

J.M. Baena<sup>a</sup>,  
 M.J. Palomo<sup>a</sup>,  
 J. Pérez-Requena<sup>b</sup>,  
 S. Garzón<sup>c</sup>,  
 E. Benítez<sup>d</sup>,  
 E. Alonso<sup>a</sup>

# Valor pronóstico de la sobreexpresión de HER-2 en pacientes con carcinoma de mama precoz de alto riesgo tratadas con quimioterapia a dosis altas

## Prognostic value of HER-2 over-expression in women with high-risk early stage breast cancer treated with high-dose chemotherapy

### SUMMARY

**Purpose:** The objective of the present study was to retrospectively assess the prognostic value of HER-2 expression in a sub-group of patients with early, high-risk breast cancer treated with high-dose adjuvant chemotherapy.

**Methods:** Paraffin blocks of the primary tumor were obtained from 62 appropriate patients. Sections were independently assessed by two pathologists (MJP and JPR) who were blinded with respect to clinical results. Immunohistochemistry on tissue sections was with the commercially available HercepTest (Dako®). Other variables included in the association analysis of patient survival were tumor size, axillary node involvement, histological grade, nuclear grade, steroid hormone receptor expression and age.

**Results:** HER-2 expression was 3+ in 12 (19%), 2+ in 9 (14%), 1+ in 10 (17%) and 0 in 31 cases (50%). Overexpression of HER-2 (score 3+) was statistically significantly associated with negative hormonal receptor expression ( $p = 0.03$ ) and with high nuclear grade ( $p = 0.02$ ) but no significant associations were observed with tumor size, node involvement, histological grade, nor age. The findings were similar when the statistical analyses employed HER-2 values of 2+ and 3+ as "positive". Only overexpression (score 3+) of HER-2 was significantly associated with a lower disease-free survival ( $p = 0.05$ ) but not with overall survival ( $p = 0.75$ ).

**Conclusions:** Overexpression of HER-2, as measured by the HercepTest is a predictive factor of disease free survival in patients with high-risk primary breast cancer treated with high-dose chemotherapy.

**Palabras clave:**

Carcinoma de mama. Quimioterapia a dosis altas. HER-2. Inmunohistoquímica.

**Key words:**

HER-2/neu. Breast cancer. High-dose chemotherapy. Immunohistochemistry.

<sup>a</sup>Unidad de Patología Mamaria.  
<sup>b</sup>Servicio de Anatomía Patológica  
 y <sup>d</sup>Servicio de Medicina Preventiva.  
 Hospital Universitario Puerta del Mar.  
 Cádiz.

<sup>c</sup>Servicio de Hematología.  
 Hospital de Jerez. Jerez.

Correspondencia:  
 J.M. Baena Cañada.  
 Unidad de Patología Mamaria.  
 Hospital Universitario Puerta del Mar.  
 Avda. Ana de Viya, 21. 11009 Cádiz.  
 Correo electrónico:  
 jmbaenacanada@hotmail.com

## INTRODUCCIÓN

HER-2 es un miembro de la familia de receptores de factores de crecimiento epidérmico. Esta familia está constituida por cuatro receptores tirosin-kinasa situados en la membrana citoplasmática y están codificados por genes individuales pero muy similares. HER-2 es un importante mediador en los procesos de proliferación y diferenciación celular<sup>1</sup> y se encuentra sobreexpresado en el 15-30 % de los carcinomas infiltrantes de mama<sup>2</sup>. Tras su descubrimiento, el gen HER-2 ha adquirido gran importancia clínica debido al reconocimiento de que su amplificación y la sobreexpresión de la proteína que codifica en tumores mamarios, condiciona un peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama<sup>3</sup>. Estos resultados han sido confirmados en pacientes con carcinoma de mama precoz con ganglios positivos<sup>4,5</sup>. En el subgrupo de pacientes con alto riesgo de recidiva, tratadas con quimioterapia a dosis altas y autotrasplante de progenitores hematopoyéticos, la sobreexpresión de HER-2 también se ha mostrado como un factor pronóstico negativo e independiente, condicionando menores tasas de supervivencia libre de enfermedad y de supervivencia global<sup>6</sup>.

