

Revisión sistematizada de la implicación pronóstica de la sobreexpresión de la proteína HER2/erbB2 en osteosarcoma pediátrico

Systematic review of the prognostic implications of the overexpression of HER2/erbB2 in pediatric osteosarcoma

Ana Cristina García-Espinosa,¹ Araceli Castellanos-Toledo.²

▷ RESUMEN

Introducción: En la actualidad, los factores de crecimiento y sus receptores juegan un papel importante en el desarrollo de la célula normal y de la tumoral, además de regular el crecimiento celular, la diferenciación, la apoptosis, la migración celular y la invasión. El gen receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), también conocido como *neu* y *c-erb-B2*, ayuda a controlar el crecimiento celular, su división y su reparación y se ha encontrado amplificado en un 10% a 30% de los cánceres de mama, ovario, gástrico, cervicouterino, adenocarcinoma y en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. Su sobreexpresión ha demostrado tener implicaciones pronósticas en el cáncer gástrico y en el cáncer de mama, siendo en este último, donde el valor terapéutico de *c-erb-B2* también ha sido ampliamente demostrado. Recientes publicaciones han demostrado que la sobreexpresión de HER2/erbB2 también sucede en algunas otras neoplasias malignas no epiteliales, tales como

▷ ABSTRACT

Introduction: Currently, growth factors and their receptors play an important role in the development of the normal cell and tumor, as well as regulate cell growth, differentiation, apoptosis, cell migration and invasion. The receptor gene of growth factor human epidermal 2 (HER2), also known as *neu* and *c-erb-B2*, helps control cell growth, its division and its repair, and has been amplified by 10% to 30% of cancers of breast, ovarian, gastric, cervical, adenocarcinoma and head and neck squamous cell carcinoma. Their overexpression has been shown to have prognostic implications in gastric cancer and breast cancer, being in the latter, where the therapeutic value of *c-erb-B2* has also been widely demonstrated. Recent publications have shown that overexpression of HER2/erbB2 also happens in some other cancers not epithelial as osteosarcoma and Ewing's sarcoma. Some studies have shown a high incidence (approximately 40%) of the HER2 expression in osteosarcoma and postulated the use of antibody monoclonal specific anti-HER2 in their treatment, but the true prognostic involvement of HER2 in this malignancy still has not been well

1 Hospital Infantil del Estado de Chihuahua-CECAN. Chihuahua, Chih., México.

2 Servicio de Oncología, Instituto Nacional de Pediatría, S.S. México D.F., México.

Correspondencia: Dra. Araceli Castellanos Toledo, Servicio de Oncología, Instituto Nacional de Pediatría, S.S., Insurgentes Sur 3700-C, Insurgentes Cuicuilco, Delegación Coyoacán, C.P. 04530. México D.F., México. Teléfono: (55) 1084 0900, ext. 1312. Correo electrónico: aracastol@hotmail.com

el osteosarcoma (OS) y el sarcoma de Ewing. Algunos estudios han demostrado una alta incidencia (aproximadamente 40%) de la expresión de HER2 en OS, y han postulado el uso del anticuerpo monoclonal específico anti-HER2 en su tratamiento, pero la verdadera implicación pronóstica del HER2 en esta neoplasia aún no ha sido bien determinada. Mientras algunos autores han demostrado la correlación de la sobreexpresión del HER2/erbB2 con enfermedad metastásica, pobre respuesta histológica y pobre sobrevida libre de enfermedad (SLE), otros la han asociado a un menor riesgo de metástasis, o simplemente no han documentado su expresión. Debido a estas controversias, decidimos realizar la presente revisión sistematizada.

Objetivo: Conocer cuál ha sido la implicación pronóstica asociada a la sobreexpresión del gen HER2/erbB2 en pacientes con OS pediátrico, publicadas en la literatura médica.

Material y métodos: Se realizó la búsqueda de literatura sobre HER2/erbB2 y OS pediátrico en las bases de datos LILACS, Pubmed, Artemisa, IMBIOMED, COCHRANE y EMBASE, en los años de 1990 al 2005. Realizándose esta búsqueda desde 1990, debido a que anterior a este año no se conocía sobre el papel de la proteína HER2/erbB2 en OS. En los criterios de selección se incluyeron los estudios que evaluaron a pacientes pediátricos y adultos con OS, sarcoma de Ewing y sarcomas de partes blandas. Se excluyeron los artículos sobre animales.

Resultados: Se encontraron 14 estudios publicados. Cinco artículos fueron referentes a sarcomas de partes blandas, tanto en pacientes pediátricos como en adultos, en tres de estas publicaciones se demostró la sobreexpresión de HER2/erbB2 en 10.6%, 31% y 52.3%, respectivamente. Sólo se identificó la sobreexpresión de HER2 en ciertos tipos de sarcomas como carcinosarcoma, fibrohistiocitoma maligno, dermatofibrosarcoma y en el sarcoma sinovial. Nueve artículos fueron referentes a OS pediátrico y de adultos, de éstos, siete presentaron sobreexpresión de HER2 en 42%, 45.3%, 63%, 45%, 44%, 53% y 30%, respectivamente. Seis de estos siete artículos coinciden en que los pacientes con sobreexpresión de HER2 tienen una SLE menor que aquellos pacientes sin sobreexpresión de HER2 (40% vs 78% a cinco años, $p=0.01$), y sólo un artículo demostró que la sobreexpresión se asocia a buen pronóstico.

Conclusiones: La sobreexpresión de HER2 si parece tener una implicación pronóstica negativa en OS, y se asocia con una sobrevida global (SG) y una SLE muy pobre a pesar de tratamientos agresivos.

determined. While some authors have shown the correlation of overexpression of HER2/erbB2 with disease metastasis, poor histological response and poor disease-free survival (DFS), others have been associated with a lower risk of metastasis, or simply have not documented its expression. Due to these controversies, we decided to make the present systematized review.

Objective: To know what has been the prognostic implications associated with overexpression of the gene HER2/erbB2 in patients with pediatric osteosarcoma published in literature.

