

Evaluación de la amplificación del oncogén *HER2* en pacientes con cáncer de mama a través de la técnica de hibridación *in situ* cromogénica (CISH)

Ángel Fernández^{1,2}, Aldo Reigosa¹, Eduardo Caleiras³, Mai Lyng Hung¹, Felipe Saldivia⁴, Néstor Gutiérrez⁴

RESUMEN

El protooncogén *HER2* se encuentra localizado en el cromosoma 17. Codifica una glicoproteína transmembrana llamada receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (*HER2*). Está amplificado a bajos niveles en muchos tejidos normales y regula el crecimiento, diferenciación y muerte celular. La sobreexpresión de *HER2* es el resultado de anomalías en la amplificación del oncogén *HER2*. El objetivo de este trabajo fue evaluar la amplificación del oncogén *HER2* en pacientes con cáncer de mama a través de la técnica de hibridación *in situ* cromogénica (CISH). La muestra estuvo constituida por 200 biopsias fijadas en formol al 10%, procesadas por las técnicas habituales hasta la inclusión en parafina, correspondientes a pacientes diagnosticadas con carcinoma ductal infiltrante de la mama, procedentes de consulta privada y del Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño", con estudio inmunohistoquímico realizado en el Hospital Metropolitano del Norte en Valencia. Se encontró una asociación estadísticamente significativa ($p < 0,001$) de la amplificación de *HER2* con los diferentes niveles cuantitativos del producto de expresión del gen. Cabe destacar que hubo 16 (11%) de 146 casos considerados negativos desde el punto de vista inmunohistoquímico para la expresión de *HER2*, que resultaron amplificados para el oncogén a través de la CISH. Asimismo, más de la mitad (52,4%) de los casos positivos (3+) no presentaron amplificación. Este estudio demuestra la importancia de realizar la determinación de la amplificación de *HER2* en los casos con resultado de 1+ por inmunohistoquímica, al evidenciar que el 12,3% de los casos son positivos a la amplificación del oncogén.

Palabras clave: Cáncer de mama, *HER2*, hibridación *in situ* cromogénica.

¹ Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

² Departamento de Ciencias Fisiológicas. Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

³ Unidad de Diagnóstico Anatomopatológico. Hospital Metropolitano del Norte. Valencia, Venezuela.

⁴ Servicio de Patología Mamaria del Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño". Valencia, Venezuela.

Correspondencia: Ángel Fernández.

E-mail: angelbiouc@gmail.com.

Recibido: Mayo 2013 **Aprobado:** Marzo 2014

ABSTRACT

Evaluation of *HER2* oncogene amplification in breast cancer patients through technical chromogenic *in situ* hybridization.

HER2 proto-oncogene is located on chromosome 17. It encodes a transmembrane glycoprotein called human epidermal growth factor receptor 2 (*HER2*). It is amplified at low levels in many normal tissues and regulates growth, differentiation and cell death. *HER2* overexpression is the result of abnormalities in the *HER2* oncogene amplification. The aim of this study was to evaluate the *HER2* oncogene amplification in patients with breast cancer through the chromogenic *in situ* hybridization (CISH) technique. The sample consisted of 200 biopsies fixed in 10% formalin, processed by standard techniques to paraffin embedding, from patients diagnosed with infiltrating ductal carcinoma of the breast, coming from private practice and the Institute of Oncology "Dr. Miguel Pérez Carreño", with immunohistochemical study performed at Northern Metropolitan Hospital in Valencia. It was found a statistically significant association ($p < 0.001$) of *HER2* amplification with different quantitative levels of the product of the gene expression. It is noteworthy that there were 16 (11%) of 146 cases considered negative from the immunohistochemical point of view for the *HER2* expression, that proved to be amplified for the oncogene through the CISH. Likewise, it is emphasized that more than half (52.4%) of the positive cases (3+) showed no amplification. This study shows the importance of the determination of *HER2* amplification in cases result of 1+ by immunohistochemistry, demonstrating a 12.3% positive for these cases to the oncogene amplification.