El estudio inmunohistoquímico con el anticuerpo polyclonal de Dako, denominado HercepTest ha sido propuesto como un método seguro para determinar la sobreexpresión de la proteína HER-2 en tumores mamarios y su validez ha sido confirmada cuando ha sido comparado con la determinación de la amplificación genética mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH)<sup>7</sup>.

A pesar de los avances en la información pronóstica en pacientes con cáncer de mama, la mayoría de los estudios sobre el valor pronóstico de la sobreexpresión de HER-2 han sido retrospectivos. El hallazgo de HER-2 como factor predictivo de la respuesta a la quimioterapia y hormonoterapia se basa también en estudios no prospectivos. Se ha sugerido que la sobreexpresión de HER-2 condiciona resistencia a la quimioterapia adyuvante tipo CMF<sup>8,9</sup>, así como que dicha sobreexpresión incrementa la sensibilidad tumoral a la adriamicina<sup>10-13</sup> y que estas pacientes mejoran su pronóstico cuando son tratadas con regímenes adecuados de quimioterapia adyuvante que contienen adriamicina<sup>14</sup>. Respecto a la hormonoterapia, se ha observado en algunos estudios clínicos que la sobreexpresión de HER-2 ocasiona resistencia a este tratamiento<sup>15,16</sup>.

La quimioterapia a dosis altas de consolidación con soporte de progenitores hematopoyéticos en el cáncer de mama fue considerada un tratamiento muy prometedor en la pasada década, apoyándose en los resultados de estudios pilotos y ensayos de fase I y II. Los re-

sultados de estos estudios no controlados en los que se demostraba un beneficio en la supervivencia de las pacientes con carcinoma de mama precoz de alto riesgo, animaron a muchos investigadores a tratar de este modo a estas enfermas. Hoy disponemos de datos procedentes de siete ensayos aleatorizados y prospectivos que han incluido unas 3.000 pacientes en el contexto adyuvante, donde el tratamiento de quimioterapia a dosis altas con soporte de progenitores hematopoyéticos ha sido comparado con diferentes regímenes de quimioterapia con antraciclinas, más o menos intensos, pero sin soporte hematológico. Sólo uno de dichos estudios ha demostrado beneficio en la supervivencia para las pacientes tratadas con quimioterapia a dosis altas<sup>17-21</sup>. Mientras que los resultados definitivos están pendientes, es posible que un subgrupo de pacientes pueda beneficiarse de la quimioterapia a dosis altas. Es muy interesante identificar nuevos factores pronósticos y predictivos con objeto de aplicar con mayor seguridad los tratamientos a que es sometido este subgrupo de pacientes.

La finalidad de este estudio es identificar de manera retrospectiva el valor pronóstico y predictivo de la sobreexpresión de HER-2, medida mediante HercepTest, junto a factores pronósticos clásicos como el tamaño tumoral, estado ganglionar, receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP), grados histológico y nuclear y edad en las pacientes con carcinoma de mama precoz de alto riesgo tratadas por nuestro grupo con altas dosis de quimioterapia adyuvante y autotrasplante de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Han sido revisadas 62 pacientes con los siguientes requisitos: edad de 60 años o menos, diagnóstico histopatológico de carcinoma de mama obtenido mediante cirugía, estadio II o III con seis o más ganglios axilares positivos, adecuada capacidad funcional (ECOG 0-1) y funciones hematopoyética, hepática, renal, cardiaca y pulmonar normales. Se excluyeron las mujeres gestantes, con enfermedad psiquiátrica grave, con segundas neoplasias distintas al carcinoma intraepitelial de cérvix y carcinoma cutáneo. Siguiendo las normas del Comité Ético de nuestro hospital, todas las pacientes otorgaron su consentimiento por escrito antes del tratamiento y el estudio retrospectivo de HercepTest fue aprobado con garantías de anonimato de las pacientes. Las pacientes recibieron 6 ciclos de quimioterapia adyuvante FEC: ciclofosfamida 600 mg/m<sup>2</sup>, 4-epirubicina 80 mg/m<sup>2</sup> y 5-fluoruracilo 600 mg/m<sup>2</sup> intravenosos (IV)

cada 3 semanas y un ciclo de quimioterapia a dosis altas con ciclofosfamida 5 gr/m<sup>2</sup> IV, etopósido 1,2 gr/m<sup>2</sup> IV y carboplatino 1,5 gr/m<sup>2</sup> IV. Todas recibieron radioterapia y se prescribió tamoxifeno 20 mg/día durante 5 años a las enfermas con tumores con RE/RP positivos. Las características de las pacientes se recogen en la tabla 1.

