



Revista de Senología y Patología Mamaria

www.elsevier.es/senologia



ARTÍCULO DOCENTE

Manejo de las muestras para test inmunohistoquímicos, moleculares y genéticos en el cáncer de mama



Francesc Tresserra^{a,*}, Maria Angeles Martinez Lanao^a y M. Teresa Soler^b

^a Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Quirón Dexeus, Barcelona, España

^b Servicio de Anatomía Patológica, Unidad Funcional de Mama, Institut Català d'Oncologia (ICO), Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España

Recibido el 7 de septiembre de 2015; aceptado el 25 de noviembre de 2015

Disponible en Internet el 14 de enero de 2016

PALABRAS CLAVE

Perfil molecular;
Inmunohistoquímica;
Pronóstico;
Cáncer de mama

KEYWORDS

Molecular profile;
Immunohistochemistry;
Prognostic;
Breast cancer

Resumen Las determinaciones inmunohistoquímicas y moleculares en las muestras tisulares son métodos utilizados para establecer factores pronósticos y predictivos en el cáncer de mama. Para que estas técnicas sean lo más eficaces posible se requiere de un correcto manejo de los especímenes, lo que incluye controles preanalíticos como el del tiempo de ischemia, una correcta fijación, tallado e inclusión en parafina, así como la adecuada selección de la representación del tumor que se someterá a estudio. La precisión en todos estos pasos repercutirá en un resultado óptimo de la técnica inmunohistoquímica o molecular aplicada.

© 2015 SESPM. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Management of samples for immunohistochemical, molecular and genetic tests in breast cancer

Abstract Molecular and immunohistochemical analysis of tissue samples are useful tools to establish prognostic and predictive factors in breast cancer. The efficiency of these techniques is based on a correct management of surgical specimens which includes pre-analytic controls such time of ischemia, appropriate fixation, gross manipulation and paraffin embedding. It is also important the right selection of tumor representation for study submission. The accuracy of all these steps will affect in the optimal result of the immunohistochemical and molecular test applied.

© 2015 SESPM. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: francesc.tresserra@quiron.es (F. Tresserra).

El Servicio de Anatomía Patológica es el encargado de recibir las muestras tisulares para su procesamiento y estudio microscópico a fin de emitir un diagnóstico. Además, actualmente es posible determinar en una muestra tisular una

serie de biomarcadores que representan factores pronósticos y predictivos que contribuirán al manejo terapéutico de las pacientes con cáncer de mama. Así, el tejido ha de someterse a pruebas inmunohistoquímicas, determinaciones moleculares y test genéticos. También pueden almacenarse muestras tumorales en biobancos o el material estudiado remitirse a otros laboratorios para contrastar opiniones. Es por ello que las muestras tisulares deben procesarse siguiendo unos estándares óptimos para que todos estos procesos sean posibles y se desarrollen en las mejores condiciones con el objetivo de preservar los hallazgos morfológicos y las características biológicas. Para la preservación tisular es necesaria la utilización de un fijador adecuado, para la preservación de la antigenicidad se requiere que el tiempo de fijación sea el óptimo, y para preservar el material genético es imprescindible el control del tiempo de isquemia.

Los biomarcadores a estudiar son¹:

- Proteínas: es el biomarcador más utilizado, pues puede determinarse mediante inmunohistoquímica. No obstante, su examen se ve alterado por al menos 67 variables preanalíticas². Su determinación puede llevarse a cabo en material paraafinado.
- ADN: es relativamente resistente al manejo rutinario de las muestras; no obstante, su determinación se ve influida por la acción del formol.
- ARNm: es la molécula más lábil y es la que utilizan muchas firmas genéticas. Su determinación se ve influida por el tiempo de isquemia caliente e isquemia fría.

Existen varias marcas comerciales que ofrecen test genéticos, ya sean con carácter clasificador (clasifican el tumor mamario en un subtipo molecular) o pronóstico/predictivo (ofrecen información acorde del comportamiento del tumor: riesgo de recidiva, de metástasis, etc., y la respuesta a tratamientos específicos), que utilizan técnicas distintas y determinan un número variable de genes. Estas técnicas están validadas para tejido en fresco y/o tejido paraafinado (tabla 1)³⁻⁶.

