



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica  
Polo didattico di Alessandria

*Corso di Laurea Magistrale in Biologia (LM6)  
Curriculum Biomedico e Biomolecolare*

*Tesi di Laurea Magistrale*

*Anno Accademico 2022/2023*

## PROVA FINALE

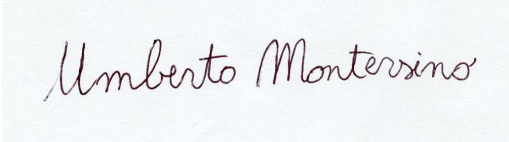
REVISIONE DI UNA CASISTICA DI CARCINOMI DELLA  
MAMMELLA HER2 0: CARATTERIZZAZIONI BIOLOGICHE  
E IMPLICAZIONI TERAPEUTICHE NELL'OTTICA DEI  
RECENTI FARMACI ANTICORPO-CONIUGATI

RELATORE: Prof. Salvatore Sutti 

CO-RELATORI:

- Dott. Marco Pagano
- Dott.ssa Maria Cristina Vivaldo

CANDIDATO: Umberto Montersino





## INDICE

1. INTRODUZIONE .....	5
1.1 EPIDEMIOLOGIA .....	5
1.2 FATTORI DI RISCHIO .....	6
1.3 PREDIZIONE del RISCHIO .....	19
1.4 SCREENING .....	22
1.5 CLASSIFICAZIONE ED INQUADRAMENTO DIAGNOSTICO .....	28
1.5.1 Classificazione Istologica.....	28
1.5.2. Classificazione Molecolare .....	37
1.5.3 Classificatori prognostici genomici.....	43
1.5.4 Classificazione TMN e stadiazione.....	48
1.5.5 Fattori prognostici e predittivi .....	52
1.5.6 Categorie emergenti.....	56
1.6 VALUTAZIONE LINFONODI .....	59
1.7 TERAPIA .....	62
1.7.1 Chirurgia.....	62
1.7.2 Chemioterapia.....	63
1.7.3 Radioterapia .....	64
1.7.4 Terapia endocrina.....	65
1.8. PATHWAY MOLECOLARI ASSOCIATI AL TUMORE MAMMARIO .....	66
1.9 EVOLUZIONE BIOLOGICA DEL TUMORE DURANTE L'EVOLUZIONE DELLA MALATTIA.....	69
1.10 TERAPIE ANTI-HER2 .....	75
1.11 STUDI DB-04, DAISY E DB-06 .....	80
2. SCOPO del LAVORO.....	89
3. MATERIALI E METODI .....	91
4. RISULTATI .....	100
4.1 CASISTICA GENERALE .....	100

4.1.1 Stato di ER e PgR.....	100
4.1.2 Ki-67/MIB-1 .....	101
4.1.3 HER2.....	102
4.1.4 HER2 e recettori ormonali.....	104
4.1.5 Immunofenotipo .....	105
4.2 HER2 SCORE 0 .....	107
4.2.1 Immunofenotipo HER2 0.....	109
4.2.2. Evoluzione score HER2 0 nella storia clinica dei pazienti .....	110
4.2.3 Evoluzione HER2, ER e Ki-67/MIB-1 tra biopsia e pezzo operatorio.....	111
4.3 RIVALUTAZIONE CASI HER2 0 .....	113
4.4 CASI PARTICOLARI.....	115
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI .....	117
6. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA .....	130
7. RINGRAZIAMENTI .....	146

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 EPIDEMIOLOGIA

Il tumore alla mammella rappresenta il 25% di tutte le neoplasie femminili e si manifesta nelle donne in ogni fase di vita a partire dalla pubertà con un aumento di incidenza con l'avanzare dell'età.

Il carcinoma mammario è la principale causa di decessi correlati al cancro per le donne in Europa e nel mondo [1].

Come riporta l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) in base alle Global Cancer Statistics a livello mondiale, nel 2020, sono stati diagnosticati 2,3 milioni di casi e sono stati registrati quasi 700.000 decessi. Sempre secondo i dati 2020, il tumore della mammella rappresenta la patologia neoplastica a più elevata prevalenza [2].

L'OMS si pone importanti obiettivi nel campo dell'oncologia mammaria. In particolare, con la "Global Breast Cancer Initiative", istituita nel 2021, l'OMS fornisce indicazioni ai governi di tutto il mondo sui modi per rafforzare i sistemi per rilevare, diagnosticare precocemente e trattare questa patologia, delineando un percorso di miglioramenti sostenibili basati su strategie e obiettivi chiave adattati alle esigenze specifiche di ogni paese. L'intento è di limitare le disuguaglianze e ridurre la mortalità per cancro mammario del 2,5% all'anno, prevenendo 2,5 milioni di decessi per questa patologia entro il 2040 [3]. In Italia il carcinoma della mammella è il tumore più frequentemente diagnosticato nelle donne. Secondo il report 2022, sono state stimate circa 55.700 nuove diagnosi, con un incremento di incidenza dello 0,5% rispetto al 2020 [4].

La sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi è dell'88% ed è una delle più alte registrate in Europa, e per quanto riguarda la prevalenza si stimano 834.200 le donne viventi in Italia dopo una diagnosi di tumore alla mammella [4]. Relativamente alla mortalità, nel 2021 sono stati stimati circa 12.500 decessi. Secondo i dati ISTAT nel 2018, secondo quanto riporta il Ministero della Salute, il carcinoma mammario ha rappresentato, con 13.076 decessi, la prima causa di morte per tumore nelle donne. Tuttavia, dalla fine degli anni

Novanta si osserva una continua tendenza alla diminuzione della mortalità per carcinoma mammario (-0,8%/anno), attribuibile a una maggiore diffusione dei programmi di screening e quindi all'anticipazione diagnostica e ai progressi terapeutici [4].

## 1.2 FATTORI DI RISCHIO

L'eziologia del tumore della mammella è caratterizzata da una complessa interazione tra numerose componenti, modificabili e non modificabili. La probabilità di sviluppo del tumore è infatti influenzata dall'età, dal genere e da altri elementi, tra cui fattori riproduttivi, ormonali, nutrizionali, familiarità ed ereditarietà (Tab.1) [5].

FATTORI NON MODIFICABILI	FATTORI MODIFICABILI
Genere femminile	Terapia ormonale sostitutiva
Età avanzata	Dietilstilbestrolo
Storia familiare (tumori mammari e ovarici)	Attività fisica
Mutazioni genetiche	Sovrappeso/obesità
Razza/etnia	Consumo di alcool
Gravidanza e allattamento	Fumo
Periodo fertile e menopausa	Deficit vitaminico
Densità del tessuto mammario	Esposizione eccessiva alla luce artificiale
Storia pregressa di tumore mammario	Consumo di cibo
Patologie mammarie non neoplastiche	Esposizione ad agenti chimici
Precedente radioterapia	Altri farmaci

*Tab.1 Fattori di rischio per il tumore della mammella [5]*

I fattori di rischio non modificabili sono quelli che predispongono all'insorgenza della patologia, ma non possono essere modificati con l'attuazione di misure preventive [5]. Tra questi ultimi annoveriamo il genere, infatti, le donne, rispetto agli uomini, subiscono notevoli sbalzi ormonali sia prima che dopo la menopausa che le rendono maggiormente suscettibili all'insorgenze del cancro mammario e, nelle donne in post-menopausa, la quantità di estrogeni e androgeni circolanti è positivamente correlata con il rischio di insorgenza della patologia [6].

A tal proposito, ogni anno, negli Stati Uniti vengono diagnosticati circa 280.000 tumori della mammella femminili e 3.000 maschili. Nelle donne, quindi, la probabilità di insorgenza di tumore della mammella è circa 100 volte maggiore rispetto agli uomini [7]. Dal punto di vista epidemiologico, il cancro mammario maschile comprende meno dell'1% di tutti i tumori maschili e meno dell'1% di tutti i tumori della mammella. A causa dell'invecchiamento della popolazione, l'incidenza è in aumento raggiungendo un plateau all'età di 80 anni. Negli uomini l'età media alla diagnosi è di 63,4 anni mentre nelle donne è 58,2 anni [8]. La distribuzione per età negli uomini con tumore mammario è unimodale, con un picco all'età di 71 anni. Nel genere femminile la distribuzione è bimodale, con picchi a 52 e 71 anni. Nell'uomo i ritardi diagnostici sono dovuti ad un basso indice di sospetto della patologia [8].

Dal punto di vista prognostico, i tumori mammari maschili e femminili sono simili. Tuttavia, i tassi di sopravvivenza globale sono più bassi per gli uomini a causa dell'età avanzata e dello stadio avanzato alla diagnosi [8]. Probabilmente il carcinoma della mammella maschile deriva dall'interazione di fattori di rischio concomitanti. Si ipotizza che una storia familiare positiva di tumore mammario e mutazioni BRCA predisponenti alla patologia interagiscono con squilibri ormonali e fattori di rischio ambientali e professionali [8]. La suscettibilità genetica a sviluppare la patologia può derivare da mutazioni in geni ad alta penetranza come BRCA1 e BRCA2 che si verificano raramente, ma possono conferire un rischio elevato, o da mutazioni geniche a bassa penetranza come CHECK2 che sono più frequenti, ma conferiscono un rischio da piccolo a moderato [8]. Le mutazioni di BRCA2 sono il più importante fattore di rischio per lo sviluppo del carcinoma mammario maschile. Oltre a mutazioni geniche, anche condizioni che alterano il rapporto androgeni-estrogeni costituiscono fattori di rischio per la patologia [8]. Alcune cause di possibile squilibrio tra androgeni ed estrogeni includono condizioni di sovrappeso/obesità, cirrosi epatica, diabete. La sindrome di Klinefelter (cariotipo 47XXY) con basse concentrazioni di testosterone ed elevate gonadotropine conferisce un rischio di cancro mammario maschile 20-50 volte superiore al rischio della popolazione maschile generale con tassi di mortalità simili a quelli del carcinoma mammario femminile. Inoltre,

qualunque condizione che riduce l'esposizione agli androgeni o incrementa l'esposizione agli estrogeni, come l'uso di antiandrogeni o estrogeni nel trattamento del cancro alla prostata o la somministrazione di estrogeni ai transessuali è stata correlata ad un aumentato rischio di cancro alla mammella maschile [8].

La storia familiare è importante per entrambi i sessi. Negli uomini una storia familiare positiva conferisce un rischio relativo di 2,5 e studi sulla popolazione hanno dimostrato che il 15-20% degli uomini cui è stato diagnosticato un carcinoma mammario hanno una parente di primo grado e di sesso femminile affetta dalla patologia [8].

Il rischio di insorgenza del tumore mammario è correlato all'età. Secondo le linee guida AIOM (Associazione Italia Oncologia Medica) 2021, nelle donne fino a 49 anni il rischio è del 2,3%, tra i 50 e i 69 del 5,4%, mentre tra i 70 e gli 84 anni è del 4,5% [9].

Da quanto riportato dalle linee guida Società Europea di Oncologia Medica (ESMO) 2019 circa il 25% dei tumori della mammella si manifestano prima dei 50 anni e meno del 5% prima dei 35. L'incidenza del carcinoma della mammella è aumentata anche in virtù dall'adozione diffusa dello screening mammografico e continua a crescere con l'invecchiamento della popolazione [1]. La curva d'incidenza sale in modo esponenziale fino all'età della menopausa (55 anni circa), mentre si stabilizza con un plateau subito dopo la menopausa, riprendendo poi a crescere dopo i 60 anni [1]. La correlazione del carcinoma mammario con l'età potrebbe essere dovuta all'accumulo di modificazioni epigenetiche che alterano l'equilibrio oncogeni-oncosoppressori, al progressivo danneggiamento del DNA e al continuo stimolo proliferativo endocrino [9]. L'età influenza anche la prognosi. Le donne con diagnosi di cancro mammario a un'età inferiore ai 50 anni hanno tassi di sopravvivenza inferiori rispetto a quelle la cui diagnosi ricade in un'età compresa tra i 50 e i 70 anni [7].

È stata osservata una relazione tra un particolare sottotipo molecolare di carcinoma mammario e l'età: il tumore mammario triplo negativo (caratterizzato da mancanza di espressione dei recettori di estrogeno, progesterone e fattore di crescita epiteliale umano 2) è infatti più frequentemente diagnosticato al di sotto dei 40 anni, mentre nei pazienti ultrasettantenni è di più comune riscontro il sottotipo luminale A [5]. Il tasso di



sopravvivenza più basso nelle pazienti più giovani è quindi molto probabilmente legato alla maggiore incidenza di un carcinoma mammario più aggressivo [7].

Un altro fattore di rischio non modificabile per il carcinoma mammario è rappresentato dall'anamnesi personale e familiare. La storia personale di cancro della mammella è associata a un rischio aumentato, anche se basso, di sviluppare un carcinoma alla mammella controlaterale. Il rischio, secondo alcune stime, aumenterebbe dello 0,5% per ogni anno trascorso dalla diagnosi del primo tumore. Questo aumento potrebbe essere in gran parte legato all'età dato che il rischio di neoplasia a parità di età è leggermente superiore senza una precedente storia di carcinoma mammario [7]. Un'anamnesi personale caratterizzata da alterazioni non neoplastiche come iperplasia o carcinoma *in situ* aumenta il rischio di insorgenza del tumore [5]. La malattia benigna della mammella (BBD) è un'ampia categoria di diagnosi correlate a un grado variabile di aumento del rischio di carcinoma mammario. La valutazione di rischio di carcinoma della mammella dopo una biopsia mammaria benigna può migliorare le conoscenze cliniche e guidare le raccomandazioni di screening.