Key words: Breast cancer, *HER2*, chromogenic *in situ* CISH.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es el crecimiento tisular patológico originado por una proliferación continua de células anormales. El cáncer de mama ocurre cuando las células de la glándula mamaria crecen sin control, debido a que éstas escapan de los exquisitos controles que regulan la multiplicación celular, ocasionando una proliferación celular sin respuesta a la regulación (1).

Muchos de estos tumores son el resultado de mutaciones que afectan esencialmente a genes de dos tipos: a) oncosupresores y b) protooncogenes. Los genes oncosupresores causan cáncer como consecuencia de una mutación experimentada por la forma normal, llamada también, gen supresor de tumores o antioncogén. Por otra parte, el protooncogén codifica una proteína normal, generalmente relacionada con la proliferación celular

o la apoptosis, que actúa sólo cuando recibe señales reguladoras específicas. Por el contrario, la forma mutada u oncogén expresa una proteína anormal (oncoproteína) que se mantiene activa independientemente de las señales reguladoras (2,3).

Las alteraciones en cualquiera de estos dos tipos de genes pueden contribuir al desarrollo o progresión del fenotipo maligno. Los principales mecanismos mediante los cuales estos genes participan en la carcinogénesis son la amplificación (incremento en el número de copias del gen) y la sobreexpresión de sus productos de expresión (2,4).

El protooncogén *HER2* se encuentra localizado en el cromosoma 17, codifica una glicoproteína transmembrana con actividad tirosina quinasa intrínseca, llamada receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (*HER2*), que promueve la activación de cascadas de señalización intracelular, regulando el crecimiento, supervivencia, adhesión, migración y la diferenciación celular. Está amplificado a bajos niveles en muchos tejidos normales (1 a 5 copias por núcleo), incluyendo el tejido mamario sano. La sobreexpresión de *HER2*, como resultado de anomalías en la amplificación de *HER2* (más de 10 copias por núcleo), ocasiona reproducción celular sin control (5,6).

La oncoproteína *HER2* se encuentra sobreexpresada de un 20 a 30% en los carcinomas de mama, los cuales se caracterizan por presentar resistencia a los tratamientos convencionales de quimioterapia y terapia hormonal (5-7).

Se ha comercializado con autorización para uso clínico, un anticuerpo monoclonal humanizado específico dirigido contra el receptor *HER2* (anti-*HER2* o trastuzumab), el cual interfiere en las funciones de señalización de la oncoproteína, inhibiendo la proliferación celular (7-9).

En tal sentido, actualmente la determinación de la amplificación de *HER2* en pacientes con carcinoma ductal infiltrante de mama permite establecer el pronóstico, predecir la respuesta terapéutica, definir el tratamiento y evaluar el empleo de trastuzumab (6,10,11).

Ante la necesidad de desarrollar tratamientos más efectivos y específicos, se requieren marcadores que permitan predecir más acertadamente el beneficio terapéutico. En las últimas décadas se han realizado revisiones de trabajos que incluyen más de 15.000 pacientes, las cuales han demostrado la importancia de la determinación de la sobreexpresión y la determinación de *HER2* como valor pronóstico y orientación terapéutica en mujeres con carcinoma de mama (12).

Este trabajo representa el primer estudio venezolano publicado de evaluación de la amplificación de este oncogén a través de CISH, por lo tanto y conociendo que su producto de expresión es susceptible de ser una diana terapéutica, se planteó como propósito de este trabajo, evaluar la amplificación del oncogén *HER2* en pacientes con cáncer de mama a través de la técnica de hibridación *in situ* cromogénica (CISH).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de campo, descriptivo, transversal y retrospectivo. Con la aprobación del Comité de Ética y de la Comisión de Investigación del Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño", se conformó una muestra no aleatoria, de tipo intencional, con 200 pacientes, de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión: 1) sexo femenino, 2) diagnóstico anatomopatológico de carcinoma ductal infiltrante de la mama, 3) resultado de inmunohistoquímica (IHQ) para receptor de estrógeno y progesterona (RE y RP, respectivamente), realizado en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Metropolitano del Norte (HMN) de Valencia, Estado Carabobo, 4) disponibilidad de las preparaciones histológicas y bloques de parafina respectivos correspondientes al diagnóstico inicial, en el archivo del Servicio de Anatomía Patológica del HMN y 5) suficiente tejido tumoral para realizar las matrices de tejido. Se excluyeron casos con estudio de IHQ realizados en otros laboratorios para garantizar mayor uniformidad y por accesibilidad a las preparaciones histológicas y bloques de parafina respectivos.