El estudio inmunohistoquímico con HercepTest (Dako<sup>®</sup>) se realizó tras obtener los bloques de parafina de los tumores primarios diagnosticados en nuestro centro y en los hospitales de referencia, a partir de los cuales se obtuvieron las secciones histológicas. Las muestras fueron analizadas por dos patólogos (M.J.P.G y J.P.R) ajenos a los resultados clínicos. Se llevó a cabo tras desparafinación de los cortes tisulares mediante el protocolo del sistema HercepTest. Se realizó recuperación antigénica mediante calor y bloqueo de la peroxidasa endógena. Los cortes se incubaron con el anticuerpo primario (anticuerpo de conejo anti-proteína HER-2 humana) durante 30 minutos, con el reactivo de visualización (EnVision) durante otros 30 minutos y finalmente con el sustrato cromógeno diaminobenzidina. Los pasos finales incluyeron la contratinción con hematoxilina de Mayer y el montaje. El control de la técnica se realizó con preparaciones histológicas de líneas celulares de cáncer de mama (MDA-231, MDA-175 y SKBR-3) que expresan diferentes intensidades de inmunotinción (0, 1+ y 3+). La evaluación se realizó mediante microscopía óptica, asignando puntuaciones del 0 al 3+. El valor de la cuantificación 0 corresponde a la ausencia de inmunotinción de membrana, el valor 1+ a una tinción de membrana débil e incompleta en más del 10% de las células tumorales, el valor 2+ a la inmunotinción de intensidad moderada en la totalidad de la membrana celular en más del 10% de las células y la categoría 3+ a los casos con tinción intensa y completa de membrana en más del 10% de la población tumoral.

Los RE y RP fueron determinados por inmunohistoquímica y considerados positivos cuando más del 50% de los núcleos presentaban tinción de intensidad 1, más del 35% presentaban intensidad 2 o más del 20% presentaban intensidad 3. Los grados histológico y nuclear fueron determinados según los criterios clásicos de Bloom y Richardson modificados<sup>22</sup>. El tamaño tumoral y los ganglios fueron clasificados de acuerdo con el sistema TNM<sup>23</sup>.

Las variables para el análisis estadístico fueron el status HER-2 (positivo: puntuación 3+, repitiendo la evaluación considerando positivo la puntuación 2+ y 3+), tamaño tumoral (T1-T2 o T3-T4), número de ganglios axilares metastatizados (6-10 o > 10), grado histológico (1-2 o 3), grado nuclear (1-2 o 3), status RE/RP combinado (positivo o negativo) y edad (< 35 o > 35). Se ha

TABLA 1  
CARACTERÍSTICAS DE LAS PACIENTES

Edad mediana	43 años
Rango	25-60 años
Tipo histológico	
Ductal	55 (89%)
Lobulillar	6 (10%)
Mixto	1 (1%)
Estadio	
II-A	6 (10%)
II-B	26 (42%)
III-A	25 (40%)
III-B	5 (8%)
Tamaño tumoral	
Media	3,9 cm
Rango	1-7 cm
Ganglios	
Mediana	10
Rango	6-44
6-10	32
> 10	30
Grado histológico	
1	1 (4%)
2	39 (69%)
3	15 (27%)
Grado nuclear	
1	4 (7%)
2	33 (59%)
3	19 (34%)
RE/RP	
Positivos	37 (59%)
Negativos	25 (41%)

analizado la asociación de las variables con la expresión de HER-2. Se ha utilizado el test de la chi cuadrado para las variables cualitativas y el test de la t-student para variables cuantitativas. La duración del seguimiento fue computada desde la fecha de la quimioterapia hasta el primer evento (recurrencia o muerte) o hasta el último contacto y fue analizado como supervivencia libre de enfermedad (SLE) o supervivencia global (SG). En el análisis de la supervivencia se ha usado el test de Kaplan-Meier<sup>24</sup> para el cálculo del tiempo de SG y de SLE. Para estudiar la asociación entre supervivencia y ciertas variables se ha utilizado el test de Log-rank<sup>25</sup>.

