

Evaluación de tres métodos moleculares para el rastreo e identificación de HER2/neu en pacientes con cáncer de mama

Evaluation of three molecular methods for tracking and identifying HER2/neu oncogene in breast cancer patients

Leonel Andrés González Niño¹, Beatriz Helena Aristizábal Bernal²

RESUMEN

Objetivo: comparar las técnicas de IHQ, FISH y PCR cuantitativa en tiempo real, en la determinación de la amplificación y sobre-expresión de HER2/neu en 70 tumores de mama.

Metodología: se evaluaron las características operativas de la IHQ HercepTest y la PCR cuantitativa en tiempo real. Para ello se tomó como estándar de oro la hibridación fluorescente *in situ*. Se determinó el porcentaje de positividad de tumores de mama que tienen amplificación génica de HER2/neu.

Resultados: el 38% de tumores de mama muestra amplificación para HER2/neu, de acuerdo con la PCR en tiempo real. Se encontró una concordancia del 80% entre la PCR en tiempo real y la FISH en los casos catalogados como equívocos grado 2+ por IHQ.

Conclusión: los resultados obtenidos sugieren que los análisis por PCR en tiempo real son una alternativa válida en casos en los que se pueda usar la técnica de FISH para la reevaluación de los tumores de mama catalogados equívocos o grado 2+ para HER2/neu por IHQ. Mediante la combinación de la IHQ y la PCR cuantitativa en tiempo real se puede llegar a una buena aproximación en la determinación de los grados expresión y amplificación de HER2/neu en pacientes con cáncer de mama.

Palabras clave: neoplasias de la mama; hibridación fluorescente *in situ*; inmunohistoquímica; HER2/neu; PCR en tiempo real.

ABSTRACT

Objective: to compare IHC, FISH and quantitative real-time PCR techniques, in the determination of HER2/neu oncogene amplification and overexpression in 70 breast cancer patients.

Methods: we evaluated the performance of the IHC HercepTest and quantitative real-time PCR techniques, using as a gold standard the fluorescent *in situ* hybridization technique. We determined the positivity percentage of the breast neoplasms that have the amplification for HER2/neu oncogene.

Results: 38% of breast tumors demonstrate amplification of HER2/neu oncogene according to real-time PCR and we found an 80% concordance for real-time PCR and FISH in cases classified as equivocal or grade 2+ with IHC.

Conclusion: the results of this study suggest that the analysis by real-time PCR is a valid alternative in cases when it is not possible to use the FISH technique for reassessment of breast neoplasms classified as equivocal or grade 2+ for HER2/neu with IHC. The combination of IHC and quantitative real-time PCR may be a good approach in the determination of the expression and amplification status of HER2/neu in breast cancer patients.

Key words: breast neoplasms; *in situ* hybridization, fluorescence; immunohistochemistry; HER2/neu; real-time PCR.

¹ Bacteriólogo, Magister en Biología Molecular - Universidad de Pamplona, Pamplona, Colombia. Ex becario Unidad de Diagnóstico Molecular - Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín. Coordinador Laboratorio de Biología Molecular, Diagnóstico y Asistencia Médica - Dinámica IPS, Medellín.

² Bacterióloga, Magister en Inmunología, PhD. en Biología Molecular, Postdoc. Coordinadora Unidad de Diagnóstico Molecular - Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia.

Correspondencia: Beatriz Helena Aristizábal Bernal. Correo electrónico: baristizabal@hptu.org.co

Fecha de recibido: 5 de enero de 2010

Fecha de aprobación: 10 de mayo de 2010

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la proliferación acelerada, desordenada y no controlada de células que pertenecen a distintos tejidos de la glándula mamaria. El cáncer de mama invasivo es un grupo de tumores malignos epiteliales, caracterizados por una excesiva proliferación, desdiferenciación, mutabilidad genética, invasión de los tejidos adyacentes y una marcada tendencia a la metástasis a distancia. Es el resultado de diferentes alteraciones en los genes que controlan los procesos de proliferación y diferenciación celular. Dichas alteraciones pueden contribuir al desarrollo o progresión del fenotipo maligno¹⁻³. El cáncer de mama es una de las neoplasias humanas más comunes¹; en Colombia, el cáncer de mama es la causa de muerte de, aproximadamente 1 700 mujeres cada año; 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^{4,5}. En los últimos diez años en Colombia, la mortalidad por cáncer de mama ha ido en aumento, hasta el punto de convertirse en un gran problema nacional. Desde el año 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 año⁴. En el Hospital Pablo Tobón Uribe (HPTU) de Medellín, en el año 2005 se diagnosticaron 700 pacientes con cáncer, de los cuales 78 corresponden a cáncer de mama, lo que lo ubica en el segundo lugar de egresos de pacientes con tumores malignos, después del cáncer de pulmón⁶.

Existen factores de riesgo que se pueden clasificar como físicos, endocrinos y genéticos; entre estos factores que predisponen al cáncer de mama están: historia familiar de cáncer, edad avanzada (más de 60 años), inicio temprano del ciclo menstrual (antes de los 11 años), menopausia tardía (después de los 55 años), administración prolongada de terapia hormonal de reemplazo (cinco años o más) con estrógenos e historia de radioterapia⁷. Esta enfermedad está fuertemente caracterizada por marcadores de

susceptibilidad genética, lo que permite el uso de técnicas de biología molecular que pueden hacer posible la predicción de la evolución clínica de la enfermedad y de tratamiento en pacientes individuales. Dentro de estos marcadores está el proto-oncogén HER2/neu⁸.

La importancia clínica de medir la amplificación génica de HER2/neu radica en que aquellas pacientes que tienen cáncer de mama y que además tienen amplificación de HER2/neu presentan un fenotipo de tumor agresivo, con 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 un anticuerpo monoclonal humanizado que se dirige específicamente contra el dominio extracelular del receptor HER2/neu, lo que aumenta la tasa de supervivencia de las pacientes⁹.

En la actualidad existen métodos moleculares para identificar la amplificación de este gen o la expresión de su producto. Dos de estos métodos diagnósticos se encuentran aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos de América (FDA). Estos métodos son: la inmunohistoquímica (IHQ) para detección de la sobre-expresión de la proteína, y la hibridización fluorescente *in situ* (FISH) para detección de la amplificación del gen. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR en tiempo real) y la hibridización cromogénica *in situ* (CISH), aún no aprobadas por la FDA pero sí por la Agencia Europea de Medicamentos y prometen ser los métodos diagnósticos para ser usados en el futuro, ya que han mostrado tener buena sensibilidad y especificidad, no requieren de equipos costosos y pueden ser fácilmente realizadas. De allí que podrían ser utilizados como métodos diagnósticos de rutina y disminuiría los costos económicos para los pacientes y para las entidades prestadoras de salud¹⁰⁻¹².

El propósito de este estudio fue comparar las técnicas de IHQ y PCR cuantitativa en tiempo real, en la determinación de la amplificación y sobre-expresión de HER2/neu en 70 tumores

de mama y compararlos con la prueba FISH, estándar de oro, en aquellas muestras que tenían resultados discordantes o dudosos ¹³.

METODOLOGÍA

Tipo de estudio: estudio de características operativas de pruebas diagnósticas.

Población objetivo: pacientes con cáncer de mama.

Población accesible: pacientes con cáncer de mama atendidos en el Hospital Pablo Tobón Uribe, Clínica Las Américas y otras entidades de salud de la ciudad de Medellín, durante el período comprendido entre el 1º de enero de 2004 y el 31 de diciembre de 2006.

Muestra: se calculó en el programa estadístico Epi Info versión 6.04 (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], U.S.A) para diseños de corte transversal con los siguientes parámetros:

- Para la prueba de IHQ:
 - Confiability 95%
 - Poder 80%
 - Razón 1:1
 - Frecuencia esperada en no expuestos (sensibilidad mínima, de acuerdo con la literatura): 85%
 - Frecuencia esperada en expuestos (proporción de falsos positivos: 1 – E): 50%
 - Total de muestras con sobre-expresión del gen: 32
 - Total de muestras sin sobre-expresión del gen: 32
 - Total de muestras: 64
- Para la prueba de PCR en tiempo real:
 - Confiability 95%
 - Poder 95%
 - Razón 1:1
 - Frecuencia esperada en no expuestos (sensibilidad mínima, de acuerdo con la literatura): 85%
 - Frecuencia esperada en expuestos (proporción de falsos positivos: 1 – E): 5%

Total de muestras con sobre-expresión del gen: 9

Total de muestras sin sobre-expresión del gen: 9

Total de muestras: 18

Criterios de inclusión: biopsias con diagnóstico de cáncer de mama de pacientes del HPTU y de las instituciones de salud participantes. La selección de la muestra se realizó de manera no probabilística y se tuvieron en cuenta los casos consecutivos de pacientes que consultaran al HPTU en el periodo de estudio.

Unidad de análisis: secciones de tumor mamario, obtenido por extracción del tejido o área comprometida y embebido en parafina, a partir de 70 pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama infiltrante. Se incluyeron las muestras con suficiente tejido para realizar las pruebas. Se corroboró nuevamente el diagnóstico, se hizo una nueva lectura de las placas de eosina-hematoxilina por parte de un médico patólogo, especialista en el área.

Métodos de laboratorio

Extracción del DNA

Para extraer el DNA se realizaron entre tres y cuatro cortes de 20 micrómetros de grosor del tejido embebido en parafina para lo que se utilizó un micrótopo convencional. Los cortes fueron almacenados en viales de 1.5 ml libres de DNAsas y RNAsas y almacenados a una temperatura entre 20 y 25°C por 24 a 48 horas hasta su uso. Se realizó la extracción del DNA por el método de Qiagen (DNeasy Tissue Kit- for DNA purification) siguiendo el protocolo descrito. Este juego de reactivos usa la tecnología de membranas de sílica-gel, para purificar DNA celular total de una forma rápida y eficiente, que evita el uso de extracción orgánica o por precipitación por etanol. Una vez obtenido el DNA, se realizaron tres alícuotas de cada muestra en tubos eppendorf de 1.0 ml libres de DNAsas y RNAsas y se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento.

Pruebas de inmunohistoquímica

- Receptor de estrógenos (ER) y progesterona (PR): se utilizaron los juegos de reactivos de Novocastra NCL-L-ER-6F11 y NCL-L-PGR-312, respectivamente, indicados para la identificación cualitativa del receptor de estrógenos humano y receptor de progesterona humano, mediante microscopía óptica, y se siguieron las recomendaciones del fabricante (Novocastra Laboratorios Ltd, 2003).
- Proteína HER2/neu: la medición de la sobre-expresión de la proteína HER2/neu fue hecha en el Laboratorio de Patología del Hospital Pablo Tobón Uribe y en el Laboratorio de Patología del Hospital San Vicente de Paúl. Se usó el kit de DAKO HercepTest TM (DakoCytomation California Inc, 2004). Se realizaron cortes de 4 micrómetros de grosor, a partir de muestras previamente seleccionadas con diagnóstico de cáncer de mama invasivo, embebidas en parafina. Además de las láminas de tejido provistas por el juego de reactivos como control, se utilizaron tejidos negativos grado 0 y tejidos positivos grado 3+, además de tejido catalogado como equívoco grado 2+. Los reportes finales de la prueba se expresaron como: positivo o negativo y el grado de expresión se determinó por cruces.

Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real

La PCR cuantitativa en tiempo real fue realizada en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Pablo Tobón Uribe y se utilizó un termociclador en tiempo real LightCycler 2.0 de Roche (catálogo N° 2011468) y el juego de reactivos de cuantificación LightCycler-HER2/neu DNA Quantification kit (catálogo N° 3113922 de Roche, Molecular Biochemicals). La preparación de los componentes de la reacción de PCR se llevó a cabo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

A cada muestra de DNA del paciente se le efectuaron tres pruebas de PCR en tiempo real en experimentos por separado, con el propósito de observar la reproducibilidad de la prueba. En esta reacción de PCR se amplificó un fragmento de 112 pb del gen HER2/neu y otro fragmento de 133 pb de un gen de expresión constitutiva de referencia (gastrina) a partir de DNA genómico humano a través del uso de *primers* específicos. Ambos genes se cuantificaron con dos sondas de hibridización específicas en el mismo capilar (red-705 y red-640) marca Roche (catálogo N° 3113922).

Determinación de la tasa de amplificación de HER-2/neu

En este estudio se realizó una cuantificación relativa y se empleó el software Relative Quantification versión 4.0 de Roche Molecular Biochemicals, que mide la fluorescencia emitida por el DNA amplificado. El reporte final se dio como porcentaje normalizado; una tasa de amplificación mayor o igual que 2.0 se interpretó como positivo e indica sobre-amplificación del gen HER2/neu y una tasa menor que 2.0 se asumió como negativo (Roche Applied Science (a), 2003).

Hibridización in situ Fluorescente (FISH)

La hibridización *in situ* fluorescente (estándar de oro) para la detección del gen HER2/neu en el cromosoma 17, se hizo en la Fundación Santa Fe de Bogotá (FSFB) centro de referencia en Colombia para esta prueba. Se usó el juego de reactivos de Vysis LSI HER2/neu sonda de hibridización de color dual, espectro rojo y CEP 17 espectro verde, en el que se siguieron las instrucciones del inserto (Vysis PathVysion, Abbot Laboratorios IL). Se realizó FISH a 18 muestras de las 24 pacientes que mostraron resultados discordantes entre la IHQ y la PCR. Los niveles de amplificación del gen HER2/neu fueron determinados a partir de secciones de tejido embebido en parafina, donde se realizó una relación entre el número de copias del gen HER2/neu y el número de copias del centrómero

del cromosoma 17 (Vysis Inc). Esta metodología excluye la polisomía del cromosoma 17 para evitar que ésta sea origen de un incremento en el número de copias del gen HER2/neu. Se tomó la clasificación dada por las guías internacionales reportadas en la literatura, en la que se lee que los casos con IHQ grado 3+ son asumidos como positivos por FISH y los casos con grados 0 y 1+ son asumidos como negativos por FISH, según Zarbo RJ *et al*.

Conteo de las señales fluorescentes

El conteo fue hecho por duplicado por dos profesionales especialistas en el área, lo que asegura una mejor interpretación de la prueba. Este procedimiento fue realizado en un microscopio de fluorescencia equipado con los filtros necesarios para el mismo. El conteo, según Vysis Inc, se llevó a cabo en 20 núcleos y donde quedaron dudas se contaron más núcleos. Se contaron las señales rojas y verdes en cada núcleo de manera independiente y se determinó la relación total señales rojas / total señales verdes; esta división dio la relación gen HER2/neu / señales centroméricas, y fue lo que se reportó como resultado final de la prueba.

La interpretación de los resultados se hizo teniendo en cuenta los siguientes valores: negativo: 0.75 – 1.79; indeterminado (*borderline*): 1.80 – 1.99; positivo: mayor o igual a 2.0.

Análisis y procesamiento de datos

Se elaboró una base de datos en el programa Microsoft® Office Excel™ 2007, en el que se hizo un análisis univariado. Las variables cualitativas se presentan como frecuencias absolutas y relativas. Las variables cuantitativas como media y desviación estándar (DE) o mediana (Me) y rango intercuartílico (RIQ) según su distribución normal o no.

Se tomó como prueba de referencia (estándar de oro) los resultados de FISH e IHQ y se comparó con la técnica de PCR en tiempo real para la cuantificación de la amplificación HER2/neu. Las muestras seleccionadas para la prueba de FISH, fueron aquellas en las que la IHQ no tuvo concordancia con la PCR en tiempo real.

Se consideró una verdadera prueba positiva cuando el resultado de FISH fue positivo más IHQ positivo grado 3+ o FISH positivo después de haber tenido una IHQ grado 2+.

Se consideró una verdadera prueba negativa cuando el resultado de FISH fue negativo o indeterminado más IHQ grado 0 o 1+.

Quien hizo estas pruebas (IHQ y PCR tiempo real) fue una persona distinta de la que realizó la de FISH y no conoció los resultados de ésta para la interpretación de las pruebas mencionadas. La persona que leyó e interpretó los resultados de la IHQ no conoció los resultados de la PCR en tiempo real.

La sensibilidad se determinó como la proporción de pacientes con FISH positivo que tienen la prueba positiva (PCR en tiempo real para HER2/neu). La especificidad se determinó como la proporción de pacientes con FISH negativo que tienen la prueba negativa (PCR en tiempo real para HER2/neu).

El valor predictivo positivo (VPP) se determinó como la proporción de pacientes con la prueba positiva (PCR-tiempo real para HER2/neu) que tienen FISH positivo. El valor predictivo negativo (VPN) se determinó como la proporción de pacientes con la prueba negativa (PCR-tiempo real para HER2/neu) que tienen FISH negativo.

La proporción de falsos positivos (PFP) se calculó mediante la fórmula: $PFP / (PFP + VPN) = 1 - \text{especificidad}$. La proporción de falsos negativos (PFN) fue calculada mediante la fórmula: $PFN / (PFN + VPP) = 1 - \text{sensibilidad}$. Estos datos fueron medidos con las calculadoras para pruebas diagnósticas de la Asociación de la Sociedad Española de Hipertensión.

Se calcularon los respectivos intervalos de confianza del 95%, mediante la fórmula: estimado puntual $\pm (1.96)$ (raíz cuadrada de pq/n). Se calculó la razón de verosimilitud (LR, Likelihood Ratio) positiva mediante la fórmula: $\text{sensibilidad} / 1 - \text{especificidad}$. Se calculó la razón de verosimilitud (LR, Likelihood Ratio) negativa mediante la fórmula: $1 - \text{sensibilidad} /$

especificidad. Además, se calcularon el índice de validez o exactitud mediante la fórmula $E = (VPP+VPN) / (VPP+PFP+PFN+VPN)$ y el índice Kappa mediante la fórmula $k = Po - Pe / 1 - Pe$; donde: Po = Concordancia observada y Pe = Concordancia esperada. El índice Kappa (k) se clasificó en cinco grupos, y se asignó a cada nivel de concordancia un valor de índice Kappa: deficiente (< 0.20); regular (0.21 – 0.40); moderado (0.41 – 0.60); bueno (0.61 – 0.80) y muy bueno (0.81 – 1.00).

Además, se calculó el índice de Youden mediante la fórmula: $Y = \text{Sensibilidad} + \text{Especificidad} - 1$.

Estos análisis se efectuaron a través del software EPIDAT, programa para análisis epidemiológico de datos tabulados versión 3.1 de la Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS, enero de 2006). Este software estadístico también fue usado para realizar los análisis de curvas ROC (Receiver Operating Characteristic). Las frecuencias y correlaciones de datos obtenidos por la PCR en tiempo real se calcularon con el software estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS® versión 13.0).

Aspectos éticos

El estudio fue aprobado por el Comité de Investigaciones y Ética del Hospital Pablo Tobón Uribe.

RESULTADOS

La edad promedio de los pacientes fue de 53.6 años (DE: 12.86), con un rango comprendido entre 23 y 83 años. De los 70 casos estudiados, el 91.4% corresponde a carcinoma ductal infiltrante (CDI) de diferentes grados histológicos, distribuidos de la siguiente forma: 35.7% CDI grado I, 27.1% CDI grado II y el 28.6% fue CDI grado III. Cuatro de los 70 casos fueron adenocarcinoma metastásico (5.7%), un caso (1.4%) correspondió a adenocarcinoma infiltrante mal diferenciado y el caso restante (1.4%) fue carcinoma apocrino intraductal (*in situ*) (Figura 1).

Amplificación génica de HER2/neu en carcinoma infiltrante de mama de acuerdo con la edad de las pacientes: se encontró que la edad, en el momento del diagnóstico del cáncer de mama infiltrante, fue menor en las pacientes positivas para HER2/neu, respecto de las pacientes negativas para este gen, así: 51.3 años para las pacientes HER2/neu positivo y 55 años para las pacientes HER2/neu negativo.

Distribución de los diferentes grados histológicos de carcinoma mamario y la amplificación del gen HER2/neu: se encontró que el 70% de las pacientes con amplificación del gen HER2/neu tenía carcinomas mamarios de mediano y alto grado (II y III), 30% más de lo encontrado en las pacientes que eran HER2/neu negativo.

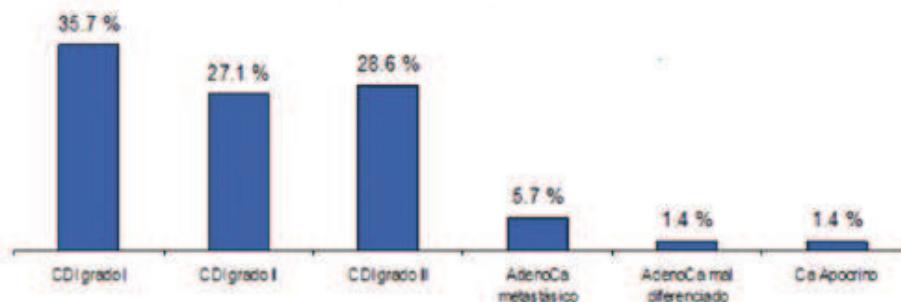


Figura 1. Distribución porcentual de pacientes, según la clasificación del cáncer de mama.

Receptores hormonales: del total de 70 pacientes, a quienes se realizó inmunohistoquímica para los receptores hormonales, se obtuvieron resultados en 64 pacientes. De estas pacientes, 78.1% fue positivas para el receptor de estrógenos y 68.8% para el receptor de progesterona. El 68.7% de estas pacientes tenía expresión concomitante de los receptores de estrógeno y progesterona, 21.9% fue negativas para la expresión de ambos receptores y el 9.4% restante, presentó un patrón discordante en la expresión de estos receptores hormonales (ER+ PR-).

Amplificación del gen HER2/neu por PCR cuantitativa en tiempo real de acuerdo con la expresión de los receptores hormonales: cuando no hay amplificación del gen HER2/neu, el 42.2% de las pacientes estudiadas presentaba expresión de ambos receptores hormonales ER y PR, presentándose casi un 50% de más expresión de estos receptores que cuando se es positivo para HER2/neu. En los casos positivos para HER2/neu se encontró que sólo el 26.6% de pacientes, expresaba ambos receptores hormonales. Cabe resaltar que se encontró

que el 10.9% de las pacientes negativas para la amplificación de HER2/neu era negativas para la expresión de los receptores hormonales de estrógeno y progesterona.

