

ARTICULOS ORIGINALES

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL CÁNCER
DE MAMA POR EL ONCOGÉN HER-2/NEU
MEDIANTE LA TÉCNICA DE FISH PARA EL
DEPARTAMENTO DEL CAUCA, COLOMBIA

Osorio Martha C¹; Muñoz Sulma²; Bravo Miriam³;
Dorado Javier M.⁴; Romero Hernando⁵

RESUMEN

Introducción. Se evaluó la presencia del gen Her-2/neu en una muestra de 28 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama a quienes se les realizó biopsias o mastectomías desde enero de 2000 a febrero de 2002. **Objetivos.** Determinar la amplificación del Oncogén HER-2/neu con la técnica de FISH y comparar los resultados obtenidos con lo reportado en el ámbito internacional. **Materiales y métodos.** Se utilizaron láminas embebidas en parafina, a las cuales se aplicó la técnica de Hibridación In Situ por Fluorescencia (FISH) para visualizar copias del oncogén Her-2/neu. **Resultados.** Se observaron hasta 60 núcleos por muestra. Se analizaron 28 muestras (100%), de las cuales el 36% (10 muestras) evidenciaron ser positivas para la amplificación del oncogén. **Discusión** Las pacientes positivas para la amplificación del oncogén HER-2/neu, presentaban en su mayoría carcinomas de tipo ductal con ganglios positivos y con estadios clínicos desde II hasta IIIB. Los reportes científicos respecto a la presencia de este gen en mujeres con cáncer de mama corroboran los resultados de este trabajo. Finalmente, se reitera la necesidad de continuar este tipo de estudios que conduzcan a entender las bases moleculares de esta grave patología en Colombia.

Palabras Clave: *Genética, diagnóstico molecular, cáncer de mama, Técnica de FISH, oncogén HER-2/neu, cromosoma 17.*

- 1 Bióloga Genética. Joven Investigadora COLCIENCIAS -Universidad del Cauca. Laboratorio de Genética Humana. Facultad de Ciencias de la Salud Universidad del Cauca.
- 2 Magíster en Genética. Jefe del Laboratorio de Genética Humana Facultad de Ciencias de la Salud Universidad del Cauca.
- 3 Médica Patóloga. Profesora Asistente. Departamento de Patología, Facultad de Ciencias de la Salud Universidad del Cauca.
- 4 Estudiante X semestre de Medicina. Facultad de Ciencias de la Salud Universidad del Cauca.
- 5 Médico Cirujano. Jefe Departamento de Ciencias Quirúrgicas, Facultad de Ciencias de la Salud Universidad del Cauca.

INTRODUCCIÓN

En los países desarrollados el cáncer de mama constituye el tumor femenino más frecuente y representa la segunda causa de mortalidad en la mujer. De acuerdo con la Sociedad Americana de Cáncer, desde 1980 se ha observado un incremento del 2% anual, con lo que en Estados Unidos¹ de cada 8 mujeres desarrolla cáncer de mama durante su vida y en Europa representa el primer cáncer femenino, el 24% de los nuevos tumores y el 18% de los fallecimientos por estos procesos, estimándose en unos 135.000 el número de nuevos casos por año, lo que conlleva a unas 58.000 muertes². Se ha encontrado como causa de estos cánceres, mutaciones que alteran la expresión de varios genes que descontrolan la división de las células que conforman el epitelio de la mama, provocando los múltiples tipos de cáncer mamario.³

Por otro lado, las células tumorales generalmente muestran menores requerimientos de los factores de crecimiento exógeno que las células normales. Esta menor dependencia se debe en parte a la capacidad de la célula tumoral de sintetizar factores de crecimiento que puedan regular su propia proliferación a través de mecanismos autócrinos/intrínsecos que llevan a la activación específica de sus receptores de membrana. En muchos tipos de tumores se han descrito alteraciones en el número de receptores y/o receptores mutados, capaces de generar señales mitogénicas muy eficientemente.⁴

