
Expresión del HER2/neu en pacientes venezolanas con cáncer de mama localmente avanzado.

Luisa Morales^{1,2}, Aldo Reigosa^{1,3}, Eduardo Caleiras^{4,5}, Richard Mora², Nuria Marrero⁴, Eliécer Payares⁴, Karla Molina¹ y Luis Sucre⁴.

¹Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas, ²Departamento de Farmacología,

³Departamento de Morfofisiopatología, Universidad de Carabobo,

⁴Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño” y ⁵Unidad de Anatomía Patológica, Hospital Metropolitano del Norte. Valencia, Venezuela.

Palabras clave: HER2/neu, cáncer de mama, inmunohistoquímica, pronóstico, factor predictivo.

Resumen. Conocer el pronóstico de un paciente con cáncer permite elegir la terapéutica más apropiada. Se ha relacionado la expresión del HER2/neu con un pronóstico desfavorable en pacientes con carcinoma infiltrante de mama, razón por la cual, se plantea como propósito analizar su valor pronóstico y predictivo en pacientes con cáncer de mama, localmente avanzado, tratadas en el Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño”. Se recopiló información de 58 pacientes, acerca de sus datos personales, así como del tratamiento recibido, su respuesta clínica, los datos del reporte de biopsia, grado histológico, grado nuclear, estado ganglionar y evolución de la paciente. La determinación de la expresión del HER2/neu se realizó mediante inmunohistoquímica, utilizando la técnica de avidina-estreptavidina-peroxidasa. Para la interpretación del HER2/neu se asignó una puntuación de 0 a 3+ acorde con las pautas de interpretación del Hercep-Test (DAKO); 37,9% de los casos presentó expresión del HER2/neu en la membrana de las células neoplásicas. El estado ganglionar y el estado de los receptores hormonales resultaron ser variables pronósticas significativas para predecir el intervalo libre de enfermedad. Las pacientes con fuerte expresión de la oncoproteína parecían tener una tendencia a la quimiorresistencia con el régimen FAC (5-fluoracilo-doxorrubicina-ciclofosfamida). La expresión del receptor HER2/neu está relacionada con una reducción del intervalo libre de enfermedad y la supervivencia global, en las pacientes con carcinoma ductal infiltrante de mama, localmente avanzado, lo cual confirma que es un buen factor pronóstico.

HER2/neu expression in Venezuelan patients with locally advanced breast cancer.

Invest Clin 2008; 49(1): 69 - 78

Key words: HER2/neu, breast cancer, immunohistochemistry, prognosis, predictive factor.

Abstract. To know the prognosis of a patient with cancer allows choosing the most appropriate therapeutic. The expression of the oncogen HER2/neu has been related to an unfavourable prognosis in patients with infiltrating breast carcinoma, for this reason, the purpose of this work was to analyze its predictive and prognostic value in patients with locally advanced breast cancer, treated in the Oncological Institute "Dr Miguel Perez Carreño". Information about personal data of 58 patients was compiled, as well as the received treatment, clinical response data of the biopsy report, histological grade, nuclear grade, node status and evolution of the patient. The determination of the HER2/neu expression was made by immunohistochemistry, using the avidina-estreptavidin-peroxidasa technique. For the interpretation of the HER2/neu, an agreed score from 0 to 3+ was assigned, using the guidelines of interpretation of the Hercep-Test (DAKO). 37.9% of the cases displayed expression of the HER2/neu in the membrane of the tumour cells. The node state and the hormonal receptors state turned out to be significant to predict the disease-free interval. Patients with strong oncoprotein expression seem to have a quimioresistant tendency to the FAC (5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide) regime. The expression of the HER2/neu receptor is related to a reduction of the the disease-free interval and global survival in patients with infiltrating ductal breast carcinoma locally advanced, confirming, in this work, to be a good prognostic factor.