Para conocer si existe riesgo de tener amplificación del gen HER2/neu, según la expresión de los receptores hormonales estrógeno (ER+) y progesterona (PR+), se agrupó de acuerdo con la literatura ER+ PR+ como el grupo de comparación o pacientes no expuestos (menor probabilidad de amplificar el gen HER2/neu), ER+ PR- como pacientes con un riesgo intermedio de amplificación o medianamente expuestos y ER- PR- como pacientes expuestos (mayor probabilidad de amplificar el gen HER2/neu) (Tabla 1).

Cuando se compararon los tres niveles de expresión de los receptores hormonales y la amplificación o no del gen HER2/neu, se encontró que los grupos medianamente expuestos y expuestos tienen un mayor riesgo de amplificación al gen HER2/neu respecto de los pacientes no expuestos en un 29.41% (Tabla 2).

Tabla 1. Grupo de pacientes según el riesgo de amplificar el gen HER2/neu de acuerdo con tres niveles de expresión de los receptores hormonales

Receptores hormonales	Grupo	Probabilidad de amplificar gen HER2/neu
ER+ PR+	No expuestos	Baja probabilidad
ER+ PR-	Medianamente expuestos	Mediana
ER- PR-	Expuesto	Alta

Tabla 2. Amplificación de HER2/neu, según la expresión de los receptores hormonales ER y PR

Nivel de expresión de receptores hormonales	HER2/neu PCR+	HER2/neu PCR -	Proporción de amplificación	RP	IC 95 %
No expuestos (ER+ PR+)	17	27	0.3864	1.0	-
Medianamente expuestos (ER+ PR-)	7	7	0.5	1.2941	0.6805 - 2.4609
Expuestos (ER- PR-)	3	3	0.5	1.2941	0.5354 - 3.1280
Total	27	37			

PCR + = amplificación positiva, PCR - = amplificación negativa, RP = razón de prevalencias

Se realizó un segundo análisis de combinación de receptores hormonales como riesgo para tener amplificación de HER2/neu y se comparó con dos niveles de expresión. Se agrupó ER+ PR+ como el grupo de comparación o pacientes no expuestos (bajo riesgo de amplificación del gen HER2/neu) y ER+ PR- / ER- PR- en un solo grupo como pacientes expuestos (alto riesgo de amplificación de HER2/neu), se siguieron los mismos parámetros del análisis anterior. El resultado obtenido con este nuevo análisis fue igual al resultado anterior y se encontró un mayor riesgo (29.41%) de tener amplificación del gen HER2/neu cuando los receptores hormonales son doblemente negativos o discordantes en su expresión.

Inmunohistoquímica para la proteína HER2/neu: se obtuvieron resultados de inmunohistoquímica para HER2/neu en 66 de las pacientes. De las 66 pacientes estudiadas para la expresión de la proteína HER2/neu, 50 fueron negativas grado 0 (76%), cuatro fueron negativas grado 1+ (6%), seis fueron inciertas grado 2+ (9%) y las seis restantes fueron positivas grado 3+ (9%) [Figura 2].

Distribución de los grados de expresión de la proteína HER2/neu por inmunohistoquímica respecto de la amplificación del gen HER2/neu por PCR en tiempo real: de las pacientes con PCR positiva para HER2/neu, seis tuvieron IHQ grado 3+ (9.1%), cinco IHQ grado 2+ (7.7%), tres IHQ grado 1+ (4.5%) y las 15 pacientes restantes tuvieron IHQ grado 0 (27.7%) para

HER2/neu. Las pacientes con PCR negativa para HER2/neu ninguna tuvo IHQ grado 3+, una tuvo IHQ grado 2+ (1.5%), una IHQ grado 1+ (1.5%) y las 35 restantes fueron IHQ grado 0 (53%) [Figura 3].

PCR cuantitativa en tiempo real para HER2/neu: de las 70 pacientes estudiadas, en todas se logró realizar extracción del DNA a partir de la muestra de tejido embebida en parafina, obteniéndose un DNA de buena calidad para correr la prueba de PCR en tiempo real. 30 pacientes (42.85%) fueron positivas para la

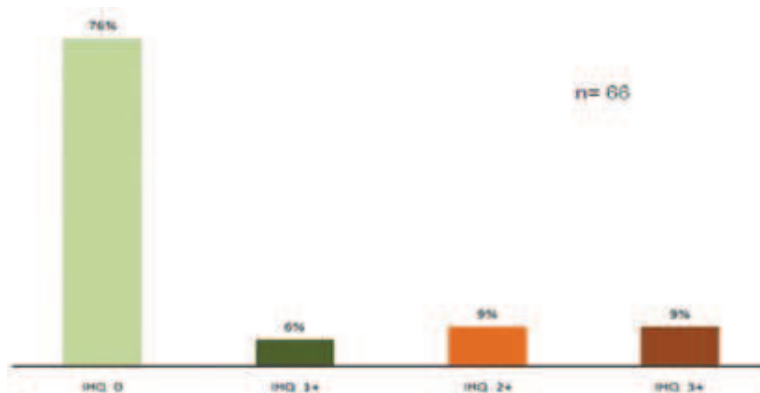


Figura 2. Distribución porcentual de pacientes, según la expresión de la proteína HER2/neu por IHQ

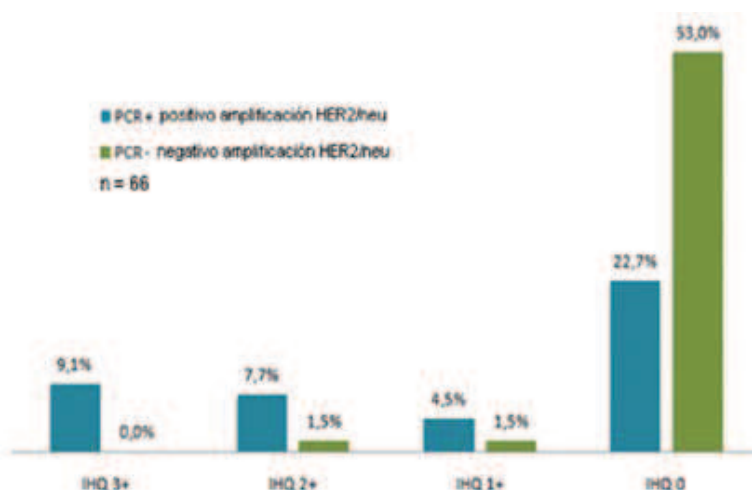


Figura 3. Expresión de la proteína HER2/neu por IHQ respecto de la amplificación del gen HER2/neu por PCR en tiempo real

amplificación de HER2/neu y las 40 restantes (57.15%) fueron negativas para la amplificación de este gen por PCR en tiempo real.

Cuando se analizaron las frecuencias de los resultados (puntajes) obtenidos de la PCR en tiempo real, para la amplificación de HER2/neu, se obtuvo que: 40 fueron menores de 2.0 (negativos); 15 tuvieron un puntaje entre 2.0 y 3.0; nueve, entre 3.1 y 4.0 (positivos) y los seis restantes estuvieron entre 6 y 15.0, es decir, altamente amplificados (positivos) para HER2/neu, según la PCR en tiempo real.

Con el objetivo de conocer el comportamiento inter-experimento (reproducibilidad) de la PCR en tiempo real, se realizaron tres corridas de PCR por paciente. Estas PCR fueron hechas en eventos separados y se siguieron los mismos parámetros y condiciones para cada experimento. El resultado fue una reproducibilidad en los resultados cercana al 90%.

FISH para HER2/neu: para establecer la evaluación de la PCR en tiempo real y FISH en la cuantificación de la amplificación de HER2/neu, se tuvieron en cuenta las pacientes en las que se realizó FISH (pacientes en las que la prueba de IHQ y PCR no fueron concordantes) y se asumieron como FISH positivas, aquellas

con IHQ grado 3+ y como FISH negativas, aquellas con IHQ grados 0 y 1+, según se describió previamente. Las muestras en las que no se obtuvieron resultados por FISH e IHQ se excluyeron del análisis con la PCR en tiempo real; de acuerdo con esto, en adelante, la evaluación de las pruebas diagnósticas para detección de HER2/neu, se realizó con 60 pacientes. Se encontró que la PCR en tiempo real es la prueba con más detección de la amplificación del gen HER2/neu, seguida por FISH y, en último lugar, la IHQ, que fue la prueba que menos detectó la presencia de HER2/neu en el grupo de las pacientes estudiadas (Tabla 3).

La concordancia entre FISH y PCR en tiempo real fue del 76.7%. Cuando se comparó el grado de amplificación del gen HER2/neu obtenido por FISH y PCR en tiempo real, se encontró una diferencia del 23.3% a favor de la PCR en tiempo real. Esta prueba muestra una mayor detección de la amplificación del gen HER2/neu respecto de la FISH. Y, cuando se hizo la comparación de la FISH versus la PCR en tiempo real, se advirtió que cuando la FISH es positiva para la amplificación del gen HER2/neu, todas las pruebas de PCR en tiempo real también son positivas para esta amplificación. Pero cuando la PCR en tiempo real es positiva sólo el 15% de las pruebas de FISH es positivas y un 23.3%

Tabla 3. Distribución de la amplificación de HER2/neu por FISH, PCR en tiempo real e IHQ

FISH positivas		FISH negativas	Total
9		51	60
15%		85%	100%
PCR positivas		PCR negativas	Total
9		51	60
15%		85%	100%
IHQ 3+	IHQ 2+	IHQ 1+ y 0	Total
6	5	49	60
10%	8.3%	81.7%	100%

Grado 3+ = positivo, grado 2+ = incierto, grado 1+ y 0 = negativo

de las pruebas es negativas. Cuando la PCR en tiempo real es negativa el 61.7% de las FISH es negativas (Figura 4). Estas discordancias pueden presentarse porque la PCR muestra una alta sensibilidad, lo que podría aumentar el número de falsos positivos.

Comparación de las tres pruebas diagnósticas utilizadas para la detección de HER2/neu: la concordancia entre las tres pruebas fue del 70%, entre la PCR en tiempo real y la FISH fue del 76.7% y entre la IHQ y la FISH fue del 91.6%. En la Tabla 4 se observan los resultados de las tres pruebas analizadas en la detección de la amplificación y expresión de HER2/neu.

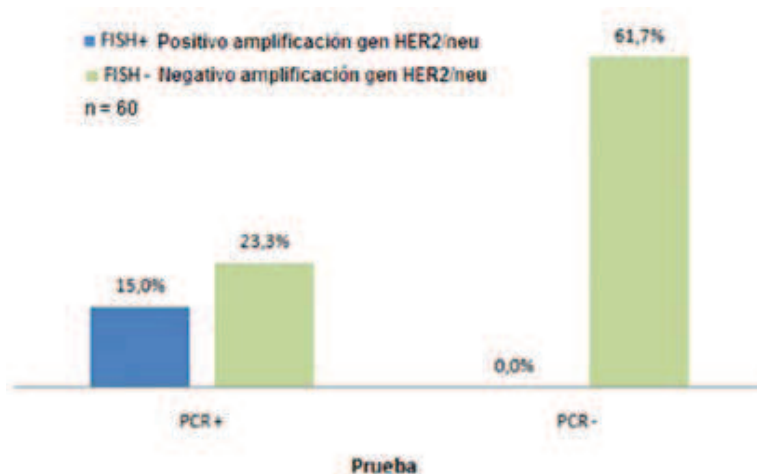


Figura 4. Número de pacientes con detección de HER2/neu por PCR en tiempo real, comparado con la amplificación por FISH

Se encontraron diferencias en la capacidad de detección entre las tres pruebas, así: al comparar la IHQ y la FISH, la diferencia en la detección fue de un 5% de mayor detección por parte de la FISH; mientras que para la IHQ y la PCR, se encontró una diferencia de 28.3% de mayor detección por parte de la PCR en tiempo real.

