ventajas más importantes comienza en la localización molecular de las anomalías dentro del contexto celular en el tejido, lo que permite distinguir los cambios que ocurren en un carcinoma in situ *versus* un carcinoma invasivo, y comparar estas señales con el estroma o las células epiteliales normales. Otra de las ventajas que incluye es la habilidad para usar simultáneamente múltiples sondas para la detección de los diferentes cambios genéticos.

Si comparamos la técnica de FISH con la de inmunohistoquímica encontramos varias ventajas y desventajas del uno sobre el otro. La FISH no tiene problemas con la fijación en formol, la preservación de los antígenos y la variabilidad en el diagnóstico entre los observadores. Sin embargo, la técnica de FISH requiere equipo (microscopio fluorescente con filtros especiales) y reactivos costosos, que no

están disponibles en muchos laboratorios; consume más tiempo ya que requiere el desarrollo de un protocolo, la estandarización para los diferentes especímenes de tejido, y, además, tiene la necesidad de diseñar y combinar las sondas para las aplicaciones específicas, lo que se traduce en una labor intensa, por lo menos de dos días. Las células que se estudiarán deben estar en metafase o interfase, sumándose a los diferentes tiempos de fijación de los tejidos, que pueden también limitar la eficiencia de la FISH en los diferentes especímenes, adicional a que la técnica depende de la habilidad del patólogo para su interpretación. Por estas razones, no es práctico el uso de FISH para medir rutinariamente la expresión de HER2/neu en el laboratorio (13,49,50).

El algoritmo recomendado actualmente para la evaluación del HER2/neu es el siguiente: tamizaje inicial con prueba de inmunohistoquímica. Todos los pacientes con un puntaje de 2+ deben confirmarse con FISH, debido a la alta rata de falsos positivos. Los pacientes con puntaje 3+ por inmunohistoquímica y los 2+ que tienen amplificación con FISH se consideran elegibles para tratamiento con trastuzumab. Los pacientes con puntaje 0 o 1+ y los 2+ que no amplifican con FISH se consideran no elegibles (51).

Se deben tener en cuenta los falsos negativos de la inmunohistoquímica; la literatura reporta amplificación del HER2/neu en, aproximadamente, 7% de los casos leídos como 0 o 1+ (52), por esta razón, la FISH se debe considerar en casos negativos por inmunohistoquímica, con alto grado histológico y resultado de receptores hormonales negativo (53) (Figura 5).



**Figura 5.** Algoritmo recomendado actualmente para la evaluación del HER2/neu

## Hibridación cromogénica in situ (CISH)

La hibridación cromogénica in situ (CISH, por sus siglas en inglés) es el método más recientemente descrito para la detección de la amplificación de HER2/neu. Este método combina características de las técnicas de FISH e inmunohistoquímica. La CISH, al igual que la FISH, permite cuantificar el número de copias de un gen, identificar traslocaciones en los cromosomas y hacer conteos cromosómicos. La diferencia radica en que la CISH usa reacciones convencionales con peroxidasas a partir de tejidos fijados en formol o embebidos en parafina (54).

La esencia de la CISH radica en la habilidad de poder marcar el ácido nucleico a partir de la unión de sondas de hibridación in situ a secciones específicas del ácido nucleico complementario en la muestra, que son detectadas con reactivos similares a los usados en inmunohistoquímica. Los resultados de la hibridación pueden visualizarse dentro del contexto de la morfología circundante del tejido al utilizar un microscopio de luz. Por lo tanto, se observa la morfología del tejido y las aberraciones del gen simultáneamente, al igual que en la FISH.

Los tumores con amplificación del gen (aumento en el número de copias) aparecen típicamente como grandes racimos intranucleares peroxidasa-positivo de la copia del gen, o pueden aparecer como señales numerosas, pequeñas e individuales peroxidasa-positivo de la copia del gen, o como mezcla de racimos y copias individuales del gen peroxidasa-positivo. Los tumores con la amplificación del gen muestran típicamente desde 6 hasta 12 copias del gen por núcleo. Los tumores con estado normal del gen exhiben típicamente de 1 a 2 puntos por núcleo, mientras que los tumores con polisomía cromosomal tienen típicamente de 4 a 6 copias del gen por núcleo. Por ello, se pueden tomar ciertos parámetros para determinar la amplificación del gen HER2/neu por CISH (54) (Tabla 3).

Tanner y colaboradores publicaron el primer estudio donde comparaban la CISH y la FISH para la detección de HER2/neu. Estos autores usaron un kit de primera generación y no obtuvieron una buena sensibilidad (55). Sin embargo, los estudios más recientes muestran una alta concordancia entre CISH y FISH (56-58).

**Tabla 3.** Escala de interpretación de resultados de HER2/neu por CISH

Escala	Interpretación
Nivel alto	Mayor de 10 copias del gen HER2/neu por núcleo, en más del 50% de las células neoplásicas
Nivel bajo	De 6 a 10 copias del gen HER2/neu por núcleo, en más del 50% de las células neoplásicas
Ninguno	De 1 a 5 copias del gen HER2/neu por núcleo de células neoplásicas

La CISH es una buena alternativa para los casos que requieren preservación de las características morfológicas del tumor, por ejemplo, los casos con focos pequeños de tumor invasor, mezclas complejas de carcinoma in situ e invasor, entre otros. La técnica de CISH contempla otras ventajas adicionales: reactivos menos costosos, señales permanentes en las placas histológicas (permite crear un expediente permanente de la prueba) y el no necesitar un microscopio adicional con características específicas. Para aquellos laboratorios que no tienen la capacidad de realizar la FISH, pero realizan pruebas de inmunohistoquímica rutinariamente, la técnica de CISH puede ser una opción (58). Se debe tener en cuenta que la interpretación de resultados en la CISH, al igual que en la FISH, puede ser subjetiva (15).

### **Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR real time)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), inventada por Kary Mullis en 1983, es una técnica para la amplificación de secuencias de ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés) in vitro, a partir de una secuencia conocida. El producto que se obtiene al finalizar la reacción es una gran cantidad de DNA con alto grado de pureza.

