
RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DEL HER-2/ NEU Y EL STATUS NODAL AXILAR EN CÁNCER DE MAMA

Sánchez M.², Montiel M.², Lubo A.², Soto L.² Guerra S.¹, Quevedo A.²

¹Cátedra de Anatomía Patológica de la Escuela de Medicina (LUZ)

²Instituto de Salud Ocupacional y Ambiental Dr. Gilbert Corzo (LUZ)

Resumen

Se realizó estudio descriptivo, comparativo de 74 casos de pacientes femeninas con diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma de mama. A los pacientes se les practicó exeresis ganglionar, procesándose inicialmente con técnicas histoquímicas convencionales y posteriormente con técnicas inmunohistoquímicas utilizando el inmunomarcador HER-2/neu. Los resultados evidenciaron que el tipo histológico más frecuentemente diagnosticado fue el adenocarcinoma ductal infiltrante sin otra especificación (ADC Ductal SOE), en 65 casos (87,83 %), seguidos del ADC Ductal+ Comedocarcinoma, en ocho casos (10,81 %) y ADC Ductal + carcinoma medular en un caso (1,35%). Siendo el grupo etario más afectado el de las mujeres post menopáusicas de 50 años o más con un total de 34 casos (45,94%). Los ganglios linfáticos se encontraron afectados en 13 de las pacientes (17,56%), seis de las cuales presentaban un grado histológico II (46,15%) y siete un grado histológico III (53,85%). Así mismo, el comportamiento del inmunomarcador se manifestó positivamente en un 21,26% y negativo en un 78,38% con $p \leq 0,05$. Se concluye que los carcinomas de alta malignidad y estadios avanzados reprimen la expresión del HER-2/neu en un alto porcentaje la presencia de positividad para el mismo empobrece el pronóstico. De este modo el conocimiento del tipo y grado histológico del tumor, la afección ganglionar y el uso de inmunomarcadores de proliferación tumoral, utilizados en conjunto constituyen una herramienta útil en la evaluación de estas pacientes, lo que ofrecería así mejor opción para tratamiento adecuado a casos particulares en un estadio más temprano de la enfermedad.

Palabras clave: adenocarcinoma, status nodal, HER-2/neu

Introducción

En los Estados Unidos, el Cáncer de mama es cinco veces más frecuente que en Japón y Taiwan y es raro antes de los 20 años, con aumento estable hasta la menopausia, seguido de un ligero incremento posterior. En Venezuela es el segundo en frecuencia en la mujer de enfermedad maligna más común provocando alrededor de 20 % de las muertes por cáncer y sólo antecedido por el cáncer de cuello uterino. Una menarquía temprana y una menopausia tardía aumentan el riesgo de cáncer de mama siendo más frecuente en mujeres nulíparas o cuando el primer embarazo tiene lugar después de los 30 años.

El conocimiento obtenido de las investigaciones epidemiológicas y biológicas en los últimos 50 años, han expandido el basamento científico de la biología tumoral y la regulación del crecimiento del cáncer, así como también ha aumentando el conocimiento de los factores de riesgo y componentes socioconductuales que sustentan la variación en la incidencia del cáncer de mama entre los individuos de diferentes razas y etnias.

El papel de la genética y del ambiente, de la experiencia reproductora y de los efector hormonales y exógenos, el cambio en el estado inmune y la vulnerabilidad del huésped, y los determinantes biológicos del cáncer de mama son claves en la mayoría de los factores etiológicos. Estas interacciones contribuyen a las variaciones observadas en la incidencia, mortalidad y sobrevida del cáncer de mama.

En la jerarquización de los genes implicados en la carcinogénesis mamaria,

existen muchas señales regulatorias de crecimiento, que van desde la superficie celular hasta el núcleo. El receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), y su familia, C-erb-2/3/4, expresado en el tejido mamario, es el que regula la mitogénesis y la diferenciación celular. La función de la proteína c-erbB-2 en el crecimiento y diferenciación mamaria normal todavía permanece desconocida. Los factores pronósticos están asociados con la aparición de metástasis tempranas o con el potencial de crecimiento del tumor primario.

