

SECCIÓN DOCENTE

Factores pronósticos en el cáncer de mama: parte II. Factores inmunohistoquímicos

V. Marco

Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Quirón. Barcelona

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el estudio histopatológico del cáncer de mama incluye la valoración de factores de pronóstico clásicos (tamaño tumoral, grado histológico y estado de los ganglios linfáticos), junto con factores predictivos de respuesta al tratamiento (receptores hormonales y Her2-neu) y otros factores relacionados con la agresividad del tumor (invasión linfovascular e índice proliferativo).

La valoración de los factores predictivos y de algunos de los factores de la agresividad del tumor se realiza mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) que permiten visualizar directamente en las células tumorales distintas proteínas con función de receptores, antígenos relacionados con la proliferación celular y otros marcadores celulares expresados en tipos especiales de cáncer de mama.

En los últimos años, la aparición de nuevas técnicas de genética molecular ha aumentado el interés por los factores de valor pronóstico, apareciendo nuevas clasificaciones basadas en el perfil genético de los tumores de mama, en su grado de agresividad y en su respuesta a la quimioterapia. Estas técnicas son útiles ya que aumentan el conocimiento de los mecanismos genéticos responsables del desarrollo del cáncer de mama y de su comportamiento biológico. Sin embargo, su aplicación práctica es difícil ya que requieren tecnología no disponible en la mayoría de los centros hospitalarios. Es por ello que la correlación entre perfiles genéticos y perfiles IHQ, basados en la expresión de proteínas, puede resultar de utilidad.

En este artículo revisamos la utilidad pronóstica del estudio IHQ, su valor predictivo y la correlación con el perfil genético de los carcinomas de mama.

FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA EN EL CÁNCER DE MAMA

Receptores hormonales (1-6)

La determinación de receptores hormonales (estrógeno y progesterona) permite valorar las posibilidades de respuesta al tratamiento hormonal. La determinación por inmunohistoquímica se considera en la actualidad que es el método de elección, siendo superior al método bioquímico, como factor predictivo de respuesta al tratamiento hormonal y como factor de mejor pronóstico en los casos positivos. Entre el 75 y el 80% de los carcinomas infiltrantes de mama expresan receptores de estrógenos y entre 50 y 60% expresan receptor de progesterona. La coexpresión de ambos receptores en un tumor es un indicador de mayor probabilidad de respuesta al tratamiento hormonal y de mejor pronóstico.

El estudio inmunohistoquímico se realiza en la mayoría de los laboratorios utilizando sistemas automatizados de tinción y protocolos estandarizados.

Dos estudios recientes demuestran que la expresión de los *receptores de estrógenos* en el cáncer de mama es esencialmente bimodal, siendo los casos positivos o negativos, y pocos casos muestran tinción débil o heterogénea, si la fijación del tejido y la técnica de inmunotinción ha sido correcta (Fig. 1). El estudio de Nadji y cols., especifica que la positividad es del 100% en los casos de carcinoma tubular, coloide, papilar y lobulillar infiltrante. Siendo negativos todos los carcinomas apocrinos, medulares y metaplásicos estudiados y más del 90% de los carcinomas con alto grado nuclear (grado 3). La positividad del receptor de progesterona es heterogénea en el 20% de los casos.

En el estudio IHQ de los receptores hormonales los factores preanalíticos más importantes, para que los resultados sean óptimos, son la fijación del tejido y el método de desenmascaramiento antigénico. El tiempo de fijación debe ser entre 6 y 18 horas, con solución de formol tamponado. En las biopsias obtenidas por punción los resultados pueden ser mejores que en las biopsias quirúrgicas, debido a la me-