Recibido: 22-01-2007. Aceptado: 26-06-2007.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama representa un gran problema sanitario. En términos generales, se ha observado un aumento global en su incidencia, lo que pudiera ser debido al desarrollo de campañas más intensas de detección, sin embargo, existe evidencia de que se está produciendo un incremento real, cuyas causas son en gran parte desconocidos (1).

En los países industrializados el cáncer de mama representa la principal causa de muerte oncológica en la población femeni-

na, se ha observado un incremento en el diagnóstico de esta patología en los estadios I y II, que representan aproximadamente el 75% de la totalidad de los casos que se diagnostican; esta realidad es muy diferente en Venezuela, donde el mayor porcentaje de los diagnósticos de cáncer de mama se realiza en los estadios III y IV (2, 3).

La evolución clínica de las pacientes con cáncer infiltrante de la glándula mamaria es muy variable, debido en parte, a diversos patrones de crecimiento y variadas respuestas al tratamiento sistémico, así como a múltiples factores que se han implicado en

el pronóstico de estas pacientes. En el caso particular del carcinoma infiltrante de mama localmente avanzado (estadios IIb, IIIa y IIIb), un tercio de las pacientes presentará recidiva y aproximadamente la mitad de ese tercio morirá de la enfermedad (4).

El conocer el pronóstico de un paciente con cáncer permite, entre otras cosas, elegir la terapéutica más apropiada, evaluar la eficacia del tratamiento, informar al paciente o a sus familiares acerca de la posible evolución, y manejar racionalmente las eventuales complicaciones que puedan aparecer en el curso de la enfermedad.

Entre los principales elementos para establecer un pronóstico se encuentran la extensión anatómica de la enfermedad y las características biológicas del tumor. En el cáncer de mama, el tamaño de la neoplasia (T) y la presencia o no de metástasis axilares (N) o a distancia (M), es decir, el estadio clínico, ha demostrado una estrecha asociación con la evolución de la enfermedad (5).

Las características biológicas del tumor incluyen el tipo y grado histológicos, la invasión vascular, la actividad proliferativa de las células neoplásicas, la presencia de receptores hormonales (estrogénicos y progestágenos), marcadores genéticos tales como la amplificación de oncogenes (HER-2/neu), delección de genes supresores, mutaciones (p53, bcl2), presencia de nuevos vasos sanguíneos próximos al tumor (angiogénesis) y la presencia de micrometástasis en médula ósea, detectada por anticuerpos monoclonales (6,7). Así mismo, deben ser considerados otros factores pronósticos, entre ellos la edad de la paciente (8, 9).

En virtud de la necesidad de desarrollar tratamientos más efectivos y específicos, se requieren marcadores que permitan predecir más acertadamente el beneficio terapéutico. El HER-2/neu es un oncogén localizado en el cromosoma 17, que se expresa en aproximadamente el 30% de las pacientes con cáncer de mama. La expresión

de este oncogén está asociada a la progresión y evolución desfavorable del cáncer de mama (10-14). A nivel nacional no se conocen trabajos publicados sobre su utilidad como factor pronóstico, por lo tanto y conociendo que el mismo es susceptible de ser una diana terapéutica, se plantea como propósito, de este trabajo, analizar su valor pronóstico y predictivo en pacientes con cáncer localmente avanzado, tratadas en el Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño" de Valencia, Venezuela, para así contribuir a establecer si las pacientes venezolanas se comportan de forma similar a las de otros países.

MATERIAL Y MÉTODOS

Mediante la revisión de historias médicas del archivo del Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño" (IOMPC), se identificaron las pacientes con diagnóstico anatomopatológico de carcinoma ductal infiltrante, cuya evaluación clínica, realizada por el Servicio de Patología Mamaria, las estatificó como IIb, IIIa o IIIb, según los criterios de la American Joint Committee of Cancer (AJCC) del año 1997. Se excluyeron aquellas pacientes con un diagnóstico anatomopatológico distinto al adenocarcinoma ductal infiltrante, pacientes de sexo masculino, pacientes con la enfermedad en estadios clínicos tempranos (I y IIa) o enfermedad en estadio IV, pacientes con seguimiento menor de 24 meses, pacientes cuyo bloque de parafina no se encontró almacenado en el Servicio de Anatomía Patológica del IOMPC, o se encontró en mal estado para su procesamiento y pacientes con segundas neoplasias malignas primarias sincrónicas y/o metacrónicas.