Características operativas de la IHQ versus FISH (estándar de oro): se analizaron los datos de la siguiente forma: pacientes HER2/neu positivo con FISH positivo y pacientes HER2/neu negativo con FISH negativo versus los resultados obtenidos con la IHQ (Tabla 5).

A partir de este análisis de datos se calculó el rendimiento de la IHQ y se evaluó la capacidad diagnóstica de la prueba, se hizo un análisis de curva ROC (Receiver Operating Characteristic) (Tabla 6 y Figura 5).

El resultado de 0.8137 de área bajo la curva para la IHQ respecto de la FISH, indica que la IHQ posee, en general, una buena capacidad discriminatoria. Podría decirse que es una prueba con buena capacidad diagnóstica, aunque cabe resaltar que no es capaz de discriminar en los resultados grado 2+ (equivocos), por lo

Tabla 4. Distribución de los resultados de las tres pruebas analizadas en la detección de la amplificación y expresión de HER2/neu

Pruebas			Número de pacientes	% de pacientes
IHQ 0 y 1	PCR -	FISH -	36	60
IHQ 3+	PCR +	FISH +	6	10
IHQ 2+	PCR -	FISH -	1	1.7
IHQ 2+	PCR +	FISH +	3	5
IHQ 2+	PCR +	FISH -	1	1.7
IHQ 0 y 1	PCR +	FISH -	13	21.6
Total pacientes			60	100

+ = positivo, - = negativo, 0 y 1 = negativo, 2+ = incierto, 3+ = positivo

Tabla 5. Prueba de referencia resultados IHQ versus FISH (estándar de oro)

Prueba diagnóstica	Pacientes FISH HER2/neu (+)	Pacientes FISH HER2/neu (-)	Total
IHQ positivo	6	2	8
IHQ negativo	3	49	52
Total	9	51	60

Tabla 6. Características operativas (rendimiento) de la IHQ para la medición de la expresión de HER2/neu, comparado con FISH (estándar de oro)

Inmunohistoquímica	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	66.67	30.31	100
Especificidad (%)	96.08	83.84	99.49
Índice de validez (%)	91.67	65.13	88.20
Valor predictivo positivo (%)	75.00	38.74	100
Valor predictivo negativo (%)	94.23	86.93	100
Prevalencia (%)	15.00	5.13	24.87
Índice de Youden (%)	0.63	0.31	0.94
Índice Kappa (%)	0.66	0.38	0.94
Razón de verosimilitud positiva (%)	17.00	4.05	71.38
Razón de verosimilitud negativa (%)	0.35	0.14	0.88
*Proporcion de falsos positivos (%)	3.9	1.1	13.2
*Proporcion de falsos negativos (%)	33.3	12.1	64.6

* Datos calculados en <http://www.seh.lelha.org/pdiagnos.htm>

que debe ser usada como prueba de tamizaje y ayudada por una prueba confirmatoria.

Las características operativas de la PCR versus FISH (estándar de oro) se presentan en las Tablas 7 y 8 y la Figura 6, que demuestran buena sensibilidad.

El resultado de 0.6491 de área bajo la curva para la PCR en tiempo real respecto de la FISH, indica que la PCR en tiempo real tiene una capacidad discriminatoria menor que la IHQ y, por consiguiente, no debería ser usada como una única prueba diagnóstica para la amplificación del gen HER2/neu.

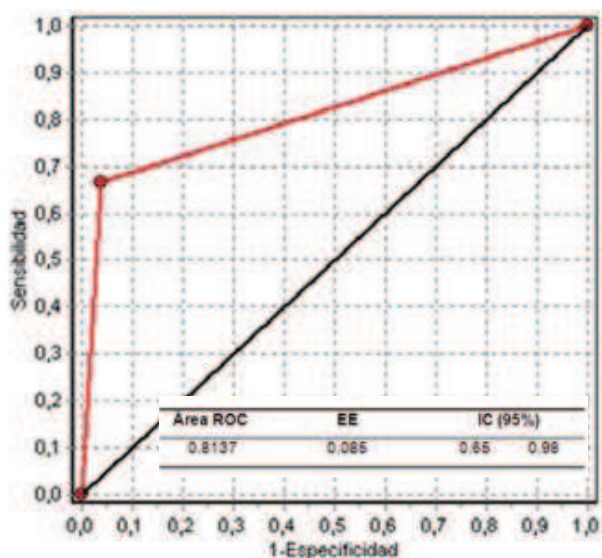
**Figura 5.** Curva ROC, IHQ versus FISH (estándar de oro)

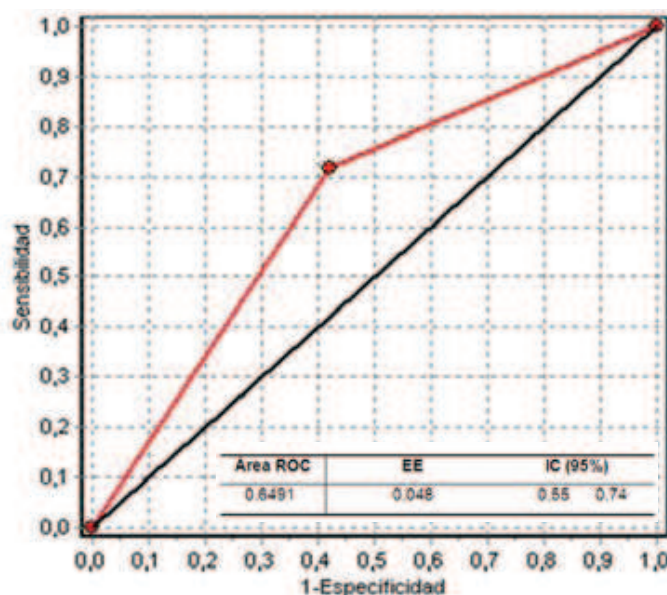
Tabla 7. Prueba de referencia resultados PCR tiempo real versus FISH (estándar de oro)

Prueba diagnóstica	Pacientes FISH HER2/neu (+)	Pacientes FISH HER2/neu (-)	Total
PCR positivo	9	14	23
PCR negativo	0	37	37
Total	9	51	60

Tabla 8. Características operativas (rendimiento) de la PCR en tiempo real para HER2/neu, comparado con FISH (estándar de oro)

PCR en tiempo real	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	100.00	94.44	100
Especificidad (%)	72.55	59.32	85.78
Índice de validez (%)	76.67	85.13	88.20
Valor predictivo positivo (%)	39.13	17.01	61.25
Valor predictivo negativo (%)	100.0	98.65	100.00
Prevalencia (%)	15.00	5.13	24.87
Índice de Youden (%)	0.73	0.60	0.85
Índice Kappa (%)	0.44	0.23	0.65
Razón de verosimilitud positiva (%)	3.64	2.33	5.69
Razón de verosimilitud negativa (%)	NC	NC	NC
*Proporcion de falsos positivos (%)	27.5	17.1	40.9
*Proporcion de falsos negativos (%)	0.0	0.0	29.9

NC: No calculable / * Datos calculados en <http://www.seh.linha.org/pdiagnos.htm>

**Figura 6.** Curva ROC, PCR en tiempo real versus FISH (estándar de oro)

Al comparar las curvas ROC de IHQ y PCR en tiempo real, la prueba de IHQ se ubicó en el vértice superior izquierdo (siempre superior), que indica que la IHQ, según este análisis, posee mejores características para detectar tanto la presencia como la ausencia de la expresión de HER2/neu versus la PCR en tiempo real (Figura 7).

A propósito de estos resultados se realizó un análisis de tablas dobles (2 x 2) para curvas ROC simples con el objeto de conocer la capacidad discriminatoria de la IHQ más la PCR en tiempo real para la detección de HER2/neu versus FISH (estándar de oro). El resultado obtenido de

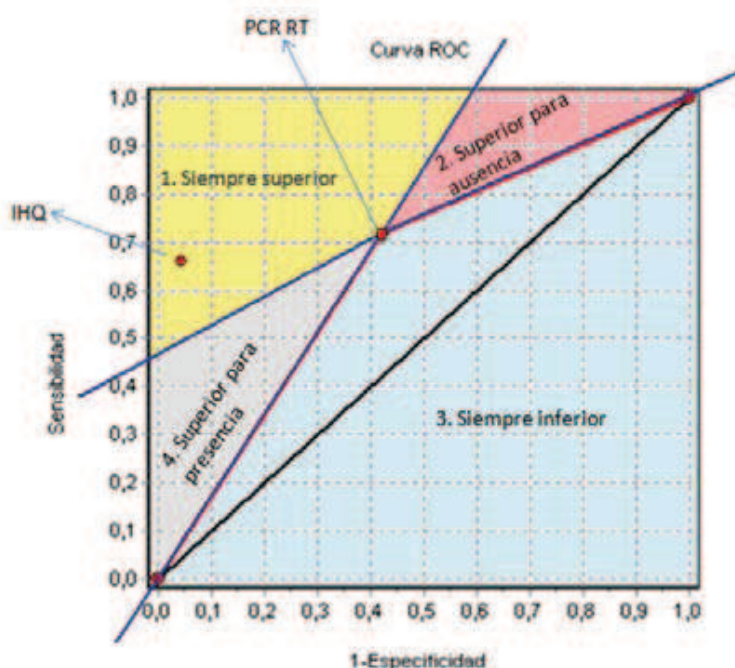


Figura 7. Comparación de los cocientes de probabilidad de IHQ y la PCR en tiempo real (PCR RT = PCR real-time)

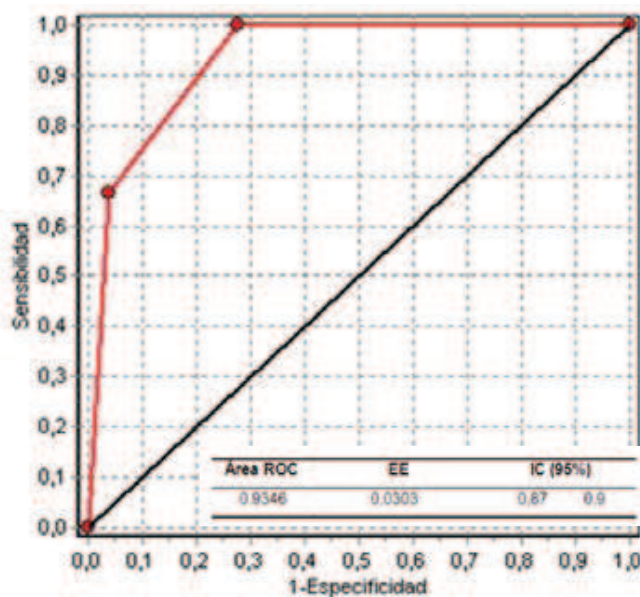


Figura 8. Curva ROC, IHQ más PCR en tiempo real versus FISH

las pruebas en paralelo, es un área bajo la curva de 0.9346, que refleja una muy buena capacidad diagnóstica cuando se emplean la IHQ y la PCR en tiempo real para la detección de HER2/neu (Figura 8).