El otro mecanismo investigado en la carcinogénesis mamaria, es la función de muchas protein-kinasas que actúan como intermediarios en los mecanismos de trasducción de señales mitogénicas o codificar receptores de factores de crecimiento cuya sobreexpresión, mutación de formas activadas independientes de ligandos resultan en transformación. Muchos miembros de la familia de las proteinkininas han mostrado que están involucrados en el desarrollo del cáncer de mama, tanto en el modelo humano como en el de animales, incluyen: receptor de factor de crecimiento epidermal EGFR/c-erB-2, receptor de factor de crecimiento de fibroblasto, HER-2/neu entre otros.

El estadio es un diagnóstico clínico/quirúrgico/patológico que define el grado de la enfermedad con el muestreo de formaciones ganglionares provenientes de la axila baja. Es un indicador de salud o una medida del status nodal de la enfermedad usado por clínicos, epidemiólogos e investigadores, que evalúa pronóstico, plan de tratamiento, y resultados.

La disección axilar es una excisión en bloque de los ganglios linfáticos del nivel I, definido anatómicamente como ganglios linfáticos medial al músculo dorsal ancho y extendiéndose hasta el borde lateral del músculo pectoral menor y la vena cefálica axilar Dowlatshahi K, et al, demostraron que la disección axilar sola no ofrece ventaja alguna en la tasa de supervivencia y que la disección del nivel I y II pudiera estudiar la mayoría de los pacientes con cáncer de mama, teniendo como parámetro el muestreo de 4 o más ganglios positivos, con promedio máximo de 10, para que sea significativo clínicamente. La decisión para realizar una disección axilar está influenciado por muchos factores: probabilidad de hallar metástasis, necesidad de obtener control de posible enfermedad en la axila, la potencial morbilidad del procedimiento, y si este incluirá en el uso de terapia sistémica adyuvante.

La mayoría de la pobre supervivencia de las mujeres en poblaciones multiculturales se deben a diagnóstico en estadios tardíos, sin embargo, numerosos estudios sugieren que los tumores puedan tener un fenotipo más agresivo. Los marcadores tumorales del cáncer de mama en mujeres afro americanas fueron revisados por Trock en 1996, los cuáles estuvieron asociados con un fenotipo más agresivo, que incluyen a receptores de estrógenos y progesterona, fracción de fase S, el p53 y el erbB-2 o HER-2/neu.

Aproximadamente el 25 a 40% de los carcinomas de mama sobreexpresan el receptor del factor de crecimiento HER-2/neu. La mitad de estos están

amplificados al gen del locus HER-2/neu, resultando en niveles elevados de ARN y proteína, sin embargo, la otra mitad contiene un diploide del gen HER-2/neu. A diferencia del p53, la frecuencia del sobre-expresión del HER-2/neu no aumenta en el estadio tardío de la enfermedad. La mayoría de los estudios de supervivencia concluyen que la amplificación/sobreexpresión del HER-2/neu es un factor pronóstico, pero principalmente para pacientes con nódulos positivos.

Con base a las consideraciones anteriores, se planteo el siguiente trabajo en el cuál se relacionó la expresión HER-2/neu y el status nodal en pacientes con cáncer de mama, previa determinación del tipo y grado histopatológico del tumor y grupos etarios involucrados para así mejorar el promedio de supervivencia y mayor tiempo libre de recaída de enfermedad mediante el diseño de terapias sistémicas adecuadas a casos particulares.

Materiales y Métodos

Se realizó un estudio prospectivo descriptivo, comparativo de 74 casos de pacientes femeninas con diagnóstico histopatológico de Adenocarcinoma ductal infiltrante, procedentes del Banco de Tumores del departamento de Anatomía Patológica del Instituto Nacional de Tumores Centro Médico “San Lucas”, Maracaibo, seleccionadas al azar en un período de tiempo comprendido entre enero – junio del 2009, con un rango de edad entre 25 - 81 años. Se elaboró una ficha para el registro de edad, diagnóstico histopatológico del tumor, presencia o no de ganglios axilares

linfáticos, expresión inmunohistoquímica del marcador HER-2/neu: negativo (-), positivo (+).