Se seleccionaron 58 pacientes, de los cuales se recopiló información acerca de datos personales, edad e información sobre el tratamiento recibido: tipo de quimioterapia neoadyuvante y adyuvante, tipo de ciru-

gía, radioterapia, se especificó la temporalidad de los mismos y la respuesta clínica al tratamiento neoadyuvante. Se recogieron los datos del informe de biopsia: presencia o no de tumor y el tamaño del mismo en la pieza de mastectomía, posterior al tratamiento neoadyuvante, grado histológico, grado nuclear, estado ganglionar, evolución de la paciente especificando la presencia de recaídas, progresión de enfermedad o muerte y el tiempo en el cual sucedieron. Todos estos datos fueron asentados en un formulario (encuesta semiestructurada) previamente elaborado.

De las pacientes evaluadas, 52 recibieron quimioterapia neoadyuvante (quimioterapia primaria previa al procedimiento quirúrgico radical), en base al régimen FAC (Fluoracilo, Adriamicina, Ciclofosfamida) a dosis estándar, por 3 ciclos; 8 pacientes no recibieron neoadyuvancia o recibieron un régimen distinto al FAC (CMF: ciclofosfamida, metrotexate, fluoracilo). En las 50 pacientes que recibieron FAC, se evaluó la respuesta clínica, obteniendo un promedio de las medidas del tumor primario previo al inicio del tratamiento y a las medidas tomadas a las tres semanas posterior al tercer ciclo de quimioterapia neoadyuvante y la respuesta patológica, de acuerdo a si el informe de biopsia de la mastectomía reporta o no tumor infiltrante. Se tomó como respuesta completa, clínica o patológica, la no evidencia de tumor clínicamente evaluable posterior a culminar la neoadyuvancia o la no evidencia de tumor infiltrante en el informe de biopsia de la mastectomía, respectivamente. Las respuestas parciales se relacionaron a las disminuciones de las dimensiones, del tumor primario entre el 50 y el 99%. Aumentos menores al 25% o disminuciones menores al 50% se tomaron como estabilización de enfermedad. Y aumentos por encima del 25% y/o aparición de nuevas lesiones se correspondieron con progresión de enfermedad.

El procesamiento del bloque celular para la determinación de la expresión del HER2/neu, se realizó en la Unidad de Anatomía Patológica del Hospital Metropolitano del Norte, Valencia, estado Carabobo, Venezuela; se utilizaron muestras histológicas tumorales embebidas en parafina, archivadas en el Servicio de Anatomía Patológica del Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño" de Valencia. El estudio por inmunohistoquímica fue realizado empleando la técnica de avidina-estreptavidina-peroxidasa y como cromógeno, la diaminobencidina (15). Se realizaron cortes de 3 micras de todos los tejidos, que fueron colocados en portaobjetos de vidrio pretratados con poly-L-lisina. Se desparafinaron, luego se colocó peróxido de hidrógeno para inhibir la peroxidasa endógena. Previa aplicación de bloqueador de proteínas inespecíficas, se determinó la expresión del HER2/neu utilizando el Kit-5206-con anticuerpo de conejo contra la proteína HER2 humana, diluido a 0,05 mol/L. Siguiendo el protocolo de procedimiento recomendado en el Manual de Interpretación DAKO Herceptest. se asignó una puntuación de 0 a 3+: 0 como negativo (no se observa tinción o se observa en menos del 10% de las células tumorales); 1+ negativo (tinción leve, apenas perceptible de la membrana en más del 10% de las células tumorales); 2+ débilmente positivo (tinción completa, débil a moderada, de la membrana en más del 10% de las células tumorales) y 3+ intensamente positivo (tinción completa, intensa, de la membrana en más del 10% de las células tumorales) (15).

