
Clasificación molecular del cáncer de mama, obtenida a través de la técnica de hibridación *in situ* cromogénica (CISH).

Ángel Fernández^{1,2} y Aldo Reigosa¹.

¹Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo.

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

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

Resumen. El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea compuesta de un número creciente de subtipos biológicos, con una sustancial variabilidad en la evolución de la enfermedad dentro de cada categoría. El objetivo del presente trabajo fue clasificar las muestras objeto a estudio de acuerdo a las clases moleculares de carcinoma de mama: luminal A, luminal B, HER2 y triple negativo, considerando el estado de amplificación de HER2 obtenido 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 (IHQ) para receptores hormonales y HER2 realizado en el Hospital Metropolitano del Norte de Valencia, Venezuela. La clasificación molecular de los tumores de las pacientes, considerando la expresión de los Receptores de Estrógeno (RE) y Receptores de Progesterona (RP) a través de IHQ y la amplificación de *HER2* por CISH, permitió agrupar en las diferentes clases moleculares los casos calificados inicialmente como desconocidos, debido a que tenían un resultado indeterminado (2+) para la expresión de HER2 por IHQ; asimismo, esta clasificación ocasionó que algunos casos considerados inicialmente en una clase molecular pasaron a otra clase, posterior a la revaloración del estado de HER2 a través de CISH.

Molecular classification of breast cancer patients obtained through the technique of chromogenic *in situ* hybridization (CISH).
Invest Clin 2013; 54(4): 406 - 416

Keywords: breast cancer; HER2; chromogenic *in situ* hybridization.

Abstract. Breast cancer is a heterogeneous disease composed of a growing number of biological subtypes, with substantial variability of the disease progression within each category. The aim of this research was to classify the samples object of study according to the molecular classes of breast cancer: luminal A, luminal B, HER2 and triple negative, as a result of the state of HER2 amplification obtained by the technique of chromogenic *in situ* hybridization (CISH). The sample consisted of 200 biopsies fixed in 10% formalin, processed by standard techniques up to paraffin embedding, corresponding to patients diagnosed with invasive ductal carcinoma of the breast. These biopsies were obtained from patients from private practice and the Institute of Oncology "Dr. Miguel Pérez Carreño", for immunohistochemistry (IHC) of hormone receptors and HER2 made in the Hospital Metropolitano del Norte, Valencia, Venezuela. The molecular classification of the patient's tumors considering the expression of estrogen and progesterone receptors by IHC and HER2 amplification by CISH, allowed those cases originally classified as unknown, since they had an indeterminate (2+) outcome for HER2 expression by IHC, to be grouped into the different molecular classes. Also, this classification permitted that some cases, initially considered as belonging to a molecular class, were assigned to another class, after the reevaluation of the HER2 status by CISH.

Recibido: 31-07-2013 Aceptado: 10-11-2013

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea compuesta de un número creciente de subtipos biológicos reconocidos. De cualquier manera, independientemente del modelo predictivo utilizado, persiste una sustancial variabilidad en la evolución de la enfermedad dentro de cada categoría. Generalmente se acepta que los cursos clínicos variados de pacientes con tumores histológicamente idénticos, son el resultado de diferencias moleculares. Se deduce que el análisis molecular detallado del cáncer pudiera aportar información que mejoraría la predicción pronóstica (1, 2).

Perou y col. (3). y Sorlie y col. (4). fueron los primeros en mostrar que los carcinomas mamarios pueden también subdividirse en base al análisis de la expresión génica. Estos estudios determinaron que existían al menos cuatro clases moleculares de cáncer de mama: a) tipo luminal, b) tipo basal, c) tipo parecido a mama normal y d) HER2 positivo. El tipo parecido a mama normal fue descartado posteriormente de las clases moleculares, al comprobarse que representaba características de tejido normal de la mama y no tejido tumoral (5).