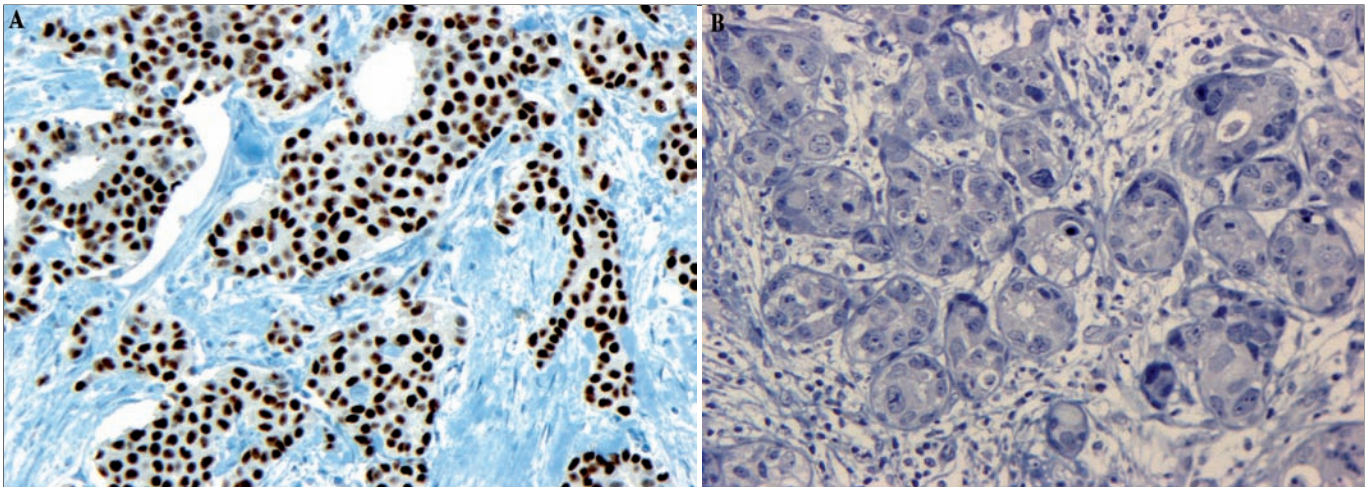


Fig 1. A: Carcinoma de mama con receptores de estrógenos positivos. Tinción nuclear en las células tumorales. B: Carcinoma de mama con receptores de estrógenos negativos. Ausencia de tinción nuclear.

por fijación del tejido. Es importante utilizar controles internos (representación de epitelio mamario normal en el bloque del tumor) y controles externos (cilindro de tumor positivo y de mama normal). La elección del anticuerpo es importante para obtener buenos resultados en el estudio IHQ de los receptores. El anticuerpo ideal tiene que ser potente y debe haber sido validado clínicamente. De los tres anticuerpos disponibles que cumplen estas condiciones, el monoclonal SP1 de conejo parece ser el más potente.

Las células del epitelio ductal en la mama normal expresan el receptor de estrógenos de forma heterogénea, coexistiendo núcleos positivos y negativos en la misma unidad lobulillar, sin embargo, los tumores que expresan receptor de estrógenos lo hacen de forma uniforme en más del 70% de las células tumorales. Por el contrario, el 99% de los casos negativos no muestra ninguna célula con tinción nuclear.

Los sistemas de cuantificación de la intensidad de la tinción no resultan útiles, ya que las diferencias probablemente reflejan el grado de preservación antigénica del receptor en el tejido y no se correlacionan con las probabilidades de respuesta al tratamiento hormonal. Casos receptor de estrógeno negativo y receptor de progesterona positivo se describen entre 2 y 5% de los casos en algunas series, algunos autores consideran que ello es debido a la alteración del receptor de estrógenos por factores relacionados con el manejo del tejido y no reflejan verdadera negatividad.

HER-2/neu (Human epidermal receptor protein-2) (1,7-10)

El HER-2/neu es un receptor de membrana de 185-kDa, con actividad de tirosinquinasa. El gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (q11-21). La activación del receptor implica la emisión de señales intracelulares que se transmiten al núcleo y activan la proliferación celular. Se expresa a bajo nivel en células epiteliales normales, inclu-

yendo las células del epitelio ductal de la mama normal. La sobreexpresión de la proteína Her-2/neu en la membrana de las células tumorales depende de la amplificación del gen, ocurre entre el 10 y el 20% de los carcinomas de mama. Es uno de los factores responsables de la proliferación excesiva e incontrolada de las células tumorales.