A fin de realizar el análisis estadístico e interpretación de los resultados, los datos fueron procesados a través del programa estadístico SSPS-10 (16), por técnicas estadísticas univariantes de frecuencia y porcentaje, así como comparación de curvas de supervivencia actuarial de Kaplan-Meier y análisis multivariante mediante regresión logística de Cox (17). Para determinar la significancia esta-

dística se utilizó la prueba de Long Rank, con un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS

La media de edad fue de 48 años \pm 10,09 (Rango: 28-71 años). Las características de las pacientes se observa en la Tabla I, donde pueden apreciarse frecuencias similares de los tres estadios clínicos en estudio.

Al analizar la distribución de los casos según los niveles de expresión del HER2/neu en la membrana de las células neoplásicas, se encontró que en 48,3% de los tumores la expresión del receptor fue negativa, en 13,8% se expresó como positivo débil y 37,9% presentó una sobreexpresión del mismo (positivo fuerte).

La media de seguimiento fue de 42 meses \pm 14,03 (Rango: 12-64 meses). En el análisis univariable a través de la curva de sobrevida actuarial de Kaplan-Meier (Fig. 1), se apreció que solo un caso (4,55%) de las

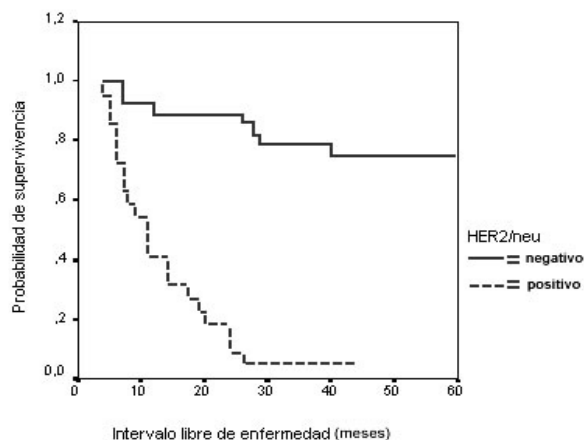


Fig. 1. Estimador de Kaplan-Meier. Intervalo libre de enfermedad (ILE).

pacientes cuyos tumores sobreexpresaron la proteína del receptor HER2/neu fuertemente (+++), se encontraba libre de enfermedad en el periodo de seguimiento, en comparación con 75% (21 casos) de las pacientes sin expresión de la misma, lo cual resultó estadísticamente significativo ($p < 0,001$).

TABLA I
CARACTERÍSTICAS DE LAS PACIENTES

Variable	n	%
Edad media 48 años \pm 10,09		
\leq 40 años	15	25,9
$>$ 40 años	43	74,1
Estado nodal (metástasis)		
$>$ 4 ganglios linfáticos	24	41,4
1 a 3 ganglios linfáticos	17	29,3
Sin metástasis ganglionar	17	29,3
Estadío clínico		
IIb	23	39,7
IIIa	16	27,6
IIIb	19	32,8
Grado histológico		
I	5	8,6
II	24	41,4
III	29	50
Receptores hormonales		
Positivos	26	44
Negativos	32	56

Así mismo, se observó que la supervivencia global, durante el periodo de seguimiento, fue de 82,14% en las pacientes sin expresión del HER2/neu y de 31,82% en las pacientes cuyos tumores expresaron fuertemente la proteína. La prueba de Long Rank mostró diferencias significativas en las curvas ($p < 0,001$) (Fig. 2).