La información relevante para la investigación: a) diagnóstico anatomopatológico y b) resultados de los niveles de expresión inmunohistoquímica para RE, RP y *HER2*, fue obtenida de los informes de IHQ archivados en el Servicio de Anatomía Patológica del HMN.

Construcción de la matriz de tejidos: Todas las muestras tisulares habían sido fijadas previamente en formol al 10% e incluidas en parafina siguiendo los métodos convencionales.

Las matrices de tejido y la CISH fueron realizadas en el Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo (CIMBUC), siguiendo el siguiente procedimiento: a) de los bloques de parafina se obtuvieron secciones histológicas de 4 µm de espesor que posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina, b) se revisaron las preparaciones histológicas y se seleccionaron las zonas con tumor, marcando esas mismas áreas en el bloque de parafina, c) se prepararon los bloques receptores o bloques únicamente de parafina, de un tamaño aproximado de 5 por 4 cm y adheridos al cassette, d) se seleccionaron los bloques donantes y se dividieron en grupos, estableciéndose el orden de éstos en una plantilla que sirvió después para la lectura en el microscopio, e) se realizó el troquelado de los bloques de parafina receptores con la ayuda de una aguja que permitió extraer un cilindro de parafina, dejando el espacio donde se introducen los cilindros obtenidos de los bloques donantes, f) seguidamente con otra aguja de menor calibre se obtuvo el cilindro con el material de la zona marcada previamente en el bloque donante y se introdujo finalmente en el bloque receptor, g) al culminar el proceso de inclusión de muestras en todos los bloques, se introdujo el bloque receptor en la estufa a una temperatura de 45°C durante 5 min, para que la parafina de los cilindros y del

bloque receptor se amoldaran y la superficie se alisara, h) las muestras fueron distribuidas en base a los patrones del HercepTest™, cada bloque contenía tumores con diferentes niveles de expresión de *HER2* (0, 1+, 2+, 3+) y controles negativos (0+) y positivos (3+), i) se realizaron cortes histológicos de 2 µm en un micrótopo y j) cada uno de los cortes fue recogido en láminas portaobjetos tratadas previamente con poly-L-lisina. En total se construyeron 7 bloques receptores (6 con 30 casos y 1 con 20 casos). Finalmente, se procedió a la realización de la técnica de la CISH.

Técnica de hibridación *in situ* cromogénica: Para la realización de la técnica se utilizó el *kit* SPOT-Light® *HER2* CISH de Invitrogen. Después de la desparafinación, las muestras fueron sometidas a un paso de pre-tratamiento al calor seguido por una digestión enzimática. Seguidamente fueron deshidratadas y secadas al aire antes de la adición de la sonda *HER2* marcada con digoxigenina (DIG). Luego de 5 min a 95°C en un hibridador de SPOT-Light® CISH™, la sonda se desnaturaliza e hibrida en la región complementaria del ácido desoxirribonucleico (ADN) presente en la muestra durante toda la noche. A continuación, las muestras se lavaron para eliminar la sonda no hibridada y la señal fue detectada cromogénicamente por adición secuencial del anticuerpo primario (anti-DIG), seguido del anticuerpo secundario (anti-anticuerpo conjugado con peroxidasa del rábano). El color se desarrolló mediante la reacción enzimática con el cromógeno diaminobencidina en presencia de peróxido de hidrógeno. Finalmente se llevó a cabo la contraindicación de la muestra con hematoxilina de Mayer.