Los datos experimentales indican que el receptor HER-2/neu es el único miembro de la familia de receptores HER capaz de transformar fibroblastos aún en ausencia del ligando o de una mutación activante.⁵ La sobreexpresión de HER-2/neu es un evento genético común que parece conferir ventajas selectivas a las células tumorales de muchos tipos de carcinomas, ya que favorece la formación de heterodímeros más mitogénicos, en especial la combinación HER-2/HER-3.⁶ Las propiedades oncogénicas de HER-2/neu podrían estar mediadas en parte por la estimulación de la angiogénesis tumoral, a través de la inducción de la síntesis de factores de crecimiento con potente actividad proangiogénica, como el VEGF.⁷

Las alteraciones genéticas en factores de crecimiento y sus receptores, así como en componentes de las vías de trasducción de señales producen acumulaciones de errores que llevan a la carcinogénesis. Es así como la familia de receptores HER (Human EGF Receptor), o ErbB y sus ligandos emergen como uno de los principales blancos de alteraciones asociadas a cánceres no hematopoyéticos, quizás porque constituyen la principal maquinaria proliferativa para células epiteliales y neuronales.⁸

El oncogén Her-2/neu (también conocido como c-erbB-2) es el segundo miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento epidermal. Se encuentra localizado en el cromosoma 17 y está sobreexpresado en muchos tipos de cánceres humanos, incluidos mama, ovario, pulmón, estómago y cánceres orales.⁹ En los mamíferos, en condiciones normales, el receptor HER-2 juega un papel importante en el desarrollo del tejido cardíaco y neuronal. Este oncogén puede ser activado por una mutación de punto, amplificación génica y/o sobreexpresión.¹⁰

Her-2 es un protooncogén que codifica para un receptor transmembranal tirosina quinasa de 185 KDa que exhibe gran homología con el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La glicoproteína P185 de Her-2 consiste en un dominio extracelular (ECD, P105), un simple segmento transmembranal y un dominio citoplasmático tirosina quinasa.¹¹

Se observa que HER-2 tirosina quinasa presenta actividad basal en una aparente ausencia de un ligando y esta actividad es significativamente realzada por heterodimerización inducida por ligandos del receptor. Se evidencia que la acumulación de dimerización del receptor es esencial para la activación del receptor.¹²

Se sabe más de un mecanismo responsable del aumento de expresión del receptor HER-2/neu en células tumorales. En algunos casos se observa un aumento en el número de copias del gen (c-erbB-2), fenómeno conocido como amplificación génica. Esta amplificación resulta en un aumento de número de transcritos génicos y una subsecuente expresión aumentada de la proteína receptora HER-2/neu. Sin embargo, en algunos tumores (10-12 % en las lesiones de mama) se detecta un aumento en la expresión del receptor sin amplificación génica. Esto involucra alteraciones en los procesos de regulación transcripcional y/o post-transcripcional. Los datos indican que no es importante el mecanismo que lleva a la sobreexpresión de HER-2/neu, sólo importa la presencia de un número elevado de receptores, lo que hace la lesión más agresiva.¹³

En el caso particular del cáncer de mama se ha observado que en 25% a 30% de los tumores primarios, las células tumorales muestran una expresión aumentada de HER-2/neu en su superficie.¹⁴ Este aumento en la expresión del receptor es un marcador de pronóstico, asociado a una mayor agresividad tumoral, menor sobrevida libre de enfermedad y una menor sobrevida total.¹⁵ Las alteraciones en HER-2/neu, han sido encontradas tanto en tumores de mama con ganglios positivos como con ganglios negativos, aunque la asociación en estos últimos ha presentado contro-

versia.¹⁶ Entre el 40-60% de las lesiones ductales de tipo benigno expresan altos niveles de HER-2/neu. Se ha especulado que estos cánceres in situ presentan lesiones que progresan con mayor probabilidad a cánceres invasivos, pero hasta el momento no hay una evidencia clara que apoye esta hipótesis.¹⁷

Aunque existen discrepancias, en diferentes estudios se ha observado que la sobreexpresión del oncogén Her-2/neu induce a quimioresistencia en ciertas condiciones experimentales.¹⁸ Muchos estudios han demostrado que la represión de los genes supresores de tumores contribuye a la sobreexpresión del gen Her-2/neu y a la formación del fenotipo maligno en las células cancerígenas.¹⁹