## RESULTADOS

La expresión de HER-2 fue 3+ en 12 casos (19%), 2+ en 9 casos (14%), 1+ en 10 casos (17%) y 0 en 31 casos (50%). Todos los casos de carcinoma lobulillar

TABLA 2

**ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LAS VARIABLES EN RELACIÓN CON LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD Y SUPERVIVENCIA GLOBAL**

Características	SLE (%)	p	SG (%)	p
Tamaño tumoral				
T1-T2	58	0,31	80	0,46
T3-T4	52		69	
Ganglios axilares		0,87		0,53
6-10	56		79	
> 10	55		75	
Grado histológico		0,93		0,67
1-2	52		78	
3	61		73	
Grado nuclear		0,87		0,65
1-2	58		74	
3	58		83	
RE/RP		0,06		0,28
Positivos	65		70	
Negativos	39		82	
Edad		0,97		0,88
< 35	57		80	
> 35	54		75	
HER-2 2+ y 3+		0,09		0,53
Positivo	41		67	
Negativo	62		81	
HER-2 3+		0,05		0,74
Positivo	33		70	
Negativo	60		77	

fueron HER-2 negativo con puntuación 0. En nuestra serie la positividad de HER-2 con una puntuación 3+ se asoció de forma significativa con la negatividad de RE/RP ( $p = 0,03$ ) y con grado nuclear alto ( $p = 0,02$ ). Sin embargo, no se observó ninguna asociación con las siguientes variables: tamaño tumoral ( $p = 0,39$ ), número de ganglios positivos ( $p = 0,52$ ), grado histológico ( $p = 0,46$ ), y edad ( $p = 0,30$ ). Cuando se realizó el mismo análisis considerando como HER-2 positivo todos los casos con puntuación 2+ y 3+ se obtuvieron resultados similares: asociación significativa con negatividad de RE/RP ( $p = 0,04$ ) y con grado nuclear alto ( $p = 0,0001$ ) y ausencia de asociación con tamaño tumoral ( $p = 0,32$ ), número de ganglios positivos ( $p = 0,26$ ), grado histológico ( $p = 0,17$ ) y edad ( $p = 0,47$ ).

La mediana de seguimiento de las pacientes es 37 meses (rango: 5-88 meses). La SG de todo el grupo es de 75 % y la SLE es de 54 % a los 37 meses. En el análisis univariante las siguientes variables no tuvieron

influencia significativa en la SG ni en la SLE: tamaño tumoral, número de ganglios, grado histológico, grado nuclear y edad. La negatividad de RE/RP está asociada a menor SLE, pero sin alcanzar significación estadística ( $p = 0,06$ ) y no mostró valor predictivo de la SG ( $p = 0,28$ ) (tabla 2). La sobreexpresión de HER-2 con una puntuación 3+ se asocia de forma significativa con una menor SLE (riesgo relativo [RR] = 2,24; intervalo de confianza del 95 % [IC] = 1-5,20;  $p = 0,05$ ) (fig. 1), pero no presenta asociación con la SG ( $p = 0,74$ ). La sobreexpresión de HER-2 con una puntuación 2+ y 3+ se asoció a una menor SLE, aunque sin alcanzar significación estadística (RR = 1,94; IC 95 % = 0,88-4,26;  $p = 0,09$ ) y no demostró valor predictivo de la SG ( $p = 0,53$ ) (tabla 2). Como sólo se identificó una variable significativa el análisis multivariante no fue realizado.