El análisis de otras variables clínico-patológicas como la edad, estadio clínico, grado histológico del tumor, estado ganglionar y estado del receptor hormonal para evaluar el intervalo libre de enfermedad (ILE), demostró que tanto el estado ganglionar como el estado de los receptores hormonales resultaron ser variables pronósticas significativas para predecirlo. En detalle, 87,5% de las pacientes con ganglios negativos se encontraba libre de enfermedad al concluir el seguimiento, mientras que sólo 33,33% de las pacientes con ganglios positivos lo estaban en dicho periodo ($p < 0,001$). Así mismo, el 70,37% de las pacientes cuyos tumores expresaban receptores hormonales positivos, se encontraban libres de enfermedad, mientras que solo lo estaba 29,03% de las pacientes con receptores hormonales negativos ($p < 0,05$). Por otra parte, para las variables de edad menor o igual a 40 años, estadio y grado histológico, la diferencia no resultó estadísticamente significativa en las pruebas de Long Rank (Tabla II).

Al evaluar la supervivencia global de las pacientes con carcinoma ductal infiltrante de mama localmente avanzado, las pacientes con ganglios positivos presentaron 52,38% de supervivencia, mientras que en las pacientes con ganglios negativos, ésta fue de 93,75%, ($p < 0,005$). El estado de los receptores hormonales también resultó un factor de valor pronóstico significativo para la supervivencia de estas pacientes, con 81,48% para las pacientes con receptores hormonales positivos y de 48,39% para las pacientes con receptores hormonales negativos ($p < 0,02$). Otras variables

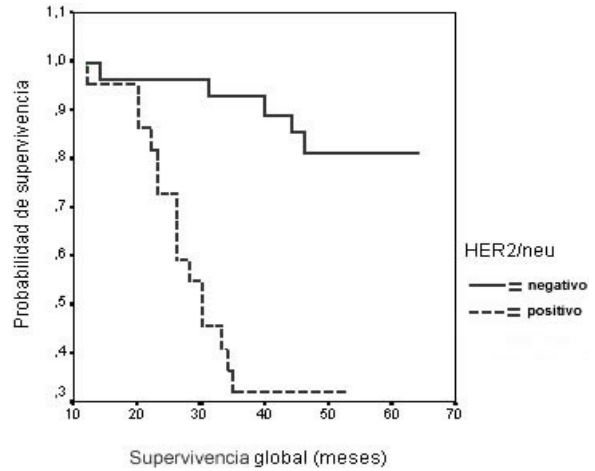


Fig. 2. Estimador de Kaplan-Meier. Curva de supervivencia global (SG).

TABLA II
INTERVALO LIBRE DE ENFERMEDAD (ILE)
EN PACIENTES CON CARCINOMA DUCTAL
INFILTRANTE DE MAMA LOCALMENTE
AVANZADO

Variable	Intervalo libre de enfermedad (ILE) estimado*
Edad	
≤ 40 años	38,46%
> 40 años	51,11%
Estadio	
II b	56,52%
III a	43,75%
III b	42,11%
Grado histológico	
I	100%
II	42,86%
III	36%
Ganglios**	
Positivos	33,33%
Negativos	87,50%
Receptores hormonales***	
Positivo	70,37%
Negativo	29,03%

*Curvas Kaplan Meier.

**Pruebas Long Rank ($p < 0,001$).

*** Pruebas Long Rank ($p < 0,05$)

como la edad, estadio clínico y grado histológico no mostraron diferencias significativas (Tabla III).

El análisis multivariable de regresión logística de Cox mostró que sólo el nivel de expresión del receptor HER2/neu es un factor pronóstico para predecir el intervalo libre de enfermedad ($p < 0,001$) y la supervivencia global ($p < 0,05$) de las pacientes con carcinoma ductal infiltrante en estadios localmente avanzados.

Se encontró una correlación positiva y significativa ($p < 0,01$) entre los niveles de expresión del HER2/neu en las células tumorales, determinados por inmunohistoquímica, y el estado ganglionar; lo que indica que las pacientes con fuerte expresión del HER2/neu tienden a presentar ganglios positivos y las pacientes HER2/neu negativos tienden a tener ganglios negativos. Así mismo, no se encontró correlación entre el nivel de expresión de la oncoproteína y el estado de los receptores hormonales en el tumor.