Interpretación de los resultados del estudio de hibridación: El estado de amplificación de *HER2* se evaluó de acuerdo a los estándares establecidos en la guía para la interpretación de resultados incluido en el *kit* SPOT-Light®

HER2 CISH de Invitrogen. Dichos estándares coinciden con los criterios establecidos en diversas investigaciones para evaluar el estado de amplificación del oncogén *HER2* en muestras de carcinoma de mama embebidas en parafina, así, se consideraron las siguientes situaciones: a) no amplificación: 1 a 5 copias por núcleo en más del 50% de células tumorales en el área de tejido elegida para la evaluación, b) baja amplificación: 6 a 10 copias por núcleo en más del 50% de células tumorales en el área de tejido elegida para la evaluación y c) amplificación: más de 10 copias por núcleo en más del 50% de células tumorales en el área de tejido elegida para la evaluación. Cada cilindro de las matrices de tejidos fue analizado microscópicamente y los datos recogidos se anotaron en tablas diseñadas para tal fin. A los casos dudosos se les tomó fotografías utilizando un microscopio de campo claro con una cámara incorporada y conectada al ordenador. Luego se contó el número de copias de *HER2* en cada núcleo de célula tumoral utilizando el programa Bronze, elaborado por el Ingeniero Víctor Barrios de la Universidad de Carabobo. De igual forma que para el resto de los casos; la interpretación de los resultados se basó en los estándares previamente establecidos. En los casos con diversos patrones de amplificación intratumoral de *HER2*, se consideró el patrón de amplificación predominante.

Análisis estadístico: A fin de realizar el análisis estadístico e interpretación de los resultados, los datos fueron procesados a través del programa estadístico SSPS/PC versión 19. Se consideraron significativos valores de $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

La Figura 1 muestra ejemplos representativos de los patrones de amplificación de *HER2* observados a través de la técnica de CISH.