Tiempo de isquemia

Para una correcta preservación del ARNm, o en caso de que se requiera una toma de muestra para banco de tumores, estudios genéticos, etc., es necesario que las piezas quirúrgicas se remitan al Servicio de Anatomía Patológica íntegras (sin seccionar) y lo más rápidamente posible después de la exéresis.

El tiempo de isquemia hace referencia al período que transcurre entre la interrupción del flujo sanguíneo y el inicio de la fijación. El tiempo que transcurre entre la interrupción del flujo sanguíneo y la exéresis es el tiempo de isquemia caliente⁷. Y el que transcurre entre la exéresis y el inicio de la fijación del tejido es el tiempo de isquemia fría⁷. Un tiempo de isquemia prolongado conlleva una acidosis tisular, una degradación enzimática y la pérdida de inmunorreacción. Es difícil influir en el tiempo de isquemia caliente, pero sí es posible controlar el tiempo de isquemia fría, que se recomienda que sea lo más corto posible (inferior a una hora), por lo que es crítico facilitar que

la muestra, una vez extraída, llegue al Servicio de Anatomía Patológica para que se realice este proceso de forma adecuada^{1,7,8}.

Excepcionalmente se ha visto que la determinación de HER2 mediante inmunohistoquímica no se ve influida hasta un tiempo de isquemia fría de 3 h, pero los resultados se ven afectados si este período se supera⁹.

Procesado del espécimen en fresco

El procesado del espécimen debe llevarse a cabo en el laboratorio por parte de personal especializado. Es imprescindible que la pieza llegue de quirófano convenientemente señalizada (con hilos de sutura, grapas, tinta, etc.) para conocer su orientación. Así mismo, si se recibe más de una pieza es necesario conocer la relación espacial entre ellas. Todo ello se hará siguiendo unas condiciones de aislamiento del tejido y limpieza de forma que se eviten contaminaciones con otros especímenes procesados previamente. Esto es de primordial importancia en aquellas muestras que deban someterse a análisis de ARN, base de muchos de los test genéticos. En caso de la recogida de material para biobanco y estudios moleculares en fresco se utilizará material desechable y estéril. Hay que tener en cuenta, no obstante, que la toma de muestras para investigación nunca debe comprometer el diagnóstico ni el estudio de factores pronósticos y predictivos.

Si es necesario se llevará a cabo un examen radiológico, ya sea para la determinación de microcalcificaciones, o para establecer la presencia de la lesión principal y su localización en la pieza, otras lesiones secundarias y la situación de los bordes.

Fijación

El proceso de fijación incluye una serie de reacciones químicas que dan lugar a unos entrecruzamientos entre proteínas y ácidos nucleicos de forma que se detiene el proceso de degradación tisular una vez se ha interrumpido el suministro sanguíneo a las células. El medio de fijación estándar es el formol a una concentración del 10% y tamponado con fosfato a pH neutro^{2,10-16}, que contiene un 4% de formaldehído. Su acción forma en el tejido unos puentes hidroximetilos en las cadenas laterales de las proteínas que enmascaran los enlaces con antígenos, alterando su estructura tridimensional. Puede penetrar en las proteínas nucleares y los ácidos nucleicos, estabilizando la cubierta ácido-proteica y modificando los nucleótidos a través de reacciones con los grupos aminos libres¹².

El volumen de fijador utilizado debe ser al menos 10 veces el volumen del tejido a fijar. En especímenes grandes puede utilizarse un papel o una esponja para cubrirlo y facilitar su penetración^{2,7}. Se recomienda que esté a temperatura ambiente. Es importante señalar que el frío enlentece el efecto del formol y retrasa la fijación, por lo que si el espécimen está en formol, no es recomendable guardarlo en la nevera. La profundidad de penetración viene dada por la ley de Medawar, que establece que la difusión de los fijadores en el tejido es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo: $d \text{ (mm)} = K \sqrt{t \text{ (min)}}$ (K es el coeficiente de difusión, que para el formaldehído a temperatura ambiente es de 0,78)¹⁵.