A questo proposito Dyrstad *et al.* hanno eseguito una metanalisi della letteratura esistente, pubblicata nel 2015, per quantificare la stima del rischio associato alla BBD che è risultata essere correlata ad un aumentato rischio di sviluppare il cancro mammario. In particolare, la stima sintetica del rischio dopo malattia non proliferativa era 1,17, dopo malattia proliferativa senza atipia era 1,76, dopo malattia benigna della mammella non altrimenti specificata era 2,07 e dopo iperplasia atipica non altrimenti specificata era 3,93 [10].

Per quanto riguarda l'anamnesi familiare, una donna con un parente di primo grado (madre, sorella o figlia) malato presenta una probabilità di tumore aumentata [7]. Circa il 13-19% delle donne con una diagnosi di carcinoma della mammella ha un parente di primo grado affetto dalla medesima patologia [5]. Se una donna ha due parenti di primo grado con tumore mammario, allora avrà una probabilità di ammalarsi tre volte maggiore rispetto ad una donna con anamnesi familiare negativa. Anche il tipo di tumore mammario influenza la probabilità di insorgenza della patologia: secondo uno studio condotto su più di 5 milioni di soggetti, le donne con parente di secondo grado affetto da

tumore mammario *in situ* hanno un rischio del 20%, mentre se il tumore è invasivo, allora il rischio sale al 30% [7].

Il tasso di incidenza del carcinoma della mammella è significativamente maggiore nelle donne con una storia familiare di questa neoplasia a prescindere dall'età. Questa associazione è influenzata sia da fattori ambientali che da modificazioni epigenetiche legate all'invecchiamento [5,11].

La maggior parte dei tumori della mammella è sporadica, mentre il 5-7% risulta essere legato a fattori ereditari, di cui un quarto determinato dalle mutazioni BRCA1 e BRCA2 [9]. La funzione di questi due geni, classificati come oncosoppressori, è legata a meccanismi chiave come la riparazione del danno al DNA, la regolazione dell'espressione genica e il controllo del ciclo cellulare. Le varianti alleliche BRCA patologiche possono causare alterazione della funzione proteica, dell'attività trascrizionale e di riparazione del DNA; portando a diffusa instabilità cromosomica che consente l'accumulo di altri difetti genetici [12]. È stato osservato che, nelle donne portatrici di mutazione del gene BRCA1 il rischio di sviluppare un carcinoma mammario nel corso della vita è del 65%, mentre nelle donne con mutazione del gene BRCA2, il rischio è del 45% [9]. La frequenza globale di queste mutazioni nella popolazione generale è di 1 su 300-500 individui [13].

L'incidenza di queste mutazioni in famiglie ad elevato rischio varia ampiamente tra diverse popolazioni, alcune presentano un largo spettro di alterazioni, mentre in particolari gruppi etnici specifiche mutazioni mostrano una elevata frequenza a causa di un effetto "founder". Si tratta di piccoli gruppi di persone che sono rimaste isolate con conseguenti incroci e il risultato che ne deriva è che una mutazione, normalmente rara, continua ad essere presente e diventa più comune all'interno della popolazione [14]. Una review condotta da Ferla *et al.* e pubblicata nel 2007 ha esaminato diverse popolazioni nelle quali le mutazioni founder sono state identificate per i geni BRCA1 e 2. L'esempio ben noto di un effetto founder è quello degli ebrei ashkenazi. In generale solo il 10% dei tumori mammari e ovarici è legato a fattori ereditari; tuttavia, la proporzione ereditaria di queste patologie è molto più alta tra gli ebrei ashkenazi poiché spesso presentano una delle seguenti tre mutazioni founder. La mutazione 158delAG di BRCA1 è stata rilevata

nell'1% di questa popolazione e contribuisce al 16-20% dei tumori mammari diagnosticati prima dei 50 anni. Una seconda mutazione founder di BRCA1, 5382insC, è stata riscontrata nello 0,13%, mentre la terza mutazione 6174delT a carico di BRCA2, ha una frequenza dell'1,52%. Si è visto che l'8% delle donne con tumore mammario diagnosticato prima dei 42 anni e il 7% delle donne con carcinoma mammario diagnosticato tra 42 e 50 anni, con una storia familiare di tumore mammario, sono portatrici di quest'ultima mutazione [14].

Le mutazioni founder sono state individuate in diverse popolazioni europee. In Islanda, ad esempio quella più comune è la mutazione 999del5 di BRCA2, riscontrata nello 0,4% di questa popolazione, nell'8,5% dei pazienti con tumore mammario e nel 7,9% dei pazienti con carcinoma ovarico, ma non sembra contribuire allo sviluppo di altri tipi di tumore [14]. In Norvegia, le forme ereditarie di carcinoma mammario e ovarico coinvolgono quattro principali mutazioni founder (1675delA, 816delGT, 3347delAG e 1135insA) e nel complesso rappresentano il 68% delle mutazioni BRCA1. In Finlandia, sono state identificate 11 mutazioni ricorrenti e che rappresentano l'84% di tutte le mutazioni trovate in BRCA1 e 2 [14].

Nel 2001, Baudi *et al.* hanno descritto per la prima volta un esempio di mutazione founder nella popolazione italiana. Lo screening dell'intero gene BRCA1 è stato eseguito su 24 pazienti con tumore mammario e/o tumore ovarico che appartenevano a famiglie non imparentate. Lo screening ha mostrato un alto tasso della mutazione 5083del19 (4 casi su 24). Tutte le famiglie con questa mutazione erano originarie della Calabria e le analisi dell'aplotipo, effettuate sui probandi e sui membri delle famiglie, hanno mostrato un allele comune, indicando un possibile effetto founder, in concordanza con il patrimonio genetico della popolazione calabrese (omogenea ed associata a fenomeni migratori trascurabili). Uno studio condotto da Nedecu *et al.* su 116 donne di origine italiana con un tumore primario mammario o ovarico ha mostrato la mutazione 5083del19 in cinque famiglie di cui tre di origine calabrese [14]. Uno studio del 2004 (Cipollini *et al.*) ha censito 1758 famiglie e nel 23% di queste sono state riscontrate mutazioni patogenetiche in BRCA1 o BRCA2. Un effetto founder regionale è stato dimostrato in Italia per le

mutazioni BRCA1 5083del19 e BRCA2 8765delAG, e una probabile nuova mutazione founder è stata caratterizzata in Toscana [12].

L'identificazione delle mutazioni founder nelle varie etnie è un passo estremamente importante nell'ambito della consulenza genica in quanto rende possibile usare un approccio più specifico ai test molecolari. L'elevata frequenza di queste mutazioni, consentendo di analizzare un gran numero di casi, potrebbe fornire informazioni accurate sulla loro penetranza. Inoltre, l'evidenza delle differenze nella suscettibilità e nell'età di insorgenza del tumore tra i portatori di una specifica mutazione potrebbe rendere possibile definire il ruolo e l'importanza dei fattori di modifica del rischio con la conseguente migliore gestione della malattia [14].

Oltre alle mutazioni di BRCA1 e BRCA2, altre condizioni geniche correlate ad un aumento di rischio per il carcinoma della mammella sono state individuate in presenza di alcune condizioni quali la sindrome di Li-Fraumeni, in cui il gene TP53 è mutato, la sindrome di Peutz-Jeghers, la sindrome di Cowden (mutazione del gene PTEN) e le mutazioni nei geni ATM e PALB2 [9].

Per quanto riguarda l'etnia sono state riscontrate incidenze diverse del carcinoma della mammella anche se i motivi di una diffusione non omogenea tra le diverse etnie non sono noti. In generale, l'incidenza di questa patologia è maggiore nelle donne bianche non ispaniche, mentre la mortalità è maggiore nelle donne di colore [5].

Per quanto riguarda i fattori ormonali si è riscontrato un aumento del rischio nelle donne che assumono terapia endocrina sostitutiva in menopausa, soprattutto in relazione all'uso di estroprogestinici sintetici ad attività androgenica, e nelle donne che fanno uso di contraccettivi orali [9]. Uno studio di Ravdin *et al.* del 2007 ha evidenziato che negli Stati Uniti dal 2002 al 2003 si è registrato un calo del 6,7% nell'incidenza del cancro al seno probabilmente risultato in seguito ad una diminuzione della terapia ormonale sostitutiva da parte delle donne americane. Il calo dell'incidenza è stato particolarmente importante per i tumori positivi al recettore degli estrogeni nelle donne di età superiore ai 50 anni [15]. Si ritiene che il calo della terapia ormonale sostitutiva sia stato la conseguenza della pubblicazione, nel 2002, dei primi risultati dello studio "Women Health Initiative".

Questo studio ha evidenziato come il rischio di tumore della mammella fosse più alto nelle donne che ricevevano la terapia ormonale rispetto al gruppo placebo, e a 5 anni di follow-up il rischio di cancro al seno nelle donne che avevano ricevuto terapia fosse del 26% più alto [15]. È stato anche osservato come l'aumento del rischio fosse correlato alla durata della somministrazione della terapia sostitutiva e reversibile alla sospensione [9]. L'associazione tra la terapia ormonale sostitutiva e il carcinoma mammario si è vista essere più forte per i tumori lobulari e tubulari rispetto ai tumori duttali. Inoltre, l'associazione è risultata inversamente correlata al grado tumorale e più marcata per i tumori estrogeno positivi rispetto ai tumori estrogeno negativi [15]. Livelli più alti di estrogeni nelle donne in premenopausa e postmenopausa sono stati associati ad un aumento del rischio di cancro al seno [7]. Una revisione di dati raccolti da studi epidemiologici ha evidenziato che le donne che hanno sviluppato carcinoma della mammella presentavano concentrazioni sieriche di estradiolo maggiori del 15% rispetto ai soggetti che non si sono ammalati [7]. Una precoce comparsa del menarca ed una menopausa tardiva comportano una lunga e continua esposizione dell'epitelio ghiandolare agli ormoni ovarici che lo stimolano a proliferare [9]. Sebbene l'età alla pubertà non coincida perfettamente con lo sviluppo del seno, i due eventi sono altamente correlati. Il tumore della mammella è pressappoco inesistente prima della comparsa del menarca e molto raro subito dopo questo evento. Di conseguenza non è possibile lo studio degli effetti a breve termine dei cambiamenti ormonali associati con il menarca confrontando il rischio di cancro mammario nelle donne della stessa età prima e dopo la pubertà. È stato dimostrato che il rischio di tumore mammario aumenta maggiormente con una comparsa precoce del menarca piuttosto che con una menopausa tardiva [16].

Molti studi hanno evidenziato che la multiparità e l'allattamento al seno hanno un effetto protettivo nei confronti del carcinoma mammario. L'efficacia dell'allattamento al seno come fattore di riduzione del rischio si è vista essere massima se si protrae per almeno sei mesi [7].

In una analisi del 2002 sono stati raccolti, controllati e analizzati centralmente i dati di 47 studi epidemiologici in 30 paesi che includevano informazioni sui modelli di allattamento

al seno e altri aspetti della gravidanza [17]. È stata osservata una diminuzione del rischio relativo di carcinoma mammario del 4,3% per ogni 12 mesi di allattamento e del 7,0% per ogni nascita. Questa riduzione del rischio associato all'allattamento al seno non differiva significativamente per le donne nei paesi sviluppati e in via di sviluppo e non variava per età, stato della menopausa, origine etnica, numero di figli ed età alla nascita del primo figlio [17]. Una prima gravidanza portata a termine in giovane età è un importante fattore protettivo, mentre una riduzione del rischio non è stata riscontrata nel caso di gravidanze non portate a termine o comunque durate meno di 33 settimane [5]. Le donne con una storia personale di preeclampsie durante la gravidanza o il parto presentano un rischio diminuito di carcinoma della mammella [5,18]. L'alterazione degli equilibri ormonali durante questi eventi si traduce in un effetto protettivo verso la possibile insorgenza del tumore mammario [5].

La densità mammaria è un altro fattore di rischio non modificabile per il tumore della mammella. In generale un tessuto mammario più denso è correlato ad un rischio aumentato di tumore mammario [5]. Una metanalisi condotta da Mokhtary *et al.*, pubblicata nel 2021, ha riscontrato un'associazione statisticamente significativa e clinicamente rilevante tra i cambiamenti nella densità della mammella e il rischio di carcinoma, principalmente in termini di rischio più elevato con aumento della densità [19]. Questa tendenza si osserva sia nelle donne in premenopausa che in postmenopausa [5,20]. La densità mammografica, d'altra parte, è un tratto che cambia costantemente e normalmente diminuisce con l'aumentare dell'età, specialmente durante la menopausa [19]. Altre variabili che hanno dimostrato avere un impatto sulla densità mammaria sono l'indice di massa corporea (BMI), l'uso di ormoni esogeni, la dieta e la storia riproduttiva [20]. Circostanze come la gravidanza e l'allattamento al seno possono influenzare questo parametro. È stato suggerito che la valutazione della densità mammaria possa essere una modalità semplice e non invasiva per effettuare una sorveglianza su quelle pazienti che presentano un rischio aumentato di sviluppare un tumore della mammella [5,21]. La densità mammografica è infatti un forte predittore indipendente di carcinoma mammario nella popolazione a rischio a causa di una storia familiare [21].

L'impiego di cicli radioterapici può rappresentare un fattore che predispone all'insorgenza di carcinoma della mammella. Il rischio di sviluppare un carcinoma della mammella dopo un trattamento radioterapico dipende dalle caratteristiche della paziente. Infatti, il tumore indotto dalla radioterapia è strettamente legato all'età del soggetto nel momento in cui è sottoposto al trattamento. Una paziente che va incontro a radioterapia prima dei 30 anni, presenta un rischio di carcinoma mammario maggiore [5,22]. La storia familiare di tumore della mammella nelle pazienti che hanno ricevuto dosi di radioterapia rappresenta un ulteriore elemento che incrementa il rischio di sviluppo della neoplasia [5]. In questo contesto, la valutazione del rischio di insorgenza risulta difficile dal momento che i tumori indotti da radioterapia hanno una latenza di 10 o più anni dal trattamento radioterapico [22].