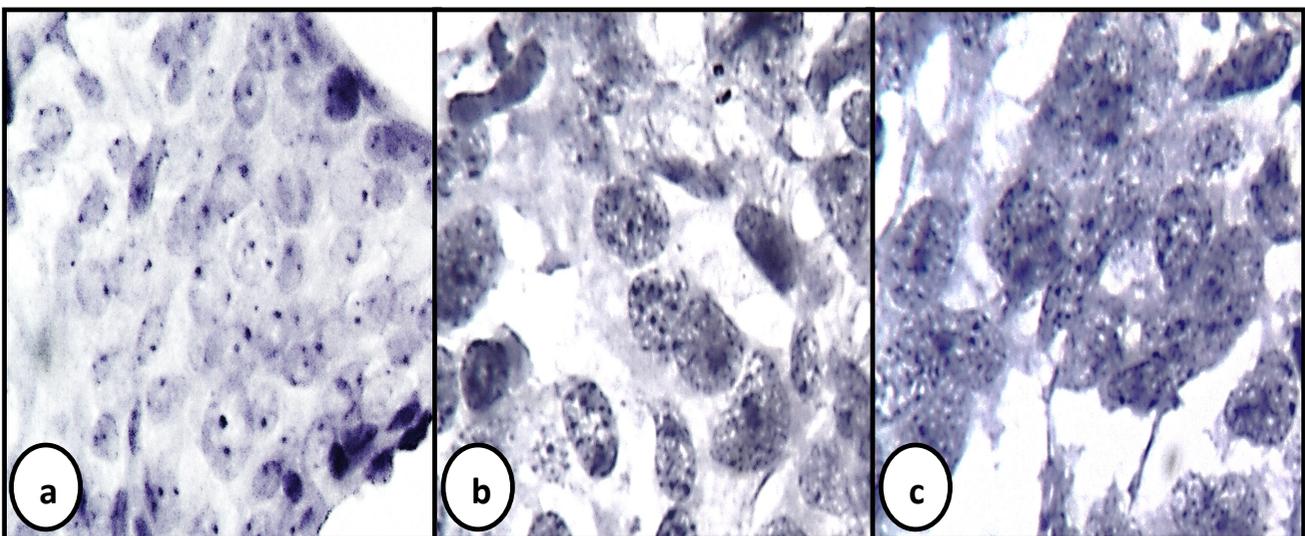


Figura 1. Tumores de carcinoma de mama negativos y positivos a la amplificación de *HER2* utilizando la técnica de hibridación *in situ* cromogénica (CISH). a) No amplificación. Células neoplásicas mostrando un número normal de copias del gen *HER2* (1 a 5 copias por núcleo) (200x). b) Baja amplificación. Presencia de más de 6 copias del gen *HER2* por núcleo de célula tumoral (400x). c) Amplificación. Numerosas señales (más de 10 copias) en cada núcleo de célula tumoral (400x).

La expresión de HER2 y su relación con la amplificación de *HER2* se presentan en la Tabla 1. Se encontró una asociación estadísticamente significativa ($P < 0,001$) de la amplificación de *HER2* con los diferentes niveles del producto de expresión del gen. Cabe destacar que hubo 16 (11%) de 146 casos considerados negativos desde el punto de vista inmunohistoquímico para la expresión de HER2, que resultaron amplificados para el oncogén a través de la CISH. Asimismo, se destaca que más de la mitad (52,4%) de los casos positivos (3+) no presentaron amplificación.

Tabla 1. Comparación entre la expresión de HER2 y la amplificación de *HER2* obtenidas a través de *IHQ y **CISH

IHQ	CISH [n (%)]		
	No amplificación	Amplificación	Total
0+	37 (92,5)	3 (7,5)	40 (20)
1+	93 (87,7)	13 (12,3)	106 (53)
2+	27 (81,8)	6 (18,2)	33 (16,5)
3+	11 (52,4)	10 (47,6)	21 (10,5)
Total	168 (84)	32 (16)	200 (100)

$P < 0,001$.

*IHQ: Inmunohistoquímica; **CISH: Hibridación in situ cromogénica.

Por su parte, en la Tabla 2, se discriminan los casos no amplificados, encontrándose que 13 de 106 casos (12,3%) de los tumores considerados *HER2* 1+ desde el punto de vista inmunohistoquímico resultaron con baja amplificación.

Tabla 2. Comparación entre la expresión de HER2 y los diferentes niveles de amplificación de *HER2* obtenidas a través de *IHQ y **CISH

	CISH [n (%)]			Total
	NA	*BA	*****A	
0+	30 (75)	7 (17,5)	3 (7,5)	40 (20)
1+	80 (75,5)	13 (12,3)	13 (12,3)	106 (53)
2+	23 (69,7)	4 (12,1)	6 (18,2)	33 (16,5)
3+	11 (52,4)	---	10 (47,6)	21 (10,5)
Total	144 (72)	24 (12)	32 (16)	200 (100)

$P = 0,002$

*IHQ: Inmunohistoquímica; **CISH: Hibridación in situ cromogénica;

NA: No amplificación; *BA: Baja amplificación;

*****A: Amplificación.

DISCUSIÓN

La CISH es un método implementado recientemente que cuenta con la habilidad de poder marcar el ADN a partir de la unión de sondas de hibridación *in situ* a secciones específicas del ácido nucleico complementario en la muestra, que son detectadas con reactivos similares a los usados en inmunohistoquímica. Los resultados de la hibridación pueden visualizarse dentro del contexto de la morfología circundante del tejido al utilizar un microscopio de luz. Por lo tanto, se observa la morfología del tejido y las aberraciones del gen simultáneamente (4,13,14).