Actualmente se considera que HER-2/neu no solo puede utilizarse como marcador pronóstico sino también como factor predictivo de respuesta a quimioterápicos, antiestrógenos y terapia con anticuerpos específicos que bloqueen la funcionalidad del receptor.²⁰ Sin embargo, se necesitan estudios con alto número de pacientes para corroborar estas observaciones.²¹

El gen HER-2/neu puede ser detectado utilizando pruebas moleculares o inmunológicas, estas varían en su complejidad, sensibilidad y especificidad.²² Hasta principios de la década del 90 la amplificación de HER-2/neu fue evaluada primeramente por Southern blotting, la cual fue reemplazada por un método más rápido y sensible, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La Hibridización In Situ por Fluorescencia (FISH) es una técnica más reciente que facilita la visualización de la amplificación del HER-2/neu directamente en la célula. Otro método muy utilizado para visualizar la amplificación de HER-2/neu al nivel de la proteína es la inmunohistoquímica (IHC).²³ Tanto FISH como IHC pueden ser aplicados a muestras de cáncer de mama embebidas en parafina, lo que conlleva a una gran ventaja pues se puede observar el rango de amplificación directamente en cada célula y así observar la heterogeneidad del tumor.²⁴ Nuevos tratamientos candidatos, como el Herceptin requieren de métodos eficientes para detectar pacientes con cáncer de mama y amplificación de HER-2/neu, para lo cual FISH representa una técnica altamente sensible.²⁵

En el presente trabajo se analizó, por la técnica de FISH, el estado de amplificación del gen HER-2/neu en muestras parafinadas de 28 pacientes con cáncer de mama en diferentes estadios clínicos, obtenidas desde enero del año 2000 hasta febrero de 2002, las cuales acudieron a diferentes centros asistenciales de la ciudad de Popayán.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio y selección de muestras

Este es un estudio descriptivo de serie de casos en un periodo de tiempo comprendido entre enero de 2000 a febrero de 2002. Teniendo como base reportes estadísticos de la Dirección Departamental de Salud del Cauca, los cuales reportan 33 casos anuales para el Departamento, se decide tomar una muestra de 28 pacientes al azar. Para la selección de los bloques se realizó un análisis detallado en el archivo de placas del Departamento de Patología del Hospital Universitario San José y/o la Compañía de Patólogos del Cauca, en la ciudad de Popayán, Colombia, seleccionando de cada paciente el bloque más representativo del tumor, los cuales fueron procesados y analizados, desconociendo el tipo histológico y estadio clínico de las muestras de las pacientes para evitar sesgos de interpretación y análisis

Pacientes y Muestras

Las muestras fueron obtenidas de biopsias de mama que fueron realizadas por el Departamento de Patología de la Universidad del Cauca y/o la Compañía de Patólogos del Cauca, en la ciudad de Popayán, Colombia, entre enero del 2000 y febrero del 2002. Los datos clínicos fueron obtenidos de las historias del Hospital Universitario San José (HUSJ) y del informe de patología de la Compañía de Patólogos del Cauca. Todos los especímenes fueron fijados en buffer neutral de formalina al 10% y embebidas en parafina.

Posteriormente, las muestras de cada paciente fueron revisadas al microscopio por un patólogo, quien seleccionó de cada caso un bloque representativo de tejido tumoral para determinar el estado del gen HER-2/neu.

Las pacientes presentaban los siguientes criterios de inclusión: Cánceres primarios, unilaterales o bilaterales, metastáticos o no metastáticos, nódulo linfáticos negativos o positivos, en diferentes estadios clínicos desde I hasta IIIB.

Se estudió un total de 28 muestras de cáncer de mama, fijadas en formalina y embebidas en parafina, de mujeres con diferentes tipos histológicos y estadios de la enfermedad, diagnosticados en el servicio de patología del HUSJ o en la Compañía de Patólogos del Cauca (CPC) de la ciudad de Popayán, Colombia.

Hibridación In Situ por Fluorescencia (FISH)

Para la realización del presente trabajo, se utilizó el Kit de Path Visión (LSI HER-2/neu espectro naranja y CEP17 espectro verde) cuyas sondas marcadas con fluorescencia están diseñadas para ser usadas en secciones de tejido de mama embebidas en parafina.