Material and methods: We conducted a literature search on pediatric osteosarcoma and HER2/erbB2 in databases of LILACS, Pubmed, Artemisa, IMBIOMED, COCHRANE and EMBASE for the years 1990 to 2005. This quest is performing since 1990 because before that this year is not known about the role of protein HER2/erbB2 in osteosarcoma. Selection criteria: We included studies that evaluated pediatric and adult patients with osteosarcoma, Ewing sarcoma and soft tissue sarcomas. Articles about animals were excluded.

Results: We found 14 published studies. Five items were related to soft tissue sarcomas in both pediatric and adult patients in three of these publications showed overexpression of HER2/erbB2 in 10.6%, 31% and 52.3% respectively. Overexpression of HER2 was identified only in certain types of sarcomas such as carcinosarcoma, malignant fibrous histiocytoma, dermatofibrosarcoma and synovial sarcoma. Nine items were related to pediatric and adult osteosarcoma, of these, seven showed HER2 overexpression in 42%, 45.3%, 63%, 45%, 44%, 53% and 30%, respectively. Six of these seven articles agree that patients with HER2 overexpression are lower than SLE patients without HER2 overexpression (40% vs 78% at five years, $p=0.01$) and only one item showed that overexpression is associated with good prognosis.

Conclusions: Overexpression of HER2 does seem to have a negative prognostic implication in osteosarcoma is associated with overall survival (OS) and SLE very poor despite aggressive treatments.

Keywords: HER2/neu, c-erb-B2, HER2/erbB2, osteosarcoma, prognostic factors, Mexico.

Palabras clave: HER2/neu, c-erb-B2, HER2/erbB2, osteosarcoma, factores pronósticos, México.

▷ INTRODUCCIÓN

Desde hace dos décadas se ha venido investigando el papel que juegan los factores de crecimiento en la tumorigénesis del cáncer. Los factores de crecimiento y sus receptores son bien conocidos, ya que juegan un papel importante durante el desarrollo de la célula normal y de la tumoral, además de regular diversos eventos que incluyen el crecimiento celular, la diferenciación, la apoptosis, la migración celular y la invasión.¹

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) juega un papel importante en los múltiples procesos de la tumorigénesis, contribuyendo a la proliferación de la célula cancerosa, angiogénesis y a las metástasis, así como a la protección de la apoptosis.²

El EGFR fue el primer receptor identificado de una familia de receptores conocidos como receptores tipo I de las tirosin-quinasa o receptores erbB,³ que anormalmente son activados por muchos tumores epiteliales.

La familia de los EGFR incluyen cuatro diferentes receptores: EGFR/erbB-1, HER2/erbB2, HER3/erbB3 y HER4/erbB4.

HER2 es la pareja principal del EGFR, ya que el complejo heterodimérico que contiene HER2 es más estable en la superficie celular, que otros complejos que contienen a otros miembros de la familia de EGFR.²

El gen receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 es también conocido como *neu* y *c-erbB2*.⁴

El HER2/neu es un receptor glicoproteico de transmembrana de 185 KD, codificado en el cromosoma 17q21 con actividad tirosin-quinasa,⁵ es el producto del protooncogen *c-erbB2* y es estructuralmente igual al EGFR.

HER2/neu es un gen que ayuda a controlar el crecimiento celular, su división y su reparación.⁶ Su sobreexpresión ha demostrado jugar un papel importante en la transformación celular, en la tumorigénesis y en el desarrollo de las metástasis.

Hallazgos adicionales soportan la hipótesis de que HER2 no sólo es un marcador, sino que también contribuye directamente en la patogénesis y en la agresividad clínica de los tumores que lo sobreexpresan.⁴

Inicialmente, la sobreexpresión de HER2 fue observada en una variedad de adenocarcinomas, principalmente en pacientes con carcinomas de sitio primario desconocido. Muchos pacientes con este tipo de carcinomas, tienen tumores que son pobremente diferenciados, agresivos y poseen un alto potencial metastásico. En las autopsias de estos pacientes se han documentado tumores primarios en lugares ocultos, que son asociados con la sobreexpresión de HER2.^{7,8} Este fenotipo también se ha visto asociado a la sobreexpresión de HER2 en uno de cada cuatro pacientes con cáncer de mama, y se correlaciona con un pobre resultado clínico en mujeres con o sin ganglios positivos.⁴ Esta sobreexpresión es considerada como un factor pronóstico negativo, está asociada con un intervalo libre de enfermedad muy corto y con una pobre sobrevida global (SG).^{6,7}

El valor pronóstico y el valor terapéutico del *c-erbB2* han sido demostrados principalmente en el cáncer de mama. Pacientes con sobreexpresión del gen *c-erbB2* tienen una SG y supervivencia libre de recaída significativamente más baja, que aquellos pacientes sin la sobreexpresión de *c-erbB2*. Aunque los niveles elevados de la expresión de p185 se correlacionan positivamente con las metástasis en los ganglios linfáticos,⁹ la sobreexpresión/amplificación del *c-erbB2* ha sido asociada con las altas incidencias de recaídas y muertes, particularmente en pacientes con enfermedad ganglionar. La amplificación cuantitativa de *c-erbB2* parece ser más relevante clínicamente para identificar a los pacientes que responderán mejor a trastuzumab (anticuerpo monoclonal anti-HER2), doxorubicina y otros agentes.

El gen *c-erbB2* también se ha encontrado amplificado en un 10% a 30% de los cánceres de ovario y gástrico, en la línea celular MKN-7 de cáncer gástrico, en adenocarcinoma de pulmón, carcinoma cervicouterino y en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.⁹

El mecanismo por el cual *c-erbB2* podría contribuir a la progresión maligna aún está por ser aclarado, sin embargo dos estudios^{10,11} han proporcionado evidencias que señalan una sobrerregulación de la invasión y metástasis dependiente de p185, en las líneas celulares de cáncer de mama NIH3T3 y MDA-MB-435.

Así la causa principal de la sobreexpresión de HER2/neu parece ser la amplificación del gen,^{7,12} la cual ha recibido mucha atención debido a su gran utilidad clínica como marcador pronóstico y como factor predictivo de respuesta al tratamiento.^{13,14}

Recientes publicaciones han demostrado que la sobreexpresión de HER2/erbB2 también sucede en algunas otras neoplasias malignas no epiteliales como osteosarcoma (OS), el sarcoma de Ewing y otros sarcomas de partes blandas.¹⁵⁻¹⁸

Los sarcomas de partes blandas representan el 1% de todas las enfermedades malignas en el adulto y el 15% de las enfermedades malignas en la infancia; su tratamiento es controversial. El papel de la activación de HER2/neu en estas neoplasias de partes blandas es pobremente entendido, y los datos moleculares son insuficientes sobre los estudios de inmunohistoquímica (IHQ) hasta ahora realizados.