El 12,1% (7 casos) de las pacientes que recibieron régimen de quimioterapia neoadyuvante, esquema FAC, presentó una respuesta clínica completa y 8,6% (5 casos) una respuesta patológica completa; en el caso de respuestas parciales, en el 55,2% (32 casos) fueron clínicas y 58,6% (34 casos) patológicas; en 15,5% y 19% de las pacientes no hubo respuesta clínica y patológica al tratamiento, respectivamente.

Al correlacionar el tipo de respuesta clínica y patológica según el nivel de sobreexpresión del HER2/neu, se observó una tendencia a obtener respuestas completas tanto clínicas como patológicas en pacientes HER2/neu negativos; por el contrario, los pacientes con fuerte sobreexpresión de la oncoproteína parecían tener una tendencia a la quimiorresistencia con el régimen FAC, sin embargo el reducido número de casos invalidó la utilización de métodos estadísticos de prueba.

TABLA III
SUPERVIVENCIA GLOBAL EN PACIENTES
CON CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE
DE MAMA, LOCALMENTE AVANZADO

Variable	Sobrevivencia Global (SG) estimada*
Edad	
≤ 40 años	46,15%
> 40 años	68,89%
Estadio	
II b	69,57%
III a	62,50%
III b	57,89%
Grado histológico	
I	100%
II	60,87%
III	57,14%
Ganglios**	
Positivos	52,38%
Negativos	93,75%
Receptores hormonales***	
Positivo	81,48%
Negativo	48,39%

* Curvas Kaplan Meier. ** Pruebas Long Rank ($p < 0,005$). *** Pruebas Long Rank ($p < 0,02$).

DISCUSIÓN

El interés principal del presente trabajo fue analizar el valor pronóstico y predictivo de la sobreexpresión del HER2/neu en pacientes con adenocarcinoma ductal infiltrante localmente avanzado, tratadas en el Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño".

De las 58 pacientes estudiadas, 37,9% presentó sobreexpresión del HER2/neu en la membrana de las células neoplásicas, hallazgo que coincide con la literatura, la cual sitúa la sobreexpresión de esta oncoproteína en aproximadamente un 30% de los carcinomas infiltrantes de mama, con un rango entre el 10 y el 40% en las distintas series (18, 19).

En la curva de supervivencia actuarial de Kaplan-Meier, se apreció que solo un

caso de las pacientes cuyos tumores sobreexpresaron la proteína del receptor HER2/neu fuertemente, se encontraba libre de enfermedad en el periodo de seguimiento ($p < 0,001$). Así mismo, la sobrevida global de las pacientes presentó un valor de 82,14% en aquellos casos sin expresión del HER2/neu, lo que coincide ampliamente con la literatura, la cual señala que la sobreexpresión de la proteína del gen HER2/neu es un indicador independiente de mal pronóstico, que predice una disminución tanto del intervalo libre de enfermedad como de la sobrevida global en pacientes con carcinoma infiltrante de mama HER2/neu positivas (20).

El estado ganglionar y el estado de los receptores hormonales resultaron ser variables pronósticas significativas para predecir el ILE. Se observó así que 87,5% de los pacientes con ganglios negativos y 70,37% de los pacientes cuyos tumores expresaron receptores hormonales positivos, se encontraban libres de enfermedad al concluir el seguimiento. Las pacientes con ganglio negativos mostraron una sobrevida global de 93,75% y en las pacientes con receptores hormonales positivos fue de 81,48% ($p < 0,01$). Estos resultados se corresponden con lo ya plenamente establecido, que los ganglios axilares positivos representan un factor pronóstico de extraordinaria importancia en pacientes con carcinoma infiltrante de la mama. La sobrevida global, recidiva, velocidad de la recidiva y fracaso del tratamiento se correlacionan con el número de ganglios axilares positivos. Así mismo, numerosos estudios han confirmado que el periodo libre de enfermedad y la media de sobrevida global son mayores en pacientes con tumores receptores de estrógeno y progesterona positivos (20-23).