## DISCUSIÓN

Están disponibles varios métodos para determinar la sobreexpresión del gen HER-2 o de la proteína que codifica. Los más comunes son la evaluación de la amplificación génica con FISH, que es considerado un test más específico y el estudio inmunohistoquímico del tejido tumoral, que se basa en la demostración de la proteína de membrana en el tejido mediante su reacción con anticuerpos específicos. Varios estudios han demostrado que la tinción de la membrana celular en el análisis inmunohistoquímico se correlaciona bien con el contenido de HER-2 medido por otros métodos<sup>26,27</sup>, pero distintos anticuerpos han obtenido resultados diferentes, con amplia variabilidad de la sensibilidad entre los mismos<sup>27</sup>. Este hecho sugiere que el método de medida de HER-2 puede ser importante en la predicción de los resultados<sup>28</sup>, siendo fundamental en los estudios de esta área analizar si estos diferentes métodos de medida obtienen resultados comparables. A pesar de utilizar anticuerpos diferentes, los resultados de nuestro estudio coinciden con los del publicado por la Universidad de Colorado<sup>6</sup> en la ausencia de asociación entre la sobreexpresión de HER-2 (analizado mediante el anticuerpo CB 11) y el tamaño tumoral y el número de ganglios. Hay también coincidencia en el significativo valor predictivo de la sobreexpresión de HER-2 sobre la SLE y en la ausencia de predicción de la SG en el análisis univariante. En nuestro estudio, además, se halló una asociación significativa entre sobreexpresión de HER-2, RE/RP negativos y grado nuclear alto.

Los porcentajes de positividad de HER-2 detectados en nuestra serie (33 % de casos con puntuación 2+ y

3+ y 19 % de casos con puntuación 3+) son equiparables a las tasas de 15-30 % observadas en otros estudios y están lejos del 60 % de positivos comunicados con el anticuerpo policlonal de Dako<sup>28</sup>. No parece, por tanto, plausible la explicación de que este subgrupo de pacientes con un fenotipo tumoral más agresivo (tamaño tumoral grande y elevado número de ganglios axilares metastatizados) posea una mayor prevalencia de sobreexpresión de HER-2.

El subgrupo de pacientes con expresión de HER-2 con puntuación 2+ selecciona casos donde el 75 % carece de amplificación génica<sup>29</sup>, mientras que la mayoría de los casos con una puntuación 3+ presenta amplificación del gen<sup>30</sup>. Por este motivo, hemos estudiado la asociación con la supervivencia de los casos HER-2 positivo fuerte (puntuación 3+) y de forma separada añadimos los casos HER-2 positivo débil (puntuación 2+ y 3+), con objeto de detectar si la información predictiva aumentaba proporcionalmente a la expresión de HER-2, ya que los peores resultados se obtienen en tumores con altos niveles de amplificación<sup>3</sup>. El hecho de hallar como única variable significativa a la expresión 3+ está de acuerdo con dicho planteamiento.

El carcinoma de mama es una enfermedad heterogénea en cuanto a su comportamiento clínico, pero, en general, es posible identificar factores predictivos biológicos y clínicos, como el grado histológico y nuclear, los receptores hormonales, el tamaño tumoral y el estado nodal que están bien establecidos y se correlacionan con la sobreexpresión de HER-2<sup>31</sup>. El valor de los diferentes indicadores pronósticos en las pacientes con carcinoma de mama locorregional de alto riesgo tratadas con quimioterapia a dosis altas y autotrasplante de progenitores hematopoyéticos no está bien establecido. Bitran et al<sup>32</sup> han analizado los patrones de recidiva en estas pacientes, encontrando que la sobreexpresión de HER-2 es el único factor estrechamente relacionado con el fallo del tratamiento. En el estudio de Somlo et al<sup>33</sup> el RP negativo fue el único factor que influyó negativamente en la SLE y SG de estas pacientes, hecho que contrasta con los resultados del análisis de Nieto et al<sup>34</sup> que hallan como factores predictivos e independientes de la SLE a la ratio nodal (número de ganglios positivos entre número de ganglios aislados), al tamaño tumoral y a los RE/RP negativos. En nuestro estudio no hemos podido detectar ningún factor predictivo de peor supervivencia, a excepción de la sobreexpresión de HER-2 con puntuación 3+. En las pacientes con carcinoma de mama metastásico tratadas con quimioterapia a dosis altas la sobreexpresión de HER-2 mediante inmunohistoquímica o FISH no estuvo asociada a peor