Por último, en la Tabla 9, se observan las características operativas de la IHQ y la PCR en tiempo real con la aplicación del teorema de Bayes, utilizado para el cálculo de los valores predictivos positivo y negativo a partir de la sensibilidad y especificidad teniendo en cuenta la prevalencia promedio de HER2/neu reportada en la literatura (30%). El resultado obtenido para la PCR en tiempo real al realizar este análisis es un aumento de 21.8% en el VPP y un aumento de 4.09% en el índice de validez, lo que mejora sus características operativas. En el caso de la IHQ el VPP tuvo un aumento de 12.94%, el VPN una disminución de 7.17% y el índice de validez disminuyó un 4.41%.

DISCUSIÓN

Los tumores de mama son un sistema complejo constituido por células epiteliales, estroma, elementos vasculares y otros componentes que pueden ser fundamentales en la expresión de factores mitogénicos reguladores, comunicación intracelular e interacción de tipo paracrina¹³. En el estudio

Tabla 9. Características operativas (rendimiento) de la PCR en tiempo real e IHQ para HER2/neu, con el uso del teorema de Bayes

Características	PCR tiempo real	IC (95%)		IHQ	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	100.00	94.44	100.0	66.67	30.31	100.0
Especificidad (%)	72.55	59.32	85.78	96.08	83.84	99.49
Índice de validez (%)	80.76	NC	NC	87.26	NC	NC
Valor predictivo positivo (%)	60.93	40.9	77.9	87.94	53.4	97.9
Valor predictivo negativo (%)	99.94	90.6	100.0	87.06	75.3	93.7
Prevalencia (%)	30.00	NC	NC	30.00	NC	NC
Índice de Youden (%)	0.72	0.60	0.85	0.63	0.31	0.94
Índice Kappa (%)	0.44	0.23	0.65	0.66	0.38	0.94
Razón de verosimilitud positiva (%)	3.64	2.33	5.69	17.01	4.05	71.38
Razón de verosimilitud negativa (%)	0.0	NC	NC	0.35	0.14	0.88
*Proporcion de falsos positivos (%)	27.5	17.1	40.9	3.9	1.1	13.2
*Proporcion de falsos negativos (%)	0.0	0.0	29.9	33.3	12.1	64.6

NC: No calculable / * Datos calculados en <http://www.seh.lilha.org/pdiagnos.htm>

objeto de este proyecto de investigación, se ha elegido como sistema experimental el tejido tumoral procedente de biopsias de cáncer de mama, debido a que las biopsias de tumores sólidos son un fiel reflejo de la situación real *in vivo* en cuanto a heterogeneidad celular, aunque los estudios basados en su utilización están limitados, sobre todo, por la disponibilidad de tejido. Esta es una de las principales dificultades del estudio en cuanto a la captación de un mayor número de pacientes.

Como sucede con la mayoría de los cánceres, la edad es un factor muy importante, puesto que el riesgo de desarrollar cáncer de mama aumenta a medida que la persona envejece. La mayoría de los casos de cáncer de mama avanzado se encuentran en mujeres de 50 años y más, lo que abarca el 77% de los casos nuevos y 84% de las muertes por cáncer de mama ¹⁴. ¹⁵. Cuando se analizó la edad de las pacientes en el estudio, se observó que la edad promedio fue de 53.6 años y un 70% de las pacientes está compuesto por menores de 60 años. Estas cifras se corresponden con las presentadas en las estadísticas mundiales; sin embargo, casi la mitad de las pacientes son mujeres menores

de 50 años de edad (41.8%). Esto refleja que el cáncer de mama, hoy por hoy, no es una enfermedad exclusiva de personas de edad avanzada y que cada vez el cáncer de mama afecta a mujeres más jóvenes, situación similar a la presentada en el departamento de Antioquia en el que el 63% de las pacientes con cáncer de mama está conformado por menores de 60 años y, de éstas, 33.5% por menores de 50 años ¹⁶.

En este estudio se observó que el 95.8% de los tumores de mama es de carácter invasor, comportamiento similar al registrado en el departamento de Antioquia en donde 96% de los tumores de mama corresponde a carcinomas invasivos y el 4% restante a carcinomas *in situ* de un total de 2 316 casos reportados durante el año 2005 ¹⁶.

Los tumores positivos para el receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR, se relacionan con edad más joven (40% en mujeres con menos de 50 años frente a 24% en los EGFR negativos pacientes) ¹⁷. También existen reportes de observaciones clínicas en las que se tuvieron en cuenta la asociación con la edad entre los receptores hormonales, el grado del tumor y

cómo éstas pueden predecir la sobre-expresión de HER2/neu. Ello sugiere, en consecuencia, una relación relativa entre la sobre-expresión de HER2/neu y la edad¹⁸. Además, se ha reportado una mayor cantidad de mujeres premenopáusicas que postmenopáusicas que expresan HER2/neu¹⁹. Cuando se analizó la amplificación génica de HER2/neu en carcinoma de mama y la relación con la edad de las pacientes, se encontró que las pacientes con cáncer de mama HER2/neu positivo son, en promedio, de menor edad (51 años) respecto de las pacientes con cáncer de mama HER2/neu negativo (55 años).

Cada vez es más importante encontrar factores pronósticos tempranos para el cáncer de mama que orienten a un tratamiento con mejores resultados. Como bien se sabe, la etiología y progresión del cáncer de mama está estrechamente relacionada con la expresión de estos receptores^{20,21}. El tejido tumoral que exhibe expresión de ambos receptores hormonales presenta una mejor diferenciación histológica, interpretándose como un tumor con un mejor comportamiento^{22,23}. Los receptores de estrógeno y progesterona han mostrado ser indicadores de pronóstico, muy útiles en la decisión para instaurar terapia antihormonal²⁴. Las pacientes con tumores que expresan estos receptores serán probablemente más beneficiadas de la terapia hormonal que las pacientes negativas para estos mismos receptores^{25,22}. En términos generales, aproximadamente el 70% de los tumores primarios de mama es positivo para ER y aproximadamente el 50% positivo para PR²⁶.

En este trabajo se obtuvo un 78.1% y un 68.8% de positividad para los receptores de estrógenos y progesterona, respectivamente, lo que indica una marcada tendencia a la positividad de los receptores hormonales en los tumores de mama estudiados. Situación similar a la encontrada en diferentes estudios^{22,23,27}.

Cuando se analizó la expresión concomitante de los receptores, la asociación más frecuente fue la de ambos receptores positivos (ER+ PR+) que abarca el 68.7% de todos los casos.

El 31.3% restante fue de casos negativos y discordantes. Cabe resaltar que en ninguno de los casos se presentó la combinación ER- PR+. Estos datos sugieren que la mayoría de las pacientes estudiadas (68.7%) se pudieron ver más beneficiadas de la terapia hormonal que las que exhibieron receptores hormonales con expresión discordante o sin expresión. De ahí la importancia de su medición²².

Por otro lado, en las pacientes con receptores hormonales negativos, la frecuencia de amplificación del gen HER2/neu es mayor en comparación con aquellas que tienen receptores hormonales positivos²⁸. Esto también se observó en la población del estudio, cuando se analizó la distribución concomitante de los receptores hormonales respecto de la amplificación del gen HER2/neu, según la PCR en tiempo real. Se encontró que la mayoría de las pacientes negativas para la amplificación de HER2/neu, tenía receptores hormonales positivos (42.2%), catalogándose como un grupo de buen pronóstico²⁹. Sin embargo, 26.6% de las pacientes con receptores hormonales positivos resultó positivas para la amplificación de HER2/neu, situación idéntica a la reportada por Crabtree *et al*²⁷.

Se ha visto que en pacientes con sobre-expresión o amplificación de HER2/neu, asociado con receptores hormonales positivos, se tiene una mala respuesta al tratamiento hormonal con tamoxifeno²⁹. El 10.9% de las pacientes en el estudio exhibió el patrón de cáncer de mama triple negativo (receptores hormonales negativos ER- PR- , así como HER2/neu negativo), que constituye un grupo de pacientes con características biológicas y clínicas propias, con una supervivencia menor y una mayor incidencia de mutaciones en BRCA1 y en BRCA2¹⁷. Existe un pequeño subgrupo de pacientes (4.7%) que exhibe el patrón de expresión discordante ER+ PR- y HER2/neu negativo. Este es un subtipo de cáncer de mama que se relaciona con la estimulación de señales relacionadas con el EGFR y con una mayor resistencia a la terapia antihormonal en relación con las pacientes ER+ PR+¹⁷.

En cáncer de mama existe una relación inversa entre la sobre-expresión de HER2/neu y los receptores hormonales de estrógeno y progesterona^{18, 30}. Se encontró en este estudio que existe una mayor probabilidad (29.4%) de tener amplificación del gen HER2/neu, cuando se es negativo para la expresión de ambos receptores hormonales (ER- PR-) o cuando existe una expresión discordante (ER+ PR-), comparado cuando se es positivo para la expresión de ambos receptores hormonales (ER+ PR+). Situación similar a la reportada por Lal P *et al.* en 2005, en el que la expresión de los receptores de estrógenos y progesterona disminuía significativamente en los tumores con sobre-expresión de HER2/neu, en comparación con los tumores sin sobre-expresión de HER2/neu (ER, 49.1% vs 78.17%; PR, 24.3% vs 53.13%). Incluso, cuando se analizó el grado de expresión de los receptores hormonales (ER y PR) en los tumores con sobre-expresión de HER2/neu ésta disminuyó significativamente en los tumores de alto grado en relación con los tumores de grado intermedio y bajo grado histológico³¹. Según lo reportado en la literatura, la expresión de los receptores hormonales ER y PR es, por lo general, inversamente correlacionada con la expresión o sobre-expresión de HER2/neu; sin embargo, Lal P *et al.* en su estudio reportan al igual que en el presente estudio, un número sustancial de tumores con sobre-expresión de HER2/neu que son positivos para la expresión de los receptores hormonales: ER (49.1%) y PR (24.3%)³¹.

Cuando se examinaron los resultados de la IHQ para HER2/neu se encontró un gran número de pacientes negativos que abarcan el 82% de las pacientes, una zona gris o de incertidumbre del 9% y sólo un 9% de pacientes positivas para la expresión de HER2/neu^{31, 32}. Estos datos, además, confirmarían que la IHQ es una prueba que puede tener una gran cantidad de posibles falsos negativos y que le hace falta poder discriminatorio en aquellos pacientes clasificados por ella misma como equívocos grado 2+. Por estas razones, la IHQ debe ser usada sólo como una prueba de tamizaje, que debe ser acompañada por una prueba confirmatoria, debido a que esta prueba se ve influenciada

por el impacto pre-analítico que pueden tener los tejidos, como el almacenamiento, duración y tipo de fijación, intensidad del antígeno de recuperación, tipo de anticuerpo (policlonal versus monoclonal), sistema de control de las muestras y, lo más importante, las dificultades encontradas al aplicar el sistema de cuantificación del grado de expresión en placa, variable entre los patólogos^{24, 33}.