Tabla 1 Características de las distintas firmas genéticas comercializadas

Test	Marca	Compañía	Aprobación	Tipo	Categoría	Técnica	Diana	Tejido	Información
PAM50®	Prosigna®	NanoString	UE y FDA	Molecular	Clasificador. Pronóstico	qRT-PCR nCounter	50 genes y 5 controles	Formol/parafina	Subtipo intrínseco, score de riesgo de recidiva (continuo)
ER, PR, HER2, Ki67	MammaTyper®	BioNTech AG	FDA	Molecular	Clasificador. Pronóstico	qRT-PCR	4 genes	Formol/parafina	Subtipo intrínseco
Firma de 70 genes	MammaPrint®	Agendia	UE y FDA	Molecular	Pronóstico. Predictivo	Microarray	70 genes	Formol/parafina. Fresco/congelado	Categoría de riesgo (bajo/alto)
Firma de 21 genes	Oncotype Dx®	Genomic Health	UE	Molecular	Pronóstico. Predictivo	qRT-PCR	16 genes y 5 controles	Formol/parafina	Score de riesgo y categoría (bajo/moderado/alto)
Análisis de 11 genes	EndoPredict®	Sividon	UE	Molecular	Pronóstico. Predictivo	qRT-PCR	8 genes y 3 controles	Formol/parafina	Score de riesgo y categoría (bajo/alto)
ER, PR, HER2, Ki67	IHC4	ND	ND	Proteína	Pronóstico. Predictivo	IHQ/FISH-CISH	4 marca-dores	Formol/parafina	Score de riesgo y categoría (bajo/alto)
p53, NDRG1, CEACAM5, SLC7A5, HTF9C	Mammostrat®	Clariant Insight DX	ND	Proteína	Pronóstico. Predictivo	IHQ	5 marca-dores	Formol/parafina	Categoría de riesgo (bajo/moderado/alto)
Chip DX	Breast PRS®	Signal Genetics ChipDX	ND	Molecular	Pronóstico. Predictivo	Microarray	200 genes	Formol/parafina	ND
uPA/PAI-1	Femtelle®	Sekisui	FDA	Proteína	Pronóstico. Predictivo	ELISA	uPA/PAI-1	Fresco/congelado	Score de riesgo de recidiva (continuo)
Índice Grado Genómico	MapQuant Dx®	Ipsogen	UE	Molecular	Pronóstico. Predictivo	Microarray	97 genes	Formol/parafina. Fresco/congelado	Categoría de riesgo (bajo/alto)
Análisis de 76 genes	Firma de Rotterdam	Veridex	ND	Molecular	Pronóstico. Predictivo	Microarray	76 genes	Fresco/congelado	Score de riesgo y categoría (bajo/alto)

CISH: hibridación *in situ* fluorescente; ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas; FDA: *Food and Drug Administration*; FISH: hibridación *in situ* fluorescente; IHQ: inmunohistoquímica; ND: no determinado; qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa; UE: Unión Europea; uPA/PAI-1: activador de plasminógeno-uroquinasa/inhibidor del activador del plasminógeno-1.

Fuente: Prat et al.³, Sinn et al.⁴, Chang et al.⁵ y Harbeck et al.⁶.

El tiempo óptimo de fijación está establecido entre las 6 y las 48 h^{2,3,12-15}. Un tiempo de fijación corto puede dar lugar a una fijación alcohólica por coagulación durante el proceso de deshidratación que se lleva a cabo en la inclusión en parafina y que afecta a la determinación de antígenos como el HER2. Un tiempo de fijación largo incrementa el enmascaramiento antigénico y requerirá de la utilización de técnicas de recuperación antigénica en las técnicas de inmunohistoquímica^{2,11}.