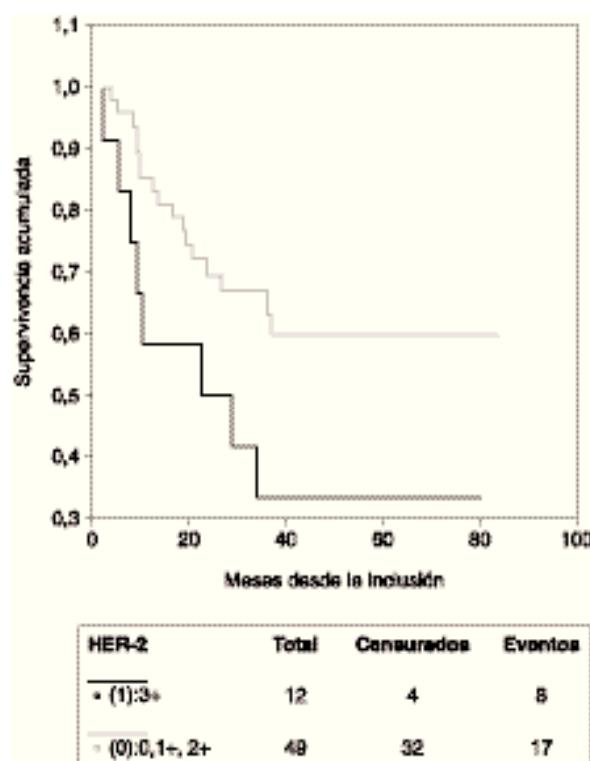


Fig. 1. Supervivencia libre de enfermedad de las pacientes con tumores HER-2 positivo (puntuación 3+) y negativo (puntuación 0, 1+ y 2+).

pronóstico en el estudio publicado por Harris et al<sup>35</sup> y si lo estuvo en otro estudio de Nieto<sup>36</sup>.

Nuestro estudio tiene las limitaciones del escaso número de casos, el corto seguimiento y los sesgos inherentes a todos los estudios retrospectivos. Sin embargo, es el primero que evalúa el impacto pronóstico de la sobreexpresión de HER-2 analizado mediante Hercep-Test y encuentra que las pacientes con puntuación 3+ presentan SLE más corta. No está claro el beneficio de la quimioterapia a dosis altas adyuvante en la supervivencia de las pacientes con carcinoma de mama locorregional de alto riesgo, pero es posible, basándose en nuestros resultados, que la sobreexpresión de HER-2 sea también en este subgrupo de pacientes un factor predictivo de pobre supervivencia, obligando a los clínicos a mejorar sus opciones terapéuticas. Por supuesto que son necesarios más datos que provengan de ensayos bien diseñados antes de que el status HER-2 pueda ser empleado en estas pacientes para tomar decisiones de tratamiento.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Laboratorios Roche su generoso suministro de los reactivos del estudio inmunohistoquímico con HercepTest.

Agradecemos también a los servicios de Anatomía Patológica de los siguientes hospitales haber puesto a nuestra disposición los bloques de parafina de los tumores: Hospital Universitario de Puerto Real, Hospital de Jerez, Hospital Punta de Europa de Algeciras, Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, Hospital Virgen de Valme de Sevilla, Hospital Juan Ramón Jiménez de Huelva, Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, Hospital Ciudad de Jaén y Hospitales Militares de Sevilla y San Fernando.

## RESUMEN

**Objetivo:** La finalidad del estudio es determinar de manera retrospectiva el valor pronóstico de la sobreexpresión de HER-2 en el subgrupo de pacientes con carcinoma de mama precoz de alto riesgo tratadas con altas dosis de quimioterapia adyuvante.

**Métodos:** Se obtuvieron los bloques de parafina del tumor primario correspondientes a 62 pacientes con carcinoma de mama locoregional tratadas con quimioterapia adyuvante a dosis altas. Las secciones del tumor fueron analizadas por dos patólogos (MJP y JPR) ajenos a los resultados clínicos, mediante inmunohistoquímica con HercepTest de Dako®. Se analizó la asociación de distintas variables con la expresión de HER-2. Se ha estudiado la asociación de la expresión de HER-2 y las otras variables con la supervivencia.