La mejor forma de realizar la clasificación molecular del cáncer de mama es mediante el análisis de expresión génica, sin

embargo, la mayoría de los especímenes clínicos archivados no permiten este análisis, bien sea por su alto costo o la falta de disponibilidad en muchos países, lo que ha determinado el empleo de otras técnicas, como por ejemplo, la inmunohistoquímica y más recientemente, a través de técnicas de hibridación, como por ejemplo, la hibridación *in situ* cromogénica (CISH) (6).

Actualmente, desde el punto de vista inmunohistoquímico, se reconocen las clases moleculares: a) luminal A, b) luminal B, c) HER2 y d) triple negativo (TN) (7). Un análisis combinado de diversos trabajos (8-10) demostró que los tipos moleculares de carcinoma de mama están definidos de la siguiente forma: a) luminal A: Positivo (+) a receptor de estrógeno (RE) y receptor de progesterona (RP), HER2 negativo (-); b) luminal B: RE o RP +, independientemente del marcaje de HER2; c) HER2 +: RE -, RP -, HER2 + y d) TN: RE -, RP -, HER2 -.

El pronóstico y sensibilidad a la quimioterapia de los subgrupos moleculares es diferente. El tipo luminal tiende a tener mejor pronóstico que los otros, mientras los tumores tipo basal y HER2 positivo son de peor pronóstico, debido a que están asociados con una mayor agresividad biológica. No obstante, estos últimos tienen una alta tasa de respuesta a la quimioterapia y resistencia a los agentes quimioterapéuticos convencionales, respectivamente (11-13).

Por su parte, los tipo luminal A presentan una alta tasa de respuesta a la terapia endocrina, mientras que el luminal B la respuesta a ésta es variable (11, 12).

PACIENTES Y MÉTODOS

Muestra

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"

(IOMPC), 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 RE, RP y HER2, realizado en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Metropolitano del Norte (HMN) de Valencia, Estado Carabobo, Venezuela, 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. Criterios de exclusión: para garantizar mayor uniformidad y por accesibilidad a las preparaciones histológicas y bloques de parafina respectivos, se excluyeron casos con estudio de IHQ realizados en otros laboratorios.

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.

Debido a que la gran mayoría de los casos procedían de consulta privada, desafortunadamente no fue posible acceder a dichas variables en todos los casos previamente seleccionados.

Construcción de la matriz de tejidos

Todas las muestras tisulares previamente habían sido fijadas 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 histológi-

cas 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 micrótomo 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 Invi-

trogen. 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™ de Invitrogen, la sonda se desnaturaliza e hibrida en la región complementaria del ácido desoxirribonucleico 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 contra tinción 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 y b) 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 Bronce, elaborado por el ingeniero Víctor Barrios de la Universidad de Carabobo.

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

Se logró obtener la edad de 145 pacientes, encontrándose que la edad media de éstas en el momento del diagnóstico fue de 52,28 años (rango de 21-94 años). Un 45,5% tenían 50 años de edad o menos y un 54,5% tenían 51 años de edad o más. En relación al grado histológico, se ubicaron los datos sólo de 61 casos, siendo el grado II el más frecuente (49,2%). Por su parte, sólo fue posible conseguir el estadio clínico de 48 pacientes, siendo el más frecuente el estadio III (47,9%).

El 55,5% y 47,5% de los tumores resultaron positivos a la expresión inmunohistoquímica de RE y RP, respectivamente. El tipo histológico más frecuente fue el carcinoma ductal infiltrante (93,5% de los casos).

El resto de los principales datos clínico-patológicos de las pacientes incluidas en este estudio se detallan en la Tabla I.

Con base al porcentaje de expresión de RE, RP y *HER2* se clasificaron los tumores seleccionados para el presente estudio en las cuatro clases moleculares del cáncer de mama, siendo el luminal A el más frecuente (34,5%, 69 de 200 casos). Cabe destacar

que 33 casos (desconocidos) inicialmente no pudieron ser agrupados en dichas clases, debido a que tenían un resultado de inmunohistoquímica de 2+ (indeterminado) para la expresión de *HER2*. La distribución del resto de los tumores se visualiza en la Fig. 1.