Se recomienda que para una pieza quirúrgica se empleen entre 24 y 48 h de fijación, para una biopsia por punción más de 6 h, y, en general, se recomienda que el tiempo de fijación no supere las 72 h^{13,14}.

Con un tiempo de fijación en formol de entre 24 h y 3 días no hay diferencias en la determinación inmunohistoquímica de receptores hormonales; no obstante, cuando este tiempo supera los 8 días la expresión de estos receptores disminuye, y esta disminución es significativa a partir de los 16 días de fijación¹².

La fijación en formol es el método idóneo para preservar los detalles morfológicos, ofrece un buen resultado para la determinación de pruebas inmunohistoquímicas y de hibridación *in situ* y conserva los ácidos nucleicos. Es también el reactivo para el que están optimizados prácticamente todos los kits comerciales utilizados en inmunohistoquímica, técnicas moleculares y muchos test genéticos¹¹.

No es recomendable la utilización de agentes decalcificantes (EDTA, ácido nítrico, etc.), fijadores alcohólicos (Z5, Pen-Fix®, etc.), fijadores mercuriales (Zenker, B3, B5, etc.), solución de Bouin, o métodos de fijación rápida (microondas, etc.) por sus efectos en la antigenicidad del tejido^{7,14,16,17}.

Tallado

En primer lugar, se efectuará una descripción macroscópica de la pieza indicando las características de la lesión (tamaño, presencia de necrosis, etc.), y se procederá a señalar los márgenes quirúrgicos mediante tinta china, especificándose la distancia macroscópica entre estos y la lesión.

A continuación se efectuará el tallado del espécimen obteniéndose muestras representativas del tumor. Si el espécimen mide 3 cm o menos se aconseja incluirlo en su totalidad. Si es mayor, se incluirá toda la lesión macroscópica en cortes consecutivos o 3 bloques tisulares para un tumor de 2 cm y un bloque por cada centímetro adicional^{7,10}, lo que hará que se disponga de material suficiente para futuros test.

Inclusión en parafina

Para incluir en el bloque de parafina se utilizará un bloque tisular de entre 1 y 1,5 cm de lado y 0,2 cm de espesor¹⁴. La parafina debe ser pura y estar a una temperatura aproximada de entre 55 y 58 °C². Una vez efectuado el bloque este debe conservarse a temperatura ambiente (entre 20 y 25 °C)^{1,14}.

Selección del bloque para análisis

Para llevar a cabo estudios inmunohistoquímicos, moleculares, y sobre todo los test genéticos, el bloque tisular a seleccionar debe reunir las siguientes condiciones^{8,11,18,19}:

- Estar representado el componente infiltrante del tumor (más de un 30% de las células a estudiar han de ser tumorales).
- Estar representado el foco tumoral «más agresivo».
- Evitar el componente *in situ* en el cáncer de mama.
- Estar representada la periferia de la lesión con presencia de tejido no neoplásico.
- No utilizar el material en el que se hayan efectuado los cortes por congelación para el estudio intraoperatorio.
- Presentar la menor cantidad posible de inflamación, necrosis, tejido adiposo, estroma, hemorragia, etc., que contaminan el análisis.

Si es necesario, para evitar la presencia de elementos contaminantes, como son el componente *in situ*, hemorragia, necrosis, etc., pueden utilizarse técnicas de microdissección sobre la sección histológica sin teñir para recuperar el material tisular idóneo para estudiar.

Condiciones particulares las constituyen las lesiones bilaterales, multifocales o multicéntricas, o los tumores con distintos patrones morfológicos en función del área estudiada.

Para las lesiones bilaterales, multicéntricas o multifocales se recomienda efectuar los análisis en cada uno de los tumores. La heterogeneidad dentro de un mismo tumor existe, pero parece ser que es a nivel de la expresión de genes individuales y con una baja influencia en las determinaciones basadas en *microarrays* en la predicción del comportamiento o evolución clínica; en cualquier caso, siempre es aconsejable seleccionar la parte más agresiva²⁰.