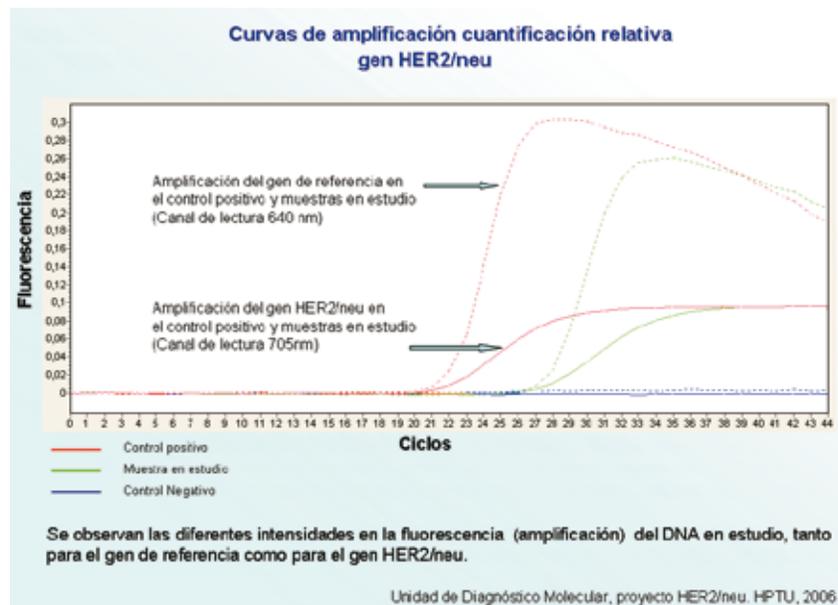
La PCR se fundamenta en la propiedad natural del DNA polimerasa para duplicar el DNA por elongación de cadenas complementarias, al iniciar la síntesis a partir de unos iniciadores, o *primers*,

que indican el inicio y el final de fragmento a duplicar. Los *primers* son secuencias cortas y específicas de oligonucleótidos sintéticos, cada uno complementario de una de las cadenas del DNA para amplificar. Éstos, por lo general, tienen una extensión de 18 a 25 bases. La técnica usa ciclos de alta temperatura (95°C-denaturación) para separar las cadenas de DNA recién formadas; ciclos de baja temperatura (55°C-alineamiento) para dejar que vuelvan a unirse nuevamente a las polimerasas, y ciclos de temperatura media (72°C-extensión) para que el DNA polimerasa duplique estas nuevas cadenas usando los deoxidionucleótidos trifosfato (dNTPs) añadidos a la reacción y necesarios para obtener una réplica exacta de la cadena original (59,60).

La PCR en tiempo real es una versión adaptada de la PCR convencional, y tiene una aceptación más amplia, ya que es más rápida, sensible y reproducible; además, el riesgo de contaminación se reduce al mínimo, ya que no hay manipulación postamplificación (no necesita el uso de geles), convirtiéndose en una herramienta esencial en los laboratorios de investigación y diagnóstico.

El empleo de la PCR en el diagnóstico molecular ha aumentado a tal punto que hoy en día se acepta en algunas pruebas como el método estándar de oro para detectar ácidos nucleicos a partir de una gran variedad de muestras (61,62). La PCR en tiempo real usa sondas fluorescentes, las cuales son monitoreadas durante cada ciclo mediante un *software* que analiza la fluorescencia emitida por los fluorocromos a diferentes longitudes de onda para determinar la cantidad del producto amplificado (63).

En el caso de la cuantificación de la expresión del gen HER2/neu, la plataforma de PCR en tiempo real más usada es la del kit LightCycler, de Roche Corporation, el cual emplea *primers* y sondas de hibridación específicas. En la reacción de PCR se amplifica un fragmento de 112 pb del gen HER2/neu y otro de 133 pb de un gen de expresión constitutiva de referencia (gastrina), a partir del DNA genómico humano, usando *primers* específicos. Ambos genes se cuantifican con dos sondas de hibridación específicas en el mismo capilar (red-705 y red-640).



**Figura 6.** Identificación y cuantificación del gen HER2/neu por PCR en tiempo real

Para la determinación de la tasa de amplificación de HER-2/neu, se emplea un *software* que mide la fluorescencia emitida por el DNA amplificado, donde se realiza una cuantificación relativa. El reporte final se da como porcentaje normalizado; una tasa mayor a 2,0 indica sobreexpresión del gen HER2/neu, y una tasa menor a 2,0 se asume como negativo (64). En la Figura 6 se observan las gráficas de amplificación que se obtienen para HER2/neu con el termociclador de PCR en tiempo real LightCycler 2.0 (Roche), en muestras de tumores de mama. Los tiempos de cada uno de los ciclos de amplificación de la PCR son de 10 segundos, lo que hace posible obtener resultados en sólo 70 minutos (64). La utilización de la PCR en tiempo real para cuantificar HER-2/neu implica gran beneficio clínico, ya que se puede usar rutinariamente, debido a que es rápida y fácil de estandarizar, además, los costos son comparativamente inferiores a la FISH (65). Un aspecto que se debe tener muy en cuenta al trabajar con PCR es elegir correctamente la muestra donde haya presencia de tumor, para así evitar falsos negativos (37).

Ya revisados los diferentes métodos que actualmente están disponibles en el mercado para la medición de la amplificación o sobreexpresión de HER2/neu, podemos comparar sus características, ventajas y desventajas en las tablas 4 y 5.

**Tabla 4.** Características de los métodos empleados para la identificación y cuantificación de HER2/neu

Características de los métodos	IHQ	FISH	CISH	PCR tiempo real
Tejido fresco formalina o parafina	X	X	X	X
DNA		X	X	X
RNA				X
Proteína	X			
Semicuantitativa	X	X	X	
Cuantitativa				X
Automatizada				X

## Consideraciones clínicas, implicaciones terapéuticas y recomendaciones

Respecto a la terapia citotóxica, los análisis combinados reportados en pacientes con cáncer de mama y con ganglios positivos, receptores hormonales negativos CALGB 8541, CALGB 9344/int 0148 y CALGB 9741, determinan que el impacto de la quimioterapia adyuvante en cinco años alcanza una mejora general del 30% para la supervivencia libre de enfermedad y del 21% para la supervivencia total.