Las muestras se procesaron en primer término con técnicas histoquímicas convencionales, en las cuáles el tejido es fijado en formalina tamponada al 10%, deshidratado en concentraciones crecientes de etanol, aclaradas en xilol e incluidas en parafina. En algunos casos, se recibieron bloques de parafina procesados en otros centros, que fueron reincluidos para procesamiento. Para el análisis histopatológico se utilizaron secciones de 3 micras teñidas con Hematoxilina – eosina. El estudio inmunohistoquímico se realizó en secciones de tejidos de 2 micras, las cuales fueron desparafinadas, rehidratadas e incubadas en una solución de Peróxido de Hidrógeno al 3% en Metanol, durante 20 minutos, bloqueando la acción de las peroxidasa endógenas.

Posteriormente, fueron secuencialmente incubadas en suero normal durante 20 minutos, anticuerpo primario (DAKO c-erb-2 oncoprotein) diluido en PBS durante toda la noche a 4°C, anticuerpo secundario biotinilado durante 60 minutos y finalmente en solución de avidin-biotina-peroxidasa (solución de ABC). El marcados tumoral HER-2/neu se preparó a una dilución 1/100 y 1/200. Para desarrollar la reacción se utilizó una sustancia fresca de 3.3 diaminobencina HCL (DAB) conteniendo peróxido de hidrógeno como sustrato para la enzima. Secciones tratadas con suero normal o con el buffer sin la enzima se utilizaron como control. Todas las secciones se contrastaron con una solución diluida de Hematoxilina.

Las secciones para diagnóstico histopatológico convencional y los resultados de inmunohistoquímica fueron evaluados con un microscopio de campo claro Zeiss Axioscópico, cuantificando el número de células que exhiben una tinción marrón oscura en la membrana celular. Los ganglios axilares metastáticos fueron procesados de igual forma. La organización y procesamiento de la información se efectuó mediante el uso del paquete estadístico SPSS versión 15 y Microsoft Excel for Windows. Los resultados se expresaron en valores absoluto y relativos determinándose medidas de tendencia centra, porcentaje y el Coeficiente de Correlación de Spearman se estableció una $p < 0.05$, mediante tablas y microfotografías.

Resultados y Discusión

De los 74 casos estudiados con carcinoma de mama, en cuanto a las variantes histológicas encontradas el adenocarcinoma ductal infiltrante de mama fue el diagnosticado en un mayor número de veces con un total de 65 casos representado en un 87.83%, seguidos por el adenocarcinoma ductal en asociación con patrón histológico de comedocarcinoma en 8 pacientes (10.81%) y en combinación con carcinoma medular en 1 caso (1.35%) (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución y porcentaje de las variantes histológicas en pacientes con diagnósticos de adenocarcinoma ductal infiltrante de mama

VARIANTES HISTOLÓGICAS	Nº	%
ADCa Ductal infiltrante SOEb	65	87.83
ADC Ductal + Comedocarcinoma	08	10.81
ADC Ductal + Carcinoma Medular	01	1.35
TOTAL	74	100%

a: Adenocarcinoma; b: Sin otra especificación

La distribución del carcinoma de mama según la edad reveló que el grupo etario de 50 años y más fue el más numeroso: 34 pacientes, constituyendo el 45.94% de la muestra, seguidos del grupo 45 – 49 años con 14 casos (18.91%) y 40 – 44

años: 11 (14.85%); con una disminución importante en los grupos de mujeres más jóvenes: 1 caso (1.35%) para el grupo de 25 – 29 años, 8 casos (10.81%) en las de 30 – 34 años y por último 6 casos en las edades correspondientes a 35 – 39 años (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución absoluta y porcentual de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama

EDAD (Años)	Nº	%
25-29	01	1.35
30-34	08	10.81
35-39	06	8.10
40-44	11	14.86
45-49	14	18.91
50 y +	34	45.94
TOTAL	74	100%

En relación a los grados histológicos sólo se encontraron en pacientes con grado II: 16 casos (21.62%) y pacientes con grado III: 58 (78.33%) mostrados en la Tabla 3.

Cuando comparamos el estado de los ganglios linfáticos en estos pacientes obtuvimos un total de 13 casos (17.56%) con involucramiento de los ganglios linfáticos y 61 pacientes sin invasión a los mismos (Tabla 4); así mismo se analizó la positividad ganglionar con respecto al grado histológico del tumor

obteniéndose un resultado de un 46.15% para los tipos II y un 53.85% para los tipos III (Tabla 5).