En definitiva, no hay que olvidar que el mejor escenario para la paciente es ser candidata a un tratamiento específico, por lo que es recomendable encontrar la expresión del marcador antes de negarle la terapia¹¹.

Debido a estas condiciones requeridas, es totalmente imprescindible que sea el patólogo el que lleve a cabo la selección del material adecuado para la realización de estudios específicos.

Recomendaciones

Material fijado:

- Fijar el tejido antes de una hora después de la extracción.
- Utilizar formol al 10% tamponado.
- Respetar un tiempo de fijación entre 6 y 48 h a temperatura ambiente.
- Representación en el bloque tisular de más de un 30% de componente infiltrante y evitar que haya necrosis, grasa, estroma, hemorragia, inflamación, etc.
- Si hay más de una lesión han de estudiarse todas, aunque puede efectuarse un análisis progresivo lesión a lesión hasta encontrar la positividad del marcador o un resultado pronóstico con trascendencia clínica.

Material en fresco:

- Procesar el tejido antes de una hora después de la extracción.
- Utilizar entre 3 y 5 mm cúbicos de pieza tumoral en un tubo con sustancia conservante de ARNm.

- Si es necesario puede conservarse el tubo a 4 °C durante 12 h, o a -20 °C hasta 30 días hasta su procesamiento, o a -80 °C de forma definitiva en un biobanco.

El informe anatomopatológico debe integrar:

- Parámetros morfológicos clásicos^{7,10}: tamaño, tipo histológico, grado histológico, invasión linfovascular, afectación de los márgenes, etc.
- Factores pronósticos y predictivos inmunohistoquímicos^{7,8,13,14,17,21}:
 - o Receptores hormonales (estrógenos y progesterona): porcentaje de células con positividad nuclear e intensidad media de la tinción.
 - o Ki67: en porcentaje de núcleos que lo expresan.
 - o HER2: negativo (0 o 1+), equívoco (2+), positivo (3+).
- Hibridación *in situ* (FISH/SISH/CISH)^{13,21}. En test con una sola sonda: media del número de señales de HER2/número de células. En test con sonda dual: media del número de señales de HER2/media del número de señales CEP17.
- Perfil genético²¹: indicando el nombre del test y las variables que este ofrece (riesgo alto, moderado o bajo, índice de recidiva, etc.) y la evaluación de la concordancia con los otros métodos.

Cabe señalar que tanto los parámetros morfológicos como los factores inmunohistoquímicos (receptores hormonales, Ki67 y HER2) son imprescindibles, siendo los demás optativos en función de las características de cada caso.

También deben consignarse^{7,13,14,21}: solución fijadora, tiempo de fijación y clon utilizado en el test inmunohistoquímico.

En resumen, el procesamiento de muestra tisulares para test inmunohistoquímicos, moleculares o genéticos requiere de un control de variables preanalíticas, como son el tiempo de ischemia, el fijador y el tiempo de fijación, etc., y la selección del bloque adecuado para el análisis. Una vez efectuado el análisis, los resultados deben correlacionarse con los hallazgos histológicos, clínicos y radiológicos antes de elaborar un informe. Si estos resultados no son acordes con los datos clínicos se debe reevaluar la histología y la información clínica, los resultados y la técnica utilizada para el test, los efectos de las variables preanalíticas y considerar un retest en material adicional. En cualquier caso, es imprescindible seguir unos protocolos basados en guías estandarizadas, utilizar métodos analíticos validados y reproducibles, y un trabajo en equipo que permita discutir los resultados en un comité multidisciplinar antes de aplicar una conducta terapéutica a la paciente.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Autoría