I fattori di rischio modificabili sono quelli legati ad abitudini e comportamenti per cui può risultare possibile attuare una prevenzione primaria nei confronti della malattia.

Per quanto riguarda i farmaci, i dati di alcune ricerche indicano che la somministrazione di DES (dietilstilbestrolo) durante la gravidanza potrebbe essere associata ad un aumentato rischio di carcinoma della mammella nella madre e nella prole [5,23]. Questo incremento del rischio è risultato essere dose correlato ed aumentare con l'età. Si è visto infatti che le donne con età uguale o maggiore a 40 anni sono quasi 1,9 volte più suscettibili allo sviluppo neoplastico rispetto alle donne sotto i 40 anni [5,24]. Inoltre, secondo Palmer *et al.*, le donne con esposizione prenatale a DES hanno un aumentato rischio di carcinoma della mammella dopo i 40 anni [24].

L'uso di antidepressivi potrebbe essere associato ad un rischio maggiore di carcinoma della mammella [5].

Secondo Friedman *et al.*, il rischio di tumore mammario è maggiore durante l'utilizzo di tetracicline [5].

Sono stati effettuati dei tentativi per correlare l'impiego di farmaci antinfiammatori non steroidei con un rischio aumentato di carcinoma mammario, ma i dati rimangono non coerenti [5].

Relativamente allo stile di vita, secondo una metanalisi (Chen *et al.*) su 38 studi pubblicati dal 1994 al 2017, esiste una relazione inversa tra attività fisica e rischio di tumore della mammella [25]. Sebbene i meccanismi con cui l'attività fisica e lo sport diminuiscono la possibilità di sviluppo del carcinoma mammario non siano ancora del tutto chiari, uno svolgimento quotidiano e regolare di tali pratiche costituisce un fattore protettivo [5]. Secondo uno studio condotto da Thune *et al.*, nella popolazione generale, il beneficio dell'attività fisica è più marcato nelle donne in periodo fertile rispetto a quelle in postmenopausa [5,26].

Nelle donne con una storia familiare di carcinoma della mammella, l'attività fisica è stata associata ad un rischio ridotto di carcinoma della mammella solo nel periodo postmenopausa [5].

Un altro fattore di rischio è rappresentato dall'obesità soprattutto nelle donne in postmenopausa, probabilmente perché l'eccesso di tessuto adiposo rappresenta durante la menopausa la principale fonte di sintesi di estrogeni circolanti [9]. Le donne obese hanno inoltre una prognosi peggiore dovuta al fatto che tendono ad avere uno stadio TNM (Tumour, Node, Metastasis) più elevato alla diagnosi [27]. È stato osservato che un BMI più elevato è associato a caratteristiche biologiche più aggressive del tumore come dimensioni maggiori e una percentuale più alta di metastasi linfonodali [5]. Secondo Wang *et al.*, le pazienti sopra i 50 anni con un elevato BMI presentano un rischio di prognosi negativa maggiore rispetto a pazienti con un BMI minore [28]. Un decorso clinico peggiore è principalmente riscontrato nei casi in cui il BMI è uguale o superiore a 25 kg/m<sup>2</sup> [5]. Secondo Chen *et al.*, ad ogni aumento di 5 kg dall'età di 20 anni si associa un incremento del rischio di tumore mammario in postmenopausa del 6% [25]. Nelle donne in età fertile, invece, un BMI elevato è associato ad un rischio ridotto di carcinoma della mammella e le cause di questa relazione inversa non sono del tutto note [7]. Sempre secondo Chen *et al.*, questa associazione è probabilmente legata alla minor concentrazione di ormoni sessuali nelle donne obese in premenopausa [25].

L'obesità addominale è uno dei fattori che, insieme ad alterato metabolismo glucidico, elevati livelli di colesterolo e/o trigliceridi e ipertensione arteriosa, caratterizza la sindrome



metabolica. Questa condizione aumenta il rischio di malattie cardiovascolari e di carcinoma mammario. Si suppone che nei soggetti con sindrome metabolica esista una resistenza insulinica a cui l'organismo reagisce aumentando i livelli di insulina la quale, agendo sul recettore di membrana del fattore di crescita insulino-simile 1, può attivare le vie del segnale intracellulare che risultano fondamentali per la crescita neoplastica [9]. La sindrome metabolica si basa su una predisposizione genetica, ma allo stesso tempo è influenzata da stili di vita caratterizzati da sedentarietà e diete ipercaloriche. Lo stile di vita, pertanto, può concorrere a ridurre il rischio di carcinoma mammario attraverso una regolare attività fisica e una dieta equilibrata ricca di vegetali e fibre (per esempio la dieta mediterranea) [9].

Il consumo di carne rossa, cibi processati, prodotti di soia e cibi grassi è stato associato ad un incremento del rischio di cancro al seno [7]. Secondo l'OMS la carne processata è classificata come carcinogeno di gruppo 1 (sostanze delle quali sono noti gli effetti mutageni sull'uomo) e potrebbe aumentare il rischio di insorgenza di tumori gastrointestinali e mammari. Osservazioni simili sono state fatte in termini di assunzione eccessiva di grassi saturi [5]. I cibi molto elaborati sono ricchi di sodio e predispongono all'obesità, riconosciuta come fattore di rischio per il carcinoma della mammella [5].

Secondo uno studio prospettico condotto da Fiolet *et al.*, un incremento del consumo di questi cibi del 10% si è visto associato a un aumento del 12% del rischio di cancro in generale e dell'11% del rischio di carcinoma della mammella [29].

Al contrario, le vitamine esercitano proprietà antitumorali, che potrebbero potenzialmente rappresentare un beneficio nella prevenzione di diversi tumori maligni, tra cui il carcinoma della mammella, tuttavia, il meccanismo non è ancora del tutto compreso [5]. Per quanto concerne il carcinoma della mammella, la maggior parte degli studi è focalizzata sull'assunzione di vitamina D. A tal proposito, si è osservato che elevati livelli sierici di idrossivitamina D sono associati ad una minore incidenza della patologia nelle donne in periodo fertile e in menopausa [5,30]. Mentre pazienti con carcinoma mammario mostrano bassi livelli di vitamina D rispetto ai controlli sani. Si è visto inoltre che, nelle donne con diagnosi di tumore mammario, bassi livelli di vitamina D erano associati ad

una prognosi infausta: circa il 94% delle donne con vitamina D inferiore a 20 ng/ml sviluppa metastasi e il 73% muore a causa della malattia avanzata [30].

Uno studio di Huss *et al.* ha rilevato che un'elevata espressione di recettore per la vitamina D nei tumori mammari invasivi è associata a fattori prognostici favorevoli e un basso rischio di morte per la patologia tumorale [31].

Il consumo di alcol è un fattore di rischio noto per il carcinoma della mammella, con un aumento del 7-10% del rischio per ogni bevanda alcolica standard consumata quotidianamente [32]. Una metanalisi di oltre 100 studi ha evidenziato infatti un'associazione positiva tra il tumore della mammella e il consumo di alcol. È stato riportato anche che l'assunzione di alcol *una tantum* è linearmente correlata con il rischio di cancro al seno in particolare se questo comportamento compare in età molto precoce e molto avanzata. Il legame tra il consumo di alcol e rischio di tumore della mammella può essere correlato all'effetto dell'alcol sul metabolismo degli estrogeni, che porta ad un aumento del livello di estrogeni nel sangue [7]. Inoltre, l'assunzione di alcol si traduce spesso in un eccessivo aumento di grasso con livelli di BMI più elevati, il che aumenta ulteriormente il rischio. Da considerare sono anche gli effetti cancerogeni diretti e indiretti dei metaboliti dell'alcool [5]. Un consumo di alcool prima della prima gravidanza, contribuisce in modo significativo all'induzione di alterazioni morfologiche del tessuto mammario, predisponendolo a ulteriori eventi cancerogeni [5].

Per quanto concerne il fumo, numerosi studi hanno mostrato che aumenta il rischio di diverse neoplasie, fra cui il carcinoma della mammella [7]. Gli agenti cancerogeni presenti nel tabacco raggiungono il tessuto mammario e aumentano la probabilità di mutazioni in oncogeni e oncosoppressori (p53 in particolare). Anche il fumo passivo contribuisce all'induzione di eventi favorevoli l'insorgenza del tumore [5]. Uno studio prospettico, condotto su più di centomila donne, ha evidenziato che il fumo è correlato ad un aumento del rischio di carcinoma mammario del 5%, in particolare nelle donne che hanno iniziato a fumare nell'adolescenza [7]. Secondo Gram *et al.*, le donne che hanno iniziato a fumare più di 5 anni prima del primo parto e fumavano più di 20 pacchetti all'anno, presentavano un rischio complessivo di carcinoma della mammella superiore del 35% [33].

Recentemente, l'esposizione alla luce artificiale notturna è stata collegata ad un rischio aumentato di carcinoma della mammella. La probabile causa potrebbe essere un'interruzione del ritmo della melatonina e successive alterazioni epigenetiche [5]. Secondo Johns *et al.*, una maggiore esposizione alla luce artificiale notturna è associata ad un rischio maggiore di tumore mammario rispetto ad individui con un'esposizione ridotta. Tuttavia, i dati riguardanti l'eccessivo uso di dispositivi elettronici a LED connesso ad un maggiore rischio di tumore mammario sono insufficienti e richiedono altre valutazioni in quanto alcuni risultati sono contraddittori [5].

Anche l'esposizione prolungata a sostanze chimiche può promuovere la carcinogenesi influenzando il microambiente tumorale inducendo successivamente modificazioni epigenetiche [5]. Secondo Videnros *et al.*, le donne esposte professionalmente a composti chimici presentano un rischio maggiore di carcinoma della mammella. Il rischio è correlato positivamente alla durata dell'esposizione, ma non all'intensità [34].

Il numero di composti chimici proposti per indurre il carcinoma della mammella è significativo. Ad oggi le sostanze su cui si pone la maggiore attenzione sono il DDT (dicloro-difenil-tricoloretano) e il PCB (policlorinato bifenil) poichè l'esposizione precoce a questi composti interrompe lo sviluppo delle ghiandole mammarie [5].

### **1.3 PREDIZIONE del RISCHIO**

La diagnosi precoce del carcinoma della mammella è importante per ridurre il tasso di mortalità legato a questa patologia [35]. In alcuni paesi a basso e medio reddito, a causa di risorse economiche limitate dei sistemi sanitari, la diagnosi di carcinoma mammario è perlopiù realizzata in stadi più avanzati della patologia. In questo modo si ha un peggioramento della prognosi ed una diminuzione della sopravvivenza del paziente. Programmi di screening per la diagnosi precoce possono implementare l'assistenza primaria tramite l'utilizzo di strumenti validati per il calcolo di rischio individuale che rappresentano una strategia a basso costo che può facilitare il processo decisionale nell'ambito della prevenzione e dello screening per questa patologia [35].

Il modello di Gail è uno dei numerosi modelli di valutazione del rischio che possono aiutare a determinare il rischio a 5 anni e il rischio a lungo termine [36]. Tale modello, in base alla probabilità di sviluppare il cancro, aiuta a determinare quali sono le opzioni di riduzione del rischio più appropriate per i singoli pazienti, tenendo in considerazione i rischi e i benefici dell'intervento [36]. Come mostrato dalla tabella 2, questo modello ha tradizionalmente sei input auto-riferiti: età attuale, età al menarca, età al primo parto a termine, numero di parenti di primo grado che hanno avuto il carcinoma della mammella, razza/etnia e numero di precedenti biopsie mammarie negative [9, 36]. La storia familiare include solo parenti di primo grado affetti dalla patologia [36]. Tuttavia, questo parametro non fornisce alcuna stima circa il rischio che una paziente abbia la mutazione BRCA. Inoltre, viene sottovalutato il rischio di cancro per i pazienti con una lunga storia familiare e con iperplasia atipica [36].

MODELLO DI GAIL <sup>1</sup>	
Età (valido per donne di età compresa tra 35 e 85 anni)	
Età menarca	7-11 anni
	12-13 anni
	>13 anni
Età al primo parto a termine	Nessuna
	< 20 anni
	20-24 anni
	25-29 anni
	≥ 30 anni
Familiare di primo grado con diagnosi di carcinoma mammario	0
	1
	≥ 1
Numero biopsie mammarie negative	0
	1
	≥ 1
Razza/Etnia	Bianca
	Afro-Americana
	Ispanica
	Asia tico-Americana
	Americo-Indiana/Nativa d'Alaska

Tab.2 Modello di GAIL [9]

Il modello di Gail non è stato progettato per stimare il rischio in:

- donne con una precedente diagnosi di carcinoma mammario, carcinoma lobulare *in situ* o carcinoma duttale *in situ*;
- donne che hanno ricevuto una precedente radioterapia al torace per il trattamento del linfoma di Hodgkin;

- donne con mutazioni genetiche in BRCA1 o BRCA2 o con sindromi genetiche che aumentano il rischio di carcinoma della mammella;
- donne di età inferiore a 35 anni o superiore a 85 anni [36];

Il BCRAT (Breast Cancer Risk Assessment Tool) è un'implementazione del modello di Gail che utilizza i dati relativi alla storia personale di iperplasia atipica, se disponibili, oltre ai tradizionali sei input del modello di Gail [36]. Il BCRAT è validato per donne di etnia bianca, afroamericana, ispanica e asiatica. I dati sulle donne native dell'Alaska sono limitati e il loro rischio viene stimato sfruttando in parte i dati sulle donne bianche e la stima potrebbe risultare imprecisa [37].