Su presencia indica peor pronóstico, peor respuesta al tratamiento con CMF, mayor sensibilidad al tratamiento con antraciclinas y peor respuesta al tratamiento hormonal con tamoxifeno. Las pacientes con sobreexpresión de la proteína Her-2/neu pueden beneficiarse del tratamiento con anticuerpos anti-Her-2 (trastuzumab/herceptin). Estudios recientes indican que la administración de trastuzumab en adyuvancia reduce el riesgo de recidiva tumoral a la mitad y la mortalidad en una tercera parte de los pacientes con cáncer de mama en fases iniciales. Es por ello que la determinación de Her-2/neu en las biopsias de cáncer de mama es esencial para la selección del tratamiento adecuado. Asimismo, la cardiotoxicidad de esta medicación, que puede presentarse entre 1,4 y 27% de las pacientes tratadas y su alto coste, obliga a que la determinación de Her-2/neu sea lo más fiable posible.

La valoración de HER-2/neu se puede realizar mediante IHQ, técnicas de hibridación *in situ* (FISH, CISH, SISH) y rt-PCR.

La sobreexpresión de la proteína HER-2/neu se determina mediante IHQ, siendo de especial importancia los factores preanalíticos (fijación del tumor, la técnica de inmunotinción), la elección de anticuerpo y la interpretación de los resultados. La valoración de la tinción de la membrana citoplásmica del tumor se realiza de forma semicuantitativa. En la actualidad se utilizan las guías establecidas por la *American Society of Clinical Oncologists (ASCO)* y el *College of American Pathologists (CAP)* en 2007. El resultado IHQ de Her-2/neu puede ser negativo (0, 1+), dudoso (2+), o positivo (3+). Esta puntuación sigue el sistema propuesto por la FDA, en el cual 0 indica ausencia de tinción, 1+ tinción dé-

bil en menos del 30% de las células tumorales, 2+ tinción completa de la membrana citoplásmica de intensidad débil a moderada en 10% o más de las células tumorales, y 3+ indica tinción uniforme e intensa de la membrana citoplásmica en 30% o más de las células tumorales (Fig. 2). La tinción intracitoplasmática no debe ser valorada.

Estas guías requieren la validación de la técnica de IHQ, documentando una concordancia de 95% entre los resultados 3+ por IHQ y la amplificación por FISH. Asimismo, se requiere que exista concordancia entre los casos con IHQ negativa y la no amplificación por FISH, con una discrepancia no superior a 5%. La técnica de FISH valora la relación entre el número de copias del gen HER-2/neu y el centrómero del cromosoma 17. El HER-2 FISH está amplificado si el cociente es $> 2,2$, dudoso entre 1,8 y 2,2 y negativo si es $< 1,8$. Siendo el principal problema de la determinación IHQ los falsos positivos 3+. Para mejorar la concordancia del estudio IHQ con la técnica de FISH, se considera útil restar de la puntuación observada en el tumor, la observada en el tejido mamario

normal. Es importante que los laboratorios que realizan estudios IHQ de HER-2/neu participen en programas de control de calidad. Las guías de ASCO-CAP recomiendan la adecuada fijación del tejido en solución de formol tamponado al 10% como mínimo durante 6 horas y máximo 24 horas. La FDA ha aprobado dos anticuerpos para la valoración IHQ de HER-2/neu, el anticuerpo policlonal de DAKO A0485 y el anticuerpo monoclonal de Ventana CB11, ambos en forma de kit.

MARCADORES DE PROLIFERACIÓN CELULAR (11-13)

La valoración de la actividad proliferativa del tumor es un factor de valor pronóstico. Se han estudiado distintos métodos de valoración. El método más utilizado es la valoración inmunohistoquímica del antígeno Ki 67.

El *antígeno Ki 67* es una proteína nuclear que se detecta en las células tumorales en fase proliferativa