Por otro lado, en la actualidad la capacidad para predecir el pronóstico al diagnóstico en los pacientes con OS es limitada. El OS es una neoplasia con un alto porcentaje de metástasis al diagnóstico y un alto riesgo de desarrollo de las mismas y de recaída local, durante y después del tratamiento. La identificación de quimioterapia efectiva para los pacientes con esta neoplasia llevó a un mejoramiento significativo de los resultados del tratamiento en las últimas décadas.¹⁹ Los protocolos de tratamientos actuales usan una combinación de cirugía y quimioterapia alcanzando una sobrevida libre de enfermedad (SLE) aproximada del 70% a cinco años, en los pacientes que no tienen metástasis al diagnóstico.²⁰ Aunque esto representa una alta proporción, los pacientes que recaen raramente responden a los tratamientos de rescate.¹⁹ Uno de los más importantes predictores de resultados en OS es la respuesta histológica del tumor a la quimioterapia prequirúrgica.²⁰⁻²² Intentos de intensificación del tratamiento basado sobre al menos una respuesta histológica óptima, no han mejorado los resultados.²¹ El uso de una quimioterapia preoperatoria más intensa en ensayos clínicos subsecuentes ha aumentado el porcentaje de pacientes con buena respuesta histológica, pero no ha cambiado la SLE. Por lo tanto, los resultados en OS no han mejorado significativamente en la última década. Hasta el momento, el más importante predictor de resultados al diagnóstico es la presencia o ausencia de metástasis.¹⁹

La sobreexpresión de *erb-B2* parece inducir también la transformación maligna de los fibroblastos, se ha propuesto como un marcador potencial de respuesta y pronóstico en OS.^{18,23} En los informes de Gorlick¹⁵ y Onda,¹⁸ esta sobreexpresión parece estar asociada con la presencia de metástasis pulmonares, disminución en la sobrevida y a una pobre respuesta histológica a la

quimioterapia prequirúrgica. Sin embargo, algunos otros estudios han reportado que contrariamente a la observación anterior, la sobreexpresión de HER2 no juega un papel importante en las metástasis pulmonares,^{17,24} las cuales por sí mismas determinan el pronóstico adverso en OS. En contraste, también otros reportes^{5,25} han demostrado la ausencia de expresión del HER2/neu en OS y en sarcoma de Ewing, sugiriendo que los altos porcentajes de casos positivos en las investigaciones de Gorlick y Onda plantean la posibilidad de que estos resultados sean incorrectos, debido a la posibilidad de sobre interpretación por diferencias en los anticuerpos de IHQ usados en ambos estudios.

A diferencia de lo que sucede en cáncer de mama y en otras neoplasias epiteliales, donde es claro el valor pronóstico y terapéutico que la expresión de HER2/neu tiene en OS, las publicaciones existentes sobre el papel que HER2/neu juega en el pronóstico y los resultados del tratamiento en esta neoplasia, muestran claras controversias en varios aspectos. Primero en la frecuencia de la expresión del gen y luego, en el verdadero valor pronóstico del mismo. Hasta el momento, no existen publicaciones con datos concluyentes del verdadero valor pronóstico de la sobreexpresión del HER2/neu en esta neoplasia, motivo principal del presente estudio que tiene como propósito principal, investigar y analizar exhaustivamente en la literatura que se encuentra disponible, la asociación de la expresión de la proteína HER2/erbB2 en OS, para poder confirmar y determinar cuál es la verdadera implicación pronóstica asociada a la sobreexpresión del gen HER2/erbB2 en estos pacientes, y qué factores externos pudieron haber influido en la expresión de HER2 para modificar los resultados de los diferentes reportes.

▷ CRITERIOS PARA LA VALORACIÓN DE LOS ESTUDIOS DE REVISIÓN

Para el desarrollo de esta revisión se seleccionaron los estudios que cumplieran con las siguientes características:

1. Sólo se incluyeron artículos cuyo diseño de estudio fue de cohorte, observacionales y retrospectivos. Sólo se incluyeron este tipo de estudios porque no existen otros diseños de estudio en la literatura, acerca de la sobreexpresión de HER2 en pacientes pediátricos.
2. Se incluyeron todos los estudios que evaluaron a pacientes pediátricos y adultos con OS, sarcoma de Ewing y sarcomas de partes blandas, con expresión de HER2 y su sobreexpresión.
3. Se excluyeron los artículos sobre animales, y los artículos acerca de revisión del tema.

Las medidas del resultado fueron la sobreexpresión de la proteína HER2/neu y su correlación pronóstica clínico-patológica positiva o negativa en OS pediátrico.

ESTRATEGIAS DE BÚSQUEDA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS ESTUDIOS

Se realizó la búsqueda de literatura sobre HER2/erbB2 y OS pediátrico, se adoptó la estrategia general de búsqueda informática en las bases de datos de LILACS, Pubmed, Artemisa, IMBIOMED, COCHRANE y EMBASE, en los años de 1990 al 2005. Se realiza la búsqueda desde 1990, debido a que anteriormente no se conocía sobre la proteína HER2/erbB2 en OS. La búsqueda bibliográfica proporcionó un total de 645 referencias bibliográficas. Después de la exclusión de los estudios que no cumplían los criterios de selección, se seleccionaron 456 referencias, eliminándose 100 duplicadas. Se eliminaron también los estudios que no cumplían con los requisitos para el estudio, quedando seleccionados 36 artículos. La lectura a texto completo y la evaluación de todos los artículos seleccionados por los autores, concluyó con la inclusión consensada de 18 estudios potencialmente relevantes. Se excluyeron cuatro, dos de ellos eran sobre la relación HER2/neu y EGFR, y los otros dos se realizaron en animales. Quedando finalmente incluidas 14 publicaciones.

Se revisaron las listas de las referencias de todos los artículos identificados en busca de los estudios potencialmente relevantes.