Nel 2022 Stevanato *et al.* hanno pubblicato una review che, analizzando studi pubblicati tra il 2013 e il 2018, valutava l'applicabilità del modello di Gail in diversi paesi ed etnie. Da questo studio si evince come il modello di Gail abbia applicabilità differenti nei diversi paesi e risulti essere più efficace nei paesi sviluppati rispetto a quelli in via di sviluppo. Questo potrebbe essere correlato a stili di vita differenti e a fattori di rischio quali obesità, sedentarietà, stress, fumo e alcol eterogenei [35].

Un altro modello di predizione del rischio è quello di Tyrer-Cuzick i cui parametri sono mostrati nella tabella 3 [9].

<b>MODELLO DI TYRER-CUZICK<sup>2</sup></b>	
<b>Età (anni)</b>	
<b>BMI (body mass index)</b>	< 21
	21-23
	23-25
	25-27
	>27
<b>Età al menarca (anni)</b>	
<b>Parità</b>	0
	< 20 anni
	20-24 anni
	25-29 anni
	≥ 30
<b>Età alla menopausa (se applicabile)</b>	<35
	35-39
	40-44
	45-49
	50-54
	≥ 55
<b>Storia di patologia mammaria benigna associata ad aumentato rischio di carcinoma mammario (iperplasia, iperplasia atipica, LCIS)</b>	
<b>Storia di carcinoma ovarico</b>	
<b>Uso di terapia ormonale sostitutiva</b>	
<b>Storia familiare (compresi: carcinoma mammario ed ovarico, discendenza Ashkenazi, test genetico se effettuato)</b>	

Tab.3 Modello di Tyrer-Cuzick [9]

## 1.4 SCREENING

Lo screening mammografico è un'attività di prevenzione secondaria periodica rivolta a donne asintomatiche al fine di effettuare una diagnosi di carcinoma mammario in stadio precoce e offrire la possibilità di usare terapie meno aggressive e più efficaci con l'obiettivo di ridurre la mortalità da tumore mammario [9]. La mammografia è un esame radiografico che permette di visualizzare eventuali noduli tumorali non ancora palpabili. All'interno dei programmi di screening vengono effettuate due proiezioni radiografiche, una dall'alto e una lateralmente e i risultati vengono valutati separatamente da due radiologi al fine di garantire una diagnosi più affidabile [38]. In Italia, i programmi di screening, secondo le indicazioni del Ministero della Salute, prevedono una mammografia biennale per le donne di età compresa tra i 50 e i 69 anni. Secondo lo IARC (International Agency for Research on Cancer), la partecipazione allo screening può ridurre la mortalità per il carcinoma mammario del 40% in questa fascia d'età [38]. Alcune regioni hanno adottato l'estensione dei programmi di screening invitando le donne dai 45 ai 49 anni a sottoporsi a una mammografia annuale [9,38] e le donne fino a 74 anni a una cadenza biennale [38]. La mammografia è tuttora ritenuto il test più efficace di screening. La modalità organizzata, di popolazione, è preferibile rispetto a quella spontanea e la tecnica digitale (digital mammography) è da preferire alla mammografia analogica (film-screen) [9]. La preferenza per la tecnica mammografica digitale è confermata anche dalle linee guida europee per lo screening mammografico redatte nel 2019 dalla ECIBC (European Commission Initiative on Breast Cancer). Le raccomandazioni di screening secondo le linee guida ECIBC per le donne con rischio nella media (in assenza di aumenti del rischio dovuti a predisposizione genetica o pregressa radioterapia) sono riportate nella tabella 4 [9].

ETA'	SCREENING
40-45 anni	Nessuno
45-49 anni	Mammografia ogni 2-3 anni
50-69 anni	Mammografia ogni 2 anni
70-74 anni	Mammografia ogni 3 anni

*Tab.4 Raccomandazioni screening mammografico secondo le linee guida ECIBC [9]*

Il problema dell'età fino alla quale continuare ad eseguire lo screening è complesso e deve tenere conto dell'aumento dell'aspettativa di vita. L'ACS (American Cancer Society) suggerisce di effettuare lo screening fino a quando la paziente è in buone condizioni di salute ed ha una aspettativa di vita uguale o superiore ai 10 anni [9]. Nell'ambito di questa procedura occorre tenere presente che esiste la possibilità di falsi positivi o sovra-diagnosi (diagnosi e trattamento di un tumore che non si sarebbe reso clinicamente evidente in assenza di screening) [9]. Inoltre, secondo il documento SIRM (Società Italiana di Radiologia Medica e Interventistica), il 20% dei tumori mammari non viene diagnosticata dalla mammografia e ciò fa sì che il 10% delle donne sia sottoposto ad ulteriori esami [39]. Alcune problematiche sono rappresentate dalla densità mammaria che può oscurare una lesione e dalla sovrapposizione di tessuto fibro-ghiandolare che può essere erroneamente interpretato come una lesione [40]. Nel caso in cui la mammella esaminata sia densa, la sensibilità della tecnica può diminuire notevolmente (dal 70-75% al 30-48%) [39]. La sovrapposizione dei tessuti può creare un effetto di mascheramento, denominato in letteratura "rumore anatomico", che limita il rilevamento delle lesioni, in particolare le anomalie dei tessuti molli. La tomosintesi mammaria digitale o DBT (digital breast tomosynthesis), una tecnica di imaging tomografico della mammella ad angolo limitato,

è stata sviluppata proprio per superare la problematica della sovrapposizione dei tessuti e il suo adattamento clinico è stato facilitato dallo sviluppo di rilevatori digitali [40].

Questo strumento diagnostico permette di rintracciare anche lesioni tumorali di piccole dimensioni che originano dalla ghiandola mammaria [41]. La mammella è scomposta in molteplici sezioni di spessore millimetrico e lo studio stratigrafico individua con maggiore facilità lesioni come noduli e micro-calcificazioni e risulta efficace in presenza di ghiandole mammarie dense come nei seni di giovani donne [41]. Diversi studi hanno valutato il potenziale della DBT come esame di primo livello nello screening [9]. Un report pubblicato nel 2015 ha evidenziato che la tomosintesi garantisce un aumento del *detection rate* da 0,5 a 2,7 per mille donne sottoposte a screening ed una riduzione del tasso di richiamo dal 3,6% allo 0,8% [9,40]. Skaane *et al.* hanno riportato che la DBT ha rilevato il 54-57% di tumori individuati mediante ecografia aggiuntiva dopo mammografia digitale negativa [9]. L'uso di mammografia più tomosintesi in ambito di screening ha portato a un tasso di rilevamento del cancro significativamente più elevato e ha consentito l'individuazione di tumori più invasivi [42]. La DBT è raccomandata dalle linee guida ECIBC come tecnica di approfondimento nei casi di sospetto clinico e di richiamo allo screening. Meattini *et al.* e Sotiriou *et al.* hanno dimostrato che la DBT è almeno equivalente alle proiezioni mammografiche aggiuntive in termini di ingrandimento diretto e compressione mirata, riducendo allo stesso tempo la dose radiante [9]. In donne sintomatiche, l'accuratezza diagnostica della mammografia è migliorata con la DBT riducendo il numero di biopsie non necessarie [9].

La mammografia con mezzo di contrasto (CEM) è una tecnica emergente che utilizza materiali di contrasto iodati per la visualizzazione della neovascolarizzazione mammaria in modo simile alla risonanza magnetica [43]. Un mezzo di contrasto a base di iodio a bassa osmolarità viene iniettato per via endovenosa prima dell'acquisizione dell'immagine. I vasi formati attraverso il processo di angiogenesi spesso perdono il materiale di contrasto che si diffonde all'interno del tessuto tumorale, determinando un'immagine potenziata con iodio [43]. Al radiologo vengono fornite due immagini, una come una normale mammografia e l'altra che evidenzia le aree di captazione del contrasto [43]. La CEM ha



il vantaggio di dimostrare sia i cambiamenti anatomici che i cambiamenti locali nella perfusione mammaria, presumibilmente causati dall'angiogenesi tumorale [43]. Uno studio condotto da Cheung *et al.* su 89 donne con densità mammaria e 100 lesioni ha mostrato che la CEM rispetto alla mammografia ha migliorato la sensibilità dal 71,5% al 92,7% e la specificità dal 51,8% al 67,9% indipendentemente dall'esperienza di lettura mammografica [43,44]. Nonostante le prestazioni diagnostiche, occorre tenere conto di risultati mammografici equivoci relativamente a lesioni benigne che possono apparire accentuate [43]. In uno studio condotto da Houben *et al.*, le lesioni benigne più comunemente rilevate erano rappresentate da fibroadenomi, papillomi e iperplasia [43]. Per quanto riguarda la valutazione di microcalcificazioni sospette, la CEM potrebbe essere utile. Secondo uno studio (Cheung *et al.*), l'aumento delle calcificazioni può suggerire un sottostante carcinoma mammario o carcinoma duttale *in situ*. Tuttavia, in base ad un altro studio di popolazione condotto da Houben *et al.*, le differenze prestazionali tra CEM e mammografia convenzionale erano trascurabili sia in termini di sensibilità (93,8% per la CEM e 90,8% per la mammografia tradizionale) che, per quanto riguarda la specificità (36,6% per la CEM e 39,1% per la mammografia convenzionale) [43]. Si è pertanto concluso che non vi era alcun vantaggio evidente nell'utilizzare la mammografia a mezzo di contrasto per valutare le calcificazioni mammarie sospette [43]. Come con la risonanza magnetica, le calcificazioni sospette alla mammografia dovrebbero essere sottoposte a biopsia indipendentemente dal fatto che mostrino o meno un miglioramento nelle immagini CEM [43]. La limitazione più sostanziale della CEM è la possibilità di reazioni al mezzo di contrasto, che possono variare da reazioni di ipersensibilità lievi a fatali e controindicazioni legate all'insufficienza renale [43].

Per quanto riguarda le indagini genetiche, nel maggio 2021 AIOM ha pubblicato un documento contenente le raccomandazioni per l'implementazione del test BRCA predittivo e preventivo nei tumori della mammella, dell'ovaio, del pancreas e della prostata [45]. Le raccomandazioni AIOM vengono impiegate per l'identificazione di soggetti portatori di varianti patogenetiche costituzionali (germinali) nei geni BRCA, associate ad alto rischio di tumori (mammella, ovaio, pancreas e prostata) al fine di intraprendere i

percorsi di prevenzione primaria e/o secondaria e per la valutazione delle implicazioni terapeutiche, ovvero l'indicazione al test BRCA come strumento predittivo di efficacia di specifiche terapie antitumorali [45]. L'indicazione all'esecuzione del test è basata sull'anamnesi personale e familiare. Essa prende in considerazione elementi impiegati per il riconoscimento di tumori legati a predisposizione ereditaria fra cui numero di parenti malati, tipo di neoplasia, tumori primitivi multipli, età alla diagnosi e caratteristiche istologiche, immunohistochimiche e molecolari dei tumori [45]. Tutte queste variabili sono organizzate in criteri che, se soddisfatti, rendono indicato l'invio alla consulenza genetica (vedi tabella 5) [45].

STORIA PERSONALE di:
1. Carcinoma mammario maschile
2. Donna con carcinoma mammario
3. Donna con carcinoma mammario < 36 anni
4. Donna con carcinoma mammario triplo negativo < 60 anni
5. Donna con carcinoma mammario bilaterale < 50 anni
STORIA PERSONALE DI CARCINOMA MAMMARIO < 50 anni e FAMILIARITA' di PRIMO GRADO per:
1. Carcinoma mammario < 50 anni
2. Carcinoma mammario bilaterale
3. Carcinoma mammario maschile

*Tab.5 Criteri di accesso alla consulenza genetica oncologica [45]*

Il riscontro di una positività al test germinale BRCA permette l'accesso alla consulenza genetica oncologica e al test preventivo dei parenti collaterali del soggetto che ha effettuato il test. Nel caso di esito positivo, saranno avviati i programmi finalizzati ad una diagnosi precoce dei tumori associati alle sindromi a trasmissione eredo-familiare da difetti dei geni BRCA ed alla riduzione del rischio di carcinoma mammario [45].

Nelle linee guida globali di screening per il carcinoma della mammella, le donne caratterizzate da un rischio maggiore di tumore mammario appartengono a diverse categorie che possono essere riassunte come storia personale e familiare di cancro mammario, predisposizione genetica ed elevata densità mammaria [46]. Nelle donne ad elevato rischio per storia familiare o perché portatrici di mutazioni BRCA1 o BRCA2, lo screening mammario viene eseguito dai 25 anni ai 10 anni precedenti l'età di insorgenza del tumore nel familiare più giovane [9]. La mammografia con mezzo di contrasto viene eseguita con cadenza annuale nelle donne con mutazioni BRCA, nelle donne con rischio di sviluppare un tumore del 20-25% (secondo la stima del modello di Gail), nelle donne con pregressa radioterapia toracica tra i 10 e 30 anni e nelle donne con sindrome di Li-Fraumeni, Cowden e Bannayan-Riley-Ruvacalba [9]. Numerosi studi hanno dimostrato che, se si esegue la risonanza magnetica mammaria annuale nelle donne a rischio aumentato su base ereditaria, il contributo della mammografia in termini di ulteriore detection è limitato [9]. Ciò induce ad evitare la mammografia se si esegue la risonanza magnetica mammaria nelle donne con età inferiore ai 35 anni anche tenendo conto dell'aumentato rischio di carcinogenesi indotta dalle radiazioni correlata all'azione oncosoppressiva [1]. In un'altra categoria a rischio elevato, è rappresentata dalle donne che hanno subito radioterapia toracica in età pediatrica o nella prima fase della vita adulta, l'incidenza cumulativa di carcinoma mammario tra i 40 e i 45 anni è 13-20%, simile a quella delle donne con mutazioni nei geni BRCA [9]. Nelle donne con pregressa radioterapia toracica si è osservata una sensibilità maggiore della mammografia e minore della CEM rispetto a quanto avviene nelle donne con rischio familiare. Sulla base dei dati disponibili, le donne che sono state sottoposte prima dei 30 anni a radioterapia toracica dovrebbero essere invitate a partecipare ad un programma di sorveglianza con lo stesso

protocollo usato per le donne ad elevato rischio eredo-familiare e mammografia bilaterale o tomosintesi a cadenza annuale [9].