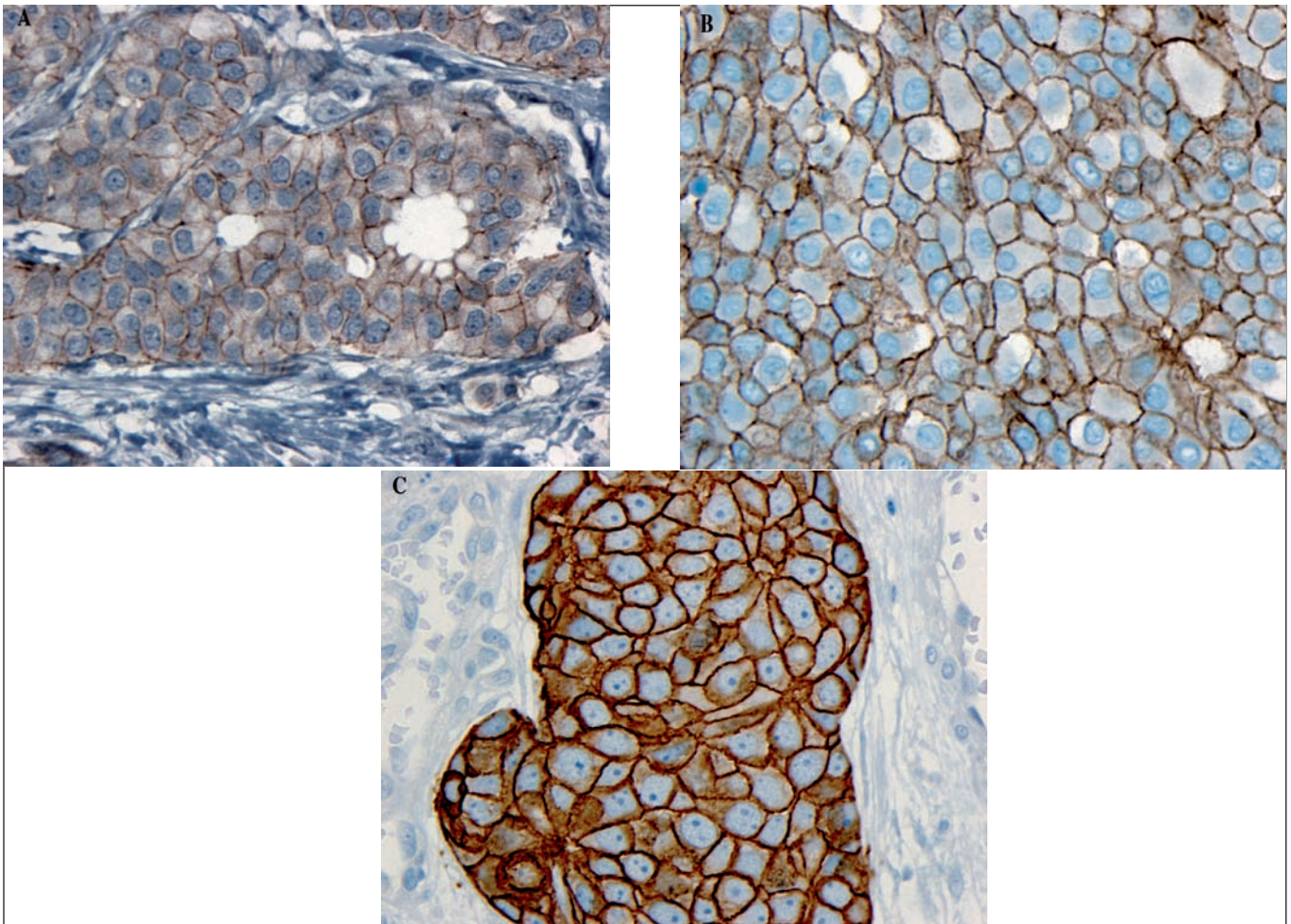


Fig. 2. A: HER-2 negativo, 1+. Tinción débil e incompleta de la membrana basal. B: HER-2 dudoso, 2+. Tinción completa de la membrana basal de intensidad moderada. C: HER-2 positivo, 3+. Tinción intensa de la membrana citoplásmica en las células tumorales.

(G1 tardía, M, G2), pero no en las que están en fase de reposo (G0) o en fase proliferativa G1 inicial. Se estudia mediante tinciones inmunohistoquímicas con el anticuerpo MIB-1, que detecta el antígeno Ki 67 a nivel del núcleo. En los carcinomas infiltrantes ha sido utilizada para estratificar los casos en categorías de buen o mal pronóstico. También se ha observado correlación con el grado de respuesta a la quimioterapia. No se ha establecido de forma absoluta el valor que permita distinguir entre tumores de baja actividad proliferativa y alta actividad proliferativa. Sin embargo, la mayoría de los estudios lo sitúan entre el 10 y 20% de las células con positividad nuclear. En nuestra práctica consideramos tumores con alta actividad proliferativa los que presentan 20% o más de las células positivas, realizando los contajes en las zonas del tumor con mayor densidad de células positivas (Fig. 3). En general existe una correlación positiva entre el índice proliferativo Ki 67, el índice mitótico y el grado histológico, y una correlación negativa con la expresión de los receptores