Todos los autores han participado en la redacción, búsqueda de bibliografía y revisión del manuscrito.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. True LD. Methodological requirements for valid tissue-based biomarker studies that can be used in clinical practice. *Virchows Arch.* 2014;464:257-63.
2. Engel KB, Moore HM. Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135:537-43.
3. Prat A, Ellis MJ, Perou CM. Practical implications of gene-expression-based assays for breast oncologists. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;9:48-57.
4. Sinn P, Aulmann S, Wirtz R, Schott S, Marme F, Varga Z, et al. Multigene assays for classification, prognosis, and prediction in breast cancer: A critical review on the background and clinical utility. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2013;73:932-40.
5. Chang M, Ismaila N, Kamel-Reid S, Rutherford M, Hart J, Bedard P, et al. Recommendation report MOAC-2. A quality initiative of the Program in Evidence-Based Care (PEBC), Cancer Care Ontario (CCO). Comparison of Oncotype DX with multi-gene profiling assays (e. g., MammaPrint, PAM50) and other tests (e. g., Adjuvant! Online, Ki-67 and IHC4) in early-stage breast cancer. November 20, 2013 [consultado Oct 2015]. Disponible en: <https://www.cancercare.on.ca/common/pages/UserFile.aspx?fileId=291506>.
6. Harbeck N, Sotlar K, Wuerstlein R, Doisneau-Sixou S. Molecular and protein markers for clinical decision making in breast cancer: Today and tomorrow. *Cancer Treat Rev.* 2014;40:434-44.
7. Viale G. Pathological work up of the primary tumor: Getting the proper information out of it. *Breast.* 2011;20 Suppl 3:S82-6.
8. Deyarmin B, Kane JL, Valente AL, van Laar R, Gallagher C, Shriver CD, et al. Effect of ASCO/CAP guidelines for determining ER status on molecular subtype. *Ann Surg Oncol.* 2013;20:87-93.
9. Allison KH. Molecular pathology of breast cancer: What a pathologist needs to know. *Am J Clin Pathol.* 2012;138:770-80.
10. College of American Pathologists. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Invasive Carcinoma of the Breast. Based on AJCC/UICC TNM, 7th edition. Protocol web posting date: December 2013 [consultado Oct 2015]. Disponible en: http://www.cap.org/apps/docs/committees/cancer/cancer_protocols/2013/BreastInvasive.13protocol.3200.pdf
11. Portier BP, Wang Z, Downs-Kelly E, Rowe JJ, Patil D, Lanigan C, et al. Delay to formalin fixation 'cold ischemia time': Effect on ERBB2 detection by in-situ hybridization and immunohistochemistry. *Mod Pathol.* 2013;26:1-9.
12. Tong LC, Nelson N, Tsourigiannis J, Mulligan AM. The effect of prolonged fixation on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast cancer: A prospective study. *Am J Surg Pathol.* 2011;35:545-52.
13. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth

- factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013;31:3997–4013.
14. Palacios J, Andreu X, Calasanz MJ, Concha A, Corominas JM, García-Caballero T, et al. Recomendación para la determinación de HER2 en cáncer de mama. Consenso nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) y de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). *Rev Esp Patol*. 2009;42:3–16.
 15. Bancroft JD, Stevens A. *Theory and practice of histological techniques*. New York: Churchill Livingstone; 1982.
 16. Babic A, Loftin IR, Stanislaw S, Wang M, Miller R, Warren M, et al. The impact of pre-analytical processing on staining quality for H&E, dual hapten, dual color in situ hybridization and fluorescent in situ hybridization assays. *Methods*. 2010;52:287–300.
 17. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103:1656–64.
 18. Oncotype DX. Genomic Health. *Guía de Anatomía Patológica para cortes sin teñir. Recomendaciones para seleccionar el bloque tumoral adecuado*. Sant Cugat del Vallès. Barcelona: Palex Medical S. A; 2010.
 19. Symphony. *Instrucciones de recogida y envío de la muestra*. Amsterdam, The Netherlands: Agendia; 2011.
 20. Barry WT, Kernagis DN, Dressman HK, Griffis RJ, Hunter JP, Olson JA, et al. Intratumor heterogeneity and precision of microarray-based predictors of breast cancer biology and clinical outcome. *J Clin Oncol*. 2010;28:2198–206.
 21. Fitzgibbons PL, Dillon DA, Alsabeh R, Berman MA, Hayes DF, Hicks DG, et al. Template for reporting results of biomarkers testing of specimens from patients with carcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138:595–601.