## 1.5 CLASSIFICAZIONE ED INQUADRAMENTO DIAGNOSTICO

Il tumore della mammella è una patologia eterogenea dal punto di vista genetico e clinico [47,48]. Tale caratteristica suggerisce l'ipotesi secondo la quale i tumori mammari possano avere inizio da diversi tipi cellulari, sia dalle cellule staminali epiteliali che dalla loro progenie (cellule differenziate o di transizione) [48]. In base a questo aspetto, il tumore mammario potrebbe essere paragonato alle neoplasie ematologiche per le quali è stato proposto un modello analogo [48].

Per districarsi nell'eterogeneità dei tumori mammari e standardizzare il linguaggio, sono stati sviluppati sistemi di classificazione che si sono evoluti nel corso degli anni in uno strumento utilizzato nell'ambito della terapia e della prognosi [47]. Con i recenti progressi e una maggiore conoscenza molecolare dell'eterogeneità tumorale, l'attuale modello clinico per la classificazione del cancro può trarre vantaggio dall'aggiunta di diversi fattori [47]. L'identificazione delle cellule staminali tumorali che danno origine al cancro e dei sottotipi molecolari contribuiranno a fornire una classificazione del carcinoma mammario più completa e rilevante dal punto di vista clinico dell'eterogeneità del carcinoma [47].

### 1.5.1 Classificazione Istologica

Nel 2019 l'OMS ha aggiornato la classificazione anatomo-patologica dei tumori della mammella (Tab. 6) [9].

TUMORI EPITELIALI
<b>Invasive breast carcinoma</b>
TUMORI EPITELIALI DELLA MAMMELLA
Carcinoma infiltrante non di tipo speciale (NST)/Carcinoma duttale infiltrante NAS

Carcinoma lobulare

Carcinoma tubulare

Carcinoma cribriforme

Carcinoma mucinoso

Cistoadenocarcinoma mucinoso

Carcinoma infiltrante micropapillare

Adenocarcinoma apocrino

Carcinoma metastatico

*Tumori rari del tipo ghiandole salivari*

Carcinoma a cellule aciniche

Carcinoma adenoideo cistico

Carcinoma secretorio

Carcinoma mucoepidermoide

Adenocarcinoma polimorfo

Carcinoma a cellule alte con polarità invertita

*Neoplasie neuroendocrine*

Tumore neuroendocrino

Carcinoma neuroendocrino

**Proliferazioni epiteliali benigne e precursori**

Iperplasia duttale usuale

Lesioni a cellule colonnari

Iperplasia duttale atipica

**Adenosi e lesioni sclerosanti benigne**

Adenosi sclerosante

Adenoma apocrino

Adenosi microghiandolare

Cicatrice radiale/lesione sclerosante complessa

**Adenomi**

Adenoma tubulare NAS

Adenoma lattazionale

Adenoma duttale NAS

**Tumori epiteliali-mioepiteliali**

Adenoma pleomorfo

Adenomioepitelioma NAS

Adenomioepitelioma con carcinoma

Carcinoma epiteliale-mioepiteliale

**Neoplasie papillari**

Papilloma intraduttale

Carcinoma duttale *in situ*

Carcinoma papillare incapsulato

Carcinoma papillare incapsulato con invasione

Carcinoma solido-papillare *in situ*

Carcinoma solido-papillare con invasione

Adenocarcinoma intraduttale papillare con invasione

**Neoplasia lobulare non invasiva**

Iperplasia lobulare atipica

Carcinoma lobulare *in situ* NAS

Carcinoma lobulare *in situ* classico

Carcinoma lobulare *in situ* florido

Carcinoma lobulare *in situ* pleomorfo

**Carcinoma duttale *in situ* (CDIS)**

Carcinoma intraduttale, non-infiltrante, NAS, CDIS di basso grado

CDIS di grado nucleare intermedio

CDIS di alto grado nucleare

**TUMORI FIBROEPITELIALI E AMARTOMI DELLA MAMMELLA**

Amartoma

Fibroadenoma

Tumore filloide

TUMORI DEL CAPEZZOLO
Adenoma del capezzolo
Tumore siringomatoso
Malattia di Paget del capezzolo
TUMORI MESENCHIMALI DELLA MAMMELLA
Tumori vascolari
Tumori fibroblastici e miofibroblastici
Tumori dei nervi periferici
Tumori del muscolo liscio
Tumori del tessuto adiposo
Altri tumori mesenchimali e condizioni simil-tumorali
TUMORI EMOLINFOPOIETICI DELLA MAMMELLA
Linfomi
TUMORI DELLA MAMMELLA MASCHILE
Carcinoma invasivo
Carcinoma <i>in situ</i>
TUMORI METASTATICI
SINDROMI GENETICHE TUMORALI

Tab. 6 Sintesi della classificazione istologica del tumore della mammella secondo WHO 2019 [9]

Rispetto alla classificazione OMS del 2012, in quella attualmente in uso, aggiornata nel 2019, sono state apportate alcune modifiche [9]. Per il grado istologico si raccomanda di riportare la conta delle mitosi per mm<sup>2</sup> piuttosto che il denominatore della conta mitotica in 10 campi ad alto ingrandimento [9]. È stato inoltre riconosciuto il valore prognostico dei linfociti infiltranti il tumore (TILs). Il carcinoma midollare viene ora considerato come un carcinoma non speciale con ricca componente linfocitaria [9]. Il carcinoma neuroendocrino rientra nella categoria delle “neoplasie neuroendocrine” che comprende

il tumore e il carcinoma neuroendocrino [9]. Questa modifica è stata proposta per adeguare la classificazione di queste lesioni a quella adoperata per organi come il tratto gastrointestinale [9]. Sono stati inseriti come nuovi tipi istologici il cistoadenocarcinoma mucinoso e il carcinoma “tall cell” a polarità invertita, entrambi a prevalente fenotipo triplo negativo e buona prognosi [9]. Inoltre, è stata introdotta la variante micro-papillare del carcinoma mucinoso che può presentarsi in giovane età e può essere più facilmente caratterizzato da metastasi linfonodali rispetto al carcinoma mucinoso classico [9].

A differenza di altre patologie tumorali (come il cancro al colon), non è stato possibile definire la progressione del tumore mammario a causa della mancanza di specifici marcatori che definiscono l'iperplasia (tipica o atipica) e l'invasività o non invasività del carcinoma [47].

Il tumore mammario può essere diviso in due macrocategorie: *in situ* e invasivo (o infiltrante) [47]. Il tumore *in situ* viene ulteriormente sotto-classificato in duttale e lobulare. La base per distinguere le due tipologie è costituita da modelli di crescita e caratteristiche citologiche [47].

Il carcinoma duttale *in situ* (DCIS) è considerevolmente più comune rispetto al carcinoma lobulare *in situ* (LCIS) e comprende un gruppo eterogeneo di tumori [47]. Il DCIS è suddiviso sulla base delle caratteristiche architetture del tumore in 5 sottotipi: cribriforme, papillare, micro-papillare, solido e comedone [47]. Questa classificazione è stata utile per decenni, ma si basa soltanto sull'aspetto istologico e non prende in considerazione nessuno dei nuovi marker molecolari che hanno un significato prognostico [47]. Anche i carcinomi invasivi sono classificati in diversi istotipi. I più frequenti includono: il carcinoma invasivo di tipo non speciale (NST), il carcinoma lobulare invasivo, il carcinoma mucinoso (o colloide) e il carcinoma tubulare [9]. Tra queste tipologie, il carcinoma NST è di gran lunga il sottotipo più comune e rappresenta circa il 75-80% delle neoplasie invasive [47,49].

Le caratteristiche istopatologiche del carcinoma invasivo NST variano considerevolmente da caso a caso e anche all'interno dello stesso tumore [50]. Possono essere osservati tutti i tipi di margini tumorali (da margini altamente infiltrativi che permeano lo stroma a



margini continui con esteso pattern di crescita) [50]. Dal punto di vista citoarchiteturale, le cellule tumorali possono essere associate in cordoni, cluster e trabecole [50]. In alcuni casi la differenziazione ghiandolare può essere evidente in strutture tubulari con lume centrale in gruppi di cellule tumorali [50]. La componente stromale, molto variabile, può essere caratterizzata da una elevata proliferazione fibroblastica, scarsi elementi di tessuto connettivo e marcata ialinizzazione [50].

Nell'80% dei carcinomi NST sono presenti dei focolai di DCIS che in alcuni casi sono estensivi [50]. Solitamente questi DCIS coesistenti si caratterizzano per lo stesso grado nucleare del carcinoma invasivo NST [50]. Circa il 20-30% dei carcinomi invasivi NST presentano invasione linfovaskolare o invasione perineurale [50].

Alcuni carcinomi della mammella possono presentare un miscuglio dell'istotipo NST e dell'istotipo speciale [50]. Nei casi in cui l'istotipo speciale costituisce dal 10 al 90% del tumore allora verranno riportati entrambi gli elementi presenti così come la percentuale dell'istotipo speciale [50]. Anche il grado e lo stato di espressione dei biomarcatori devono essere valutati per le due componenti perché potrebbero essere differenti nei due istotipi [50].

Il carcinoma mammario invasivo NST viene ulteriormente sotto-classificato in base diversi pattern morfologici [50]. I carcinomi mammari con pattern midollare, i carcinomi invasivi con differenziazione neuroendocrina e i carcinomi con i pattern pleomorfo e corioncarcinomatoso vengono considerati come speciali pattern morfologici di carcinoma invasivo NST a prescindere dalla dimensione del pattern tumorale che li caratterizza [50]. Per quanto riguarda i carcinomi con pattern midollare, le neoplasie un tempo descritte come carcinomi midollari, carcinomi midollari atipici o carcinomi con caratteristiche midollari erano riconosciute come un istotipo speciale di tumori mammari con grado istologico elevato, architettura sinciziale priva di strutture ghiandolari, regioni necrotiche, elevata componente di TILs e un decorso clinico migliore rispetto ad altri carcinomi della mammella [50]. Questi tumori sono spesso negativi per i recettori ormonali di estrogeno (ER), progesterone (PgR) e fattore di crescita epidermale umano 2 (HER2) anche se talvolta si caratterizzano per una loro debole espressione [50]. I carcinomi mammari di

questo istotipo appartengono alla sottocategoria dei carcinomi mammari triplo negativi (TNBC) [50].

Il 10-30% dei carcinomi mammari NST, come dimostrato da analisi mediante immunohistochimica, si caratterizza per una differenziazione neuroendocrina di entità variabile [50]. Tuttavia, questo aspetto è più frequente nei carcinomi mucinosi e nei carcinomi papillari solidi dove si riscontra rispettivamente nel 20% e nel 72% dei casi [50]. La distinzione tra carcinomi invasivi NST con differenziazione neuroendocrina, tumori neuroendocrini (NET) e carcinomi neuroendocrini (NEC) si basa sulla presenza e sull'estensione di caratteristiche istologiche tipiche della differenziazione neuroendocrina nel cancro invasivo [50]. Se queste caratteristiche istologiche non sono distinte e uniformi a sufficienza per classificare la neoplasia come NET o NEC, allora il caso dovrebbe essere diagnosticato come carcinoma mammario NST con differenziazione neuroendocrina [50]. I tumori di questo istotipo sono tipicamente positivi per i recettori ormonali (HR-positivi) e negativi per HER2 [50].

Il carcinoma pleomorfo è un raro istotipo di carcinoma mammario invasivo NST caratterizzato da proliferazione pleomorfa e dalla presenza di cellule tumorali giganti in uno sfondo di adenocarcinoma [50]. Generalmente l'espressione dei recettori ormonali è negativa (HR-negativi), tuttavia una parte di questi tumori esprime il recettore HER2 [50]. Le metastasi linfonodali sono presenti nel 50% dei carcinomi con pattern pleomorfo e coinvolgono 3 o più linfonodi nella maggior parte dei casi [50].

Per quanto riguarda il grado istologico, questo è definito da 3 caratteristiche istopatologiche: il pleomorfismo nucleare, l'indice mitotico e la formazione di tubuli [50]. Viene usato un sistema di punteggio da 1 a 3 per valutare ognuno di questi parametri in modo indipendente [50]. La formazione di tubuli e strutture ghiandolari è valutata su tutto il tumore a basso ingrandimento [50]. Vengono contate soltanto le strutture caratterizzate da un evidente lume centrale circondato da cellule neoplastiche polarizzate [50]. Lo score viene assegnato in base alla porzione di area tumorale caratterizzata da queste formazioni [50].

Il polimorfismo nucleare viene valutato nell'area caratterizzata da grado più elevato di pleomorfismo rispetto alla regolarità del nucleo e della forma delle cellule normali nel tessuto mammario adiacente [50]. Una morfologia irregolare, il numero e la dimensione dei nucleoli sono caratteristiche aggiuntive nella valutazione [50]. I nuclei di score 1 sono simili nella taglia ai nuclei benigni delle cellule normali e sono più grandi in un rapporto inferiore alle 1,5 volte [50]. Questi nuclei si caratterizzano per un pleomorfismo minimo, un pattern cromatinico uniforme e i nucleoli non visibili o poco appariscenti [50]. I nuclei di score 2 sono più grandi (1,5-2 volte rispetto ai nuclei di cellule epiteliali benigne), si caratterizzano per un pleomorfismo moderato e nucleoli piccoli [50]. I nuclei di score 3 sono di dimensione maggiore (più di 2 volte rispetto a cellule epiteliali benigne) e si caratterizzano per cromatina vescicolare. Presentano forme molto variabili e nucleoli spesso prominenti [50].