▷ MÉTODOS

IDENTIFICACIÓN DE LOS ESTUDIOS

Los investigadores seleccionaron los estudios potencialmente relevantes de las listas de título y resúmenes generados, a partir de la búsqueda en las bases de datos. Todos los estudios potencialmente relevantes se recuperaron en forma completa y luego fueron revisados de manera independiente por los autores. Se incluyeron 14 artículos: ocho sobre OS,^{15,17,18,24,26-29} cinco sobre sarcomas de partes blandas³⁰⁻³⁴ y un artículo sobre sarcoma de Ewing.²⁵

CALIDAD METODOLÓGICA

La evaluación de los artículos analizados se llevó a cabo mediante la escala de Jovell, donde encontramos que nuestros artículos están situados en el nivel VI de esta escala (Tabla 1).

EXTRACCIÓN DE DATOS

Se obtuvieron todos los datos mediante un formulario estructurado que recogió la siguiente información:

- *Nombre de los autores*, sólo se pusieron los dos principales autores de cada artículo analizado y el resto se nombraron como colaboradores.
- *Fecha de publicación*, los artículos se analizaron y fueron ordenados de acuerdo a su año de publicación en orden ascendente.
- *Fecha de realización*, se analizaron los artículos y se determinó la fecha de realización de acuerdo a cada artículo, en los años en que se realizó la investigación de cada artículo.
- *País*, donde se realizó, sólo encontramos artículos que se realizaron en países desarrollados como EUA, Japón e Italia, sólo se halló un artículo de Israel.
- *Diseño del estudio*, al analizar los artículos observamos que sólo son cohortes únicas, ya que no hay ningún artículo sobre ensayos clínicos.
- *Características de la población*, aquí analizamos que todos los artículos fueran pacientes hospitalizados, ambos sexos, niños y adultos, y que eran muestras de biopsias.
- *Diagnóstico*, se analizaron los artículos encontrando los siguientes diagnósticos que nos interesaban: Osteosarcoma, sarcoma de Ewing y sarcoma de partes blandas, además, si al momento del diagnóstico los pacientes tenían enfermedad localizada o enfermedad metastásica y si las muestras de las biopsias analizadas se realizaron al tiempo del diagnóstico o provenían de las metástasis o si se habían realizado al momento de la recurrencia.
- *Tipos de estudios* que se utilizaron para determinar la sobreexpresión de HER2 y/o amplificación del gen *c-erb-B2* (IHQ con el tipo de método y con el tipo de anticuerpo que utilizaron, biología molecular, FISH, CISH, RT-PCR).
- *Tratamiento*, se analizaron para determinar si los pacientes habían recibido tratamiento previo o posterior a la determinación de HER2 y el tipo de tratamiento administrado.
- *Pronóstico*, se determinó cuáles de los artículos señalaron si el pronóstico era positivo o negativo o si no lo determinaron.

Analizamos cada artículo para ver si los autores habían determinado la presencia o ausencia de sobreexpresión de HER2/neu, y si dicha expresión tenía o no implicación pronóstica.

Estas variables fueron definidas de acuerdo al tipo de artículos revisados y a los que se tenía como objetivos del estudio. Se recogió la información sobre la implicación pronóstica relacionada con la sobreexpresión de HER2/neu.

Tabla 1.

Clasificación de la evidencia científica (modificada por Jovell).

Nivel	Tipo de diseño	Condiciones de rigurosidad científica
I	Meta-análisis de ensayos controlados y aleatorizados	No heterogeneidad. Diferentes técnicas de análisis. Meta-regresión. Mega-análisis. Calidad de estudios
II	Ensayo Controlado y aleatorizado de muestra grande	Evaluación del poder estadístico. Multicéntrico. Calidad de estudios
III	Ensayo controlado y aleatorizado de muestra pequeña	Evaluación del poder estadístico. Calidad de estudio
IV	Ensayo prospectivo controlado no aleatorizado	Controles coincidentes en el tiempo. Multicéntrico. Calidad de estudio
V	Ensayo prospectivo controlado no aleatorizado	Controles históricos. Calidad de estudio
VI	Estudio de cohorte	Multicéntrico, apareamiento. Calidad del estudio
VII	Estudios de casos y controles	Multicéntrico. Calidad de estudio
VIII	Serie clínicas no controladas Estudios descriptivos: vigilancia epidemiológica, encuestas, registros, bases de datos, comités de expertos	Multicéntrico

Los artículos de la presente revisión están situados en el nivel VI de esta escala.

▷ RESULTADOS

El rango de diferencia entre la fecha de publicación y la fecha de realización fue de uno a siete años (promedio de 3.5 años). Por su año de publicación, encontramos artículos desde 1992 hasta el 2005. Antes de 1992 se encontraron artículos referentes a la sobreexpresión de HER2 en cáncer de mama en su gran mayoría, y fueron tomados únicamente como antecedentes. La mayor información sobre esta asociación pronóstica HER2 con otros tumores epiteliales y no epiteliales, se encontró partir del año 2000. De los 14 artículos incluidos para esta revisión, 10 artículos corresponden al periodo 2001 al 2005 y sólo cuatro artículos de 1992 a 1999, ocho de ellos fueron realizados en EUA, tres en Japón, dos en Italia y uno en Israel.^{15,17,18,24-34}

Todos los 14 artículos incluidos, revisados y analizados, fueron cohortes únicas retrospectivas, debido a que no se encontró ningún artículo de ensayos clínicos. El rango de edad promedio fue de 11.6-21.7 años. El tamaño de la muestra varió entre 13 a 273 casos. Para los ocho artículos de OS, el tamaño de la muestra estuvo entre 19 a 81 casos.

En estos 14 estudios finalmente incluidos, cinco artículos fueron referentes a sarcomas de partes blandas, tanto en pacientes pediátricos como en adultos. De estos cinco artículos sólo tres mostraron la sobreexpresión de HER2/erbB2, mostrando 10.6%, 31% y 52.6%, respectivamente.³²⁻³⁴ Sólo se identificó la sobreexpresión de HER2/erbB2 en ciertos tipos de sarcomas como carcinosarcoma, fibrohistiocitoma maligno,

dermatofibrosarcoma y sarcoma sinovial, y en este último sólo si tenía el gen de fusión SYT/SSX1. Dos de los tres artículos^{32,34} mostraron que la sobreexpresión de HER2/erbB2 tenía un impacto negativo en dichos pacientes, sin embargo en el otro se menciona que los pacientes con sobreexpresión de HER2 tienen un bajo riesgo de recurrencia, que aquellos que no lo expresaron ($p=0.02$)³³ y ninguno de los que sobreexpresó HER2 desarrolló metástasis.³³ En uno de los artículos³³ se menciona que la sobreexpresión sólo se encontró en pacientes masculinos ($p=0.02$).