Del total de 70 pacientes, se obtuvo resultados de inmunohistoquímica para HER2/neu en 66, en las cuatro pacientes restantes (5.7%) no se logró obtener datos, debido a la escasa cantidad de tumor presente en la muestra o por posible degradación de antígenos (tejidos embebidos en parafina por largo periodo de tiempo); situación similar a la ocurrida con la inmunohistoquímica para los receptores hormonales.

Cuando se contrastó la IHQ con la PCR en tiempo real, se evidenció que existe una discrepancia del 30% entre las dos pruebas. Discrepancia encontrada, principalmente, en casos reportados como negativos por IHQ y positivos por la PCR en tiempo real. El grupo de pacientes con resultados inciertos, grado 2+ por IHQ para la sobre-expresión de HER2/neu, el 66.7% y el 33.3% fueron positivas y negativas, respectivamente, para la amplificación de HER2/neu por PCR en tiempo real. Datos que reflejan que la PCR en tiempo real puede ser usada como prueba confirmatoria en estos casos catalogados como inciertos¹².

Cuando se comparó la IHQ con el estándar de oro, se encontró una concordancia del 91.6% entre las dos pruebas. El 8.4% de discordancia se debe a los casos grado 2+ por IHQ. Situación similar a la reportada en varios estudios en los que la concordancia entre la IHQ y la FISH es relativamente buena, se encontró que la concordancia entre la FISH y la IHQ puede ir desde el 82% al 91%³²⁻³⁴. En general, la FISH tiene la ventaja de ser un método cuantitativo que se analiza directamente sobre el área de interés en el tejido carácter del estudio, y que correlaciona bien con los resultados de los análisis de IHQ^{35, 36}.

En este momento se sabe que la sobreexpresión del gen HER-2/neu tiene un valor pronóstico desfavorable y, quizá, un valor predictivo con el advenimiento de la terapia biológica (anticuerpos monoclonales). Lo que motiva a encontrar nuevas y mejores herramientas diagnósticas que ayuden a encontrar un resultado más cercano a la realidad. Los resultados obtenidos de las muestras de las 70 pacientes seleccionadas para el estudio fueron muy buenos al aplicar ésta la PCR en tiempo real, obteniéndose un total de 210 pruebas, todas con datos informativos y valederos. La PCR en tiempo real mostró ser una prueba fácil de estandarizar y de realizar gracias a que se trata de una prueba completamente automatizada, lo que se suma al hecho de que la materia prima con la que se trabaja es DNA, lo que le da ventaja sobre la IHQ y la FISH, que requieren de la integridad de la morfología celular para poder realizar el análisis ^{10, 34, 37, 38}.

La frecuencia de los puntajes del grado de amplificación del gen HER2/neu obtenidos en los resultados de la PCR en tiempo real, muestran una clara tendencia a la cercanía de los datos entre sí. Se observó un gran grupo de pacientes con puntajes entre 1.0 y 3.0 que abarcan al 78.6% de las pacientes estudiadas, un segundo grupo de pacientes el 12.86%, con puntajes entre 3.1 y 4.0, y el 8.54% de pacientes restantes obtuvieron puntajes de amplificación del gen HER2/neu entre 4.1 y 15.0, lo que refleja que la PCR en tiempo real es una prueba con buena reproducibilidad y que podría ser usada para la medición de la amplificación del gen HER2/neu ^{10, 34, 38}.

Cuando se analizó el comportamiento de la PCR en tiempo real, se encontró un coeficiente de correlación lineal positivo fuerte, entre el 79% y el 89% con un promedio del 84% entre las PCRs, que indica un coeficiente bastante alto para una prueba diagnóstica ^{39, 40}.

Al analizar la distribución de la amplificación del gen HER2/neu, según la PCR en tiempo real, se encontró que la positividad a la amplificación del gen HER2/neu, por esta prueba, fue 7.85%

mayor a lo reportado en la literatura, en la que se encuentra en promedio un 25% a 35% de positividad a la amplificación del gen HER2/neu ⁴¹. Situación similar a la reportada por Wang S *et al.*, quienes realizaron un estudio retrospectivo con 189 tumores invasores y obtuvieron una sobreexpresión de HER2/neu del 39.2% y 39.7% por IHQ y FISH, respectivamente. El aumento del porcentaje de expresión del gen HER2/neu, explica Wang, se debió posiblemente a que se utilizó una IHQ automatizada y no se excluía el estroma y el tejido *in situ* que puede ser positivo para HER2/neu ¹⁸.

Al comparar la PCR en tiempo real con la FISH, se encontró una concordancia del 76.7% y una discordancia del 23.3% que corresponde a casos positivos por PCR en tiempo real y negativos por FISH. Cuando se comparó la FISH y la PCR en tiempo real, se encontró una diferencia del 23.3% lo que se entendería como posibles falsos positivos o como una mayor capacidad de detección por parte de la PCR en tiempo real versus la FISH y la IHQ. Cuando la IHQ y la FISH son positivas para la detección de HER2/neu, la PCR en tiempo real también lo es.

Como la FISH es la prueba estándar de oro, se tendría que inferir que la PCR en tiempo real presenta falsos positivos. Dada esta situación, se planteó la siguiente pregunta: ¿Qué sucedió para que la PCR en tiempo real dé mayor cantidad de resultados positivos y la FISH negativos? Una posible explicación es que en el momento de la selección del tejido que ha de realizar la extracción del DNA, no sólo se haya seleccionado el área con tumor invasivo, sino también área con componente *in situ* y estroma circundante y que éste haya sido positivo para la amplificación del gen HER2/neu ⁴². Sin embargo, este potencial problema que presenta la PCR cuantitativa en tiempo real puede solventarse con el empleo de la técnica de microdissección tisular, gracias a la cual pueden extraerse secciones de cortes de tejido células tumorales sin contaminación de estroma ^{10, 42}. A diferencia de la FISH, en la que el médico patólogo, a través del microscopio, puede diferenciar entre tejido invasor e *in situ* y, así, realizar un conteo

discriminatorio y dar un resultado positivo o negativo, aunque el tejido *in situ* adyacente sea altamente positivo para la amplificación génica de HER2/neu. Esta es la gran ventaja de la FISH frente a la PCR en tiempo real ^{10, 43, 44}.

Esta dificultad técnica para la realización de la PCR en tiempo real en el momento de la selección del área del tumor, ha sido tema de debate y puede quedar atrás si se tiene en cuenta que los tumores DCIS en el 50% de los casos puede progresar a tumor invasivo.⁴⁵ Diferentes estudios han estimado que la proporción de Carcinomas Ductales Infiltrantes de alto grado (DIC) que tienen amplificado y sobre-expresan HER2/neu, es alrededor del 20%. Cuando se comparan los tumores HER2/neu positivos con los negativos se observan diferencias en cuanto al grado histológico y expresión de receptores hormonales ⁴⁶⁻⁴⁸, debido, posiblemente, a que el código genético para el cáncer de mama esté escrito desde los estados de células precancerosas. Esto tendría profundas implicaciones para la prevención y tratamiento del cáncer ⁴⁹.

Otra causa probable, que puede explicar esta diferencia de casos positivos y negativos entre la PCR en tiempo real y FISH, es que la FISH de por sí es una prueba subjetiva, que puede dar lugar a la aparición de falsos negativos o positivos, que se presentan por diversas causas como: a) imprecisión del observador en el momento de la inspección visual, que debe ser realizada por un médico patólogo, entrenado en este tipo de análisis y proporcionar un reporte acertado; b) solapamiento de las señales de las sondas y de los núcleos en las preparaciones; c) heterogeneidad del tumor; d) presencia de polisomía del cromosoma 17 sin amplificación de HER2/neu (falsos positivos); e) degradación del tejido y, por ende, de su integridad celular, lo que imposibilita la fijación a la placa y lectura ^{43, 44}. Por estas razones, se puede argumentar que es posible que se está dejando de captar el total de señales y, por consiguiente, la totalidad de pacientes con amplificación al gen HER2/neu ⁵⁰.

El concepto epidemiológico puro indica que prevalencia es la proporción de la población de

individuos que en un lapso dado y una región determinada se consideran enfermos. Pero desde la perspectiva de la actividad clínica, en principio más individualizada, la prevalencia de una enfermedad corresponde a la estimación de la probabilidad de padecer la enfermedad antes de realizar la prueba. Según lo reportado en la literatura, la prevalencia de amplificación de HER2/neu en pacientes con cáncer de mama está aproximadamente entre un 25 a 35%. Tomando esta información, se realizó un análisis de valores predictivos positivos y negativos para la PCR en tiempo real y la IHQ. Para este análisis se tomó una prevalencia de amplificación del gen HER2/neu del 30%. Hay que tener en cuenta que los valores predictivos se corresponden con probabilidades *postprueba* (probabilidades condicionales) en las que la probabilidad *preprueba*, es estimada a partir de la prevalencia de la enfermedad en el estudio. En nuestro estudio la prevalencia encontrada, según el estándar de oro (FISH) fue del 15%. Sin embargo, el Teorema de Bayes permite calcular los valores predictivos a partir de la sensibilidad y especificidad (que sólo dependen de los valores de la prueba) para distintas probabilidades pre-prueba o prevalencia. Cuando se aplica el teorema de Bayes lo que se busca es conocer las características operativas de la IHQ y la PCR en tiempo real, respecto de la prevalencia promedio de HER2/neu reportada en la literatura.

La prueba de FISH presentó algunos inconvenientes en cuanto a su realización. En la mayoría de los casos problema se observó ausencia de la señal centromérica (sin señal verde del cromosoma 17), ausencia de señal del gen HER2/neu (señal roja) o desprendimiento del material de la lámina, lo que dificultó la obtención del 100% de resultados. Dadas estas dificultades, sólo se logró obtener resultados en un 68.42% de los tumores a los que se les realizó la prueba. Estas desventajas ya han sido documentadas ⁵¹.

La prueba de FISH arrojó un 15% de positividad, para la amplificación del gen HER2/neu y, aunque detectó un poco más que la IHQ, aún sigue por debajo del promedio reportado en la literatura,

en la que alcanza hasta el 35% ^{33, 41}. Existen diferentes estudios en los que se comparan diferentes métodos de FISH y se han obtenido concordancias del 98% y concordancias con la IHQ hasta del 91% ³²⁻³⁴. Es posible decir que la PCR en tiempo real, por ser una metodología automatizada que usa DNA de alta pureza, en la que no interviene la integridad celular, ni la del tejido como tal, podría dar un resultado más cercano a la realidad para medir la amplificación del gen HER2/neu, lo que explica esta baja en el porcentaje de detección de la amplificación del gen HER2/neu al utilizarse la prueba de FISH ^{10, 12}. Todo esto puede ser cierto y resulta difícil de probar, sólo cabe decir que en este momento ninguna de las dos metodologías tiene la última palabra.