hormonales. La detección IHQ de Ki 67 se correlaciona con la expresión del gen Ki 67 en el tumor, cuando la positividad es superior a 10%. Genes relacionados con apoptosis y muerte celular (bcl2, MAP2K4, TNF10) muestran baja expresión en casos con alta actividad proliferativa, con índice por IHQ superior a 45%.

MARCADORES DE MIOEPITELIO EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE CARCINOMA INTRADUCTAL Y CARCINOMA INFILTRANTE (14-16)

Estos marcadores tienen utilidad en el diagnóstico diferencial entre lesiones proliferativas benignas, carcinoma *in situ* y carcinoma microinfiltrante. Aunque no son indicadores de pronóstico o predictivos de respuesta terapéutica, su utilidad diagnóstica puede influenciar el pronóstico y el tratamiento del cáncer de mama.

En la mama normal, en las lesiones proliferativas benignas (exceptuando casos de adenosis microglandular) y en los carcinomas *in situ* la capa mioepitelial está preservada. En casos dudosos los marcadores de mioepitelio son útiles en el diagnóstico diferencial entre carcinoma *in situ* y carcinoma microinfiltrante o infiltrante, ello puede suponer la indicación de quimioterapia en algunas pacientes (Fig. 4).

Los principales marcadores de las células mioepiteliales son las actinas de músculo liso, la miosina de cadena pesada de músculo liso (SMMHC), la calponina, la p63, la citoqueratina 5 y otros (CD10, maspin, etc.).

Las actinas de músculo liso marcan las células mioepiteliales, pero tienen el inconveniente de que también marcan los miofibroblastos y la pared vascular, dificultando el diagnóstico entre carcinoma *in situ* y carcinoma infiltrante con estroma desmoplásico.

La p63 se considera que es el marcador más específico de mioepitelio en la mama, es un marcador nuclear y no marca los miofibroblastos, ni los vasos. Su principal inconveniente es que con la distensión de la capa mioepitelial producida por el carcinoma *in situ*, las células mioepiteliales separadas y atenuadas pueden ser difíciles de visualizar. Solamente los carcinomas infiltrantes metaplásicos fusocelulares y algunos tumores de células basales pueden ser positivos con p63. En los casos complejos es aconsejable además de la tinción con p63, utilizar otro marcador relativamente específico de mioepitelio como SMMHC o citoqueratina 5.

Una posible excepción no resuelta es la que plantea el carcinoma papilar intraquístico de la mama. Esta lesión presenta un patrón histológico circunscrito, parecido al del carcinoma *in situ*, sin embargo, no presenta capa mioepitelial, siendo la IHQ negativa. A pesar de ello, el comportamiento clínico es favorable, similar al del carcinoma *in situ*.