**Tabla 5.** Ventajas y desventajas de los diferentes métodos empleados para la identificación y cuantificación de HER2/neu

Prueba	Ventajas	Desventajas	Referencias
IHQ	Bajo costo, rápida. Requiere pequeñas cantidades de tejido	Moderada sensibilidad y especificidad. Múltiples anticuerpos, variabilidad de interpretación entre observadores (subjetivo)	Ross <i>et al.</i> Thomson Hoang
FISH	Alta sensibilidad y especificidad, localización molecular de las anomalías dentro del contexto celular en el tejido.	Labor dispendiosa (difícil de estandarizar), altos costos, personal experto, lectura de resultados por interpretación (subjetivo)	Gjerdum <i>et al.</i> Bruse <i>et al.</i> Dillon
CISH	Alta sensibilidad y especificidad, costos moderados, localización molecular de las anomalías dentro del contexto celular en el tejido	Necesita personal experto. Lectura de resultados por interpretación (subjetivo)	Bhargava <i>et al.</i> Zhao <i>et al.</i> Tanner <i>et al.</i>
PCR tiempo real	Alta sensibilidad y especificidad, fácil de usar y estandarizar, costos moderados, resultados rápidos y automatizados (exactos)	Se pueden obtener falsos negativos o dilución de la muestra si no se realiza una buena selección del bloque de que extraerá el DNA	Dorak, Alberts

### **Trastuzumab (descripción y mecanismo de acción)**

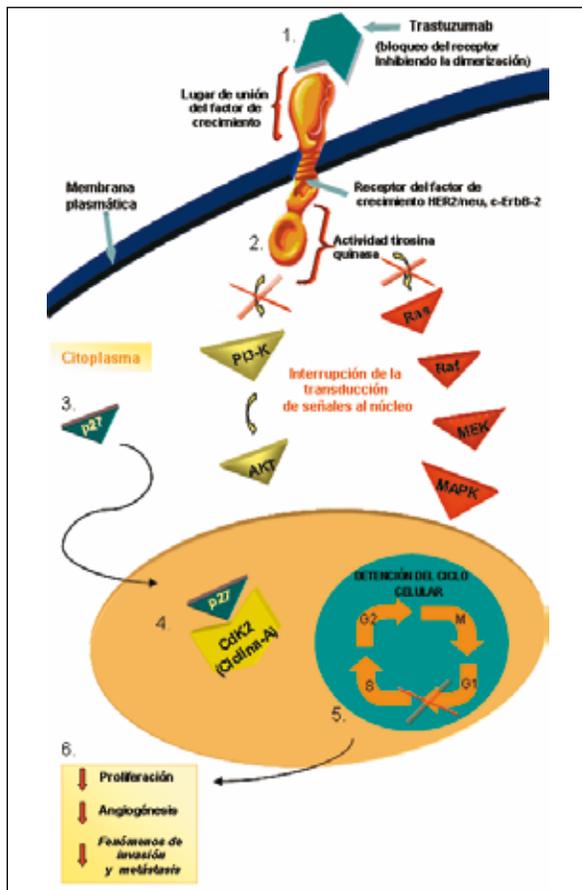
El conocimiento de los aspectos moleculares del cáncer de mama ha permitido el uso de un anticuerpo monoclonal humanizado (el trastuzumab), que se liga con alta afinidad al dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2/neu). Es un anticuerpo tipo IgG Kappa que contiene todos sus dominios de origen humano, con excepción de la región que se une específicamente al dominio extracelular de HER2/neu, que se deriva de anticuerpos murinos (MAB) 4D5 humanizados (menos inmunogénico).

El trastuzumab es un anticuerpo con una fórmula química  $C_{6470}H_{10012}N_{1726}O_{2013}S_{42}$ , un peso molecular de 145531,5 g/mol y una vida media de hasta 12 días, el cual ejerce su acción por medio de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo a las células que sobreexpresan el HER2/neu en la membrana. Tras su unión al dominio extracelular

del receptor HER2/neu, trastuzumab origina la *internalización* del receptor, y facilita su degradación endocítica. Además, el trastuzumab podría tener una acción de supresión de la angiogénesis dada por la inhibición de la formación de heterodímeros HER2/HER3 y HER2/HER4, al reprimir las vías de señalización proangiogénicas Ras-Raf-MAK-MAPK y PI3K/Akt (66).

Al suprimirse estas vías de señalización, se impide la fosforilación de la proteína p27Kip1, que es, entonces, internalizada en el núcleo de la célula; allí, se une e inhibe la actividad del complejo Cdk2-Ciclina-A (controlador y protector del ciclo celular) y forma el nuevo complejo p27/Cdk2-Ciclina-A, que bloquea la progresión del ciclo celular en la fase G1 y, por ende, la división celular (8,17,67,68) (Figura 7).

El trastuzumab es el primer anticuerpo monoclonal humanizado aprobado por la FDA para el tratamiento del cáncer de mama positivo a la sobreexpresión de HER2/neu (69).



**Figura 7.** Bloqueo de las vías de transducción de señal por el trastuzumab

1. Bloqueo de la proteína HER2/neu por unión al trastuzumab.
2. Bloqueo de la actividad tirosina-quinasa (Interrupción de la transducción de señales al núcleo).
3. Ausencia de fosforilación de la proteína p27Kip1 que se internaliza en el núcleo de la célula.
4. Formación del nuevo complejo p27/Cdk2-Ciclina-A
5. Detención del ciclo celular en la fase G1 por el complejo p27/Cdk2-Ciclina-A.
6. Disminución de los fenómenos de invasión y metástasis.

## Trastuzumab y cáncer de mama metastásico

En el cáncer de mama metastásico visceral sintomático de alto riesgo, la conducta estándar de tratamiento recomienda una quimioterapia con taxanos u otros citostáticos, además de trastuzumab, seguida luego de tamoxifeno, si expresa receptores hormonales positivos. Este esquema apunta a mejorar la supervivencia, la calidad y la duración de las remisiones. La supervivencia total con este tratamiento a cinco años puede alcanzar un nivel superior al 23%. En general, la mayoría de las pacientes sobreviven más de 26 meses (70).