**Resultados:** Se halló expresión de HER-2 3+ en 12 casos (19%), 2+ en 9 casos (14%), 1+ en 10 casos (17%) y 0 en 31 casos (50%). La sobreexpresión de HER-2 (3+) se asoció de forma significativa con la negatividad de receptores hormonales ( $p = 0,03$ ) y con el grado nuclear alto ( $p = 0,02$ ), pero no se observó ninguna asociación con las otras variables. Cuando se realizó el mismo análisis considerando como HER-2 positivo todos los casos con puntuación 2+ y 3+ se obtuvieron resultados similares. La sobreexpresión de HER-2 con una puntuación 3+ se asocia de forma significativa con una menor supervivencia libre de enfermedad ( $p = 0,05$ ), pero no presenta asociación con la supervivencia global ( $p = 0,74$ ). No se identificó ninguna otra variable con influencia significativa en la supervivencia.

**Conclusiones:** La expresión de HER-2 con puntuación 3+ analizado mediante HercepTest es un factor pre-

dictivo de la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con carcinoma de mama primario de alto riesgo tratadas con quimioterapia a dosis altas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. DiGiovanna MP. Clinical significance of HER-2/neu overexpression: Part I, in Rosenberg SA (ed): *Principles & Practice of Oncology Updates* (vol 13, no 10), London, Lippincott Williams & Wilkins 1999.
2. Gusterson BA, Machin LG, Gullick WJ, Gibbs NM, Pownals TJ, Priece P, McKenna A, Harrison S. Immunohistochemical distribution of c-erbB-2 in infiltrating and in situ breast cancer. *Int J Cancer* 1988;42:842-5.
3. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82.
4. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244:707-12.
5. Anbazhagan R, Gelber RD, Bettelheim R, Goldhirsch A, Gusterson BA. Association of c-erbB-2 expression and S-phase fraction in the prognosis of node positive breast cancer. *Ann Oncol* 1991;2:47-53.
6. Nieto Y, Cagnoni PJ, Nawaz S, Shpall EJ, Yerushalmi R, Cook B, et al. Evaluation of the Predictive Value of Her-2/neu Overexpression and p53 Mutations in High-Risk Primary Breast Cancer Patients Treated With High-Dose Chemotherapy and Autologous Stem-Cell Transplantation. *J Clin Oncol* 2000;18(10):2070-80.
7. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:1974-82.
8. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Save-Soderborgh J, Anbazhagan R, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. *J Clin Oncol* 1992;10:1049-56.
9. Allred DC, Clark GM, Tandon AK, Molina R, Tormey DC, Osborne CK, et al. HER-2/neu in node-negative breast cancer: Prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol* 1992;10:599-605.
10. Wood WC, Budman DR, Korzun AH, Cooper MR, Younger J, Hart RD, et al. Dose and dose intensity of adjuvant chemotherapy for stage II, node-positive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1994;330:1253-9.
11. Budman DR, Berry DA, Cirrincione CT, Henderson IC, Wood WC, Weiss RB, et al. Dose and dose intensity as determinants of outcome in the adjuvant treatment of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1205-11.
12. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, et al. C-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* 1994;330:1260-6.