Per quanto concerne la conta mitotica, l'osservatore deve contare solo figure mitotiche definite [50]. Nuclei ipercromici e picnotici dovrebbero essere ignorati perché è più probabile che rappresentino cellule in apoptosi piuttosto che in mitosi [50]. L'assegnazione dello score viene effettuata nell'area caratterizzata dalla frequenza più elevata di figure mitotiche secondo il metodo hot-spot [50]. Tipicamente queste zone comprendono il margine periferico del tumore [50].

Questi tre parametri vengono considerati insieme per assegnare un punteggio [50]. In linea generale, un tumore di grado 1 (score da 3 a 5 punti) è definito come ben differenziato, un tumore di grado 2 (score di 6-7 punti) come moderatamente differenziato e, infine, un tumore grado 3 (score di 8-9 punti) come scarsamente differenziato (Tab.7) [50].

CARATTERISTICA	SCORE
<i>Formazioni tubulari e ghiandolari</i>	
Maggior parte del tumore (>75%)	1
Di grado moderato (10-75%)	2
Lievi o nessuna (<10%)	3
<i>Pleomorfismo nucleare</i>	
Piccolo, regolare, cellule uniformi	1
Aumento moderato in taglia e variabilità	2
Variazioni marcate	3
<i>Conta mitotica</i>	
In base all'area valutata con il microscopio	1-3
<i>Score totale (somma degli score per tutti e tre i parametri citati)</i>	<i>Grado finale</i>
3-5	Grado 1
6 o 7	Grado 2
8 o 9	Grado 3

*Tab.7 Parametri per definire il grado istologico nei carcinomi della mammella con metodica semiquantitativa [50]*

### 1.5.2. Classificazione Molecolare

Il carcinoma della mammella è una patologia eterogenea con un decorso clinico diverso in base allo stadio della malattia, ai fattori prognostico-predittivi e all'istotipo [9]. Il modello di classificazione istologico ha valore prognostico, ma l'identificazione dei principali sottotipi molecolari di tumore mammario è stata un punto di partenza per determinare la scelta terapeutica [47]. Grazie alle analisi di espressione genetica basata su microarray, è stata indentificata una lista di 496 geni che hanno permesso la suddivisione del tumore in 4 principali tipologie: il “basal-like”, l'“HER2-enriched” o “ErbB2+”, il “luminale A” ed il “luminale B” [9] (Fig. 1 [47] e Tab.8 [51]). Nonostante la suddivisione in questi gruppi, all'interno dei sottotipi c'è una elevata eterogeneità [9]. Inoltre, alla luce di nuove conoscenze, è stato identificato un sottogruppo di neoplasie negative sia per i recettori ormonali che per HER2, ma con presenza di marcatori di cellule staminali, bassa espressione di claudine (proteine di giunzione cellulare) e linfociti infiltranti il tumore [9]. Questo nuovo sottotipo è detto “claudin-low” [9]. La classificazione molecolare del carcinoma mammario è schematizzata in figura 1 [47].

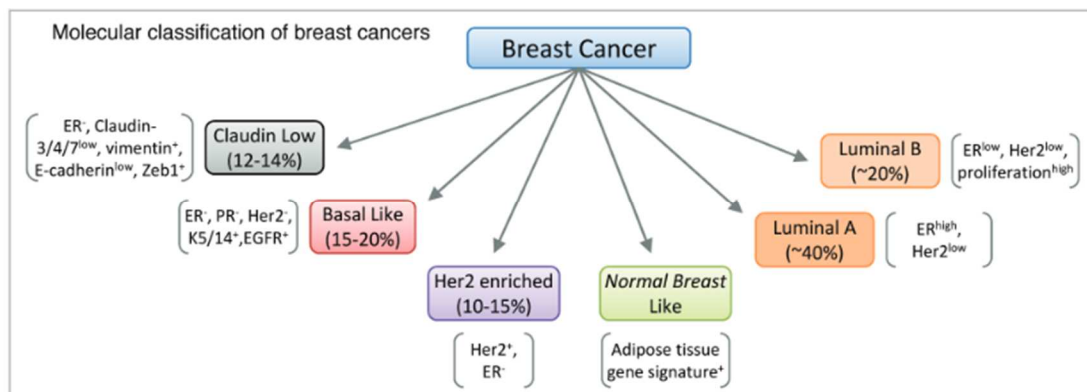


Fig.1 Classificazione molecolare del carcinoma della mammella [47]

I sottotipi molecolari si caratterizzano per differenze significative nella previsione di sopravvivenza globale (overall survival, OS) e sopravvivenza libera dalla patologia (disease free survival, DFS) [47]. Questa classificazione permette di stratificare i tumori mammari in diversi sottotipi sulla base dello stato di espressione in immunistochimica (IHC) di ER, PgR e HER2 [47]. I sottotipi sono stati correlati a differenze nella sopravvivenza dei

pazienti [47]. Il carcinoma mammario triplo negativo (TNBC) è caratterizzato dalla mancanza di espressione di questi recettori [51].

Il recettore estrogenico è un importante fattore diagnostico poiché il 70-75% dei carcinomi invasivi è caratterizzato da una espressione elevata di ER [51]. Il recettore del progesterone è espresso in più del 50% dei tumori ER-positivi mentre è raramente espresso nei tumori ER-negativi [51]. L'espressione di PgR è regolata da ER e sono entrambi marker diagnostici e prognostici del carcinoma mammario [51]. Una espressione elevata di PgR è correlata positivamente alla OS, al tempo libero dalla recidiva (recurrence free survival, RFS), al fallimento o efficacia della terapia, mentre un basso livello di espressione di PgR è solitamente associato ad un peggior decorso clinico [51]. L'HER2 è espresso in circa il 15-25% dei tumori mammari e il suo stato di espressione o amplificazione è importante per la scelta del corretto trattamento [51]. L'over-espressione di questo recettore di membrana è uno dei primi eventi nella storia del tumore e i livelli sierici di HER2 sono considerati un promettente marcatore in tempo reale per la presenza o la recidiva di tumori [51]. La sua espressione aumenta il tasso di rilevamento di tumori mammari metastatici o ricorrenti del 50-80% [51].

Un ulteriore marker IHC è l'indice proliferativo cellulare (Ki-67/MIB-1) [51]. L'attività proliferativa indicata da Ki-67/MIB-1 fornisce informazioni sull'aggressività del tumore, indirizza nella scelta della terapia e potrebbe anche essere un possibile fattore prognostico dato che una sua espressione elevata riflette tassi di sopravvivenza minori [51].

Nei carcinomi duttali *in situ* l'uso di marker molecolari è ancora oggetto di dibattito. Al contrario, nei carcinomi invasivi l'utilità della determinazione del livello di espressione di HER2, PgR ed ER è ben consolidato e determina la scelta del trattamento [47]. Le caratteristiche principali dei sottotipi molecolari di carcinoma mammario sono riassunte nella tabella 8 [51].

	Luminal A	Luminal B	HER2	TNBC
Frequency (%)	50	15	20	15
ER	Yes	Yes	Some cases	No
PR	Yes	Some cases	Some cases	No
HER	No	No	Yes	No
miRNAs	<i>Let-7f, Let-7c, miR-10, miR-29a, miR-181a, miR-223 and miR-652</i>	<i>miR155, miR-93, miR-18a, miR-135b, miR-718, miR-4516, miR-210, and miR-125b-5p</i>	<i>miR-150 and miR-142-3p</i>	<i>miR-153, miR-10b, miR-26a, and miR146a</i>
Ki67	Some cases	Some cases	High	High
Mutations	No	BRCA2	p53	p53 and BRCA1
Prognosis	Good	Middle	Middle/Bad	Bad
Therapy	Hormonal	Hormonal/ Chemo	Hormonal/Chemo/ Herceptin	Chemo/ Experimental

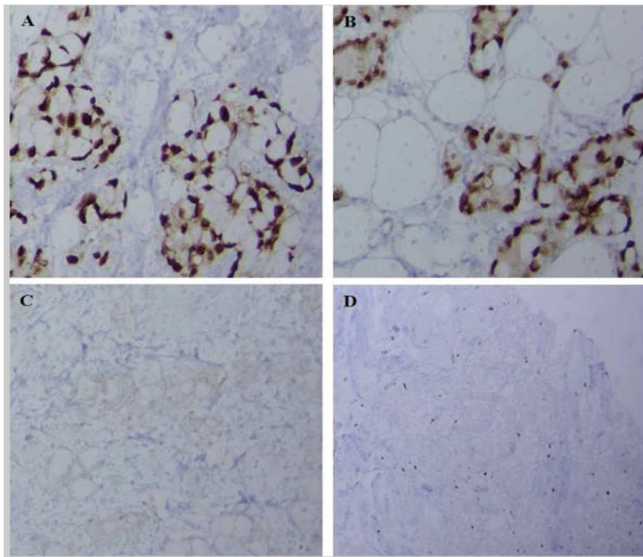
Tab.8 Caratteristiche gruppi molecolari carcinoma mammario [51]

I carcinomi mammari luminali sono ER-positivi e comprendono quasi il 70% di tutti i casi di carcinomi mammari nelle popolazioni occidentali [5]. Più comunemente tra i tumori luminali-simili rientrano i carcinomi mammari invasivi NST, ma il sottotipo luminale può raramente corrispondere anche a carcinomi invasivi lobulari, tubulari, cribriformi, mucinosi e micropapillari invasivi [5].

### 1.5.2.1 Luminali A

I tumori mammari appartenenti al sottotipo “luminale A” rappresentano il 50% dei carcinomi della mammella e circa l’80% di tutti i tumori luminali [51]. Si caratterizzano per la presenza di ER e/o PgR e l’assenza di HER2 [51]. In questo sottotipo i fattori di trascrizione ER attivano geni, la cui espressione è caratteristica per l’epitelio luminale che riveste i dotti mammari [5]. Presentano, inoltre, anche una bassa espressione dei geni legati alla proliferazione e dunque un indice proliferativo con Ki-67/MIB-1 <20% (Fig. 2) [51]. Da un punto di vista clinico sono di basso grado e progrediscono lentamente [5]. Si caratterizzano per la miglior prognosi, ridotto tasso di recidiva e sopravvivenza più elevata [5,51]. Hanno una buona responsività alla terapia ormonale e un beneficio più limitato alla chemioterapia [51]. Appartengono alla categoria dei luminali A alcuni istotipi particolari come il carcinoma tubulare e il carcinoma lobulare classico [9]. Inoltre per alcuni tumori mammari ER-positivi, secondo le linee guida dell’European Society for

Medical Oncology (ESMO), è raccomandato l'uso di piattaforme genetiche per stabilire quali pazienti potrebbero avere un beneficio dalla chemioterapia adiuvante tenendo in considerazione l'analisi di diversi geni e lo stadio di malattia [51].



*Fig.2 LUMINALI A [51]:*

*A. ER+*

*B. PgR+*

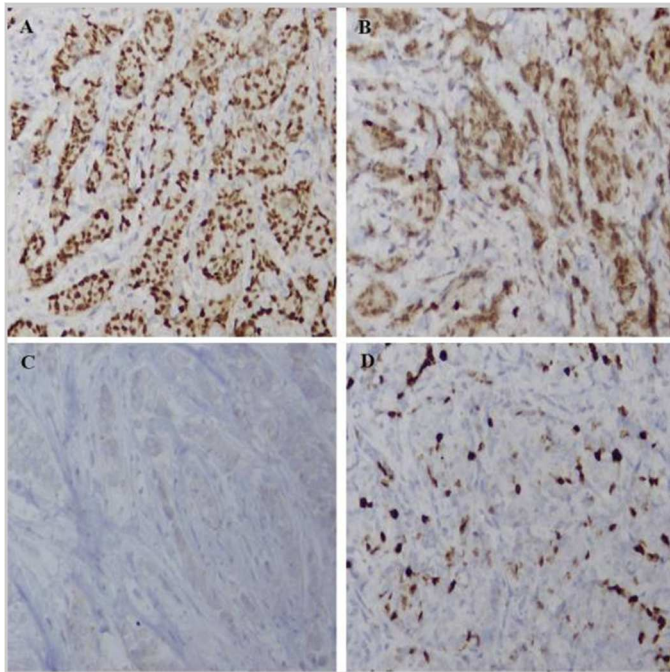
*C. HER2-*

*D. Ki-67/MIB-1 3%*

### 1.5.2.2 Luminali B

I tumori appartenenti al sottotipo “luminale B” rappresentano il 15% di tutti i carcinomi mammari e il 10-15% dei carcinomi mammari luminali [51]. Sono di grado istologico intermedio/alto e presentano una prognosi peggiore rispetto ai luminali A [5,51]. Sono ER-positivi e PgR-positivi o negativi e presentano espressione variabile di HER2 [5,51]. Solitamente si caratterizzano per un indice proliferativo elevato (>20%) [5,51] (Fig. 3) [51]. Il Ki-67/MIB-1 elevato permette che la loro crescita sia più rapida rispetto ai luminali A. Beneficiano della terapia ormonale e sono più ricettivi alla chemioterapia rispetto ai luminali A [51]. Presentano un tasso di sopravvivenza alla recidiva inferiore e frequente recidiva ossea, ma il tasso di recidiva viscerale è più elevato e la sopravvivenza, alla diagnosi di una recidiva, è inferiore [51]. I luminali B possono essere ulteriormente suddivisi in base allo status di HER2 (positivo o negativo) [9]. I luminali B HER2-negativi, oltre alla positività dei recettori ormonali, devono presentare un livello di Ki-67/MIB-1 superiore al 20%, mentre i luminali B HER2-positivi rientrano nella categoria a prescindere dal livello dell'indice proliferativo e positività per ER e/o PgR [9].