Actualmente, hay varios estudios disponibles que respaldan el beneficio de añadir trastuzumab a los esquemas disponibles. Revisamos algunos de éstos en condiciones específicas: el trastuzumab, cuando se adiciona a la quimioterapia convencional en forma adyuvante, disminuye la probabilidad de recaída y de muerte en pacientes con cáncer de mama que sobreexpresan HER2/neu. Esta recomendación se deriva de los resultados de tres estudios fase III recientemente publicados (71-73).

Luego, aparece el análisis combinado del National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B31 y el North Central Cancer Treatment Group (NCCTG) N9831 en los que se asignaron de forma aleatoria 3.351 pacientes con cáncer de mama y ganglios linfáticos positivos (NSABP B31 y NCCTG N9831), y pacientes con ganglios linfáticos negativos de alto riesgo, definido como un tumor de dos centímetros o un tumor de más de un centímetro con receptores hormonales negativos (NCCTG N9831), los cuales se dividieron en dos grupos: el primero con quimioterapia con AC y paclitaxel, y el segundo grupo con quimioterapia AC, paclitaxel y trastuzumab. El paclitaxel fue administrado cada tres semanas (175 mg/m<sup>2</sup>), en cuatro dosis en el NSABP B31, o cada semana (80 mg/m<sup>2</sup>), en 12 dosis, en el grupo NCCTG N9831.

El trastuzumab, en forma simultánea con el paclitaxel, se administró cada semana por 52 semanas (4 mg/kg, dosis de carga; 2 mg/kg, cada semana en adelante). Luego de un seguimiento por tres años se debió interrumpir el estudio, ya que el grupo que recibió trastuzumab y quimioterapia tuvo una disminución del 52% en el riesgo de recaída, cáncer primario y secundario o muerte antes de recaída, lo que se traduce en una diferencia absoluta en la supervivencia libre de recaída del 12% a favor del grupo que recibió trastuzumab, con un NNT de 8,3 y una reducción del 33% en la mortalidad. La toxicidad cardíaca fue de 4,1% en el NSABP B31 y 2,9% en el NCCTG N9831 (72).

El segundo estudio analizado es el estudio 1 HERA, en el que se asignaron de forma aleatoria 5.081 pacientes con cáncer de mama HER2 positivo con o sin compromiso ganglionar axilar, en

dos grupos de tratamiento: 1.694 pacientes fueron asignados, aleatoriamente, a terapia con trastuzumab cada tres semanas (8 mg/kg, dosis de carga; 6 mg/kg, cada tres semanas) por un año, luego de terminada la quimioterapia adyuvante. Las otras 1.694 pacientes se escogieron aleatoriamente para recibir trastuzumab por dos años, y 1.693 pacientes tuvieron quimioterapia adyuvante, pero sin trastuzumab.

Los resultados del uso de trastuzumab por un año en comparación con el no uso de éste fueron publicados por Piccart-Gebhart, en el 2005. Después de sólo un año de seguimiento se reportó una disminución del 46% en la probabilidad de eventos (recaída de cáncer de mama, cáncer de mama contralateral, enfermedad maligna no mamaria secundaria o muerte) a favor del grupo que recibió trastuzumab. La supervivencia libre de enfermedad a dos años fue 8,4% menor en términos absolutos (NNT 11,9) a favor del grupo tratado con trastuzumab. Se observó cardiotoxicidad grave en 0,5% de las pacientes tratadas con trastuzumab (71).

En el tercer estudio publicado este año por un grupo de investigadores finlandeses ("Estudio FinHer") fueron asignadas aleatoriamente 1.010 pacientes con cáncer de mama con ganglios linfáticos comprometidos o con alto riesgo de recaída, para recibir tres ciclos de docetaxel o tres ciclos de vinorelbina, seguido, en ambos grupos, por tres ciclos de epirubicina, fluoruracilo y ciclofosfamida. De este grupo, a 232 mujeres con amplificación del gen HER2/neu se les asignó, de forma aleatoria, el recibir o no 9 infusiones de trastuzumab semanal. El objetivo primario del estudio fue la medición de la supervivencia libre de recaída. Dentro del subgrupo de pacientes con sobreexpresión del HER2/neu se encontró que aquellas pacientes que recibieron trastuzumab tuvieron una mejoría significativa en la supervivencia libre de recaída a tres años, comparadas con aquellas que no la recibieron (89% *versus* 78%; Hazard ratio para recaída o muerte de 0,42; IC 95% de 0,21 a 0,83; P=0,01). Se concluyó que la aplicación de trastuzumab administrado concomitantemente con docetaxel o vinorelbina es efectivo en pacientes con cáncer de mama con amplificación del gen HER2/neu (73).

## Trastuzumab neoadyuvante

El uso de trastuzumab como neoadyuvancia se ha reportado en un pequeño estudio practicado en el MD Anderson de Houston, en el que se asignó, de forma aleatoria, tratamiento a 42 pacientes con cáncer de mama temprano (operable) que sobreexpresaban HER2/neu. Los pacientes se dividieron en dos grupos: uno con quimioterapia más trastuzumab y otro sólo con quimioterapia. El primer grupo recibió quimioterapia antes de la cirugía con paclitaxel por cuatro ciclos, seguido por FEC (fluorocil, epirubicina y ciclofosfamida), cuatro ciclos o el mismo esquema de quimioterapia, más trastuzumab semanal por 24 semanas. Una vez completada la quimioterapia (y el trastuzumab) se procedía a cirugía; se encontró que la respuesta patológica completa en el grupo que recibió trastuzumab fue del 65%, en tanto que la respuesta patológica completa en aquellas que no lo recibieron fue de tan sólo 25%. El estudio fue interrumpido por el Comité Institucional de Seguridad, sin el reclutamiento de las 164 pacientes que inicialmente se planearon porque, según los investigadores, la probabilidad de que la diferencia en respuesta clínica completa entre los dos grupos desapareciera era estadísticamente negligente (74).