La sonda HER-2/neu contiene secuencias de DNA específicas para el locus del gen humano HER-2/neu e hibridiza la región 17q11-q12 del cromosoma 17. La sonda CEP17 contiene DNA alfa satélite e hibridiza el locus D17Z1. Estas dos sondas son mezcladas en un buffer de Hibridación para facilitar su uso.²⁶

La sonda CEP17 se utiliza como un control para determinar el número de copias del cromosoma 17 a fin de verificar los efectos de la aneuploidía del cromosoma 17 cuando el número de copias del gen HER-2/neu son contadas.²⁶

Los ensayos de FISH fueron realizados según las recomendaciones del protocolo de fabricación del Kit con el debido proceso de estandarización propio del laboratorio.

El proceso de desparafinización de las muestras de 4 micras de grosor consistió en un calentamiento a 35°C por 15 minutos y desparafinadas con xylene, seguido de diferentes cambios en etanol al 80%, 70% y 100%. Posteriormente el tejido de cada placa fue desnaturalizado con formamida calentada a 73°C por 8 minutos y sometidas a diferentes lavados en diferentes concentraciones de etanol absoluto. Después se preparó un buffer conteniendo 10 ml de una mezcla de las sondas (HER-2/neu espectro naranja y CEP 17 espectro verde), las cuales fueron adicionadas a las placas e hibridizadas en una cámara húmeda a 37°C por 15 a 18 horas.

Finalmente, las láminas fueron sometidas a dos buffer de lavados post - hibridización, contrastadas con DAPI II y cubiertas con cubreobjetos. En cada caso, fueron contadas un mínimo de 60 células donde se evidenciaba la señal del gen HER-2/neu y del centrómero del cromosoma 17 con ayuda de un microscopio de epifluorescencia LEICA el cual contiene un set de filtros recomendados por Vysis, que permiten la visualización de las sondas magnificadas con el objetivo de 100X con aceite de inmersión.

El resultado se reporta con un rango de número de copias promedio del gen HER-2/neu y de la región centromérica del cromosoma 17 (CEP17). Los especímenes con un rango de señal menor a 2 fueron designados como no amplificados y con 2 o más fueron designados como amplificados.

RESULTADOS

Muestras de FISH para estatus de HER-2/neu

La tabla No. 1 muestra los resultados de los ensayos realizados por la técnica de FISH con el kit Path Vysion para identificar la amplificación del gen HER-2/neu en núcleos interfásicos de muestras embebidas en parafina con cáncer de mama. Para el análisis, se tuvieron en cuenta características de las pacientes tales como la edad cuyo promedio era de 46.2 años (rangos 32-80), la presencia o ausencia de nódulos o ganglios, el tipo histológico del tumor de mama y su estadio clínico.

La figura 1 da un ejemplo de la presencia así como de la ausencia de la amplificación del oncogén HER-2/neu en las pacientes estudiadas.

Al realizarse una mastectomía se fijan diferentes sectores del tejido de la mama, resultando un gran número de bloques por muestra; se seleccionaron los mejores bloques de cada una de las 28 muestras con el fin de aumentar la probabilidad de hallar al oncogén HER-2/neu amplificado por FISH. Adicionalmente, se estudiaron muestras desde enero del año 2000 hasta febrero del 2002, con el propósito de asegurar la integridad del tejido y así evitar posibles alteraciones en los resultados por deterioro de las muestras.

Cada placa se analizó contando un mínimo de 60 células evidenciando la amplificación o no del gen HER-2/neu. De las 28 muestras incluidas en este estudio 10 (36%) resultaron positivas para HER-2/neu y 18 (64%) evidenciaron solamente el control CEP17, siendo negativas para la amplificación de HER-2/neu (Ver figura 2). También fue posible observar células con una sola señal del cromosoma 17 (CEP17), lo que mostró la presencia de las aneuploidías cromosómicas que presentan los pacientes con cáncer.

Respecto al tipo histológico de cada uno de las muestras de mama que evidenciaron amplificación del gen HER-2/neu, se observa que 7 de las muestras (70%) corresponden con el diagnóstico de carcinoma ductal infiltrante; 1 (10%) corresponde a carcinoma lobulillar infiltrante y 2 (20%) a carcinoma ductal in situ.