Posteriormente a la ejecución de la técnica de CISH se volvieron a clasificar los casos sujetos a estudio, considerando la expresión de RE y RP por IHQ y la amplificación de *HER2* obtenida por CISH. Esto permitió agrupar a los 33 tumores que inicialmente no fueron clasificados porque tenían un resultado indeterminado (2+) por IHQ para la expresión de *HER2*. Con esta nueva clasificación se obtuvo una relación estadísticamente significativa ($p < 0,001$). Los tumores luminal A de igual forma fueron los más predominantes (36,5%) (Tabla II).

Cabe destacar, que posterior a la nueva clasificación, persistió un caso triple negativo que resultó con amplificación del oncogén *HER2* (Tabla II), hecho que conceptualmente no debe ocurrir, debido a que el término de por sí implica que es negativo a *HER2*.

Al comparar los resultados de la clasificación molecular por IHQ y CISH se obtuvo que de los 69 casos clasificados inicialmente luminal A por IHQ, 7 (10,1%) pasaron a ser luminal B por CISH; de los 38 casos clasificados como luminal B por IHQ, 2 (5,3%) pasaron a ser luminal A; de 15 casos clasificados como *HER2* por IHQ, 9 (60%) pasaron a ser triple negativo y de 45 casos triple negativo por IHQ, 5 (11,1%) pasaron a ser *HER2* (Tabla III).

DISCUSIÓN

Con base a los resultados obtenidos del análisis inmunohistoquímico de RE, RP *HER2*, y de acuerdo a los criterios aceptados por diversos autores (8-10), en el presente estudio se observó que el fenotipo

TABLA I
CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LA SERIE

		n (%)
Edad*	≤ 50	66 (45,5)
	≥ 51	79 (54,5)
Edad (años): media (rango)	52,28	21-94
Grado histológico**	I	11 (18)
	II	30 (49,2)
	III	20 (32,8)
Estadio clínico***	I	3 (6,3)
	II	18 (37,5)
	III	23 (47,9)
	IV	4 (8,3)
Receptor de estrógeno	Negativo	89 (44,5)
	Positivo	111 (55,5)
Receptor de progesterona	Negativo	105 (52,5)
	Positivo	95 (47,5)
Tipo histológico	Adenocarcinoma ductal	187 (93,5)
	Adenocarcinoma medular	4 (2)
	Adenocarcinoma mucinoso	2 (1)
	Adenocarcinoma papilar	2 (1)
	Adenocarcinoma tubular	1 (0,5)
	Adenocarcinoma lobulillar	2 (1)
	Adenocarcinoma ductolobulillar	2 (1)

*Considerando los datos de 145 pacientes, **61 pacientes y ***48 pacientes.

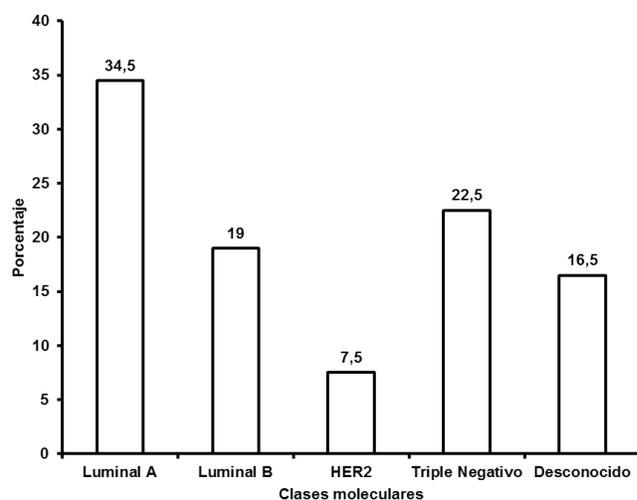


Fig. 1.
Distribución de las pacientes de acuerdo a las clases moleculares del carcinoma de mama obtenida según la expresión de receptor de estrógeno, receptor de progesterona y HER2 por inmunohistoquímica.