Este trabajo reporta por primera vez en Venezuela, los diversos patrones de amplificación de *HER2* obtenidos a través de la técnica de CISH. Los mismos coinciden ampliamente con los resultados obtenidos en diversas series (15-17). En la ejecución de la técnica se incluyeron casos positivos (3+) y negativos (0+ y 1+) conocidos a la expresión de *HER2* por IHQ. Se observó una relación estadísticamente significativa ($P < 0,001$) entre los controles definidos por IHQ y los resultados obtenidos por CISH; con una concordancia global de 77% entre las dos técnicas. Este porcentaje es menor al reportado por otros autores, quienes refieren una concordancia global entre ambas técnicas de más del 85% (18-20), datos poco aceptables tomando en cuenta que el tratamiento dependerá de los resultados inmunohistoquímicos.

No obstante, con los resultados obtenidos en este estudio no se puede concluir que la IHQ haya fallado en la detección del estado de *HER2*, puesto que es posible que en algunos casos la causa de la diferencia sea debido a la CISH. Para la correcta interpretación de los resultados, debe contemplarse que se realizó la CISH por primera vez en el CIMBUC, la disponibilidad de los reactivos era limitada para poder repetir las reacciones; no se contó con la FISH (hibridación *in situ* fluorescente, técnica estándar de oro para la determinación de la amplificación de *HER2*) para poder corroborar los resultados de la CISH, y en definitiva, los mismos factores que influyen en el resultado de la IHQ (fijación de la muestra, almacenamiento de las mismas, recuperación antigénica, tipo de anticuerpo, sistema de medición y variabilidad de interpretación entre los observadores), también pudieron incidir en los resultados de la CISH (4,6,21).

Hay que tener en cuenta además, que el cáncer de mama es una enfermedad biológicamente heterogénea, con alta tasa de variabilidad genética (22-24), evidenciada en el hecho de que en un mismo tumor pueden coexistir diferentes patrones de amplificación del oncogén *HER2*, y esta heterogeneidad se asocia con mayor agresividad del tumor y respuesta variable a la terapia empleada para combatirlos (25). Sin embargo, resulta interesante que 13 de 106 casos (12,3%) *HER2* negativo (1+) resultaron amplificados para *HER2* utilizando la CISH. Este porcentaje de casos amplificados no coincide con los reportados en diversos estudios, en donde en la gran mayoría de éstos han encontrado amplificación

en menos de 5% de los casos *HER2* 1+ definidos desde el punto de vista inmunohistoquímico (26-28). No obstante, este hallazgo es importante, ya que trabajos como el de Gilcrease y col. (29) han determinado que el subgrupo de tumores *HER2* 1+ según IHQ se asocia con peor pronóstico, al igual que los tumores con sobreexpresión de *HER2*. En Venezuela, no existen trabajos publicados que comprueben este hecho en la población femenina con cáncer de mama.

En la muestra estudiada se incluyeron tumores con expresión inmunohistoquímica indeterminada (2+), puesto que para éstos la técnica de IHQ es insuficiente para correlacionar la expresión de la proteína en la membrana citoplasmática con la amplificación del gen y requieren de la realización de técnicas de hibridación válidas y estandarizadas, como la CISH (31). En relación a estos últimos casos, se obtuvo por la técnica de CISH que 23 de 33 casos (69,7%) *HER2* 2+ resultaron no tener amplificación de *HER2* (Tabla 2), este hallazgo coincide con Rossi y col. (31), quienes concluyeron en su estudio que la expresión indeterminada (2+) por IHQ en su mayoría arroja un resultado negativo para la amplificación de *HER2*. Sin embargo, esto puede tener repercusiones adversas en pacientes con cáncer de mama, debido a que si se llegaran a valorar estos casos equívocamente como positivos para la sobreexpresión de *HER2*, la paciente recibirá un tratamiento adyuvante postoperatorio (trastuzumab) que puede no limitar el crecimiento del tumor, lo cual ocasionaría una desmejora del pronóstico y la supervivencia de la paciente, aparte del elevado costo de este tratamiento. En el sentido contrario, casos interpretados como negativos y que son positivos, les quitan la posibilidad a estas pacientes de beneficiarse con el tratamiento específico (31).