13. Thor AD, Berry DA, Budman DR, Muss HB, Kute T, Henderson IC, et al. ErbB-2, p53 and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1346-60.
14. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Yothers G, Park C, Wickerham DL, et al. HER-2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1991-8.
15. Borg A, Baldetorp B, Fernö M, Kilander D, Olsson H, Rydén S, et al. ErbB2 amplification is associated with tamoxifen resistance in steroid-receptor positive breast cancer. *Cancer Lett* 1994;81:137-44.
16. Carluomagno C, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabito A, et al. C-erbB-2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 1996;14:2702-8.
17. Rodenhuis S, Bontelbal M, Beex L, Van der Wall, Richel D, Nooitj M, et al. Randomized phase III study of high-dose chemotherapy with cyclophosphamide, thiotepa and carboplatin in operable breast cancer with 4 or more axillary lymph node. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000;74:286 (abstract).
18. Hortobagyi GN, Buzdar AU, Champlin R, Gajewski J, Holmes FA, Booser D, et al. Lack of efficacy of adjuvant high-dose tandem combination chemotherapy for high-risk primary breast cancer – a randomised trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1998;17:123 (abstract).
19. Peters WP, Rosner G, Vredenburgh J, Shpall E, Crump M, Marks, et al. Updated results of a prospective, randomized comparison of two doses of combination alkylating agents as consolidation after CAF in high-risk primary breast cancer involving ten or more axillary lymph nodes: CALGB 9082/SWOG 9114/NCIC Ma-13. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001;20:21 (abstract).
20. Bergh J, Wiklund T, Erikstein B, Lidbrink E, Lindman H, Malmström P, et al. Tailored fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide compared with marrow-supported high-dose chemotherapy as adjuvant treatment for high-risk breast cancer: A randomised trial. *Lancet* 2000; 356(9239):1384-91.
21. Crown JP, Lind M, Gould A, Verrill M, Twelves C, Coleman R, et al. Failure of adjuvant peripheral blood progenitor-supported high-dose chemotherapy to improve the prognosis of patients with high-risk breast cancer in a randomised trial with low treatment-related mortality: The Anglo-Celtic I Study. *Ann Oncol* 2002;2: 20 (abstract).
22. Elston CW, Ellis IO. The breast. Edinburgh, UK: Churchill Livingstone, 1988:365.
23. American Joint Committee on Cancer. Breast. In: AJCC cancer staging manual, 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997:171.
24. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53: 457-81.
25. Peto R, Peto J. Regression models and life tables. *J R Stat Soc A* 1972;135:185-8.
26. Press MF, Hung G, Godolphin W, Salmon DJ. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissues samples: Potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res* 1994;54:2771-7.
27. Taylor SL, Platt-Higgins A, Rudland PS, Winstanley JHR, Barracough R. Cytoplasmic staining of c-erbB-2 is not associated with the presence of detectable c-erbB-2 mRNA in breast cancer specimens. *Int J Cancer* 1998;76:459-63.
28. Roche PC, Ingle JN. Increased HER2 with U.S. Food and Drug Administration-approved antibody. *J Clin Oncol* 1999;17:434.
29. Lebeau A, Deimling D, Kaltz C, Sendelhofert A, Iff A, Luthardt B, et al. HER-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: Comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridisation. *J Clin Oncol* 2001;19(2):354-63.
30. Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seashadri R, Slamon DJ. Assessment of methods for tissue based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: A direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2000;18:3651-64.
31. DiGiovanna MP. Clinical significance of HER-2/neu overexpression: Part II, in Rosenberg SA (ed): *Principles & Practice of Oncology Updates* (vol 13, no 10), London, Lippincott Williams & Wilkins 1999.
32. Bitran JD, Samuels B, Trujillo Y, Klein L, Schroeder L, Martinec J. Her2/neu overexpression is associated with treatment failure in women with high-risk stage II and stage IIIA breast cancer (> 10 involved lymph nodes) treated with high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic progenitor cell support following standard-dose adjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res* 1996;2:1509-13.
33. Somlo G, Doroshow JH, Forman SJ, Odom-Maryon T, Lee J, Chow W, et al. High-dose chemotherapy and stem-cell rescue in the treatment of high-risk breast cancer: Prognostic indicators of progression-free and overall survival. *J Clin Oncol* 1997;15:2882-93.
34. Nieto Y, Cagnoni PJ, Shpall EJ, Xu X, Murphy J, Vredenburgh J, et al. A predictive model for relapse in high-risk primary breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplant. *Clin Cancer Res* 1999;5:3425-31.
35. Harris LN, Liotcheva V, Broadwater G, Ramírez MJ, Maiorinis P, Anderson S, et al. Comparison of methods of measuring HER-2 in metastatic breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001; 19:1698-706.
36. Nieto Y, Nawaz S, Jones RB, Shpall EJ, Cagnoni PJ, McSweeney PA, et al. Prognostic model for relapse after high-dose chemotherapy with autologous stem-cell transplantation for stage IV oligometastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20(3):620-3.