TABLA II
RELACIÓN ENTRE LAS CLASES MOLECULARES DEL CARCINOMA DE MAMA OBTENIDA SEGÚN LA EXPRESIÓN DE RE Y RP POR IHQ Y LOS RESULTADOS DE LA AMPLIFICACIÓN DE HER2 POR CISH

Clase molecular	CISH [n (%)]		Total
	No amplificación	Amplificación	
Luminal A	73 (100)	-	73 (36,5)
Luminal B	35 (70)	15 (30)	50 (25)
HER2	-	16 (100)	16 (8)
Triple negativo	60 (98,4)	1 (1,6)	61 (30,5)
Total	168 (84)	32 (16)	200 (100)

p<0,001. RE: Receptor de estrógeno; RP: Receptor de progesterona; IHQ: Inmunohistoquímica; CISH: Hibridación *in situ* cromogénica.

TABLA III
COMPARACIÓN DE LA CLASIFICACIÓN MOLECULAR OBTENIDA SEGÚN LA EXPRESIÓN DE HER2 POR IHQ Y LA AMPLIFICACIÓN POR CISH, CONSIDERANDO LA EXPRESIÓN DE RE Y RP

Clase molecular	CISH [n (%)]					Total
	IHQ	LA	LB	HER2	TN	
Luminal A	62 (89,9)	7 (10,1)	-	-	-	69 (34,5)
Luminal B	2 (5,3)	36 (94,7)	-	-	-	38 (19)
HER2	-	-	6 (40)	9 (60)	-	15 (7,5)
Triple negativo	-	-	5 (11,1)	40 (88,9)	-	45 (22,5)
Desconocido	9 (27,3)	7 (21,2)	5 (15,2)	12 (36,4)	-	33 (16,5)
Total	73 (36,5)	50 (25)	16 (8)	61 (30,5)	-	200 (100)

RE: Receptor de estrógeno; RP: Receptor de progesterona; IHQ: Inmunohistoquímica; CISH: Hibridación *in situ* cromogénica; LA: Luminal A; LB: Luminal B; TN: Triple negativo.

molecular predominante fue el luminal A, con el 34,5% (69 casos) y el luminal B representó el 19% (38 casos), con un total de 53,5% de casos luminales (107 casos, 64,5% de luminal A y 35,5% de luminal B).

Esta tendencia difiere a la información recogida por Blows y col. (14) quienes en una recopilación de 12 estudios que comprenden más de 10 mil casos, refieren un total de 77% de casos luminales, repartidos en un 71% de casos luminal A y un 6% de luminal B. Sólo 1 de los 12 estudios refiere porcentajes similares a los obtenidos en este trabajo, con un 42% de casos con fenotipo

luminal A y un 15% de casos con fenotipo luminal B. En el resto de artículos los porcentajes oscilan entre 67 y 86% para la clase luminal A y entre un 3 y 11% para la clase luminal B.

Es posible que estas diferencias se deban al método de clasificación utilizado, pues en varios de los trabajos incluidos en esa recopilación, sólo consideran luminal B a los casos que co-expresan receptores hormonales y HER2. Aun así, el porcentaje global de casos luminales es alto en comparación con el de este estudio, y pudiera ser debido al tipo de población incluida en esos

estudios, con mayoría caucásica. En otros estudios como los de Carey y col. (10) y O'Brien y col. (15), que comparan a la población caucásica con la afroamericana, reportan para este último, un porcentaje más parecido a los de este trabajo, con 48 y 8% para los casos luminal A y B, respectivamente. Estudios hechos en otras partes del mundo con poblaciones no caucásicas, tales como el de Salhia y col. (16) en Egipto, reflejan porcentajes parecidos a los de este estudio con un 44,3% para los casos luminal A y un 24,6% para los carcinomas con fenotipo luminal B.

Por su parte, el 7,5% de las pacientes en estudio (15 casos) corresponde a carcinomas de mama de tipo HER2, siendo este porcentaje comparable al publicado en los estudios citados previamente, en los cuales la frecuencia de esta clase molecular oscila entre 9 a 16% (14-16). En general, la tasa de casos HER2 positivo está entre un 15 a 30%, aunque debe señalarse que en estos porcentajes se incluyen los casos que también tienen receptores hormonales positivos, que son clasificados molecularmente como luminal B y, por tanto, no se consideran en la clase HER2 (17-19). Hoy en día se sabe que estos dos tipos de carcinoma son entidades diferentes y deben seguir siendo clasificadas separadamente (20).