Los ocho artículos referentes a OS se realizaron en pacientes pediátricos y en adultos, de éstos, seis reportaron sobreexpresión de HER2/erbB2 en 45.3%, 63%, 42%, 45%, 44% y 53%, respectivamente.^{15,17,18,26,28,29} Uno de los artículos se basó en las curvas de supervivencia de Kaplan Meier, encontrando que el grado de supervivencia de los pacientes con sobreexpresión de HER2/erbB2 fue significativamente peor, que para aquellos pacientes sin expresión de HER2/erbB2 ($p<0.01$). Sin embargo, los seis artículos coinciden en que los pacientes con sobreexpresión HER2 tienen una SLE menor, que aquellos pacientes sin sobreexpresión de HER2 (40% vs 78% a cinco años) ($p=0.01$). La sobreexpresión de HER2/erbB2 en la biopsia inicial se asoció con una pobre SG libre de metástasis ($p=0.04$), aún en pacientes con enfermedad localizada ($p=0.04$). Los pacientes con sobreexpresión de HER2 tuvieron más número de metástasis pulmonares y un intervalo corto de recurrencia. La sobreexpresión de HER2 también se relacionó

significativamente con el grado de necrosis (respuesta histológica), a la quimioterapia preoperatoria ($p=0.02$). Pacientes con sobreexpresión de HER2 tenían peor respuesta a la quimioterapia preoperatoria en comparación con aquellos que no (83.3% vs 51.7%) ($p=0.02$). En 58% de estos casos, la sobreexpresión de HER2 también sucedió en las metástasis pulmonares y tuvo una asociación significativa ($p<0.05$). La edad de los pacientes también se correlacionó con la expresión de HER2 ($p<0.05$), así como la pobre respuesta a la quimioterapia preoperatoria ($p<0.01$).

Un solo artículo¹⁷ mostró un alto porcentaje (63%) de sobreexpresión de HER2, esta sobreexpresión de HER2/neu fue más frecuente en las pacientes mujeres que en los hombres ($p=0.035$). No hubo relación entre el nivel de expresión de HER2, encontrado en el 68% de los buenos respondedores y en el 58% de los pobres respondedores ($p=0.035$). Los niveles elevados de HER2 fueron significativamente asociados con una alta probabilidad de que los pacientes no presentaron recaídas después del diagnóstico ($p=0.01$). Los pacientes con sobreexpresión de HER2/neu tuvieron una SLE a cinco años del 72% vs 46% de aquellos que no lo sobreexpresaron, por lo que la sobreexpresión de HER2/neu fue significativamente asociado con una alta SG ($p=0.028$).

La asociación también fue explorada de acuerdo al patrón histológico. La variedad osteoblástica fue la más frecuentemente observada, seguida de la condroblástica, fibroblástica y telangiectásica. El 24% a 36.7% de los casos con variedad osteoblástica, el 16% de los fibroblásticos, el 8.6% al 16% de los condroblásticos y el 1.2% de los telangiectásicos sobreexpresaron HER2, pero no hubo un análisis de pronóstico realizado para estos resultados.

En los 14 artículos revisados, las pruebas que se utilizaron para determinar la sobreexpresión de HER2 fueron: IHQ, RT-PCR, RISH, PCR e hibridación *in situ* cromogénica (CISH). Para la IHQ hubo una gran diversidad de anticuerpos monoclonales usados para tal fin, dentro de los cuales destacan: policlonal de conejo A0485 o kit de herceptest (DAKO), anticuerpo monoclonal mAb-1, anticuerpo monoclonal de ratón anti-erbB2 CB11 (Novacastra laboratorios Ltd.), anticuerpo monoclonal 5B5 herceptest (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ), anticuerpo monoclonal c-neu (Ab3) (Oncogén, Boston MA, EUA) y anticuerpo de conejo oncoproteína antihumana *c-erb-B2* (DAKO, Glostrup Dinamarca). Diez de los 14 artículos mencionan haber usado alguno de estos anticuerpos, el resto menciona sólo haber utilizado la prueba de herceptest de DAKO o un anticuerpo de ratón, sin embargo, en términos generales los anticuerpos más utilizados fueron el anticuerpo

policlonal de conejo A0485 (herceptest de DAKO) y el anticuerpo monoclonal CB11, principalmente en OS y sarcoma de partes blandas (**Tabla 2**). Las investigaciones hasta ahora publicadas de sobreexpresión de HER2/neu en OS utilizaron IHQ para tal fin.^{5,15,17,18,24,25}

▷ DISCUSIÓN

Uno de los primeros estudios en demostrar la correlación existente entre la expresión de *erb-B2* y el pobre pronóstico para los pacientes con OS, fue realizado por Onda y colaboradores en 1996,¹⁸ quienes concluyeron que la expresión de *erb-B2* estuvo relacionada con un pobre pronóstico y supervivencias bajas. Los pacientes que expresaron *erb-B2* tuvieron un alto riesgo de desarrollar metástasis pulmonares dentro de los primeros seis meses después del diagnóstico, y estuvo relacionada también con una pobre respuesta a la quimioterapia. Estos datos sugieren que el *erb-B2* juega un papel muy importante en la agresividad y en el crecimiento del tumor, así como en la producción potencial de metástasis en OS.