DISCUSIÓN

Al evaluar la presencia o no de la amplificación del oncogén Her-2/neu de las 28 placas embebidas en parafina de pacien-

Características	No. de casos		Amplificados	
	n=28	%	n= 10	%
edad				
< 50	16	57,2	6	60
>50	12	42,8	4	40
Nódulos				
Positivo	14	50	8	80
Negativo	14	50	2	20
Histología				
Ductal in situ	5	17,9	2	20
Ductal infiltrante	16	57,1	7	70
Lobular	7	25	1	10
Estadio clínico				
I	5	17,9	1	10
IIA	9	32,1	1	10
IIB	10	35,7	6	60
IIIA	4	14,3	2	20
IIIB	0	0	0	0

Tabla 1: Diagnóstico Molecular del Oncogén HER-2/neu por la Técnica de FISH para el Departamento del Cauca, Colombia. Características clínico patológicas y presencia de amplificación del gen Her-2/neu

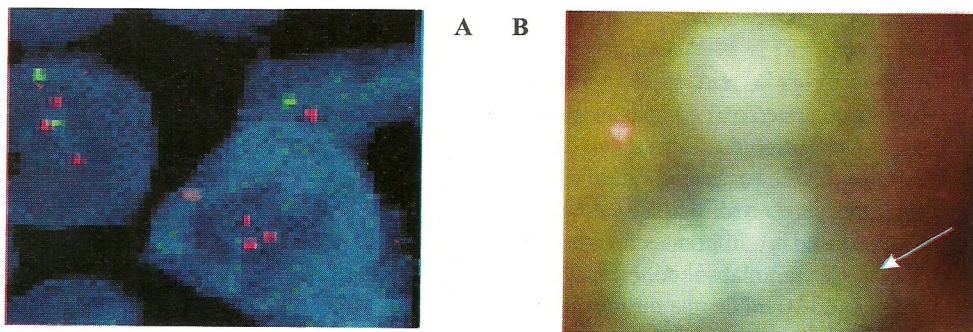


Figura 1. Microfotografías de núcleos interfásicos de pacientes con cáncer de mama que evidenciaron la presencia o ausencia del oncogén Her-2/neu, mediante la técnica de Hibridación in situ por Fluorescencia (FISH), con el Kit de Path Vision™ utilizando objetivo de 100X. Algunos casos representativos son: **A.** Paciente HER-2/neu positiva. La flecha muestra la señal naranja que manifiesta la amplificación del oncogén Her-2/neu y la señal verde indica la región centromérica del cromosoma 17. **B.** Foto de varios núcleos interfásicos normales sin amplificación del oncogén Her-2/neu (flecha)

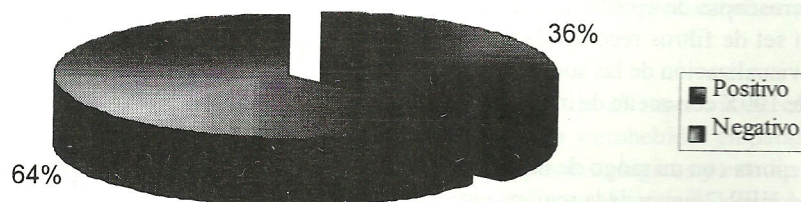


Figura 2: Diagnóstico Molecular del Oncogén HER-2/neu por la Técnica de FISH para el Departamento del Cauca, Colombia. Porcentaje de casos amplificados del gen Her-2/neu por la técnica de FISH.

tes con cáncer de mama, se evidenció lo reportado en la literatura acerca de la diferente frecuencia de amplificación observada de dicho oncogén, dependiendo del tipo histológico y estadio clínico en que se encuentre la paciente al momento del diagnóstico.