## Trastuzumab como monoagente *versus* trastuzumab más quimioterapia

En el manejo del carcinoma de mama metastásico, el trastuzumab exhibe una modesta actividad como agente único. Un estudio multicéntrico en fase II en el que se incluyeron a 222 pacientes con cáncer de mama metastásico con sobreexpresión de HER2/neu, y que habían recaído luego de uno o más líneas de quimioterapias previas para enfermedad metastásica, mostró una respuesta objetiva del 14%, con un 2% de respuesta completa.

Las pacientes recibieron una dosis de carga de trastuzumab de 4 mg/kg intravenosa, seguido por 2 mg/kg intravenosa cada semana (75). La aprobación para el uso del trastuzumab por la FDA se basó en los resultados de un estudio prospectivo *aleatorizado* y controlado en 469 pacientes con cáncer de mama metastásico que sobreexpresaban HER2/neu, que no habían recibido tratamiento previo para su enfermedad metastásica (11); 235

de éstos recibieron trastuzumab y quimioterapia, y 234 recibieron quimioterapia sin trastuzumab. La quimioterapia podía ser doxorubicina y ciclofosfamida, esquema AC, si las pacientes no habían recibido antraciclinas anteriormente, o paclitaxel, si las pacientes habían recibido antraciclinas como parte de la terapia adyuvante. El tiempo libre de progresión fue de 7,2 meses versus 4,5 meses a favor del trastuzumab ( $p < 0,0001$ ); la tasa de respuestas fue del 45% versus 29% a favor del trastuzumab ( $p < 0,001$ ); la duración de la respuesta fue de 8,3 meses versus 5,8 meses a favor del trastuzumab, y la supervivencia fue de 25,1 meses versus 20,3 meses a favor del trastuzumab ( $p = 0,05$ ) (11).

Otros estudios clínicos de fase III recientemente publicados, con combinaciones de quimioterapia y trastuzumab, revelaron como óptima la paliación de pacientes con cáncer de mama metastásico con el uso de la combinación trastuzumab, paclitaxel y carboplatino. En este estudio fase III, se asignaron de forma aleatoria diferentes tratamientos a 194 pacientes con cáncer de mama metastásico que no habían recibido quimioterapia para enfermedad metastásica; se dividieron en dos grupos: el primero recibió trastuzumab a las dosis usuales y paclitaxel a dosis de  $175 \text{ mg/m}^2$ , cada tres semanas (esquema TP), y el segundo grupo TP y carboplatino a dosis de AUC 6, cada tres semanas (TPC). De las 160 pacientes evaluables para respuesta se encontró respuesta en 57% en el grupo TPC, frente a un 38% en el grupo TP. Existieron diferencias en el tiempo de evidencia de progresión de 13 meses frente a 7 meses en el grupo TPC versus TP. La respuesta fue particularmente alta en el grupo que exhibía sobreexpresión fuerte de HER2/neu (3+): 67% frente a 37%, a favor del grupo que recibió TPC, y en el tiempo a la progresión de este subgrupo fue de 17 meses frente a 9 meses, también a favor de las que recibieron TPC versus TP. Todos estos resultados son estadísticamente significativos (76).

En el último estudio realizado en el Instituto Nacional del Cáncer en Canadá se asignaron, de forma aleatoria y controlada, 710 mujeres premenopáusicas con cáncer de mama, con ganglios positivos, sometidas a cirugía (mastectomía completa o parcial) y que recibieron quimioterapia adyuvante con CEF (ciclofosfamida, epirubicina y fluoruracilo) o CMF (ciclofosfamida, metrotexato y fluoruracilo),

con el objetivo de comparar el beneficio en términos de supervivencia y de recaída en estas mujeres, con el propósito de identificar el régimen de quimioterapia adyuvante más apropiado para las pacientes con cáncer de mama que sobreexpresan el gen HER2/neu.

El estudio reporta un incremento del 15% en supervivencia y un 25% menos de recaídas a 10 años en pacientes que sobreexpresan HER2/neu y que recibieron CEF comparado con CMF. Por lo que concluyen que el régimen de quimioterapia adyuvante CEF es superior al CMF en términos de recaídas y supervivencia. Se podría decir que la amplificación de HER2/neu, o la sobreexpresión de su producto, no sólo predice la respuesta al trastuzumab, sino que también identifica a las pacientes en las que el tumor no responderá a la quimioterapia adyuvante con CMF, por lo que se recomendaría usar la quimioterapia adyuvante CEF en mujeres que sobreexpresan HER2/neu (31). Los estudios mencionados se comparan en la Tabla 6.

En mujeres con cáncer de mama que no sobreexpresan HER2/neu no se encontró diferencia significativa entre la quimioterapia adyuvante con CEF y CMF. Por esto, sugerimos usar el trial CMF (menos tóxico) en este tipo de pacientes. La sobreexpresión de HER2/neu en cáncer de mama es asociada con sensibilidad a la quimioterapia adyuvante que contenga antraciclinas (31).

## Conclusiones y recomendaciones

Podemos comenzar diciendo que el producto del oncogén HER2/neu es una diana terapéutica de mucha importancia, que ha abierto un nuevo camino a la investigación en biología molecular aplicada, como es el desarrollo de anticuerpos monoclonales humanizados dirigidos a bloquear este tipo de receptores en forma específica, no sólo en cáncer de mama, sino también en otros tipos de cáncer (11).

La inmunohistoquímica, por razones prácticas, es y ha sido mayoritariamente la técnica de elección para la medición de la proteína HER2/neu. Sin embargo, la gran desventaja de la inmunohistoquímica es que es una técnica semicuantitativa y con diferentes variaciones según el observador, el anticuerpo antiHER2 utilizado, el periodo de almacenamiento del tejido, los procesos de fijación del tumor y la

recuperación de epítopes; así, da variabilidad en los resultados, por lo que se deben buscar métodos alternativos que puedan reemplazarla (33).

La hibridación fluorescente in situ (FISH) ha mostrado tener muy buena sensibilidad y especificidad al momento de medir la amplificación de HER2/neu, y por eso, en este momento, es el estándar de oro para esta determinación. Sin embargo, es una técnica laboriosa y costosa, que además requiere un equipo especializado de detección de fluorescencia y una amplia experiencia en la visualización de las preparaciones, que debe ser realizada por un médico patólogo; esto no le permite convertirse en una técnica de rutina (13,50).