Posteriormente, Gorlick y colaboradores¹⁵ realizaron un estudio retrospectivo realizando IHQ sobre el material obtenido de 53 pacientes tratados en el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, demostrando altos niveles de expresión de HER2/erbB2 en 42.6% de los casos, y una alta frecuencia de expresión en las muestras de los pacientes con enfermedad metastásica al diagnóstico y al tiempo de la recaída. La expresión de HER2/erbB2 correlacionó con una significativa pobre respuesta histológica a la quimioterapia preoperatoria con SLE disminuida ($p=0.03$), aún en pacientes con enfermedad localizada. En los pacientes que al diagnóstico se presentaron sin metástasis, la expresión de HER2/erbB2 al tiempo de la biopsia inicial fue asociada con una disminución significativa de SLE a cinco años (47% vs 79%). Considerando que la sobreexpresión de HER2 puede tener un papel directo en la patogénesis y pobre curso clínico de ciertos tumores humanos, sugiriendo fuertemente que HER2 debe ser evaluado prospectivamente como un factor pronóstico. Por lo anterior, a los dos años de haber realizado este estudio, Gorlick y colaboradores realizan un nuevo estudio,²⁶ donde ellos pudieron confirmar lo que anteriormente Onda y ellos mismos habían concluido, acerca de que la sobreexpresión de HER2 se relacionó con una pobre SLE y muy pobre respuesta histológica a la quimioterapia preoperatoria, reafirmando nuevamente que la sobreexpresión de HER2 juega un papel muy importante en la biología del tumor, la agresividad y el crecimiento tumoral, y que su expresión puede ser un marcador muy útil en la determinación del pronóstico del paciente antes de iniciar el tratamiento.

Tabla 2.

Relación de anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Nº Artículos	Diagnóstico
Ac. Policlonal A0485	7	3 osteosarcomas 1 sarcoma de Ewing 3 sarcoma de partes blandas
A. Monoclonal CB11	3	Osteosarcoma
Ac. Monoclonal 5B5	1	Osteosarcoma
Ac. Monoclonal Ab-3	1	Osteosarcoma
Ac. Monoclonal mAb-1	1	Sarcoma de partes blandas
Ac. Monoclonal de ratón	1	Sarcoma de partes blandas
Total	14	

Panel de anticuerpos usados en 10 de los 14 artículos seleccionados para la presente revisión. El resto usó la prueba de herceptest de DAKO o un anticuerpo de ratón. En términos generales, los anticuerpos más utilizados fueron el anticuerpo policlonal de conejo A0485 (herceptest de DAKO) y el anticuerpo monoclonal CB11, principalmente en osteosarcoma y sarcoma de partes blandas.

Contrariamente, Akatsuka y colaboradores²⁴ demostraron en un primer estudio, que la expresión de *erbB2* disminuye en los individuos con OS tanto como ellos llegan a ser metastásicos, sugiriendo que el HER2 no juega un papel importante en el desarrollo de las metástasis pulmonares. En un estudio posterior realizado por los mismos investigadores,¹⁷ concluyeron que los niveles altos de *erbB2* en las células tumorales se relacionaron significativamente con una SLE y una SG elevada en 81 pacientes con OS, sin enfermedad metastásica al diagnóstico. Encontró que un 61% de los tumores examinados demostraron una alta expresión de *erbB2* y su presencia fue asociada significativamente con una incrementada probabilidad libre de evento y SG.¹⁷ El análisis multivariado demostró que el riesgo de eventos adversos y muerte fue aumentando sustancialmente entre los pacientes con expresión disminuida de la proteína *erbB2* en las células del tumor, comparados con los pacientes que tuvieron alta expresión de *erbB2* en las células del tumor. No se demostró una relación entre la expresión de *erbB2* y la extensión de la necrosis del tumor, después de la quimioterapia prequirúrgica. La conclusión de este estudio fue que una tinción negativa para *erbB2* es un factor de riesgo independiente en OS y que las discordancias encontradas en los estudios previos,^{15,18} donde demostraron que la sobreexpresión de *erbB2* puede estar asociada con metástasis pulmonares y con un pobre pronóstico para los pacientes con OS, se explica porque en éstos no excluyeron a los pacientes con enfermedad metastásica al diagnóstico, que es el más importante predictor de resultados, además de

que los protocolos de la quimioterapia utilizada no fueron descritos. Sin embargo, como el riesgo de factores adversos se incrementaron dos veces más en aquellos pacientes que tuvieron niveles disminuidos de *erbB2*, Akatzuka y colaboradores^{17,24} asociaron la sobreexpresión *erbB2* con un resultado favorable, sólo si los pacientes con OS no tuvieron enfermedad metastásica al diagnóstico y además fueron tratados con cirugía y altas dosis de quimioterapia neoadyuvante. Otro hallazgo igual de interesante fue que los pacientes que tuvieron una mayor sobreexpresión de *erbB2* fueron con mayor frecuencia mujeres, una explicación para lo anterior resulta de un estudio que demostró que el estradiol puede unirse y activar al receptor de *erbB2*. Es posible que *erbB2* no juegue un papel importante en el desarrollo de las metástasis pulmonares en los pacientes con OS, porque la ausencia en su sobreexpresión puede ser causada por el empleo de una quimioterapia muy intensa o porque simplemente no exista sobreexpresión de HER2 desde el inicio de la enfermedad. En otros estudios realizados por Maitra y Thomas,^{25,27} concluyeron que en contraste con los estudios previos,^{15,18} los suyos demostraron la ausencia de la expresión Her2/neu tanto en OS como en sarcoma de Ewing, y que la expresión de la proteína HER2/neu es un raro evento no sólo en el OS primario, sino también en la enfermedad metastásica. Las posibles razones para la discrepancia de este estudio con los estudios de Gorlick¹⁵ y Onda¹⁸ son desconocidas, pero existen varias posibilidades como que los estudios emplearon distintos anticuerpos para la determinación de HER2 (Tabla 2), y presumiblemente con sensibilidad y especificidad variables. Otra posibilidad es que todos los estudios usaron material archivado de parafina y la descalificación se realizó durante la noche, y en algunos casos esto pudiera influir en los resultados; otro es el criterio para determinar su interpretación, y la interpretación que se les dio. Asimismo, ellos concluyeron que HER2/neu no es un factor pronóstico ni un evento molecular importante en la oncogénesis del OS y el sarcoma de Ewing, al igual que Merimski y George,^{30,31} quienes sugieren que la expresión de *erbB2* en los sarcomas osteogénicos aún sigue siendo controversial, ya que los resultados indican que la sobreexpresión de HER2/neu es un raro evento o se encuentra ausente en los sarcomas y tumores de células pequeñas redondas y azules en niños, y su detección no parece tener alguna implicación pronóstica, sin embargo, esta conclusión fue hecha sobre una investigación de sobreexpresión de HER2/neu en sarcomas de partes blandas, en una cohorte de adultos la mayor parte, que además no incluyó a pacientes con OS, por lo que su conclusión en sarcomas osteogénicos no tiene fundamento alguno, además de que esta investigación no contó con el rigor metodológico necesario.