Por otro lado, el grupo de carcinomas de mama de fenotipo triple negativo constituyó el 22,5% (45 casos). En la literatura médica el porcentaje de carcinomas de mama de fenotipo basal en mujeres caucásicas varía en los diferentes estudios y oscila entre el 4,2 y el 26,8%, con una media de 16% (99). La frecuencia obtenida coincide mejor con las cifras referidas en mujeres afroamericanas e hispanas (10, 15, 21, 22).

Cabe destacar que en este estudio no se consideró el grupo étnico de las pacientes, sin embargo, las mujeres que acuden al IOMPC son en su gran mayoría de bajos re-

ursos económicos y predominantemente mestiza o hispana.

Como se comentó anteriormente, luego de la determinación de la amplificación de HER2 en la muestra en estudio, se realizó una nueva clasificación molecular de los tumores de las pacientes, considerando ahora la expresión de los receptores hormonales (RE y RP) a través de IHQ y la amplificación de HER2 por CISH. Esto permitió agrupar en las diferentes clases moleculares los casos calificados inicialmente como desconocidos, debido a que tenían un resultado indeterminado (2+) para la expresión de HER2 por IHQ. Lo más importante a tomar en cuenta, es que esta nueva clasificación ocasionó que algunos casos considerados inicialmente en una clase molecular pasaron a otra clase, posterior a la revaloración del estado de HER2 a través de CISH (Tabla III).

Considerando la sumatoria del número de casos (167 en total), se evidenció que 23 de 167 casos (13,7%), cambiaron de categoría en la clasificación molecular del cáncer de mama luego de a la revaloración.

Este hecho tiene importante repercusiones clínicas, pues el abordaje terapéutico difiere entre las clases moleculares, así como los factores pronósticos asociados a cada tipo molecular de cáncer de mama. Hay que recordar que los tumores tipos luminales son de buen pronóstico, sin embargo, el luminal B tiene peor pronóstico que el luminal A. Esto se debe a la variación en la respuesta al tratamiento. Los tumores luminal A pueden ser tratados sólo con hormonoterapia, y los luminal B, requieren de una combinación de quimioterapia con hormonoterapia (11-13).

Como se ha comentado anteriormente, la sobreexpresión de HER2 en las células tumorales implica un pobre pronóstico, ocasionado entre otras cosas, por una mayor agresividad biológica de las células neoplá-

sicas. Sin embargo, a diferencia del subtipo triple negativo, el HER2 tiene agentes moleculares: el anticuerpo monoclonal anti-HER2, trastuzumab. La efectividad de éste en cáncer de mama metastásico y la marcada reducción en las recaídas en los tumores HER2 positivos al combinarlo con quimioterapia, lo ha llevado a ser considerado una herramienta terapéutica valiosa para tratar a las pacientes con esta clase molecular de cáncer de mama (23, 24).

Hoy en día, 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.

Por su parte, el triple negativo es un subtipo de mal pronóstico, pero que se asocia a una alta tasa de respuesta a la quimioterapia en la etapa inicial del tratamiento, debido a que tienen un alto porcentaje de células en mitosis, que explica su buena respuesta inicial, sin embargo, recidivan y metastizan rápidamente, llevando a un pronóstico muy sombrío (8, 9, 18).