En la Tabla. 6, se expresa que la inmunorreactividad negativa ocurrió en un mayor número: 58 reportes del universo muestreado, y en 16 pacientes se evidenció inmunorreactividad positiva, dicho marcador también se comparó en asociación a ganglios linfáticos positivos y con respecto al grado histológico tumoral, notándose que las pacientes con ganglios positivos

mostraron expresión negativa en un mayor porcentaje 69.23% y sólo un 30.77% manifestó positividad para el mismo, lo que denota un peor pronóstico para esta minoría con una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0,05$ como se observa en la (Tabla. 7). En asociación con el grado histológico, se demostró que la expresión positiva del mismo en pacientes grado III fue en un menor porcentaje de casos (18.96%)

mientras que en expresión negativa resultó más alta 81.04%; igualmente, lo encontrado para los grados II fue de un total de 16 diagnósticos de este tipo hubo positividad del inmunomarcador en un 31.25 y negatividad en un 68.75%, diferencian estadística de $p < 0,05$ como se muestra en la (Tabla 8).

Tabla 3. Distribución en número y porcentaje de los grados histológicos

encontrados en las pacientes con carcinoma ductal infiltrante de mama

GRADO HISTOLÓGICO	N°	%
Grado II	16	21.62
Grado III	58	78.38
TOTAL	74	100%

Tabla 4. Distribución en número y porcentaje de pacientes con carcinoma de mama y afectación ganglionar

PACIENTES CON CÁNCER	GANGLIOS POSITIVOS		GANGLIOS NEGATIVOS	
	No.	%	No.	%
74	13	17.56	61	82.44

Tabla 5. Distribución en número y porcentaje en cuánto a correlación entre el grado histológico y positividad ganglionar

GRADO HISTOLÓGICO	N° GANGLIOS	%
II	6	46.15
III	7	53.85
TOTAL	13	100%

Tabla 6. Distribución número y porcentaje de pacientes con cáncer de mama e

inmunoreactividad al her-2/neu

PACIENTES		HER-2/neu POSITIVO		HER-2/neu NEGATIVO	
No.	%	No.	%	No.	%
74	100	16	21.26	58	78.38

Tabla 7. Distribución en número y porcentaje en cuánto a la correlación entre el her-2/neu y la afectación ganglionar

HER-2/neu	Nº GANGLIOS POSITIVOS	%
Negativos	09	69.23
Positivos	04	30.77
TOTAL	13	100%

Tabla 8. Correlación entre el grado histológico y el marcador tumoral her-2/neu

GRADO HISTOLÓGICO			INMUNOMARCADOR			
TIPO	No.	%	HER-2/neu +		HER-2/neu –	
			No.	%	No.	%
II	16	21.62 ^b	5	31.25 ^b	11	68.75 ^b
III	58	78.38 ^b	11	18.96 ^b	47	81.04 ^b

^bp < 0,05

El marcador tumoral HER-2/neu representa en la actualidad una herramienta de vigilancia y seguimiento de primera línea en el cáncer de mama, aunado a otros inmunomarcadores, en especial, receptores estrogénicos (ER) y receptores progestérgicos (PR) brindan una importante información que ayudan en la determinación de alternativas terapéuticas adecuadas para cada una de las pacientes afectadas en forma particular.

El HER-2/neu (c-erbB-2) codifica un receptor de tirosín-kinasa, el cual es miembro de la familia de receptores factor de crecimiento epidermal (EGF). El proto-oncogen c-erb-B2 está amplificado en más del 33% de

los tumores primarios examinados. La función de la proteína c-erbB-2 en el crecimiento y diferenciación mamaria normal todavía permanece desconocida, pero bien es cierto su papel en la formación tumoral y la adquisición de su capacidad metastásica. La sobre expresión del HER-2/neu ha sido observado en muchos tipos de tumor, que incluye células tumorales pulmonares, colon, próstata, ovario y mama. Su titulación predice una tasa de supervivencia sumamente baja y acortamiento del tiempo libre de recaída y ganglio linfático positivo.