En la actualidad, Zhou y Ferrari^{28,29} retoman estas investigaciones y concluyen que el hallazgo de la expresión de HER2 tiene una alta tendencia de metástasis, sugiriendo que la expresión de HER2 puede caracterizar a un tipo de tumor más agresivo asociado con metástasis tempranas, los pacientes tienden a tener un intervalo de recurrencia corto con múltiples metástasis pulmonares, este patrón de recurrencia refleja el incremento biológico de agresividad del tumor, confirmando lo que ya antes se había mencionado por Onda y Gorlick.^{18,15} Señalando que la presencia de HER2 puede servir como un marcador pronóstico para un alto riesgo de metástasis pulmonares y un pobre pronóstico en pacientes con OS localizado al diagnóstico, y que la expresión de HER2/erbB2 juega un papel importante en el proceso de metástasis en OS. También encontraron que el OS puede mostrar la amplificación del gen como el posible mecanismo de la sobreexpresión de HER2/neu.

La realización e interpretación de la IHQ pudo haber sido el factor más importante y determinante para la discrepancia entre todos estos resultados, ya que los estudios emplearon distintos anticuerpos para la determinación de HER2, con sensibilidad y especificidad variables, así como el tipo de material archivado de parafina usado, procesos de descalificación, la interpretación intraobservador e interobservador y el criterio de dicha interpretación para considerar un resultado positivo o negativo.

Al respecto de esto, Press y colaboradores³⁵ evaluaron un panel de 28 anticuerpos (siete policlonales y 21 monoclonales) sobre 187 casos de cáncer de mama, que previamente demostraron ser HER2/neu positivos, y mostraron que la habilidad para detectar células positivas a HER2/neu varió de 6% a 82%, sugiriendo que se debe tener precaución en la interpretación de la IHQ por el fenómeno bien estudiado de la inconsistencia interobservador, uniforme con el material de referencia estandarizado. Lo que bien pudo haber sucedido en las discrepancias de los dos estudios anteriormente mencionados.

Una revisión de estudios de IHQ publicados sobre la sobreexpresión de HER2/neu,⁷ demostró un amplio rango de índices de sobreexpresión, variando del más bajo de 9% al más alto de 60%, esto pudo deberse a que una amplia variedad de diferentes anticuerpos se usaron en estos estudios. El herceptest de DAKO (Glostrup, Dinamarca) aprobado por la FDA, representa un método confiable para la investigación de la expresión de HER2/neu, ya que es un anticuerpo policlonal de conejo con procedimientos de evaluación estandarizados. Incluso comparado con la amplificación del gen HER2/neu por FISH, demostró una excelente correlación de altos niveles de sobreexpresión de HER2/neu (3+). Aunque

la amplificación del gen HER2/neu por FISH parece ser un predictor más preciso del beneficio clínico del tratamiento con el anticuerpo monoclonal específico, que la sobreexpresión por IHQ.³⁶ Las investigaciones hasta ahora publicadas de sobreexpresión de HER2/neu en OS han utilizado IHQ para tal fin.^{5,15,17,18,24,25}

▷ CONCLUSIONES

Fundamentado en esta revisión sistemática, nosotros concluimos que la sobreexpresión de HER2 en OS sí parece tener una implicación pronóstica negativa, con una SG y una SLE muy pobre a pesar de tratamientos agresivos, pero se requiere de los siguientes elementos para poder determinar con certeza si en realidad es un factor pronóstico:

- Realizar un estudio sólo en pacientes pediátricos con OS.
- Estandarizar las pruebas para la determinación de HER2.
- Separar a los pacientes y analizarlos cada uno, es decir, analizar si son metastásico o con sólo enfermedad localizada, y llevar un seguimiento de ellos para poder analizar si la sobreexpresión de HER2 tiene una implicación pronóstica positiva o negativa.
- Determinar si en los pacientes que ya fueron tratados y que presentaban sobreexpresión de HER2, ésta puede ser eliminada con el uso de quimioterapia o si esta sobreexpresión de HER2 persiste a pesar del tratamiento.
- Realizar estudios donde se identifiquen nuevos factores de riesgo para el OS, y así incorporar nuevas estrategias de tratamiento.
- El impacto que tiene la sobreexpresión de HER2 debe ser analizado en un estudio prospectivo en pacientes tratados de manera uniforme para evitar confusión de variables.
- Realizar un estudio multicéntrico que pueda examinar el papel que juega el oncogén HER2/neu en la patogénesis y progresión del OS.
- Realizar estudios sobre la seguridad y eficacia de trastuzumab en pacientes con OS que sobreexpresaron HER2.

El 15% a 20% de los pacientes con OS que presentan metástasis al diagnóstico tienen un pronóstico extremadamente pobre, con aproximadamente un 10% de SLE a largo plazo. Las metástasis como predictores no son útiles en el 80% al 85% de los pacientes que se presentan con enfermedad local únicamente. Sin embargo, la expresión de HER2 asociada a mal pronóstico en OS, indicaría asimismo que la terapia con anticuerpos

monoclonales dirigidos contra este blanco podría considerarse como una alternativa eficaz en el tratamiento de esta neoplasia altamente metastásica.