Al correlacionar el tipo de respuesta clínica y patológica según el nivel de sobreexpresión del HER2/neu, se observó una tendencia a obtener respuestas completas

tanto clínica como patológica en pacientes HER2/neu negativo, por el contrario, los pacientes con fuerte sobreexpresión de la oncoproteína parecieran tener una tendencia a la quimiorresistencia con el régimen FAC. Los reportes de la literatura en este tópicó tienden a ser contradictorios, por una parte los estudios refieren un posible beneficio de la terapia basada en antraciclina, a dosis óptimas, en pacientes con tumores HER/2neu positivos (24-26). Sin embargo, otros estudios no confieren al estatus del HER2/neu capacidad para predecir la respuesta al tratamiento quimioterápico (27-29). En conclusión, la sobreexpresión del receptor HER2/neu está relacionada con una reducción del intervalo libre de enfermedad y de la supervivencia global, en pacientes con carcinoma ductal infiltrante de mama localmente avanzado, por lo que puede ser utilizado como factor pronóstico para predecir la evolución de la enfermedad. Por otro lado, el estado ganglionar y de los receptores hormonales pudieran ser factores indicadores de mal pronóstico, tanto de reducción del intervalo libre de enfermedad como de disminución de la supervivencia global. Se encontró una correlación positiva, significativa e inversa entre los niveles de expresión del HER2/neu en las células tumorales, determinados por inmunohistoquímica, y el estado ganglionar. Los tumores que sobreexpresaron fuertemente el receptor HER2/neu mostraron una tendencia a presentar menor respuesta al tratamiento quimioterápico neoadyuvante, régimen FAC.

REFERENCIAS

1. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *Br Med J* 2000; 32:624-628.
2. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:10-30.