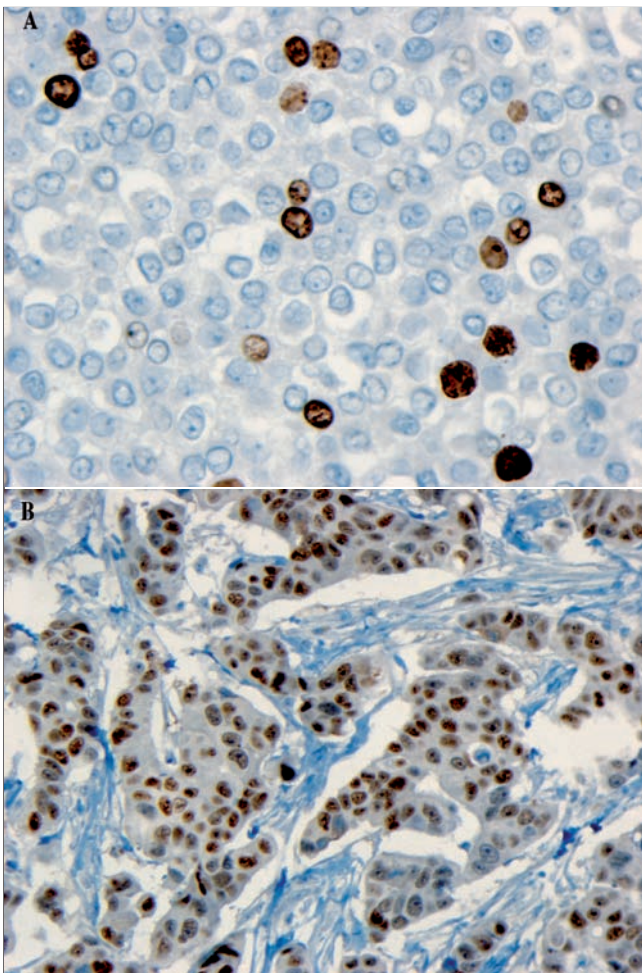


Fig. 3. A: Índice proliferativo bajo. Tinción nuclear de Ki 67 en menos del 20% de las células tumorales. B: Índice proliferativo alto. Tinción nuclear de Ki 67 en más del 20% de las células tumorales.

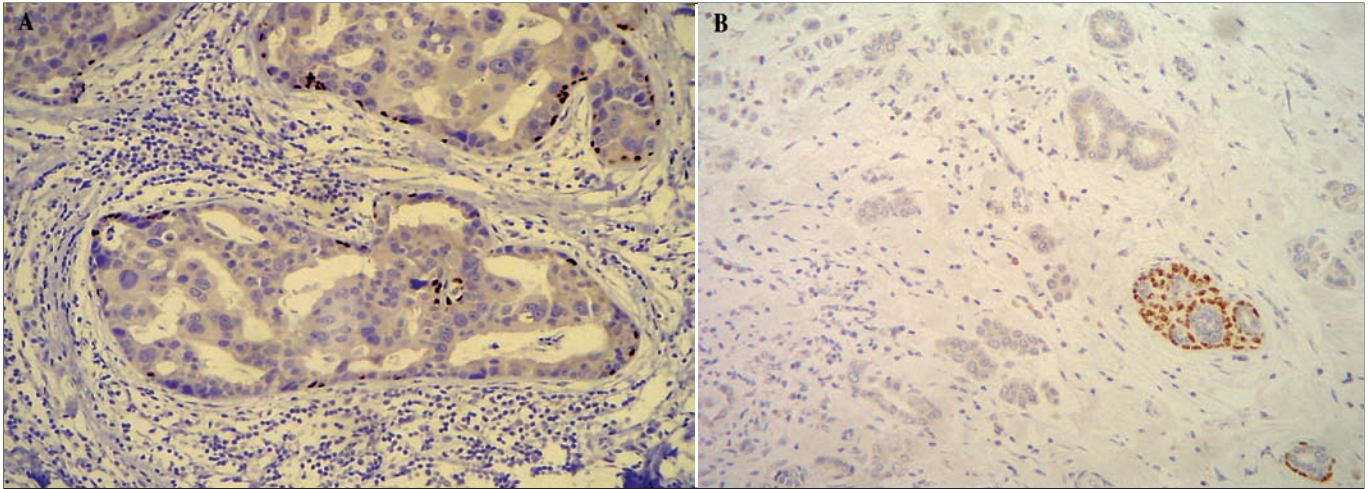


Fig. 4. A: Carcinoma ductal in situ. La capa mioepitelial está preservada muestra tinción nuclear con p63. B: Carcinoma infiltrante. La capa mioepitelial en la tinción de p63 está preservada en pequeños acinos no tumorales. La tinción es negativa en el componente infiltrante.

TIPOS ESPECIALES DE CÁNCER DE MAMA CON MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS CARACTERÍSTICOS (17)

Algunos tipos especiales de cáncer de mama presentan perfil IHQ característico. Ello es importante para la clasificación histológica y en algunos casos se correlaciona con el comportamiento biológico del tumor.

—*Carcinoma lobulillar*: ausencia de E-caderina. Citoqueratinas de alto peso molecular (34betaE12) positiva. Sobreexpresión de HER2 infrecuente.

—*Carcinoma adenoide-quístico*: receptores hormonales y HER2 negativos. Marcadores de célula basal/mioepitelial positivos (p63, citoqueratina 5 y 14).