El significado del HER-2/neu en

pacientes con ganglio linfático negativo es controversial, y de allí, que su utilidad como indicador pronóstico sea limitado. Los tumores con grado histológico III tienen un riesgo 4,4 veces mayor de recurrencia que aquellos con grado I. En ese sentido, el grado histológico puede ser utilizado como factor decisivo para instaurar terapia adyuvante frente a un tumor de tamaño límite y ausencia de compromiso ganglionar. En el presente estudio, se encontró asociación entre la sobreexpresión del HER2/neu con los grados II y III, pero no resultaron ser variables independientemente asociadas. De forma similar, el estudio de Gonzalez C. encontró asociación con la sobreexpresión del HER2/neu en análisis multivariado.

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. 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 marcador de mal pronóstico y de potencial como diana terapéutica, válida para el tratamiento de esta enfermedad con el uso de anticuerpos monoclonales específicos que se unen al dominio extracelulares del receptor, como el trastuzumab.

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. La importancia clínica e 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 monoclonar humanizado trastuzumab.

En nuestro estudio el HER-2/neu se presentó reprimido en un alto porcentaje, el cual verdaderamente mide pronóstico clínico de invasividad tumoral y promedio de sobrevida.

La amplificación y sobre expresión de HER-2/neu y EGFR han sido correlacionados con un fenotipo de tumor agresivo y pobre pronóstico clínico, y relacionado con metástasis a ganglio linfático axilar. La frecuencia de la sobre-expresión de HER-2/neu no está incrementada en la fase tardía de la enfermedad. Coincidiendo con lo reportado por varios autores [Dominguez y Colbs, (2001); Gonzalez y Colbs (2007); Rojas (2005); Verdu y Colbs (2005)]. Muchos estudios de supervivencia para esta enfermedad concluyen que la amplificación/ sobre- expresión de HER-2/neu es un factor pronóstico independiente, pero principalmente para pacientes ganglio axilar-positivo. En la actualidad, a nivel mundial, la investigación está enfocada en la búsqueda de predictores de recurrencia de enfermedad, respuesta a la terapia y comportamiento tumoral, particularmente en pacientes con cáncer de mama en fase temprana.

Según González (2005) los carcinomas que muestran sobre-expresión de la proteína neu son usualmente del tipo ductal y están asociados con un

componente intraductal extensivo, lo cual coincide con lo arrojado en nuestro estudio donde el mayor número de casos fueron carcinomas ductales con un total de 65 casos expresado en la Tabla 1.

Existen casos donde el tumor es demasiado pequeño o no se detecta en su superficie celular la presencia en dichos marcadores tumorales que ayuden a programar la terapéutica hormonal específica para cada paciente. De allí, surgió la necesidad de preconizar el uso del estadiaje o disección ganglionar axilar, como una herramienta biológica, para medir el grado de invasividad metastásica tumoral.

La disección ganglionar axilar, aunque aporta importante información pronóstica, no es capaz de identificar todos los pacientes que potencialmente pueden fallar sistemáticamente. Cuando no se logra detectar enfermedad metastásica ganglionar, pueden suceder dos cosas: uno, que el drenaje linfático del tumor sea exclusivamente hacia la cadena ganglionar mamaria interna, y como tal, no sea debidamente estudiada por una disección ganglionar estándar, segundo, los pacientes pueden tener una biología del tumor con diseminación hematogena primero, que resulta en falla a distancia, sin desarrollo demostrable de enfermedad metastásica.

En nuestra investigación, solo 13 casos mostraron positividad para enfermedad ganglionar metastásica de un universo de 74 casos, cuando se correlacionaron con el grado histológico se encontró 6 casos con grado histológico II (moderadamente diferenciados) y 7 casos con histológico III (pobrementemente diferenciados) ilustrados en las Tablas 3 y 4. En contraposición,

en 61 casos no se les detectaron ganglios linfáticos, quedando la incógnita de cómo será el comportamiento biológico de dichos tumores y su probabilidad o no de recaída.

Por último, hay que resaltar que la importancia de diagnosticar correctamente un tumor de mama, no sólo radica en el status nodal axilar sino también en el tipo histológico del tumor. En la Tabla 1 se muestra que el mayor número de casos fueron diagnosticados como adenocarcinoma ductal infiltrante sin otra especificación (SOE), con 65 pacientes, representando el 87.83%, además de la combinación de adenocarcinoma ductal más comedocarcinoma en 8 casos (10.81%) y por último sólo se detectó 1 caso en asociación con carcinoma medular (1.35%).