3. **Anuario de mortalidad 2004.** Ministerio de Salud, Venezuela. 2005. Disponible en http://www.msds.gov.ve/msds/direcciones_msds/Epidemiología/Estadística/Index.htm.
4. **Denley H, Pinder SE, Elston WC, Lee AH, Ellis IO.** Preoperative assessment of prognostic factors in breast cancer. *J Clin Pathol* 2001; 54: 20-24.
5. **Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM.** Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists consensus statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:966-978.
6. **Hlupic L, Jakic-Razumovic J, Bozikov J, Coric M, Belev B, Vrbancic D.** Prognostic value of different factors in breast carcinoma. *Tumori* 2004; 90:112-119.
7. **Subramaniam DS, Isaacs C.** Utilizing prognostic and predictive factors in breast cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2005; 6:147-159.
8. **Sundblad A, Xynos F, Caprarulo L.** Cáncer de mama en mujeres mayores de 65 años. *Rev Argent Ciruj* 1999; 76:224-228.
9. **Rapiti E, Fioretta G, Verkooijen HM, Vlastos G, Schafer P, Sappino AP, Kurtz J, Neyroud-Caspar I, Bouchardy C.** Survival of young and older breast cancer patients in Geneva from 1990 to 2001. *Eur J Cancer* 2005; 41:1446-1452.
10. **El-Ahmady O, el-Salahy E, Mahmoud M, Wahab MA, Eissa S, Khalifa A.** Multivariate analysis of *bc1-2*, apoptosis, *p53*, and HER-2/neu in breast cancer: a short-term follow-up. *Anticancer Res* 2002; 22:2493-2499.
11. **San Miguel A, González-Blanco I, García-Iglesias R, Alonso N, Rodríguez-Bujez AB, Martín-Medrano EM, Martín-Gil FJ.** Factores pronósticos del cáncer de mama y oncogén HER2/neu. *Rev Electron Biomed* 2006; 2:72-88.
12. **Yamashita H, Nishio M, Toyama T, Sugiera M, Zhang Z, Kobayashi S, Iwase H.** Coexistence of HER2 over-expression and *p53* protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004; 6:24-30.
13. **Zadrozny M, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, Kozłowska E, Kuli.** Genetic analysis of HER-2/neu gene amplification in paraffin embedded tumour tissue in women with breast cancer. *Pol J Pathol* 2002; 53:189-193.
14. **Albanell-Mestres J, Muñoz-Mateo M, Gascón P.** ErbB tyrosine kinase receptor inhibitors in breast cancer. *Rev Oncol* 2004; 6:12-21.
15. **Dako Herceptest.** A manual for interpretation. 2002. [Documento en línea]. Disponible en: <http://www.pri.dako.com/herceptestmanual.pdf>
16. **SPSS-10 Guía de análisis estadístico de datos.** [Documento en línea]. Disponible en: <http://www2.uca.es/serv/ai/formacion/spss/Pantalla/verguia.pdf>.
17. **de Ramón Garrido E, Fernández O.** Estadística para los clínicos VI. Análisis de supervivencia multivariante II. s.f. [Documento en línea]. Disponible en: <http://www.fedem.org/revista/n12/estadistica.htm>.
18. **Alfred DC, Clark GM, Tandon AK, Molina R, Tormey DC, Osborne CK, Gilchrist KW, Mansour EG, Abeloff M, Eudey L.** HER 2/neu in node-negative breast cancer. Prognostic significance over expression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol* 1992; 10:599-605.
19. **Robinson AG, Turbin D, Thomson T, Yorida E, Ellard S, Bajdik C, Huntsman D, Gelmon K.** Molecular predictive factors in patients receiving trastuzumab-based chemotherapy for metastatic disease. *Clin Breast Cancer* 2006; 7:254-261.
20. **Ross JS, Fletcher JA.** The HER2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. *Stem Cells* 1998; 16:413-428.
21. **Collins LC, Botero ML, Schnitt SJ.** Bimodal frequency distribution of estrogen receptor immunohistochemical staining results in breast cancer: an analysis of 825 cases. *Am J Clin Pathol* 2005; 123:16-20.
22. **Tokatli F, Altaner S, Uzal C, Ture M, Kocak Z, Uygun K, Bilgi S.** Association of HER-2/neu overexpression with the number of involved axillary lymph nodes in hormone receptor positive breast cancer patients. *Exp Oncol* 2005; 27:145-149.
23. **Horita K, Yamaguchi A, Hirose K, Ishida M, Noriki S, Imamura Y, Fukuda M.** Prog-

- nostic factors affecting disease-free survival rate following surgical resection of primary breast cancer. *Eur J Histochem* 2001; 45:73-84.
24. **Muss HB, Thor AD, Berry DA.** C-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node positive early breast cancer. *N Engl J Med* 1994; 330: 1260-1266.
 25. **Paik S, Bryant J, Park C.** erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node positive, hormone receptor negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1361-1370.
 26. **Ravdin PM.** Is HER2 of value in identifying patients who particularly benefit from anthracyclines during adjuvant therapy? A qualified yes. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001; (30):80-84.
 27. **Hamilton A, Piccart M.** The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: A review of the literature on HER-2, p53 and BCL-2. *Ann Oncol* 2000; 11:647-663.
 28. **Andersson J, Larsson L, Klaar S, Holmberg L, Nilsson J, Inganäs M, Carlsson G, Ohd J, Rudenstam CM, Gustavsson M, Bergh J.** Worse survival for TP53 (p53)-mutated breast cancer patients receiving adjuvant CMF. *Ann Oncol* 2005; 16:743-748.
 29. **Rozan S, Vicent-Salomon A, Zofrani B.** No significant predictive value of c-erbB-2 or p53 expression regarding sensitivity to primary chemotherapy or radiotherapy in breast cancer. *Int J Cancer* 1998; 79:72-82.