*Fig.3 LUMINALI B [51]:*

*A. ER+*

*B. PgR+*

*C. HER2-negativo (1+)*

*D. Ki-67/MIB-1 30%*

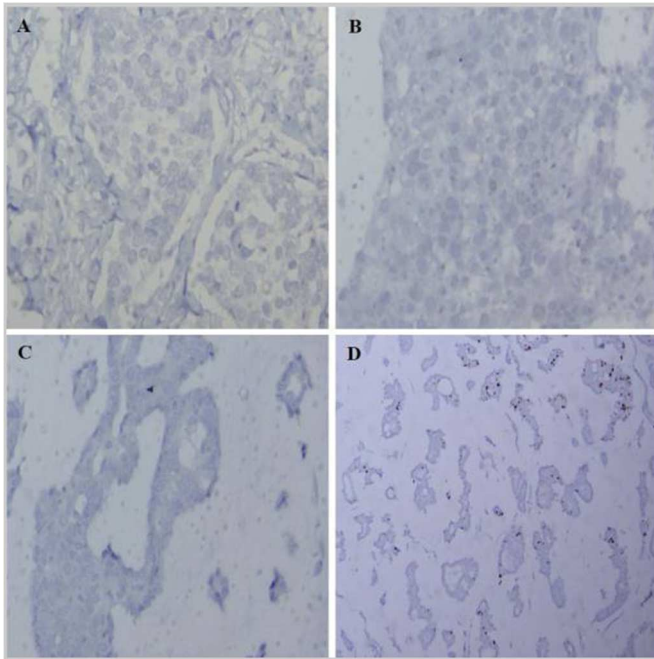
### 1.5.2.3 HER2 Positivi

Il sottogruppo HER2-positivo costituisce circa il 10-15% dei tumori della mammella [5,51]. Si caratterizza per elevata espressione di HER2 con valori di ER e PgR variabili [51]. I tumori HER2-positivi si caratterizzano per una crescita più rapida rispetto ai luminali e prognosi peggiore che, però, è migliorata dopo l'introduzione di innovative terapie mirate per HER2 [5,51]. La categoria dei tumori HER2-positivi viene ulteriormente suddivisa in luminali HER2 (ER+, PgR+, HER2+ e Ki-67/MIB-1 dal 15 al 30%) e HER2-positivi non luminali (HER2+, ER-, PgR-, Ki-67/MIB-1 superiore al 30%) [51]. I pazienti con tumore mammario HER2-positivo possono essere candidati a trattamenti con specifici farmaci diretti contro il recettore HER2 come Trastuzumab, Pertuzumab e gli inibitori tirosin chinasi (TKI) come il lapatinib associati a chemioterapia [51]. È importante sottolineare che il sottotipo HER2-positivo non luminale non è sinonimo di carcinoma mammario clinicamente HER2-positivo perché molti tumori ER-positivi/HER2-positivi si qualificano come luminali B [5].

#### 1.5.2.4 Triplo Negativi

I carcinomi triplo negativi (TNBC) rappresentano circa il 20% di tutti i tumori della mammella e comprendono un gruppo eterogeneo di tumori negativi per ER, PgR e HER2 [5,51] (Fig.4) [51]. Sono più comunemente diagnosticati tra le donne sotto i 40 anni e tra le donne di etnia afroamericana [5]. Il rischio di sviluppare un carcinoma mammario TNBC dipende dalla genetica, dall'etnia, dall'età, dall'obesità ed altri fattori di rischio [51]. Circa l'80% dei carcinomi mammari con mutazione germinale BRCA1 sono TNBC, mentre l'11-16% di tutti i TNBC si caratterizza per mutazioni germinali BRCA [5]. Sul profilo di espressione genica, i carcinomi triplo-negativi possono essere ulteriormente classificati in diversi sottogruppi, fra cui i basal-like (BL-1 e BL-2), claudin-low, mesenchimali, mesenchimali stem-like, luminali con recettore androgenico, immunomodulatori e un gruppo non ancora specificato [5,51]. I basal-like sono i TNBC più comuni e rappresentano circa il 50-70% di questo gruppo molecolare mentre i claudin-low (CL) corrispondono al 20-30% dei TNBC e il 7-14% di tutti i tumori mammari invasivi [51]. I carcinomi mammari CL sono tumori a prognosi infausta essendo per lo più ER-negativi, PgR-negativi e HER2-negativi [51]. Non sono state riscontrate differenze nei tassi di sopravvivenza tra i tumori CL e altri sottotipi di prognosi sfavorevole (luminale B, HER2-positivo non luminale e basal-like) [51]. Questo sottotipo è caratterizzato dalla bassa espressione di geni coinvolti nell'adesione cellula-cellula, tra cui claudine, occludine, ed E-caderina [51]. Inoltre, questi tumori mostrano una elevata espressione dei geni di transizione epiteliale-mesenchimale (EMT) e modelli di espressione genica simili alle cellule staminali [5,52]. La corrispondenza tra il fenotipo "triplo negativo" individuato su base immunoistochimica e il sottogruppo "basal-like" individuato geneticamente è presente solo nell'80% dei casi [9]. Questo sottolinea l'eterogeneità di tali sottocategorie [9]. I TNBC si caratterizzano per un comportamento aggressivo, recidiva precoce, maggiore tendenza a presentarsi in uno stadio già avanzato e per essere spesso associati ad una prognosi peggiore [5,51]. Presentano un alto tasso proliferativo, alterazione nei geni di riparo del DNA e instabilità genomica [51]. Dal punto di vista istologico, si tratta di carcinomi di alto grado [5]. Tra i TNBC rientrano il

carcinoma NST (tra cui il carcinoma con pattern midollare e un infiltrato linfocitario prominente), tumori metaplastici che possono mostrare differenziazione delle cellule squamose e rari tumori di tipo speciale come il carcinoma mammario adenoideo cistico [5].



*Fig.4 TRIPLO NEGATIVI [51]:*

*A. ER-*

*B. PgR-*

*C. HER2-negativo (0)*

*D. Ki-67/MIB-1 10%*

### 1.5.3 Classificatori prognostici genomici

Per definire con precisione la prognosi e scegliere il miglior trattamento per ciascun paziente, sono stati studiati i profili genici dei tumori mammari con un numero limitato di geni [9].

I test di analisi genica del carcinoma della mammella oggi in commercio sono il PAM50 di Prosigma, il Mammaprint (originariamente sviluppato su RNA estratto da tessuto fresco congelato), l'Oncotype DX, il Breast Cancer Index e l'Endopredict, tutti eseguiti a partire da tessuto paraffinato [9]. I test genici vengono usati nella pratica clinica per assistere con la prognosi e aiutare il processo decisionale in merito alla chemioterapia adiuvante [9]. Alcuni di questi test sono già stati valutati in studi retrospettivi [9]. Solamente per Mammaprint ed Oncotype DX sono attualmente disponibili trials clinici randomizzati [9].

Il test genico Mammaprint è stato il primo test di espressione genica di carcinoma mammario approvato dalla Food and Drug Administration nel febbraio 2007 [53]. È composto da un microarray di 70 geni classificatori che mostrano una differenza nei modelli di espressione tra i gruppi tumorali con una prognosi favorevole e quelli con una prognosi sfavorevole [53]. I gruppi sono stati selezionati in base all'esito clinico, quello con cattiva prognosi era costituito da pazienti con metastasi dopo 5 anni mentre il gruppo con buona prognosi era libero dalla patologia dopo lo stesso periodo [53]. In uno studio di validazione del test sono stati studiati 295 pazienti con tumori pT1 o pT2, con pN0 o pN+ e follow-up medio di 7,8 anni [53]. L'analisi ha mostrato una differenza significativa di sopravvivenza globale e sopravvivenza libera da metastasi tra i gruppi con prognosi favorevole e sfavorevole [53]. La sopravvivenza totale e libera da metastasi era del 94% nel gruppo con prognosi positiva mentre era del 54% in quello con prognosi peggiore [53]. In precedenza, questo test aveva una limitazione nell'ottenimento di tessuto fresco congelato e di cDNA di alta qualità. Tuttavia, dal 2012, il test è diventato disponibile anche per i tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina [53].

Il test di analisi genomica Oncotype DX è basato su 21 geni ed è il più frequentemente adoperato nella pratica clinica negli Stati Uniti [53]. Permette di valutare il livello di espressione di 5 geni di riferimento e 16 geni selezionati sulla base dei livelli di espressione quantitativa della reazione a catena polimerasica inversa [53]. Si tratta di geni correlati al recettore dell'estrogeno, HER2, proliferazione ed invasione. Il test genico Oncotype DX determina uno score di ricorrenza (Recurrence Score, RS) che assegna ai pazienti categorie di rischio diverse (basso, intermedio ed elevato) [9,53]. Il test è stato validato grazie ad uno studio pubblicato nel 2004 che includeva 668 pazienti con tumori ER-positivi trattati con tamoxifene e senza coinvolgimento dei linfonodi [53,54]. I risultati hanno mostrato una significativa differenza nelle recidive a distanza di 10 anni tra i tre gruppi caratterizzati da un RS diverso in base ai risultati forniti dall'Oncotype DX [53]. Lo score RS ha rappresentato un fattore predittivo indipendentemente dall'età della paziente o dalla dimensione del tumore. Il tasso di recidiva della patologia a distanza di 10 anni era del 6,8% nel gruppo a basso rischio, del 14,3% in quello a rischio intermedio e del 30,5%

nel gruppo a rischio più elevato [53]. Il Recurrence Score ha mostrato una correlazione indipendente con la sopravvivenza totale [53].

Il test di espressione genica della Prosigna detto PAM50 è stato approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) nel 2013 [53]. L'espressione genica è valutata sull'RNA estratto da tessuto fissato in formalina e poi incluso in paraffina [53]. Viene usata una tecnologia basata su un codice a barre codificato a colori che consente la misurazione di più trascritti con elevata sensibilità [53]. È possibile rilevare meno di una copia di trascritto per cellula [53]. Questo test sfrutta un pannello di 50 geni classificatori e 5 geni standard per suddividere il carcinoma mammario in una delle varie categorie molecolari [53]. Usando il sottotipo intrinseco definito dalla firma di 50 geni, insieme a parametri prognostici standard, il PAM50 ha permesso di migliorare la valutazione del rischio di recidiva della patologia [53]. La previsione del rischio di recidiva è stata significativamente migliorata nei casi in cui la classificazione del sottotipo era stata aggiunta ai fattori clinici influenzanti la prognosi [53]. L'unione di questi aspetti è stata definita dalla sigla "ROR-C" che significa rischio di recidiva e variabili cliniche [53]. Nei pazienti che hanno ricevuto terapia neoadiuvante, il rischio di recidiva tumorale basato sui sottotipi intrinseci ha permesso di predire la risposta della patologia al trattamento chemioterapico con una sensibilità del 94% e un valore predittivo negativo nel 97% dei casi [53]. Il test PAM 50 è stato consolidato anche in base ad uno studio pubblicato nel 2014 nel quale è stata analizzata una coorte di circa 1478 pazienti post-menopausa affette da un tumore mammario ER-positivo in stadio iniziale [53]. Questi pazienti erano stati trattati con terapia ormonale (tamoxifene da solo oppure combinato ad un inibitore dell'aromatasi) [53]. Il test PAM50 ha predetto la sopravvivenza libera dalla recidiva della patologia [53]. In tutti i sottogruppi, ad eccezione dei tumori HER2 positivi, lo score per il rischio di ricorrenza ha fornito importanti informazioni prognostiche ai parametri clinico-patologici utilizzati di routine [53]. Attualmente, PAM50 è approvato per le pazienti post-menopausa con tumore ormono-positivo con o senza il coinvolgimento dei linfonodi [53]. Il Breast Cancer Index (BCI) incorpora l'unione di due test genici. Basato su una reazione polimerasica a catena unita al Molecular Grade Index, permette di valutare il rapporto di

espressione di due geni: HOXB13 e IL17BR. Il Molecular Grade Index è un test di espressione basato su 5 geni correlati al grado istologico e alla progressione tumorale [53]. In uno studio pubblicato nel 2008, condotto su 60 pazienti ER+ trattate con tamoxifene, Ma *et al.* hanno mostrato che il livello di espressione di HOXB13 e IL17BR era un fattore prognostico indipendente [55]. Un elevato indice di grado molecolare è stato associato ad una peggiore prognosi solo se rilevato in concomitanza ad elevati livelli di IL17BR [55]. L'analisi dell'indice di grado molecolare unito allo studio del rapporto HOXB13/IL17BR ha permesso di identificare un piccolo sottogruppo di tumori ormono-positivi in stadio iniziale nei quali la prognosi non era buona nonostante la terapia endocrina [53]. Nel 2011 Jerevall *et al.*, hanno dimostrato che la combinazione del rapporto HOXB13/IL17BR e dell'indice di grado molecolare fornisce un valore predittivo migliore rispetto a uno dei due elementi da solo [53]. Lo studio è stato condotto su circa 588 pazienti post-menopausali ed ER-positivi divisi in due gruppi: uno trattato con tamoxifene e l'altro placebo [53,56]. Questo studio è stato usato per sviluppare un fattore di predizione del rischio continuo: il BCI o indice di cancro mammario [53,56]. Tale indice, sfruttando una scala da 0 a 10, ha mostrato un valore prognostico in una popolazione di pazienti senza il coinvolgimento dei linfonodi che non ha ricevuto terapia adiuvante [53]. Lo scopo era di fornire una stratificazione di queste pazienti in base al rischio di morte da tumore mammario [53]. Il test BCI può essere preso in considerazione per valutare la probabilità di recidiva a distanza in pazienti con diagnosi di carcinoma mammario ER-positivo senza il coinvolgimento dei linfonodi e per predire la probabilità di beneficio di una terapia endocrina estesa (mantenuta per più di 5 anni) in pazienti liberi da recidiva dopo 5 anni di terapia adiuvante endocrina [53]. Le caratteristiche dei 4 principali test genomici sono riassunte nella tabella 9 [53].