En cualquier estudio de investigación una cuestión clave es la fiabilidad de los procedimientos empleados de medida ⁵². Uno de los objetivos de este estudio era determinar las características operativas (sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, etc.) de la IHQ y de la PCR en tiempo real, respecto de la FISH. Estos análisis nos permiten llegar a conclusiones de las pruebas estudiadas y dar cumplimiento al objetivo trazado. Se encontró poca concordancia entre la IHQ y la PCR en tiempo real y buena concordancia de resultados entre la IHQ y la FISH. Estos resultados son similares a lo reportado en varios estudios en los que la concordancia entre la FISH y la IHQ está entre el 80 y 90% ³²⁻³⁴.

Al determinar la sensibilidad de las dos pruebas (IHQ y PCR tiempo real) se obtuvo que la IHQ en nuestro estudio exhibe una sensibilidad del 66%, comparado al 100% de sensibilidad obtenida por la PCR en tiempo real respecto de la FISH. Estos datos ayudan a demostrar lo que se viene sugiriendo y es que la PCR en tiempo real es una prueba que tiene una capacidad de detección muy alta, además, que es capaz de detectar, amplificar e identificar todas las pacientes con amplificación al gen HER2/neu.

Según estos datos de sensibilidad y especificidad la PCR en tiempo real, se trata de

una prueba muy buena para descartar pacientes que no tienen amplificación de HER2/neu, pero no tan buena para confirmarlo ⁵³. Este resultado ayuda a esclarecer la respuesta dada para responder la pregunta formulada, en la que queremos determinar a qué se debió la mayor capacidad de detección de la PCR en tiempo real respecto de la IHQ y la FISH.

Los resultados de la IHQ presentan una mayor validez que los de la PCR en tiempo real; sin embargo, cuando se analizó el índice de Youden (probabilidad corregida de detectar la enfermedad - seguridad diagnóstica), que mide la calidad del resultado obtenido mediante la diferencia entre la tasa de verdaderos positivos y la de falsos positivos. Según este índice, una buena prueba diagnóstica debe tener alta esta diferencia. Teóricamente es igual a 1 sólo cuando la prueba diagnóstica es perfecta, de modo que también puede decirse que cuanto más cercano a 1, mejor es la prueba diagnóstica que se evalúa. El índice de Youden tiene la ventaja de no estar afectado por la selección de la prevalencia y se prefiere por la combinación de los valores de la sensibilidad y la especificidad. Se encontró que la PCR en tiempo real tiene un índice de Youden de 0.73 en relación al obtenido por la IHQ que fue del 0.63. Estos datos sugieren que la PCR en tiempo real es una prueba con resultados más confiables ⁵⁴.

Otra herramienta usada en el análisis estadístico de la prueba fue el índice Kappa. Este índice se utiliza para determinar la fuerza de concordancia entre pruebas diagnósticas cuando son realizadas por dos o más observadores ⁵⁵. En esencia, el valor de Kappa es la razón entre el exceso de concordancia observado más allá del atribuible al azar ⁵¹. Mientras más cercano sea Kappa de 1.0, mayor es la fuerza de concordancia ⁵⁶. El resultado obtenido para la IHQ fue de 0.66%, lo que la cataloga como una prueba con buena concordancia respecto de la FISH. En el caso de la PCR en tiempo real, el resultado obtenido fue de 0.44% lo que la hace considerar como una prueba con una concordancia moderada en relación con FISH. Estos resultados fortalecen los datos que se han analizado con anterioridad

y ayudarían a confirmar que, estadísticamente, existe mayor fuerza de concordancia entre la IHQ y la FISH que entre la PCR en tiempo real y la FISH, en este caso. Sin embargo, la IHQ no tiene el suficiente poder discriminatorio en los casos reportados catalogados equivocados o grado 2+. Esta es una de las principales debilidades de la IHQ.

Cuando se analizaron los casos clasificados como equivocados, se encontró una concordancia del 80% entre la PCR en tiempo real y la FISH¹². Es decir, se presentó discrepancia sólo en una de las cinco pruebas analizadas y catalogadas como equivocadas por la IHQ. En la muestra discrepante se obtuvo una relación de 2.28 por PCR en tiempo real y una relación de 1.20 por FISH. Este resultado se considera positivo para la amplificación del gen HER2/neu porque se trata de una relación mayor o igual que 2.0. Además, plantea nuevamente la inquietud de qué se debería hacer en estos casos: hacer caso de la FISH, de la IHQ o de la PCR en tiempo real, prueba realizada por triplicado, en ensayos completamente separados.

Al analizar la proporción de falsos positivos y negativos para ambas pruebas se obtuvo que: la IHQ presenta un 3.9% de falsos positivos y un 33.3% de falsos negativos, lo que confirmó su baja capacidad de detección y, por consiguiente, su baja sensibilidad en el momento de detectar la expresión de la proteína HER2/neu. Al aplicar este análisis a la PCR en tiempo real se encontró una proporción de falsos positivos del 27.5% y una proporción de falsos negativos del 0.0%. Estos datos reflejan un mejor comportamiento de la PCR en tiempo real en relación con la IHQ y sugieren que la PCR en tiempo real es una buena prueba siempre y cuando se trabaje sólo con tumor invasivo y no *in situ*. La PCR en tiempo real puede ser una buena herramienta diagnóstica para confirmar los casos catalogados como grado 2+ por IHQ, en los que la FISH no puede ser empleada^{10, 12}.

Cuando se aplicó el valor predictivo positivo y negativo (VPP / VPN), a ambas pruebas, se encontró que la IHQ presenta un mejor

comportamiento ante la PCR en tiempo real cuando se comparan con FISH. Se observó un mejor VPP en la IHQ (75%) comparado con el VPP obtenido por la PCR en tiempo real (39.13%). Este resultado se corresponde con los anteriores análisis estadísticos, en los que se sugiere que la PCR en tiempo real presenta falsos positivos. Al analizar el comportamiento del VPN para ambas pruebas, la PCR en tiempo real obtuvo un VPN del 100%, comparado con 94.23% obtenido por la IHQ. Los resultados del VPN son buenos para las dos pruebas; sin embargo, la PCR en tiempo real es superior. Este resultado muestra que la PCR en tiempo real es una excelente prueba en el momento de precisar cuándo una paciente no tiene amplificación del gen HER2/neu, pero tiene poco poder en el momento de definir la probabilidad de que una paciente sea realmente positiva para la amplificación del gen HER2/neu⁵⁷⁻⁵⁹.

En todo estudio en el que se evalúan pruebas diagnósticas se debe realizar un análisis de curva ROC, que mide la capacidad discriminatoria de la prueba en estudio⁵⁷. En la situación ideal, una prueba que discrimina perfectamente quedaría representada en la gráfica como una línea que coincidiría con los lados izquierdo y superior del cuadrado, es decir, sin solapamiento. Quedaría una región en la que cualquier punto de corte tiene una sensibilidad y especificidad iguales a 1: la curva sólo tiene el punto 0,1 (90°). Si la prueba es inútil que no discrimine en lo absoluto ambas pendientes coinciden y la sensibilidad (verdaderos positivos) es igual a la proporción de falsos positivos, corresponde a una línea en diagonal de (45°) que iría de 0,0 a 1,1.^{52, 53, 58} Por lo tanto, cuanto más desplazada esté la curva ROC hacia el vértice superior izquierdo, mejor es la capacidad discriminatoria de la prueba. Precisamente, una forma de evaluar de manera global esa capacidad de discriminación consiste en calcular el área del polígono que queda debajo de la curva ROC, y se denomina área bajo la curva, sirviendo como índice de comparación entre pruebas diagnósticas. Cuanto mayor es el área mejor es la capacidad diagnóstica. Las pruebas habituales tienen curvas intermedias⁵³.

Al evaluar la PCR en tiempo real, se observó que la curva era intermedia y presentaba un área bajo la curva de 0.6491, que la cataloga como una prueba intermedia para la determinación de la amplificación del gen HER2/neu en relación con FISH. Al aplicar este mismo análisis a la IHQ, se observó un área bajo la curva de 0.8137, catalogándola como una prueba buena para determinar la sobre-expresión de la proteína HER2/neu.

Al comparar el resultado de la curva ROC de la IHQ con el obtenido por la PCR en tiempo real, se obtuvo que la IHQ se ubicó en el vértice superior izquierdo (siempre superior), que indica que esta prueba presenta mejores características para confirmar la presencia y ausencia de HER2/neu versus la PCR en tiempo real. En síntesis, según el análisis de curva ROC, se trata de una prueba con mejor capacidad discriminatoria. Sin embargo, ha sido bien documentado que la IHQ es una prueba que presenta poca capacidad discriminatoria en los casos grado 2+ en los que existe incertidumbre diagnóstica^{60, 61}. Incertidumbre dada cuando el marcaje de la membrana de las células tumorales en estudio es débil o moderado. Las muestras de las pacientes que presentan esta características son catalogadas como tumores inciertos para la expresión de la proteína HER2/neu y se deben confirmar por FISH por protocolo^{62, 63}.

Estos análisis estadísticos deben ser tomados como consideraciones que sólo se refieren a la capacidad discriminatoria de una prueba. La decisión sobre qué prueba diagnóstica es más adecuada es más complicado, que no se le puede dejar sólo a la estadística, puesto que intervienen otros aspectos como el costo de la prueba, los riesgos que supone para el paciente, valorar las consecuencias que conlleva un falso positivo o un falso negativo.

Dadas estas circunstancias se realizó un análisis de tablas dobles (2 x 2) para curvas ROC simples con el propósito de conocer la capacidad discriminatoria de la IHQ y la PCR en tiempo real cuando son utilizadas juntas para la

detección de HER2/neu en relación con FISH (estándar de oro). El resultado obtenido es un área bajo la curva de 0.9346, que refleja una muy buena capacidad diagnóstica cuando se emplean la IHQ y la PCR en tiempo real. Esta es una alternativa viable para la reevaluación de los tumores de mama que reciben una categoría de grado 2+ por IHQ. El uso combinado de la IHQ y la PCR en tiempo real, puede ser un buen acercamiento a la determinación del estado de HER2/neu en pacientes con cáncer de mama y una estrategia efectiva y eficiente¹².

Con los análisis anteriores podemos concluir y dar respuesta a las hipótesis planteadas en este estudio, y es que la PCR en tiempo real es una prueba capaz de confirmar resultados catalogados como equívocos (grado 2+) por IHQ para la expresión de HER2/neu. Además, por ser usada junto con la IHQ en el rastreo e identificación de HER2/neu, podría ser una estrategia costo efectiva igual o mejor que FISH.

La amplificación de HER2/neu registrada en el estudio por la PCR en tiempo real confirma que una de cada tres pacientes con cáncer de mama se podría beneficiar con la adición de trastuzumab asociado con quimioterapia y hormonoterapia.

Se debe determinar el estatus hormonal a la paciente con cáncer mamario, ya que es crucial identificar al grupo de pacientes que se beneficia con una terapia adecuada. Los resultados obtenidos en este estudio avalan esta afirmación ya que dos terceras partes de las pacientes estudiadas fueron positivas para la expresión de los receptores hormonales de estrógeno y progesterona.

Además, podemos concluir que existe un mayor riesgo (estadísticamente no significativo) de tener amplificación de HER2/neu cuando se es negativo o con expresión discordante de los receptores hormonales de estrógeno y progesterona.