—*Carcinoma medular*: ausencia de receptores hormonales y de sobreexpresión de HER2. Alta positividad con p53.

—*Carcinoma micropapilar infiltrante*: tinción con EMA de la periferia de la membrana citoplásmica (patrón *inside out*). Alta frecuencia de positividad para HER2.

—*Carcinoma apocrino*: receptores de estrógenos y progesterona negativos, receptores de andrógenos positivos. Frecuente sobreexpresión de HER2.

—*Carcinomas metaplásicos fusocelulares*: receptores hormonales y HER2 negativos. Marcadores de célula basal/mioepitelial positivos (p63, citoqueratina 5 y 14).

—*Carcinomas neuroendocrinos*: cromogranina A y sinaptofisina positivos. TTF-1 positivo en 20% de los carcinomas de célula pequeña.

EXPRESIÓN DE CITOQUERATINAS EN CÁNCER DE MAMA Y CORRELACIÓN CON EL PERFIL MOLECULAR INTRÍNSECO (18-25)

Si bien los perfiles moleculares de valor pronóstico serán objeto de otro artículo en esta revista, tiene interés introducir aquí la correlación con los perfiles IHQ.

Los conductos y acinos de la mama normal están tapizados por una doble capa epitelial. La capa interna o luminal expresa citoqueratinas 7, 8, 18, 19, y receptores hormonales. La capa mioepitelial o basal expresa citoqueratina 5, 14 y 17. La capa mioepitelial también expresa marcadores de músculo liso, CD 10 y p63. Algunas células que expresan citoqueratina 5/6 se localizan en el compartimento luminal y muestran morfología de células madre, pudiendo diferenciarse hacia células luminales o hacia células basales/mioepiteliales.

Perou y cols. y Sorlie y cols. identificaron distintos tipos de cáncer de mama según su perfil genético, llamado *perfil molecular intrínseco*. Estos son los tipos de células epiteliales luminales (A y B), el de células epiteliales basales, el fenotipo HER-2 positivo y tumores con perfil genético de “células normales”. Sorlie y cols. demostraron que los tumores con fenotipo de células basales y los Her-2 positivos tienen peor pronóstico.

Abd El-Rehim y cols. correlacionaron el patrón IHQ de citoqueratinas, receptores hormonales y HER 2-neu con los tipos descritos en el perfil molecular intrínseco. Estos estudios han servido de base para la clasificación del perfil de IHQ en el cáncer de mama, siguiendo la nomenclatura utilizada en la clasificación molecular, que incluye los siguientes tipos:

—*Luminal A*: ER/PR +, HER2-neu -, Ki 67 bajo (< 20%), citoqueratinas 8,18 +.

—*Luminal B*: ER/PR +, HER2-neu ±, Ki 67 alto (> 20%), citoqueratinas 8,18 +.

—*HER2-neu*: ER/PR ±, HER2-neu +, Ki 67 alto (> 20%), citoqueratinas 8,18 +.

—*Basal*: ER/PR-, HER2-neu -, citoqueratina 5 o 14 +, EGFR +, c-kit +.

El perfil IHQ del tipo luminal B no está perfectamente definido. Algunos autores incluyen en esta categoría casos con receptores hormonales positivos y HER-2/neu positivos. Sin embargo, otros autores proponen incluir en

la categoría luminal B tumores con baja expresión de receptores hormonales, que son HER-2/neu negativos. El objetivo de esta subdivisión, es definir dentro del grupo de tumores que expresan características luminales con receptores hormonales positivos, un subtipo de buen pronóstico (luminal A) y un subtipo de mal pronóstico (luminal B).

Uno de los principales logros de esta clasificación ha sido la identificación de los carcinomas con características de célula basal. Estos tumores se asocian con mayor frecuencia a cáncer familiar tipo BRCA1, tienen peor pronóstico, mayor incidencia de metástasis cerebrales y pulmonares y menor incidencia de afectación ganglionar. La histología del tipo basal es de carcinoma ductal infiltrante de alto grado, con frecuencia presentan infiltrado linfocítico y fibrosis, con rasgos de carcinoma medular. El estudio inmunohistoquímico es triple negativo (ER-, PR-, HER2-) y presentan de forma variable y con frecuencia focal, marcadores IHQ de célula basal (citoqueratina 5, 14, EGFR, c-kit).