Usualmente, el carcinoma ductal invasivo, lobular, medular, con altas tasas proliferativas, son receptor – hormonal negativo, concluyéndose que los carcinomas de alta malignidad son receptor negativos en un alto porcentaje más que los carcinomas bien diferenciados.

Conclusiones

Este estudio no se encontró asociación con la sobreexpresión del inmunomarcador HER-2/neu en relación con el status nodal axilar, tiene implicaciones en la formación tumoral y capacidad metastásica del mismo.

El HER-2/neu predice la tasa de supervivencia más baja y acortamiento del tiempo libre de enfermedad – recaída asociado a ganglio linfático positivo.

El marcador HER-2/neu se presentó

fuertemente reprimido y en los casos donde se demostró inmunorreactividad positiva fueron mujeres menores de 50 años, con fenotipo tumoral agresivo y alto poder metastático a ganglios linfáticos axilares, comprobándose su propiedad invasiva.

La disección ganglionar aunque aporta importante información, no es capaz de identificar a todas las pacientes susceptibles de fallar sistemáticamente, ya que existen 2 cadenas o vías de diseminación tumoral, la linfática axilar, propia de las mujeres postmenopáusicas, que son las que se benefician con la técnica de disección axilar; y la vía vascular no linfática, o mamaria interna, encontrada en los casos de mujeres premenopáusicas, o aquellas que presentan recaída en período de tiempo corto, motivación por la cual se postula la necesidad de disección de ganglio centinela, definido así, por ser el primero en recibir la linfa del lecho tumoral, evitándose técnicas de vaciamiento axilar, que incrementan la morbilidad de las pacientes afectadas. En este estudio el universo fue de 72 pacientes, sólo 13 casos les fue detectada enfermedad ganglionar axilar metastásica positiva, sin poder descartarse la posibilidad, de que un 25% de los casos de ganglios negativos, pueden desarrollar posteriormente enfermedad ganglionar metastásica.

La determinación anatomopatológica del tumor, su grado histológico, es fundamental para el desarrollo de una quimioterapia personalizada, ya que en nuestro estudio detectamos que, los casos clínicos con grado histológico III y ganglios axilares positivos

tuvieron un alto porcentaje, sabiendo que estos son tumores pobremente diferenciados, de pobre diagnóstico y mala respuesta a la manipulación hormonal, disminuyéndose así el promedio de supervivencia y acortamiento del tiempo de recaída de enfermedad; postulándose con esta aseveración, la necesidad de un rastreo mamográfico precoz, despistaje biopsico dirigido ante la menor sospecha de tumoración mamaria, buscando así ofrecer nuevas y más rápidas opciones terapéuticas a nuestra población femenina.

Se plantea la necesidad de promover campañas de educación sobre los riesgos de exposición a ciertos mutágenos ambientales potenciadores de las enfermedades (alcohol, cigarrillo, disturbios hormonales), rastreo de familias portadoras de genes predisponentes al cáncer mamario, chequeo mamográfico de control y divulgación de los estudios científicos relacionados al tema, para establecer en la población femenina susceptible.

Referencias Bibliográficas

- Baquet, C.; Commiskey, P. (2000). Socioeconomic factors and Breast Carcinoma in multicultural woman. *Cancer*. 88(5): 1256-1264.
- Bisell, M.; Weaver, V.; Lelievre, S.; Wang, F.; Peterson, O.; Schmeichel, K. (1999). Tissue structure, nuclear organization and gene expression in normal and malignant breast. *Cancer Research*. 59:1757-1764.
- Cemiecki, B.; Schaff, A.; Callans, L.; Spitz, F.; Bedrosian, I. (1999). Immunohistochemistry with pancytokeratins improves the sensitivity of