REFERENCIAS

1. Bookman MA, Darcy KM. Evaluation of monoclonal Humanized antiher2 antibody, trastuzumab, in patient with recurrent of refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the gynecologic oncology group. *J Clin Oncol* 2003;21:283-290.
2. Capuzzo F, Gregorc V, Rossi E, et al. Gefitinib in pretreated non small cell lung cancer (NSCLC): analysis of efficacy and correlation with HER2 and epidermal growth factor receptor expression in locally advanced or metastatic (NSCLC). *J Clin Oncol* 2003; 21:2658-2663.
3. Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonist in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21:2787-2799.
4. Cobleigh MA, Vogel CL. Multinational study of efficacy and safety of humanized antiher2 monoclonal antibody in women who have HER2 overexpressing metastatic breast cancer that progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999;17:2639-2648.
5. Witig JC, Cruz L, Wodajo F, et al. Expression of HER2/neu and EGFR in osteosarcoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* (abstr 790).
6. Slomovitz BM, Russell RB, Burke TW, et al. HER2/neu overexpression and amplification in uterine apillary serous carcinoma. *J Clin Oncol* 2004;22:3126-3132.
7. Lebeau A, Deimling D, Kaltz C, et al. HER2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Oncol* 2001;19:354-363.
8. Hainworth JD, Lenington WJ, Greco FA. Overexpression of HER2 in patients with poorly differentiated carcinoma of poorly differentiated adenocarcinoma of unknown primary site. *J Clin Oncol* 2000;18:632-635.
9. Allgayer H, Babic R, Gruetzner KU, et al. c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor associated protease system. *J Clin Oncol* 2000;18:2201-2209.
10. Yu D, Hung MC. Expression of ras neu oncogene is sufficient to induce experimental metastasis in 3T3 cells. *Oncogene* 1991;6:1991-1996.
11. Tan M, Yao J, Yu D. Overexpression of the c-erbB-2 gene enhanced intrinsic metastasis potential in human breast cancer cells without increasing their transformation abilities. *Cancer Res* 1997;57:1199-1205.
12. Thor AD, Lui S, Edgerton, et al. Activation (tyrosine phosphorylation) of erbB-2 (her/neu): A study of incidence and correlation with outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 2000;18:3230-3239.
13. Knoop AS, Bentzen SM, Metta M, et al. Value of epidermal growth factor receptor, HER2, P53 and steroid receptor in predicting the efficacy of tamoxifen in high risk postmenopausal breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2001;19:3376-3384.
14. Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, et al. Evaluation of HER2/neu gene amplification and overexpression: Comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J Clin Oncol* 2002;20:3095-3105.
15. Gorlick R, Huvoos AG, Heller G, et al. Expression of HER2/erbB-2 correlates with survival in osteosarcoma. *J Clin Oncol* 1999;17:2781-2788.
16. Zhou Z, Jia SJ, Hung MC, et al. EIA sensitizes HER2/neu overexpressing Ewing's Sarcoma cell's to topoisomerase II-Targeting anticancer drugs. *Cancer Res* 2001;61:3394-3398.
17. Akatsuka T, Wuda T, Kokai, et al. ErbB2 expression is correlated with increased survival of patients with osteosarcoma. *Cancer* 2002;94:1397-1404.
18. Onda M, Matsuda S, Higaki S, et al. ErbB-2 expression is correlated with poor prognosis for patients with osteosarcoma. *Cancer* 1996;77:71-78.
19. Meyers PA, Gorlick R. Osteosarcoma. *Pediatr Clin North Am* 1997;44:973-990.
20. Provisor AJ, Etinger LJ, Nachman JB, et al. Treatment of nonmetastatic osteosarcoma of the extremity with preoperative and postoperative chemotherapy: A report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol* 1997;15:76-84.
21. Meyers PA, Gorlick R, Heller G, et al. Intensification of preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: The results of the Memorial Sloan-Kettering (T12) protocol. *J Clin Oncol* 1998;16:2452-2458.
22. Wunder SJ, Paulin G, Huvoos AG, et al. The histological response to chemotherapy as a predictor of the oncological outcome of operative treatment of Ewing sarcoma. *J Bone Joint Surg Am* 1998;80:1026-1033.
23. Baldini N, Scotlandi K, Barbanti-Bronzano G, et al. Expression of p-glycoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome. *N Engl J Med* 1995;333:1380-1385.
24. Akatsuka T, Wada T, Kokaio Y, et al. Loss of ErbB2 expression in pulmonary metastatic lesions in osteosarcoma. *Oncology* 2001;60:361-366.
25. Thomas DG, Giordano TG, Sanders D, et al. Absence of HER2/neu gene expression in Osteosarcoma and Skeletal Ewing's Sarcoma. *Clin Cancer Res* 2002;8:788-793.
26. Morris CD, Gorlick R, Huvoos AG, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 as a prognostic indicator in osteogenic sarcoma. *Clin Orth and Rel Res* 2001;382:59-65.
27. Maitra A, Wanser D, Weinberg, et al. Amplification of the HER-2/neu oncogene is uncommon in pediatric osteosarcoma. *Am Cancer Soc* 2001;92:677-683.
28. Zhou H, Randall RL, Brothman AR, et al. HER-2/neu expression in osteosarcoma increases risk of lung metastasis and can be associated with gene amplification. *J Ped Hem Oncol* 2003;25:27-32.
29. Ferrari S, Bacci G, Bertoni F, et al. Evolution of P-glycoprotein, HER-2/ErbB2, p53, and Bcl-2 in primary tumor and metachronous lung metastases in patient with high grade osteosarcoma. *Am Can Soc* 2004;100:1936-1942.
30. George E, Niehans GA, Swanson PE, et al. Overexpression of the c-erbB-2 oncogene in sarcomas and small round-cell tumors of childhood. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116:1033-1035.
31. Merimsky O, Issakov J, Schwartz I, et al. Lack of ErbB-2 oncogene product overexpression in soft tissue sarcomas. *Acta Oncológica* 2002;41:366-368.
32. Froster H, Kox S, Ganti AK, et al. HER-2/neu overexpression detected by immunohistochemistry in soft tissue sarcomas. *Am J Clin Oncol* 2003;26(2):188-191.
33. Nuciforo PG, Pellegrini C, Fasani R, et al. Monoclonal and Immunohistochemical analysis of HER2/neu oncogene in sinovial sarcoma. *Human Pathol* 2003;34(7):639-645.
34. Thomas DG, Giordano TJ, Sanders D, et al. Expression of receptor tyrosine kinases epidermal growth factor and her-2/neu in sinovial sarcoma. *Am Can Soc* 2005;103:830-838.
35. Press MF, Hung G, Godolphin W, et al. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res* 1994;54:2771-2777.
36. Mass R, Sanders C, Kasian C, et al. The concordance between the clinical trials assay (CTA) and fluorescence in situ hybridization in the Herceptin pivotal trials. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000;19:75^a(abstr 291).