La frecuencia del gen Her-2/neu que evidenció amplificación fue del 36% (10 muestras) lo que coincide con lo reportado en la literatura para la frecuencia de este gen relacionado con cáncer de mama, en la población general.²⁷

Por otro lado, la mayoría de los autores reportan una alta frecuencia de sobre expresión del oncogén Her-2/neu en carcinomas de tipo ductal.²⁷ En el presente estudio, el 90% 9 de las muestras amplificadas fue de tipo ductal in situ e infiltrante, 20% 2 y 70% 7 respectivamente. La literatura reporta que estos cánceres positivos para el oncogén HER-2/neu presentan lesiones que progresan con mayor probabilidad a cánceres de tipo invasivos.²⁸

Respecto a la presencia de metástasis ganglionar, se observó que el 80% 8 de las placas amplificadas para el gen Her-2/neu era de pacientes con ganglios positivos y el 20% restante, 2 fue con ganglios negativos. La mayoría de las investigaciones respecto al significado pronóstico de Her-2/neu ha demostrado que la amplificación de este gen es indicador adverso en pacientes con ganglios positivos con la enfermedad; sin embargo, el significado pronóstico de Her-2/neu es menos claro en pacientes con ganglios negativos.²⁹ Una posible causa para la diferencia de opiniones respecto al valor pronóstico del grado de amplificación de este gen en pacientes con ganglios negativos, se deba a la divergencia de definiciones acerca de la ausencia total de ganglios implicados.³⁰ Se requieren más estudios a este respecto en pacientes con carcinomas invasivos y con carcinoma ductal in situ.²⁹

Otro factor de análisis se refiere al estadio clínico de las pacientes que resultaron positivas para la amplificación del gen. El 60% de las mismas presentaba estadio clínico IIB y el 20% IIIA, por lo cual la mayor frecuencia del oncogén HER-2/neu se observa en estadios avanzados de la enfermedad, lo que se relaciona con lo reportado en la literatura respecto a que la presencia de este oncogén es indicador de pronóstico asociado a una mayor agresividad tumoral, menor sobrevida libre de enfermedad y a una menor sobrevida total para la paciente.¹²

Sin embargo, hubo 18 muestras (64%) que no evidenciaron amplificación del gen Her-2/neu debido probablemente a que se hayan tratado de carcinomas de mama con mutaciones de genes diferentes al Her-2/neu, o debido también a la

gran heterogeneidad que evidencian este tipo de tumores, lo que dificulta considerablemente su diagnóstico.³⁰

Por otro lado, es posible que se hubieran presentado problemas en la aplicación de la técnica debido a que las placas con las que se realizó el estudio no fueron sometidas a enzimas de digestión posteriores al proceso de desparafinización de las mismas; además, la técnica de FISH es compleja pues requiere de condiciones muy estrictas tanto en temperatura como en pH de las soluciones, así como lo dificultoso que se hace el trabajar las muestras en condiciones de escasa luz.

A pesar de las dificultades logísticas, se evidenció un alto porcentaje de pacientes que resultaron positivos para la amplificación del oncogén HER-2/neu, debido a que se realizó una preselección histológica minuciosa del material, lo que condujo a aplicar la sonda a láminas con mayor probabilidad de resultar positivas para la amplificación por las características específicas del tumor. Esto representa una estrategia nueva y eficaz que reitera la necesidad del trabajo interdisciplinario para el estudio médico a nivel genético molecular.

Según los datos obtenidos de la Dirección Departamental de Salud del Cauca se presentan alrededor de 33 casos nuevos de cáncer de mama al año, de los cuales el 63.2% acuden en estadios ya avanzados de la enfermedad, hecho que se corroboró con este estudio ya que el 90% de la muestra recopilada estaba en estadio IIA en adelante

Respecto a la técnica de FISH utilizada para este estudio, se pudo corroborar lo afirmado por la literatura en el sentido de la alta sensibilidad y especificidad al momento de hallar la amplificación del gen HER-2/neu. El uso del Kit de Path Visión permitió detectar el gen al poderse observar al microscopio las amplificaciones del gen Her-2/neu presentes en el núcleo de las células. El conteo de dichas amplificaciones es objetivo ya que se observa directamente el número de copias del gen presentes en cada célula y además la preparación de cada muestra produce efectos pequeños que puedan alterar el DNA presente en cada tejido, a diferencia de la inmunohistoquímica, cuyo tratamiento es más agresivo hacia el tejido en cuestión, pudiendo afectar el resultado. El problema es que la técnica de FISH requiere de un microscopio de fluorescencia con unos filtros adecuados que permitan la visualización de la sonda HER-2/neu, los cuales no son del acceso de muchos laboratorios.

También fue posible encontrar células evidenciando aneuploidía del cromosoma 17, al observar solo una de las señales del CEP17 cuyo espectro verde indica la presencia de dicho cromosoma en cada una de las células.