Finalmente, en este estudio se pudo implementar la técnica de la CISH para la clasificación molecular de muestras histológicas de pacientes con cáncer de mama, en el CIMBUC. A pesar de que la CISH demostró ser una técnica viable de realizar, requiere de una obligatoria estandarización y el uso de un hibridizador para obtener resultados fiables. Para su validación y aplicación en forma sistémica, sus resultados deben ser comparados con los obtenidos a través la técnica estándar de oro, es decir, hibridación *in situ* fluorescente (FISH, siglas en inglés).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Menolascino, de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA), por facilitar el hibridizador utilizado para la realización de la CISH, a la Leda. Lisbeth Silva del CIMBUC y el Ledo. Andrius Tapia, por haber colaborado en la realización de los cortes histológicos y las matrices de tejido. 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

1. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, Ollila DW, Sartor CI, Graham ML, Perou CM. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* 2007; 13:2329-2334.
2. Pusztai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, Symmans W. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. *Oncologist* 2006; 11: 868-877.
3. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406:747-752.
4. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Borresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:10869-10874.
5. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H,

- Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:8418-8423.
6. Zepeda-Castilla E, Recinos-Money E, Cuéllar-Hubbe M, Robles-Vidal C, Maafs-Molina E. Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cirugía y Cirujanos* 2008; 76:87-93.
 7. Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist* 2011; 16:61-70.
 8. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, van de Rijn M, Perou CM. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10:5367-5374.
 9. Livasy C, Karaca G, Nanda R, Tretiakova M, Olopade O, Moore D, Perou CM. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2006; 19:264-271.
 10. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang MC, Nielsen TO, Moorman PG, Earp HS, Millikan RC. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 2006; 295:2492-2502.
 11. Uribe J, Hernández C, Menolascino F, Rodríguez J, Istúriz L, Márquez M. Clasificación molecular del cáncer de mama y su correlación clínica. *Rev Venez Oncol* 2010; 22:109-116.
 12. Wright SE. Immunotherapy of breast cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12:479-490.
 13. 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.
 14. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, Cheang MC, Gelmon K, Nielsen TO, Blomqvist C, Heikkilä P, Heikkinen T, Nevanlinna H, Akslen LA, Bégin LR, Foulkes WD, Couch FJ, Wang X, Cafourek V, Olson JE, Baglietto L, Giles GG, Sevleri G, McLean CA, Southey MC, Rakha E, Green AR, Ellis IO, Sherman ME, Lissowska J, Anderson WF, Cox A, Cross SS, Reed MW, Provenzano E, Dawson SJ, Dunning AM, Humphreys M, Easton DF, García-Closas M, Caldas C, Pharoah PD, Huntsman D. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med* 2010; 7:e1000279.
 15. O'Brien KM, Cole SR, Tse CK, Perou CM, Carey LA, Foulkes WD, Dressler LG, Geradts J, Millikan RC. Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Clin Cancer Res* 2010; 16:6100-6110.
 16. Salhia B, Tapia C, Ishak EA, Gaber S, Berghuis B, Hussain KH, Duquette RA, Resau J, Carpten J. Molecular subtype analysis determines the association of advanced breast cancer in Egypt with favorable biology. *BMC Womens Health* 2011; 11:1-9.
 17. Payne SJJ, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. Predictive markers in breast cancer – the present. *Histopathology* 2008; 52:82-90.
 18. Choi YL, Oh E, Park S, Kim Y, Park YH, Song K, Cho EY, Hong YC, Choi JS, Lee JE, Kim JH, Nam SJ, Im YH, Yang JH, Shin YK. Triple-negative, basal-like, and quintuple-negative breast cancers: better prediction model for survival. *BMC Cancer* 2010; 10:1-15.
 19. Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17:245-262.
 20. Emde A, Mahlknecht G, Maslak K, Ribba B, Sela M, Possinger K, Yarden Y. Simultaneous inhibition of estrogen receptor and the HER2 pathway in breast cancer: effects of HER2 abundance. *Transl Oncol* 2011; 4:293-300.

21. **Irigoyen MA, García FV, Iturriagagoitia AC, Beroiz BI, Martínez MS, Grima FG.** Molecular subtypes of breast cancer: prognostic implications and clinical and immunohistochemical characteristics. *An Sist Sanit Navar* 2011; 34:219-233.
22. **Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V.** Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer registry. *Cancer* 2007; 109: 1721-1728.
23. **Chang HR.** Trastuzumab-based neoadjuvant therapy in patients with HER2-positive breast cancer. *Cancer* 2010; 116:2856-2867.
24. **Vu T, Claret FX.** Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Front Oncol* 2012; 2:62-68.