AGRADECIMIENTOS

Hospital Pablo Tobón Uribe Medellín, Universidad de Pamplona Colombia, Abbott Laboratories Colombia, Roche Pharmaceuticals Colombia y Fundación Santa Fe de Bogotá, laboratorio de Patología.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

El contenido del presente artículo es responsabilidad de los autores y expresan que no hay conflicto de intereses con los productores de las pruebas diagnósticas.

REFERENCIAS

1. Tavassoli FA, Devilee P, editors. World Health Organization; classification of tumors: tumors of the breast and female genital organs. Invasive breast carcinoma. Geneva: WHO; 2003. p13.
2. Pitch A, Margaria E, Chiusea L. Oncogenes and male breast carcinoma: c-erbB-2 and p53 coexpression predicts a poor survival. *J Clin Oncol*. 2000;18(16):2948-2956.
3. Dickson RB, Jhonson MD, Bano M, Shi E, Kurebayashi I, Ziff B, *et al*. Growth factors in breast cancer: mitogenesis to transformation. *J Steroid Biochemrn Mol Biol*. 1992; 43(1-3):69-78.
4. DANE. Sistema de registro civil y estadísticas vitales: certificados de nacido vivo y defunción. Bogotá: DANE; 2004.
5. 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.
6. Hospital Pablo Tobón Uribe. Departamento de Gestión de Información Clínica. Medellín: HPTU; 2006.
7. Vogel GV. Breast cancer prevention: a review of current evidence. *CA Cancer J Clin*. 2000; 50(3):156-170.
8. Yamashita H, Nishio N, Toyama T, Sugiura H, Zhang Z, Kobayashi S, *et al*. Coexistence of HER2 overexpression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast Cancer. *Breast Cancer Res*. 2004; 6 (1):24-30.
9. 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;344:783-792.
10. 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; 6 (1):42-51.
11. Madrid MA, Lo RW. Chromogenic *in situ* hybridization (CISH): a novel alternative in screening archival breast cancer tissue samples for HER-2/neu. *Breast Cancer Res*. 2004; 6: R593-R600.
12. 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; 6 (2):1-8.
13. Cullen KJ, Smith HS, Hill S, Rosen N, Lippman ME. Growth factor messenger RNA expression by human breast fibroblast from benign and malignant lesions. *Cancer Res*. 1991;51:4978-4985.
14. NCI. National Cancer Institute [sede web]. Bethesda, MD: NCI; 2004 [fecha de acceso 25 de mayo de 2006]. Disponible en: <http://www.cancer.gov>.

15. Medline Plus. Cáncer de mama [Internet]. Bethesda, MD: National Library Medicine; 2007 [fecha de acceso 6 de abril de 2007]. Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000913.htm#top>
16. Dirección Seccional de Salud Antioquia. Registro poblacional de cáncer de Antioquia. Medellín: DSSA; 2005.
17. Asociación Española Contra el Cáncer. Información del Congreso Americano de Oncología Médica (ASCO), celebrado en junio de 2006. Madrid: AECC; 2006 [fecha de acceso 3 de junio de 2007]. Disponible en: <http://www.muchoxvivir.org/index.jsp?seccion=394>.
18. 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 Pathol.* 2000; 113 (6): 855-859.
19. Ménard S, Balsari A, Casalini P, Tagliabue E, Campiglio M, Bufalino R, *et al.* HER-2-positive breast carcinomas as a particular subset with peculiar clinical behaviors. *Clin Cancer Res.* 2002; 8: 520-525.
20. Bernstein L, Ross RK. Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol Rev.* 1993;15: 48-65.
21. Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L, Press MF. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev.* 1993; 15:17-35.
22. Britton JA, Gammon MD, Schoenberg JB, Stanford JL, Coates RJ, Swanson CA, *et al.* Risk of breast cancer classified by joint estrogen receptor and progesterone receptor status among women 20-44 years of age. *Am J Epidemiol.* 2002; 156: 507-16.
23. Jaramillo C, Bravo LE, Carrascal E, Tamayo O. Expresión de receptores hormonales frente a indicadores pronósticos en carcinoma de mama. *Colombia Médica.* 2002; 33:156-161.
24. 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; 122 (1):51-60.
25. Forbes JF. The control of breast cancer: the role of tamoxifen. *Semin Oncol.* 1997;24 (suppl 1):S1-5-S1-19.
26. Pinder SE, Ellis IO. The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: ductal carcinoma in situ (DCIS) and atypical ductal hyperplasia (ADH) – current definitions and classification. *Breast cancer Res.* 2003; 5: 254-257.
27. Crabtree B, Neme Y, Rivera S, Olivares G. Hormone receptors, HER2/neu and p53 in 1027 Mexican patients with breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23(16S):903.
28. Lipton A, Ali SM, Leitzel K, Demers L, Chinchilli V, Engle L, *et al.* Elevated serum HER-2/neu levels predicts decreased response to hormone therapy in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002;20(6):1467.
29. Houston SJ, Plunkett TA, Barnes DM, Smith P, Rubens RD, Miles DW. Over-expression of c-erb2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer.* 1999; 79: 1220-26.
30. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Sävje-Söderborgh J, Anbazhagan R, *et al.* Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol.* 1992;10(7):1049-56.
31. Lal P, Tan LK, Chen B. Correlation of HER-2 Status with estrogen and progesterone receptors and histologic features in 3,655 invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2005; 123 (4): 541-546.
32. Dybdal N, Leirberman G, Anderson S, McCune B, Bajamonde A, Cohen RL, *et al.* Determination of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization and concordance with the clinical trials immunohistochemical assay in women with metastatic breast cancer evaluated for treatment with trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat.* 2005; 93(1):3-11.
33. 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; 116:495-503.
34. Bernard PS, Wittwer CT. Real time technology for cancer diagnostics. *Clin Chem.* 2002; 48(8):1178-1185.
35. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17: 1974-1982
36. Tsuda H, Akiyama F, Terasaki H, Hasegawa T, Kurosumi M, Shimadzu M, *et al.* Detection of HER-2/neu (c-erb B-2) DNA amplification in primary breast carcinoma: inter-observer reproducibility and correlation with immunohistochemical HER-2 overexpression. *Cancer.* 2001; 92: 2965-2974.
37. Milson A, Suli A, Hartung L, Kunitake S, Bennett A, Noderberg L, *et al.* Comparison of two quantitative polymerase chain reaction methods for detecting HER-2/neu. *J Mol Diagn.* 2003; 5(3):184-190.
38. Tse C, Brault D, Gligorov J, Antoine M, Neumann R, Lotz JP, *et al.* Evaluation of the quantitative analytical methods real-time PCR for HER-2 gene quantification and ELISA of serum HER-2 protein and comparison with fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for determining HER-2 status in

- breast cancer patients. Clin Chem. 2005;51(7):1093-1101
39. Molinero LM. Errores de medida en variables numéricas: correlación y concordancia. Madrid: Asociación de la Sociedad Española de Hipertensión; 2001 [fecha de acceso 3 de Junio de 2007]. Disponible en: <http://www.seh-lelha.org/concor1.htm>
40. Calmaestra LB. Correlación lineal: distribuciones bidimensionales. Madrid: Ministerio de Educación; 2005 [fecha de acceso 3 de junio de 2007]. Disponible en: http://descartes.cnice.mecd.es/Estadistica/bidimensional_lbarrios/ecorrelacion_est.htm
41. Järvinen TA, Tanner M, Rantanen V, Bärnlund 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; 156(3):839-847.
42. Schlemmer BO, Sorensen BS, Overgaard J, Olsen KE, Gjerdrum LM, Nexø E. Quantitative PCR a new diagnostic tool for quantifying specific mRNA and DNA molecules: Her2/neu DNA quantification with LightCycler real-time PCR in comparison with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. Scand J Clin Lab Invest. 2004; 64: 511-522.
43. Dillon D. Molecular markers in the diagnosis and staging of breast cancer. Semin Radiat Oncol. 2002;12:305-318.
44. Bruse SM, Waldermann 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).
45. Hoque A, Sneige N, Sahin AA, Menter DG, Bacus JW, Hortobagyi GN, *et al.* HER-2/neu gene amplification in ductal carcinoma in situ of the breast. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002;11:587-590.
46. Latta EK, Tjan S, Parkes RK, O'Malley MB. The role of HER2/neu overexpression/amplification in the progression of ductal carcinoma *in situ* to invasive carcinoma of the breast. Mod Pathol. 2002;15(12):1318-1325.
47. Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester S, Kaelin CM. Ductal carcinoma in situ of the breast. N Engl J Med. 2004;350:1340-1341
48. Hannemann J, Velds A, Halfwek JBG, Kreike B, Peterse JL, Van de Vijver M. Classification of ductal carcinoma in situ by gene expression profiling. Breast Cancer Res. 2006;8:R61.
49. Park K, Kim HJ, Kim J, Shim E. HER2 status in pure ductal carcinoma in situ and the intraductal and invasive components of invasive ductal carcinoma determined by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. Histopathology. 2006; 48:702-707.
50. Dowsett M, Bartlett J, Ellis IO, Salter J, Hills M, Mallon E, *et al.* Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centres. J Pathol. 2003;199(4):418-423.
51. Arnould L, Denoux Y, MacGrogan GM, Penault-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; 88:1587-1591.
52. Fleiss JL. Statistical methods for rates and proportions. 2. ed. New York: Wiley; 2000
53. Ochoa SC, González DJ, Hernandez M, Buñel AJC. Evaluación de artículos científicos sobre pruebas diagnósticas. Evid Pediatr. 2007; 3: 24.
54. Molinero LM. Valoración de pruebas diagnósticas. Madrid: Asociación de la Sociedad Española de Hipertensión; 2002 [fecha de acceso 3 de Junio de 2007]. Disponible en: <http://www.seh-lelha.org/concor1.htm>
55. Altman DG, Bland JM. Statistics notes: diagnostic tests 3: receiver operating characteristic plots. BMJ. 1994; 309:188.
56. López de Ullibarri GI, Pita FS. Metodología de la investigación. Medidas de concordancia: el índice Kappa. Cad Aten Primaria. 1999; 6:169-171.
57. Altman DG, Bland MJ. Statics notes: diagnostic test 2: predictive values. BMJ. 1994; 309:102.
58. Sierra F. La sensibilidad y especificidad: entendiendo su origen y utilidad real. Rev Colomb Gastroenterol. 2003;18:180-182.
59. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Amplification of DNA using the PCR technique. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. 4. ed. New York: Garland Science; 2002. p. 1426-1429.
60. Huang HJ, Neven P, Drijkoningen M, Paridaens R, Wildiers H, Van Limbergen E, *et al.* Hormone receptors do not predict the HER2/neu status in all age groups of women with an operable breast cancer. Ann Oncol. 2005;16(11):1755-1761.
61. 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;14:1079-1086.
62. McCormick SR, Lillemoe TJ, Beneke J, Schrauth J, Reinartz J. HER2 assessment by immunohistochemical analysis and fluorescence in situ hybridization: comparison of HercepTest and PathVysion commercial assays. Am J Clin Pathol. 2002;117: 935-943.
63. 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; 127: 549-553.