En conclusión, en este estudio se pudo implementar en el CIMBUC, la técnica de la CISH para la evaluación de la amplificación del oncogén *HER2* en muestras histológicas de pacientes con cáncer de mama. A pesar de que la CISH es una técnica viable de realizar, requiere de una obligatoria estandarización y el uso de un hibridador para obtener resultados fiables. Para su validación y aplicación en forma sistémica, sus resultados deben ser comparados con los obtenidos a través de la FISH.

Finalmente, este estudio demuestra la importancia de realizar la evaluación de la amplificación de *HER2* en los casos con resultado de 1+ por IHQ, al evidenciar un 12,3% de estos casos positivos a la amplificación del gen. Asimismo, es fundamental una determinación exacta y precisa de la amplificación del oncogén *HER2*, puesto que las evaluaciones con resultados falsos negativos negarán a las pacientes el acceso a un tratamiento específico que podría prolongar sus vidas, mientras que los resultados falsos positivos harán que se ofrezca el tratamiento a una paciente que probablemente no se beneficie de él.

AGRADECIMIENTOS. Al Dr. Francisco Menolascino, de la Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado (UCLA),

por facilitar el hibridador utilizado para la realización de la CISH, a la Lcda. Lisbeth Silva del CIMBUC y el Lcdo. Andrius Tapia, por haber colaborado en la realización de los cortes histológicos y las matrices de tejido.

FINANCIAMIENTO. Este trabajo fue subvencionado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC), según oficio Nro. CDCH-AM-178-11 del 22 de noviembre de 2011.

REFERENCIAS

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61:69-90.
- Lee EY, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2:1-18.
- Perera RM, Bardeesy N. On oncogenes and tumor suppressor genes in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4:a013466.
- González L, Garavito A, Echeverri C, Jaramillo S, Salazar R, Aristizábal B. Cáncer de mama: *HER2/neu*, métodos diagnósticos y consideraciones clínicas. *Rev Colomb Cancerol* 2007; 11:40-57.
- Payne SJL, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. Predictive markers in breast cancer – the present. *Histopathology* 2008; 52:82-90.
- Gutierrez C, Schiff R. *HER2*: biology, detection, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135:55-62.
- Chang HR. Trastuzumab-based neoadjuvant therapy in patients with *HER2*-positive breast cancer. *Cancer* 2010; 116:2856-2867.
- Wright SE. Immunotherapy of breast cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12:479-490.
- Vu T, Claret FX. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Front Oncol* 2012; 2:62-68.
- Curigliano G, Viale G, Bagnardi V, Fumagalli L, Locatelli M, Rotmensz N, et al. Clinical relevance of *HER2* overexpression/amplification in patients with small tumor size and node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27:5693-5699.
- González J, Morales M, López Z, Díaz M. Factores pronósticos del cáncer de mama. *Rev Cubana Cir* 2011; 1:130-138.
- Ross JS, Fletcher JA. The *Her-2/neu* oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Oncologist* 1998; 3:237-252.
- Patel R, Leung HY. Targeting the EGFR-family for therapy: biological challenges and clinical perspective. *Curr Pharm Des* 2012; 18:2672-2679.
- Garrett JT, Arteaga CL. Resistance to *HER2*-directed antibodies and tyrosine kinase inhibitors: mechanisms and clinical implications. *Cancer Biol Ther* 2011; 11:793-800.