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR *real time*) y la hibridación cromogénica in situ (CISH) prometen ser, en un futuro cercano, los métodos moleculares que serán usados para la detección y medición de la amplificación de HER2/neu en cáncer de mama u otros tumores sólidos, gracias a su fácil estandarización, buena sensibilidad y especificidad y costos relativamente bajos, respecto a la FISH (12,13,58).

Al realizar la medición de HER2/neu, podemos predecir el tipo de tratamiento a usar en cuanto a

términos de supervivencia y recaída; ejemplo de esto es la aplicación del régimen CEF a cambio de CMF, en pacientes HER2/neu positivo (31).

Al suministrar el trastuzumab como neoadyuvancia en pacientes HER2/neu positivo, se puede obtener una reducción del tumor hasta en un 40%, respecto a aquellas pacientes a quienes no se les suministra el trastuzumab (74).

Al utilizar el trastuzumab en pacientes HER2/neu positivo más quimioterapia se pueden obtener mejorías, en un 12%, en términos de supervivencia libre de recaídas, hasta un 52% menos de recaídas y una disminución del 33% en la mortalidad (72).

Para finalizar esta revisión, citaremos la frase de Gabriel Hortobagyi, presidente de la Sociedad Americana de Oncología Clínica, que acompaña el editorial de los artículos de Romond *et al.* y Piccart-Gebhart, publicados en *New England Journal of Medicine* en el 2005: "El tratamiento de pacientes con cáncer de mama HER2/neu positivo tiene que cambiar hoy". Ningún resultado en cáncer de mama se aproxima a los obtenidos por estos estudios y se propone su adopción en forma inmediata en los estándares de tratamiento (77).

**Tabla 6.** Comparación de los estudios clínicos

Número de pacientes y tiempo del estudio	Tratamiento	Características clínicas de las pacientes	Resultados	Referencia
3.351 (3 años)	Dos grupos: AC + paclitaxel AC + paclitaxel + trastuzumab	CA de mama tumor mayor a 1 cm preferible a 2 cm. Ganglios linfáticos positivos o ganglios negativos de alto riesgo más receptores hormonales negativos	Grupo con trastuzumab: riesgo de Recaída: 52%. Supervivencia libre de Recaída: 12%. Mortalidad: 33%	Romond <i>et al.</i> (72)
5.090 (2 años)	Dos grupos: trastuzumab después de terminar terapia adyuvante. Sin trastuzumab	CA de mama más HER2/neu positivo, con o sin compromiso ganglionar axilar	Grupo con trastuzumab: 46% de eventos de recaída después de un año. Enfermedad libre a dos años fue del 8,4%	Piccart-Gebhart (71)
1.010 (3 años)	Dos grupos: trastuzumab	CA de mama. Ganglios linfáticos comprometidos más HER2/neu positivo	Grupo con trastuzumab: supervivencia libre de recaída del 89%	Jonseu <i>et al.</i>
710 (10 años)	Dos grupos: CMF (ciclofosfamida, metotrexato y fluoroacilo). CEF (ciclofosfamida, epirubicina y fluoroacilo)	CA de mama + HER2/neu positivo. Ganglios linfáticos positivos + cirugía.	Grupo pacientes CEF: 25% de eventos de recaída. Supervivencia en pacientes con HER2/neu positivo: 15%	Pritchard <i>et al.</i> (31)

## Referencias

1. Harvard Center for Cancer Prevention. Harvard school of public health. Breast cancer fact sheet [en línea] 2004 Feb [fecha de acceso 3 de agosto de 2006]. URL disponible en: <http://www.hsph.harvard.edu/cancer>.
2. DANE (Departamento Administrativo Nacional de Estadística). Sistema de registro civil y estadísticas vitales: certificados de nacido vivo y defunción. Bogotá: DANE; 2004.
3. Piñeros M, Murillo R. Incidencia del cáncer en Colombia: importancia de las fuentes de información en la obtención de cifras estimativas. *Rev Colomb Cancerol* 2004;8:5-14.
4. HPTU (Hospital Pablo Tobón Uribe). Departamento de Gestión de Información Clínica. Medellín-Colombia, 2006.
5. Piñeros M, Hernández G, Bray F. Increasing mortality rates of common malignancies in Colombia: an emerging problem. *Cancer* 2004 Nov 15;101(10):2285-92.
6. Pich A, Margaria E, Chiusa L. Oncogenes and male breast carcinoma: c-erbB-2 and p53 coexpression predicts a poor survival. *J Clin Oncol* 2000 Aug;18(16):2948-56.
7. Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum R, Bast RC, Gansler TS, Holland JF, editors. Oncogenes in the initiation and progression of neoplasia. *Cancer medicine* [en línea] 2003 [fecha de acceso 3 de julio de 2006]; 6. URL disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/query.fcgi?db=books&cmd=search&term=oncogenes>.
8. Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* 2004;9(4):361-77.
9. Callahan R. Genetic alterations in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1989;13(3):191-203.
10. Yamashita H, Nishio N, Toyama T, Sugiura H, Zhang Z, Kobayashi S, et al. Coexistence of HER2 over-expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004;6(1):R24-30.
11. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001 Mar 15;344(11):783-92.
12. Bernard PS, Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem* 2002 Aug;48(8):1178-85.
13. Gjerdrum LM, Sorensen BS, Kjeldsen E, Sorensen FB, Nexø E, Hamilton-Dutoit S. Real-time quantitative PCR of microdissected paraffin-embedded breast carcinoma. An alternative method for HER-2/neu analysis. *J Mol Diagn* 2004 Feb;6(1):42-51.
14. Madrid MA, Lo RW. Chromogenic in situ hybridization (CISH): a novel alternative in screening archival breast cancer tissue samples for HER-2/neu status. *Breast Cancer Res* 2004;6(5):R593-600.
15. Nistor A, Watson PH, Pettigrew N, Tabiti K, Dawson A, Myal Y. Real time PCR complements immunohistochemistry in the determination of HER-2/neu status in breast cancer. *BMC Clin Pathol* 2006 Jan 18;6(1):2.
16. Ramírez G, Patiño J, Castro C, et al. Cáncer de seno. En: Guías de práctica clínica en enfermedades neoplásicas. 2nd ed. Bogotá: Instituto Nacional de Cancerología; 2001. p. 78-110.
17. Martín M. Anticuerpos monoclonales anti-HER2/NEU en cáncer de mama: trastuzumab. Mollet del Vallès: Merck Oncología, Merck farma y Química; 2005.
18. Ménard S, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM. Role of HER-2 gene overexpression in breast carcinoma. *J Cell Physiol* 2000 Feb;182(2):150-62.
19. Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 2000 Dec;19(56):6550-65.
20. Pao W, Miller VA. Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J Clin Oncol* 2005 Apr 10;23(11):2556-68.
21. Thor AD, Liu S, Edgerton S, Moore DII, Kasowitz KM, Benz CC, et al. Digtiovanna MP activation (tyrosine phosphorylation) of ErbB-2 (HER-2/neu): a study of incidence and correlation with outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 2000;18(18):3230-9.
22. Olayioye MA. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res* 2001;3(6):385-9.
23. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, et al. The HER-2/neu gene and protein in breast cancer: biomarker and target of therapy. *Oncologist* 2003;8(4):307-25.
24. Slamon DJ, Godelphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SJ, Keith DE, et al. Studies of the HER2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989 May;244(4905):707-12.
25. Järvinen TA, Tanner M, Rantanen V, Bärlund M, Borg A, Grénman S, et al. Amplification and deletion of topoisomerase II alpha associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. *Am J Pathol* 2000 Mar;156(3):839-847.
26. Horton J. Her2 and trastuzumab in breast cancer. *Cancer Control* 2001 Jan-Feb;8(1):103-10.
27. Weinder N. Breast cancer markers. Program and abstracts of the annual meeting of the American society of clinical pathology. *Clin Pathol* 2003 Sep 18-21.
28. Borg A, Sigurdsson H, Clark GM, Ferno M, Fuqua SA, Olsson H, et al. Association of INT2/HST1 coamplification in primary breast cancer with hormone-dependent phenotype and poor prognosis. *Br J Cancer* 1991;63(1):136-42.
29. Pérez A, Roche CP, Jenkins BR, Reynolds CA, Halling CK, Ingle JN, et al. HER2 testing in patients with breast cancer: poor correlation between weak positivity by immunohis-