CONCLUSIÓN

El estudio IHQ del cáncer de mama aporta datos fundamentales para el diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama. Debe realizarse siguiendo protocolos de calidad, en centros con experiencia en la interpretación de resultados. Es importante correlacionar los resultados de la IHQ con los obtenidos mediante técnicas de genética molecular.

BIBLIOGRAFÍA

- Gown AM. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol* 2008; 21: S8-S15.
- Mohsin SK, Weiss H, Havihurst T, Clark GM, Berardo M, Roanh le D, et al. Progesterone receptor by immunochemistry and clinical outcome in breast cancer a validation study. *Mod Pathol* 2004; 17: 1545-54.
- Collins LC, Botero ML, Schnitt SJ. Bimodal frequency distribution of estrogen receptor immunohistochemical staining result in breast carcinoma: an analysis of 825 cases. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 16-20.
- Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Morales AR. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 21-7.
- Wells CA, Sloane JP, Coleman D, Munt C, Amendoeira I, Apostolikas N, et al. Consistency of staining and reporting of oestrogen receptor immunocytochemistry within European Union, an interlaboratory study. *Virchows Arch* 2004; 445: 119-28.
- Sneige N. Hormone receptor analysis of breast cancer: current issues. XXVI International Congress of the International Academy of Pathology; 2006. Available at: www.uscap.org
- Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 18-43.
- Wolf AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 118-45.
- Burstein HJ. The distinctive nature of HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 1652-4.
- Gown AM, Goldstein LC, Barry TS, Kussick SJ, Kandalaf PL, Kim PM, et al. High concordance between immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization testing for HER2 status in breast cancer requires a normalized IHC scoring system. *Mod Pathol* 2008; 10: 1271-7.
- Railo M, Nordling S, von Boguslawsky K, Leivonen M, Kyllönen L, von Smitten K. Prognostic value of Ki-67 immunolabelling in primary operable breast cancer. *Br J Cancer* 1993; 68: 579-83.
- Gasparini G, Dal Fior S, Pozza F, Bevilacqua P. Correlation of growth fraction Ki-67 immunohistochemistry with histologic factors and hormone receptors in operable breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1989; 14: 3329-36.
- Tan PH, Bay BH, Yip G, Selvarajan S, Tan P, Wu J, et al. Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death. *Modern Pathol* 2005; 18: 374-81.
- Bacchi CE. Major diagnostic problems in breast pathology addressed by immunohistochemistry. IAP 2006 Annual Congress. Available at: www.uscap.org
- Werling RW, Hwang H, Yaziji H, Gown AM. Immunohistochemical study of p63 versus calponin and smooth muscle myosin heavy chain. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 82-90.
- Collins LC, Carlo VP, Hwang H, Barry TS, Gown AM, Schnitt SJ. Intracystic papillary carcinomas of the breast: a reevaluation using a panel of myoepithelial cell markers. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 1002-7.
- Harris G, Pinder SE, O'Malley FP. Invasive carcinoma, special types. En: *Breast Pathology. Foundations in Diagnostic Pathology Series*. Churchill Livingstone-Elsevier; 2006. p. 201-23.
- Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9212-7.
- Sørbye T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10869-74.
- Abd El-Rehim DM, Ball G, Pinder SE, Rakha E, Paish C, Robertson JF, et al. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. *Int J Cancer* 2005; 116: 340-50.
- Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell J, Blamey RW, Robertson JF, et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol* 2004; 203: 661-71.
- Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K, Jones C, Gillett CE, Hanby A, et al. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Res* 2007; 9: 1-11.
- Tamimi RM, Baer HJ, Marotti J, Galan M, Galaburda L, Fu Y, et al. Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *Breast Cancer Res* 2008; 10: R67.
- Bhargava R, Dabas DJ. Luminal B breast tumors are not Her2 positive. *Breast Cancer Res* 2008; 10: 404.
- Tamini RM, Schnitt SJ, Colditz LC, Collins LC. Luminal B breast tumors are not HER2 positive. Authors' response. *Breast Cancer Res* 2008; 10(5): 405.