15. Rosa FE, Silveira SM, Silveira CG, Bérnago NA, Neto FA, Domingues MA, et al. Quantitative real-time RT-PCR and chromogenic in situ hybridization: precise methods to detect HER-2 status in breast carcinoma. *BMC Cancer* 2009; 9:90-102.
16. Sińczak-Kuta A, Tomaszewska R, Rudnicka-Sosin L, Okoń K, Stachura J. Evaluation of HER2/neu gene amplification in patients with invasive breast carcinoma. Comparison of in situ hybridization methods. *Pol J Pathol* 2007; 58:41-50.
17. Kapila K, Al-Awadhi S, Francis I. Her-2 neu (Cerb-B2) expression in fine needle aspiration samples of breast carcinoma: A pilot study comparing FISH, CISH and immunocytochemistry. *J Cytol* 2011; 28:54-56.
18. Van de Vijver M, Bilous M, Hanna W, Hofmann M, Kristel P, Penault-Llorca F, et al. Chromogenic in situ hybridisation for the assessment of HER2 status in breast cancer: an international validation ring study. *Breast Cancer Res* 2007; 9:65-77.
19. Pothos A, Plastira K, Plastiras A, Vlachodimitropoulos D, Goutas N, Angelopoulou R. Comparison of chromogenic in situ hybridisation with fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry for the assessment of her-2/neu oncogene in archival material of breast carcinoma. *Acta Histochem Cytochem* 2008; 41:59-64.
20. García-Caballero T, Grabau D, Green AR, Gregory J, Schad A, Kohlwes E, et al. Determination of HER2 amplification in primary breast cancer using dual-colour chromogenic in situ hybridization is comparable to fluorescence in situ hybridization: a European multicentre study involving 168 specimens. *Histopathology* 2010; 56:472-480.
21. Albanell J, Andreu X, Calasanz MJ, Concha A, Corominas JM, García-Caballero T, et al. Guidelines for HER2 testing in breast cancer: a national consensus of the Spanish Society of Pathology (SEAP) and the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM). *Clin Transl Oncol* 2009; 11:363-375.
22. Kwei KA, Kung Y, Salari K, Holcomb IN, Pollack JR. Genomic instability in breast cancer: pathogenesis and clinical implications. *Mol Oncol* 2010; 4:255-266.
23. Landgraf R. HER2 therapy. HER2 (ERBB2): functional diversity from structurally conserved building blocks. *Breast Cancer Res* 2007; 9:202-210.
24. Park S, Lee H, Li H, Shipitsin M, Gelman R, Polyak K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16:876-891.
25. Seol H, Lee HJ, Choi Y, Lee HE, Kim YJ, Kim JH, et al. Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance. *Mod Pathol* 2012; 25:938-948.
26. Pothos A, Plastira K, Plastiras A, Vlachodimitropoulos D, Goutas N, Angelopoulou R. Comparison of chromogenic in situ hybridisation with fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry for the assessment of her-2/neu oncogene in archival material of breast carcinoma. *Acta Histochem Cytochem* 2008; 41:59-64.
27. Di Palma S, Collins N, Faulkes C, Ping B, Ferns G, Haagsma B, et al. Chromogenic in-situ hybridisation (CISH) should be an accepted method in the routine diagnostic evaluation of HER2 status in breast cancer. *J Clin Pathol* 2007; 60:1067-1080.
28. Ricardo SA, Milanezi F, Carvalho ST, Leitão DR, Schmitt FC. HER2 evaluation using the novel rabbit monoclonal antibody SP3 and CISH in tissue microarrays of invasive breast carcinomas. *J Clin Pathol* 2007; 60:1001-1005.
29. Gilcrease M, Woodward WA, Nicolas MM, Corley LJ, Fuller GN, Esteva FJ, et al. Even low-level HER2 expression may be associated with worse outcome in node-positive breast cancer. *Am J Surg Pathol* 2009; 33:759-767.
30. Gong Y, Sweet W, Duh YJ, Greenfield L, Tarco E, Trivedi S, et al. Performance of chromogenic in situ hybridization on testing HER2 status in breast carcinomas with chromosome 17 polysomy and equivocal (2+) herceptest results: a study of two institutions using the conventional and new ASCO/CAP scoring criteria. *Am J Clin Pathol* 2009; 132:228-236.
31. Rossi V, Sarotto I, Maggiorotto F, Berchiolla P, Kubatzki F, Tomasi N, et al. Moderate immunohistochemical expression of HER-2 (2+) without HER-2 gene amplification is a negative prognostic factor in early breast cancer. *Oncologist* 2012; 17:1418-1425.

Salus online