- tochemistry and gene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Mayo Clin Proc* 2002 Feb;77(2):148-54.
30. Nahta R, Esteva FJ. HER-2-targeted therapy: lessons learned and future directions. *Clin Cancer Res* 2003 Nov 1;9(14):5078-84.
  31. Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP, Andrulis IL, Tu D, Bramwell VH, et al. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006 May 18; 354(20):2103-11.
  32. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2 oncogene. *Science* 1987 Jan 9;235(4785):177-82.
  33. Yeh IT. Measuring HER-2 in breast cancer: IHC, FISH, or ELISA? *Am J Clin Pathol* 2002 Jun;117 Suppl 1:S26-S35.
  34. Rhodes A, Borthwick D, Sykes R, Al-Sam S, Paradiso A. The use of cell line standards to reduce HER-2/neu assay variation in multiple European cancer centers and the potential of automated image analysis to provide for more accurate cut points for predicting clinical response to trastuzumab. *Am J Clin Pathol* 2004 Jul;122(1):51-60.
  35. Gancberg D, Lespagnard L, Rouas G, Paesmans M, Piccart M, Di Leo A, et al. Sensitive of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples of invasive carcinomas. Correlation with oncogene amplification in 160 cases. *Am J Clin Pathol* 2000 May;113(5):675-82.
  36. Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, Hilland E, Sawrenko C, Phillips D, et al. HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 2001 Nov;14(11):1079-86.
  37. Lebeau A, Deimling D, Kaltz C, Sendelhofert A, Iff A, Luthardt B, et al. HER-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Oncol* 2001;19(2):354-63.
  38. Wolf AC, Hammond EH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred C, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologist Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breasts Cancer. *ASCO special Article. JCO* 2007;25(1):1-28.
  39. Hoang MP, Sahin AA, Ordóñez NG, Sneige N. HER-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2000 Jun;113(6):852-9.
  40. Wang S, Hossein Saboorian S, Frenkel EP, Haley BB, Siddiqui MT, Gokaslan S, et al. Assessment of HER-2/neu status in breast cancer. Automated cellular imaging system (ACIS)-assisted quantitation of immunohistochemical assay achieves high accuracy in comparison with fluorescence in situ hybridization assay as the standard. *Am J Clin Pathol* 2001 Oct;116(4):495-503.
  41. Shukla D, Veeramachaneni R, Abreo F, Nordberg ML. HER-2/neu status: comparison of quantitative immunohistochemistry by automated cellular imaging and fluorescence in situ hybridization. *Pathol Case Reviews* 2002;7(2):75-80.
  42. Zarbo RJ, Hammond MEH. Conference summary, Strategic Science Symposium: Her-2/neu testing of breast cancer patients in clinical practice. *Arch Pathol Lab Med* 2003 May;127(5):549-53.
  43. Abbott Introduces. CE-Marked DNA tests in Europe for the detection of chromosomal abnormalities associated with leukemia [en línea] 2006 [fecha de acceso 25 de octubre de 2006] URL disponible en: [http://www.abbott.com/global/url/pressRelease/en\\_US/60.5:5/Press\\_Release\\_0388.htm](http://www.abbott.com/global/url/pressRelease/en_US/60.5:5/Press_Release_0388.htm)
  44. Mass R, Sanders C, Kasian C, et al. The concordance between the clinical trials assay (CTA) and fluorescence in situ hybridization in the Herceptin pivotal trials. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000;19:291.
  45. Press MF, Bernstein L, Thomas PA. Her-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization. Poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol* 1997 Aug;15(8):2894-904.
  46. PathVysion. HER-2 DNA Probe Kit (package insert). Downers Grove, IL: Vysis; 2002.
  47. Inform. HER2/neu (package insert). Tucson: Ventana Medical Systems; 2002.
  48. PathVysion. Abbott Laboratories on line [en línea] 2006 [fecha de acceso 6 de julio de 2006] Doc ID: 30-630083. URL disponible en: [http://www.pathvysion.com/AdvantagesofFISH\\_322.asp](http://www.pathvysion.com/AdvantagesofFISH_322.asp)
  49. Dillon D. Molecular markers in the diagnosis and staging of breast cancer. *Semin Radiat Oncol* 2002 Oct;12(4):305-18.
  50. Merkelbach-Bruse S, Wardelmann E, Behrens P, Losen I, Buettner R, Friedrichs N. Current diagnostic methods of HER-2/neu detection in breast cancer with special regard to real-time PCR. *Am J Surg Pathol* 2003;27(12):1565-70.
  51. NCCN (National Comprehensive Cancer Network). Practice guidelines in Oncology. Versión 3 [en línea] 2003 Feb [fecha de acceso 20 de mayo de 2006]. URL disponible en: <http://www.nccn.org/physician-gls/f-guidelines.html>.
  52. McCormick SR, Lillemoe TJ, Beneke J, Schrauth J, Reinartz J. HER2 assessment by immunohistochemical analysis and fluorescence in situ hybridization: comparison of Hercept-Test and PathVysion commercial assays. *Am J Clin Pathol* 2002 Jun;117(6):935-43.
  53. Field AS, Chamberlain N, Tran D, Morey A. Suggestions for HER2/neu testing in breast carcinoma based on a comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Pathology* 2001;33:278-82.
  54. Zhao J, Wu R, Au A, Marquez A, Yu Y, Shi Z. Determination of HER2 gene amplification by chromogenic in situ hybridization (CISH) in archival breast carcinoma. *Mod Pathol* 2002 Jun;15(6):657-65.

55. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, et al. Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol* 2000 Nov;157(5):1467-72.
56. Arnould L, Denoux Y, MacGrogan GM, Penaut-Llorca F, Fiche M, Treilleux I, et al. Agreement between chromogenic in situ hybridisation (CISH) and FISH in the determination of HER2 status in breast cancer. *Br J Cancer* 2003 May 19;88(10):1587-91.
57. Park K, Kim J, Lim S, Han S, Lee JY. Comparing fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization methods to determine the HER2/neu status in primary breast carcinoma using tissue microarray. *Mod Pathol* 2003 Sep;16(9):937-43.
58. Bhargava R, Lal P, Chen B. Chromogenic in situ hybridization for detection of HER-2 gene amplification in breast cancer with emphasis on tumors with borderline and low-level amplification: does it measure up to fluorescence in situ hybridization? *Am J Clin Pathol* 2005 Feb;123(2):237-43.
59. Rybicki EP. PCR Primer Design and Reaction Optimization. *A Manual of Online Molecular Biology Techniques*. University of Cape Town, Department Molecular and Cell Biology. Private bag Rodebosch 7701, Cape Town –South Africa. 2005 [fecha de acceso 20 de octubre de 2007]. URL disponible en: <http://www.mcb.uct.ac.za/manual/MolBiolManual.htm>.
60. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, y Walter P. Amplification of DNA Using the PCR Technique. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Publishing, 2002.
61. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002 Mar 15;30(6):1292-305.
62. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004 Mar;10(3):190-212.
63. Dorak MT. Real-time PCR (advance method series) [en línea] 2006 [fecha de acceso 18 de agosto de 2006]. URL disponible en: <http://www.dorak.info/genetics/realtime.html>.
64. Roche applied science. LightCycler HER2/neu DNA Quantification Kit. Instruction Manual. Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science Nonnenwald; 2003. URL disponible en: [www.roche-applied-science.com/pack-insert/3113922a.pdf](http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/3113922a.pdf)
65. Milson A, Suli A, Hartung L, Kunitake S, Bennett A, Norderberg L, et al. Comparison of two quantitative polymerase chain reaction methods for detecting HER-2/neu. *J Mol Diagn* 2003 Aug;5(3):184-90.
66. Albanell J, Codony J, Rovira A, Mellado B, Gascon P. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. *Adv Exp Med Biol* 2003;532:253-68.
67. Kriwacki SR, Lacy ER, Filippov I, Lewis WS, Otieno S, Xiao L, et al. Disorderlines lets some proteins interact with a diversity of molecules. St Juede Children's Research Hospital. [en línea] 2004 Mar [fecha de acceso 15 de mayo de 2006]. URL disponible en: [http://www.stjude.org/media/0,2561,453\\_5485\\_10508,00.htm](http://www.stjude.org/media/0,2561,453_5485_10508,00.htm).
68. Kute T, Lack CM, Willingham M, Bishwokama B, Williams H, Barrett K, et al. Development of Herceptin resistance in breast cancer cells. *Cytometry A* 2004 Feb;57(2):86-93.
69. American Cancer Society. Making treatment decisions-monoclonal antibody therapy [en línea] 2006 [fecha de acceso 30 de junio de 2006]. URL disponible en: [http://www.cancer.org/docroot/ETO/content/ETO\\_1\\_4X\\_Monoclonal\\_Antibody\\_Therapy\\_Passive\\_Immunotherapy.asp?sitearea=ETO](http://www.cancer.org/docroot/ETO/content/ETO_1_4X_Monoclonal_Antibody_Therapy_Passive_Immunotherapy.asp?sitearea=ETO).
70. Colleoni M, Viale G, Zahrieh D, Pruneri G, Gentilini O, Veronesi P, et al. Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment. *Clin Cancer Res* 2004 Oct 1;10(19):6622-8.
71. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005 Oct 20;353(16):1659-72.
72. Romond EH, Pérez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005 Oct 20;353(16):1673-84.
73. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R, et al. The finher study investigators. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* 2006;354:809-20.
74. Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, Booser DJ, Thomas ES, Theriault RL, et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol* 2005 Jun 1;23(16):3676-85.
75. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-her2 monoclonal antibody in women who have her2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999 Sep;17(9):2639-48.
76. Robert N, Leyland-Jones B, Asmar L, et al. Phase III comparative study of trastuzumab and paclitaxel with and without carboplatin in patients with HER-2/neu-positive advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2002;76:Suppl 1:S37.
77. Hortobagyi GN. Trastuzumab in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 2005 Oct 20;353(16):1734-6.