Es importante aclarar, que el Kit de Path Vysion de Vysis no debe ser usado para screening o para diagnóstico de cáncer de mama, y para seguimiento de pacientes debe ser utilizado adjunto a otros factores pronósticos actualmente usados para predecir pérdida completa de la enfermedad y completa sobrevida en estadio clínico II en pacientes con cáncer de mama.²⁴

CONCLUSIONES

La frecuencia del oncogén Her-2/neu encontrada en las muestras a estudio fue del 36%, lo que coincide con los datos obtenidos en la literatura respecto a la frecuencia de este gen para cáncer de mama.

El 90% de las muestras amplificadas correspondió a carcinomas de tipo ductal siendo este el tipo histológico más frecuentemente reportado en la literatura evidenciando amplificación del gen HER-2/neu.

El 80% de las muestras amplificadas tuvo metástasis ganglionar lo que indica la importancia de la amplificación de este oncogén como valor pronóstico adverso para las pacientes que padecen esta enfermedad.

El 60% de las pacientes presentaba estadio clínico IIB y el 20% IIIA, lo que reitera la aparición del gen en estadios avanzados. A su vez este dato evidencia cómo la mayoría de las pacientes acuden a los diferentes centros de salud en estadios ya avanzados de la enfermedad.

El análisis de las muestras evidenció la alta heterogeneidad que presentan los tejidos de mama, lo que dificulta un diagnóstico correcto al dar lugar a posibles falsos negativos. La técnica de FISH supera a muchas otras metodologías al momento de detectar la amplificación de gen Her-2/neu, ya que permite un conteo directamente en la célula del número de amplificaciones por paciente.

El presente trabajo de Investigación fue patrocinado por Colciencias y la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca, en el programa de "Formación de Jóvenes Investigadores" en Convenio Interinstitucional realizado entre Colciencias y la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca, y fue realizado en el Laboratorio de Genética Humana de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca en Popayán- Colombia.

Agradecimientos: Los autores expresan agradecimientos a COLCIENCIAS por el apoyo a la Bióloga Martha C. Osorio

Cabrera en el Programa de Formación de Jóvenes Investigadores, al Departamento de Cirugía del HUSJ, así como a su Departamento de Patología, a la Compañía de Patólogos del Cauca, al Dr. Angel José Ceballos, Decano de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca, al personal del Laboratorio de Genética Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad del Cauca, a su Grupo de Investigación de la Genética Humana Aplicada GIGHA.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Hernández, B.** Predisposición hereditaria al cáncer de mama, evaluación del riesgo genético y recomendaciones para el seguimiento clínico de los casos de alto riesgo. *Med. Clin* 1996 107: 383-387.
2. **Ramzi, S; Vinay K; Robbins S.** Patología Estructural y Funcional 5 Edición. Editorial Mc Graw Hill Interamericana 1996.1533pp.
3. Cox T.M. & Sinclair. *Biología Molecular en Medicina.* Editorial Médica Panamericana. Bogotá 1998. P 109-202 1500pp.
4. **Schnitt SJ, Connolly, JL.** Classification of ductal carcinoma in situ: striving for clinical relevance in the era of breast conserving therapy. *Human Pathol* 1997.28 877-880.
5. **Lindholm A.** Familial breast cancer and genes involved in breast carcinogenesis. *Breast cancer research and Treatment* 1995. 34: 171- 183.
6. **Mokbel, K; Hassanally, D.** From HER-2 to Herceptin. Current Medical Research and Opinion. *Proquest* 2001 Volume 17 Issue 1. Page 51.
7. Pegram Pauletti G, Slamon D. Her-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy. *Breast cancer Res and Treat.* 1998 52: 65-77.
8. **Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA.** The nue oncogene encodes an epidermal growth factor receptor- Related protein. *Nature* 1986 319. 226- 30
9. **Hung, M.C., & Lau YK.** Basic Science of Her-2/ neu: a review. *Semin Oncol.* 1999 26 (4 Supl 12): 51-9.
10. **Guerin A; Bbarrois, M; Terrier. MJ; Spielmann, M.** Overexpression of either c-myc or c-erb B- 2 /neu proto -oncogene in human breast carcinomas , correlation with poor prognosis. *Oncogene Res* 1988 3: 21-31.
11. **Molina R, Jo J, Filella X. Zanon; Paisa J, Muñoz M, Farrus B, Latre M, Escriche C.** C-erbB-2 Oncoprotein CEA and CA15,3 in patients with breast cancer: prognostic value. *Breast cancer Research and Treatment* 1998. 51: 109- 119.
12. **Berns EM, Foekens JA, Van Staveren IL.** Oncogene amplification and prognosis in breast cancer: Relation-