- sentinel lymph node biopsy in patients with breast carcinoma. *Cancer*. 85(5): 1098-1103.
- Chodosh, L.; D'Cruz, C.; Gardner, H. Ha, S.; Marquis, S. (1999) Mammary gland development reproductive history and breast cancer risk. *Cancer Research*. 59: 1765-1772.
- Cote, R.J.; Petersen, H.; Chaiwun, B.; Gellar, R.D.; Goldhirsch, A. (1999). Role of immunohistochemical detection of lymph-node metastases in management of breast cancer. *The Lancet*. 354: 896-900.
- Domínguez, M.A.; Marcos, M.; Meiriño, R.; Villafranca, E.; Dueñas, M.; Arias, F.; Martínez, E. (2001). Factores pronósticos y predictivos en el cáncer de mama temprano. *ANALES Sis Sam Navarra*. 24(1).
- Dowlathshahi, K.; Fan, M.; Bloom, K.; Splita, D. (1999). Occult Metastasis in the sentinel lymph nodes of patients with early stage breast carcinoma. *Cancer*. 16(6): 990-996.
- Gjerdrum, L.M.; Sorensen, B.S.; Kjeldsen, E.; Sorensen, F.B.; Nexø, E.; Hamilton-Dutoit, S. (2004). Real-time quantitative PCR of microdissected paraffin-embedded breast carcinoma. An alternative method for HER2/NEU analysis. *J. Mol. Diagn.* 6 (1):42-51.
- Gonzalez- Muller, C. (2005). Características patológicas asociadas al carcinoma de mama HER-2 positivo. *Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. 66(2):89-99.
- Jemal, A.; Murray, T.; Ward, E. *Cancer statistics*. (2005). *J. Clin.* 55:10-30.
- Jhonson-Thompson, M.; Guthrie, J. (2000). Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. *Cancer*. 88(5):1224-1229.
- Kothari, A.S.; Beechey- Newman, N.; Hamed, H.; Fentiman, D' Arrigo; Hanby, A.M. (2002). Paget disease of the nipple, A multifocal manifestation of higher-risk disease. *Cancer*. 95:1-7.
- Lieberman, L. (2000). : Pathologic analysis of sentinel lymph nodes in breast carcinoma. *Cancer*. 88 (5): 971-977.
- Madrid, M.A.; Lo, R.W. (2004). Chromogenic in situ hybridization (CISH): a novel alternative in screening archival breast cancer tissue samples for HER2/NEU status. *Breast Cancer Res*. 6(5):593-600.
- Martin, M. (2005). Anticuerpos monoclonales anti-HER2/NEU en cáncer de mama: trastuzumab. *Moller del valles: Merck Oncología, Merck farma Quimica*.
- Mestres, J.; Muñoz, M.; Gascon, P. (2004). ErbB tyrosine kinase receptor inhibitors in breast cancer. *Rev. Oncol*. 6:12-21.
- Montse, A.; Valero, A.; Lledo, R.; Sagales, L.; Carazo, A.; Cardo, C.; Torrus, X. (2005). Protocolo de estudio molecular del oncogen HER2/neu en el carcinoma de mama. *Clin. Transl. Oncol*. 11:504-11.
- Nichols, D.W.; Wolff, D.J.; Self, S. (2002). A testing algorithm for determination of HER2 status in patients with breast cancer. *Ann. Clin. Lab. Sci*. 32:3-11.
- Pathank, D.; Osoch, J.; He, J. (2000). Breast Carcinoma Etiology. *Cancer*. 88(5): 1230-1238.
- Reed, W.; Hannisdal, W.; Bochler, P.; Host, H.; Nasland, J. (2000). The prognostic value of p53 and c-erbB-2

immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer*. 88(4): 804-813.

Romond, EH.; Pérez, EA.; Bryant, J. (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER 2-positive breast cancer. *N Engl. J. Med.* 353:1673-1684.

Ross, JS.; Fietcher, JA.; Linette, GP.; Stec, J.; Clark, E.; Ayer, M. (2003). The Her- 2/neu gene and protein in breast

cancer. Biomarker and target of therapy. *Oncologist*. 8: 307-25.

Wu, A. (2000). Diet and Breast carcinoma in multientnic populations. *Cancer*.88 (5): 1239-1244.

Zarpo, RJ.; Hammond, EH. (2002). Conference summary, strategic science simposium. HER-2/ neu testing of breast cancer patients in clinical practice. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 127:549-53.