- ship with systemic treatment. *Gene* 1995. 159: 11- 18.
13. **Tetu B; Brisson J.** Prognostic significance of HER-2/neu oncoprotein expression in node- positive breast cancer. *Cancer* .1994 73: 2359- 2365.
 14. **Slamon DJ., Godolphin W, Jones LA.** Studies of the HER-2/neu proto- oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989 244. 707-712.
 15. **Clark GM, McGuire WL.** Follow –up study of HER-2/neu amplification in primary breast cancer . *Cancer Res.* 1991 51: 944-948.
 16. **Onody, Peter; Bertrand Françoise; Muzeau, Françoise; Bieche, Ivan & Liderau Rosette.** Archives of Pathology & Laboratory Medicine. *Proquest.* 2001. Volume 125. Issue 6. Start Page 746.
 17. **Sjogren S, Inganas M, Lindgren A, Holmberg I.** Prognostic and predictive value of c-erbB2 overexpression in breast cancer alone and in combination with other prognostic marker. *J.Clin Oncol.* 1998. 16: 462 –9.
 18. **Pegram, M. Pauletti, G. & Slamon, Dennis.** HER-2/neu as predictive marker of response to breast cancer therapy. *Breast Cancer Research and Tratament* 1998. 52: 65- 77.
 19. **Wang, S; Saboorian, MH; Frenkel, E; Hynan, L et al.** Laboratory assessment of the status of HER-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: Comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridisation. *Proquest.* 1998. Volume 53. Issue 5. Start page 374.
 20. **Berger, M.S. Locher, GW, Ssaurer, S.** Correlation of c-erb B2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res* 1998 48:1238- 1243.
 21. **Muss HB, Thor AD, Berry Da.** C-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node – positive early breast cancer *New England J. Med* 1994. 330: 1260 – 1266.
 22. **Masood S; Bui M; Yung J.** Reproducibility of LSI Her-2/neu spectrum Orange. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 1998 p.215-236.
 23. **Cotton, RGH.** Current methods of mutation detection. *Mutation Research.* 1993 285: 125-144.
 24. **Masood S, Bui M, Yung J, Mark H, Wong E, Yang S.** Reproducibility of LSI Her-2/neu spectrum orange and CEP 17 spectrum green dual color Ddeoxyribonucleic Acid Probe Kit. *Annals Clinical and Laboratory Science.* 1999. Vol. 28 No1.
 25. **Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D.** Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-her-2 monoclonal in women who have breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J.Clin Oncol* 1999 17: 2639- 48.
 26. **Slamon DJ.** In a head to head comparison with other tests in our laboratory, the Vysis FISH test was found to be superior. It is the most reliable and accurate method of assessing HER-2 status in breast cancer tissue specimens. *Science* 1989 244;707-712.
 27. **Falo C, Figueras A, Moreno B.** HER-2/neu status determination in breast carcinoma. Comparison of two IHC methods in realltion to FISH *Eur J. Cancer* 2000 36: 52
 28. **Jimenez R.E, Wallis T, Vissler DW.** Determination of Her-2/neu status in breast carcinoma: comparative analysis of IHC and FISH. *Mod Pathol* 2000 13: 37-45.
 29. **Osorio, G, Hernández, MP, Bernal J.** Actualización en pruebas diagnósticas en citogenética. La hibridación In Situ (HIS). *Universitas Médica.* 1995 Vol 36. No 4 pg 130.
 30. **Venter DJ, Tuzi NL, Kumar, S.** Overexpression of the c-Her-2/neu oncoprotein in human breast carcinomas: immunohistological assessment correlates with gene amplification. *Lancet* 1987. 112: 69- 72.

Correspondencia:

Martha Osorio

E-mail: ikacabrera@hotmail.com