Test	Company	Number of genes	Tissue	Technology	Measure	FDA-cleared
Prosigna	Nanostring	50 + 22 ctl <sup>a</sup>	FFPE	Digital bar-coded mRNA analysis	ROR: Low (<10), intermediate (10–20), high (>20%) risk	Yes
Oncotype DX	Genomic Health	16 + 5 ctl	FFPE	qRT-PCR	RS: low (<18), intermediate (18-31), high (>31) risk	No
MammaPrint	Agendia	70	Fresh frozen, FFPE	Microarray	Good risk and poor risk	Yes
Breast Cancer Index	bioTheragnostics	5 + 2 gene ratio	FFPE	qRT-PCR	Low, intermediate, and high risk	No

Tab.9 Test genomici del carcinoma mammario usati negli Stati Uniti [53]

Nel 2016 l'American Society of Clinical Oncology (ASCO)/College of American Pathologists (CAP) ha redatto delle raccomandazioni per l'impiego dei test molecolari di espressione genica per definire un'eventuale aggiunta della chemioterapia adiuvante alla terapia endocrina in pazienti con carcinoma mammario HR-positivo e HER2-negativo considerando anche lo stato dei linfonodi. In tal senso, i test genici raccomandabili sono l'Oncotype DX e il PAM50, mentre un loro utilizzo non è raccomandato per i tumori HER2-positivo e i tripli negativi [9].

Nella conferenza di S.Gallen del 2021, è stato supportato il valore dei test genici come strumenti utili a decidere se utilizzare la chemioterapia per i tumori HR-positivo e HER2-negativo indipendentemente dall'età della paziente o dal grado istologico [9]. L'impiego di questi test non è invece raccomandato per decidere riguardo l'uso della terapia endocrina adiuvante [9]. Dal momento che lo scopo principale di questi saggi genici è di indicare allo specialista se procedere o meno con la chemioterapia adiuvante, non è necessario l'uso in routine dei test genomici in pazienti che necessitano di default di tale terapia (come pazienti affetti da carcinoma al terzo stadio) [9]. Lo scopo di questi test diventa quindi evidente nei casi "borderline" ovvero in tumori tra 1 e 3 cm di dimensione, con indice di proliferazione intermedio e da 0 fino a 2-3 linfonodi coinvolti [9]. I test genici sono indicati nei casi incerti quando serve un ulteriore elemento che supporti l'utilità della chemioterapia adiuvante post-operatoria in aggiunta alla terapia ormonale per le pazienti con carcinoma mammario dallo stadio 1 allo stadio 3A (fasi iniziali) ER-positivo/HER2-negativo [9].

I test genomici non sono invece indicati nel caso in cui il paziente non acconsenta alla chemioterapia e/o nei casi in cui l'oncologo neghi la possibilità del trattamento chemioterapico in base alle caratteristiche del tumore ed alle condizioni del paziente [9]. I test non sono indicati quando la paziente con tumore HER2-negativo/ER-positivo è stata classificata come a basso rischio di ricorrenza e candidata alla sola terapia ormonale o quando la paziente è stata classificata come ad alto rischio di ricorrenza [9]. Pazienti di

questo tipo sono candidate alla combinazione di terapia ormonale e chemioterapia post-operatoria [9].

I fattori che permettono di stratificare i pazienti in base al rischio di ricorrenza della patologia sono riassunti nella tabella 10 [9].

BASSO RISCHIO	ALTO RISCHIO
G1	G3
T1 (a-b)	T3-T4
Ki-67/MIB-1<20%	ER<30%
N0	Ki-67/MIB-1>30%

*Tab.10 Parametri rischio di ricorrenza [9]*

A partire dal 2021 sono stati stanziati 20 milioni di euro annui per garantire alle donne con tumore mammario ormono-responsivo in stadio precoce un trattamento personalizzato in base alle informazioni fornite dai test di espressione genica. L'obiettivo è evitare il ricorso ingiustificato a chemioterapia con il conseguente aggravarsi del rischio di contagio da COVID19 da depressione immunitaria [9].

#### **1.5.4 Classificazione TMN e stadiazione**

L'estensione della malattia viene descritta con il sistema Tumour, Node e Metastasis (TMN) [9,57]. Dal 2017 è in uso il sistema TMN rivisto dall'American Joint Committee on Cancer (AJCC-8<sup>a</sup>ed.) (Tab.11) [9]. L'ottava edizione AJCC, da un lato, considera l'estensione anatomica del carcinoma mammario, dall'altro lato, viene considerata anche una classificazione prognostica che comprende anche il grado tumorale, lo status dei recettori ormonali e di HER2 [9].

La classificazione clinico-patologica del tumore mammario è mostrata nella tabella 11 [9].



Classificazione clinica
<p><b>Tumore primitivo (T):</b>  <b>Tx:</b> tumore primitivo non definibile  <b>T0:</b> non evidenza del tumore primitivo  <b>Tis:</b> carcinoma <i>in situ</i>:  Tis (DCIS) carcinoma duttale <i>in situ</i>  Tis (Paget) Malattia di Paget del capezzolo non associata con carcinoma invasivo e/o <i>in situ</i> nel parenchima <sup>(1)</sup>  <b>T1:</b> tumore della dimensione massima fino a 20 mm  T1a: tumore della dimensione compresa tra 1 mm e 5 mm (arrotondare misurazioni comprese tra 1.0-1.9 mm a 2 mm)  T1b: tumore della dimensione &gt;5 mm e ≤10 mm  T1c: tumore della dimensione &gt;10 mm e ≤20 mm  <b>T2:</b> tumore superiore a 20 mm ma non superiore a 50 mm nella dimensione massima  <b>T3:</b> tumore superiore a 50 mm nella dimensione massima  <b>T4:</b> tumore di qualsiasi dimensione con estensione diretta alla parete toracica e/o alla cute (ulcerazioni o noduli cutanei)<sup>(2)</sup>  T4a: estensione alla parete toracica (esclusa la sola aderenza/invasione del muscolo pettorale)  T4b: ulcerazione della cute e/o noduli cutanei satelliti ipsilaterali e/o edema della cute (inclusa cute a buccia d'arancia) che non presenta i criteri per definire il carcinoma infiammatorio  T4c: presenza contemporanea delle caratteristiche di T4a e T4b  T4d: carcinoma infiammatorio <sup>(3)</sup></p> <p><b>Linfonodi regionali (N):</b>  <b>Nx:</b> linfonodi regionali non valutabili (ad esempio, se precedentemente asportati)  <b>N0:</b> linfonodi regionali liberi da metastasi (agli esami strumentali e all'esame clinico)  <b>N1:</b> metastasi nei linfonodi ascellari omolaterali mobili (livello I-II)  cN1mi: micrometastasi (approssimativamente 200 cellule, deposito maggiore di 0.2 mm, ma nessuno maggiore di 2.0 mm) <sup>(4)</sup>  <b>N2:</b> metastasi nei linfonodi ascellari omolaterali (livello I-II) che sono clinicamente fissi o fissi tra di loro; o in linfonodi mammari interni omolaterali clinicamente rilevabili in assenza di metastasi clinicamente evidenti nei linfonodi ascellari  N2a: metastasi nei linfonodi ascellari omolaterali (livello I-II) fissi tra di loro o ad altre strutture  N2b: metastasi solamente nei linfonodi mammari interni omolaterali e in assenza di metastasi nei linfonodi ascellari (livello I-II)  <b>N3:</b> metastasi in uno o più linfonodi sottoclaveari omolaterali (livello III ascellare) con o senza il coinvolgimento di linfonodi ascellari del livello I, II; o nei linfonodi mammari interni omolaterali in presenza di metastasi nei linfonodi ascellari di livello I-II; o metastasi in uno o più linfonodi sovraclaveari omolaterali con o senza il coinvolgimento dei linfonodi ascellari o mammari interni  N3a: metastasi nei linfonodi sottoclaveari omolaterali  N3b: metastasi nei linfonodi mammari interni e ascellari  N3c: metastasi nei linfonodi sovraclaveari</p> <p><b>Metastasi a distanza (M):</b>  <b>Mx:</b> metastasi a distanza non accertabili (ma la diagnostica per immagini non è richiesta per assegnare la categoria M0)  <b>M0:</b> non evidenza clinica o radiologica di metastasi a distanza  cM0(i+): non evidenza clinica o radiologica di metastasi a distanza, ma depositi di cellule tumorali evidenziate mediante biologia molecolare o microscopicamente nel sangue, midollo osseo o in altri tessuti diversi dai linfonodi regionali, di dimensioni superiori a 0.2 mm in una paziente senza segni o sintomi di metastasi  <b>M1:</b> metastasi a distanza evidenziate mediante classici esami clinico e radiologico e/o istologicamente dimostrate di dimensioni superiori a 0.2 mm (pM).</p>
Classificazione patologica
<b>pT: Tumore primitivo</b>

la classificazione patologica del tumore corrisponde a quella clinica

**pN: Linfonodi regionali** <sup>(5)</sup>

**pNx:** i linfonodi regionali non possono essere definiti (ad esempio non sono stati prelevati o sono stati rimossi in precedenza)

**pN0:** non metastasi nei linfonodi regionali identificate istologicamente o presenza di sole cellule tumorali (ITC)

**Nota:** si definiscono cellule tumorali isolate (isolated tumour cell=ITC) piccoli aggregati di cellule non più grandi di 0,2 mm o singole cellule tumorali o un piccolo raggruppamento di cellule con meno di 200 cellule in una singola sezione istologica. Le cellule tumorali isolate possono essere evidenziate con i metodi istologici tradizionali o con i metodi immunoistochimici. I linfonodi contenenti solo cellule tumorali isolate sono esclusi dalla conta totale dei linfonodi positivi ai fini della classificazione N, ma dovrebbero essere inclusi nel numero totale dei linfonodi esaminati.

**pN0(i-):** non metastasi nei linfonodi regionali all'istologia (con colorazione standard ematossilina eosina), negativo per il metodo immunoistochimico

**pN0(i+):** presenza di cellule maligne (ITC) nei linfonodi regionali non superiori a 0.2 mm (evidenziate con ematossilina eosina o con l'immunoistochimica)

**pN0(mol-):** non metastasi nei linfonodi regionali istologicamente accertate, RT-PCR (real time-polymerase chain reaction) negativa

**pN0(mol+):** RT-PCR positiva ma non metastasi nei linfonodi regionali all'istologia o all'immunoistochimica; non identificate ITC

**pN1:** micrometastasi; o metastasi in 1-3 linfonodi ascellari omolaterali; e/o metastasi (micro- o macro-) nei linfonodi mammari interni omolaterali rilevate con biopsia del linfonodo sentinella ma non clinicamente rilevabili <sup>(5)</sup>

**pN1mi:** micrometastasi (aggregato di cellule tumorali contigue di dimensioni superiori a 0.2 mm e/o più di 200 cellule, ma non più grandi di 2 mm)

**pN1a:** metastasi in 1-3 linfonodi ascellari, includendo almeno una metastasi delle dimensioni massime superiori a 2 mm

**pN1b:** metastasi nei linfonodi mammari interni, ITC escluse

**pN1c:** combinazione di pN1a e pN1b

**pN2:** metastasi in 4-9 linfonodi ascellari o omolaterali; o in linfonodi mammari interni omolaterali agli esami strumentali in assenza di metastasi nei linfonodi ascellari

**pN2a:** metastasi in 4-9 linfonodi ascellari, includendo almeno una localizzazione tumorale delle dimensioni massime superiori a 2 mm

**pN2b:** metastasi clinicamente rilevabili <sup>(6)</sup> nei linfonodi mammari interni, con o senza conferma istologica, in assenza di metastasi nei linfonodi ascellari

**pN3:** metastasi in 10 o più linfonodi ascellari omolaterali; o in linfonodi sottoclavicolari (livello III ascellare) omolaterali; o metastasi nei linfonodi mammari interni omolaterali evidenti all'indagine strumentale in presenza di metastasi in uno o più linfonodi ascellari positivi livello I-II; o metastasi in più di 3 linfonodi ascellari e nei linfonodi mammari interni con metastasi microscopiche o macroscopiche evidenziate con biopsia del linfonodo sentinella ma non clinicamente rilevabili<sup>(6)</sup>; o metastasi nei linfonodi sovraclaveari omolaterali

**pN3a:** metastasi in 10 o più linfonodi ascellari omolaterali (almeno uno delle dimensioni massime superiori a 2 mm); o metastasi nei linfonodi sottoclavicolari (linfonodi ascellari III livello)

**pN3b:** pN1a o pN2a in presenza di cN2b (linfonodi mammari interni omolaterali positivi all'analisi strumentale), o pN2a in presenza di pN1b

**pN3c:** metastasi nei linfonodi sovraclaveari omolaterali

*Tab.11 Classificazione clinico-patologica tumore mammario AJCC 2017, 8<sup>a</sup> ed. [9]*

<sup>(1)</sup> I carcinomi nel parenchima mammario associati con la malattia di Paget sono classificati in base al diametro e alle caratteristiche della malattia parenchimale, sebbene debba essere annotata la malattia di Paget.

<sup>(2)</sup> La sola invasione del derma non permette la classificazione del tumore come pT4.

<sup>(3)</sup> Il carcinoma infiammatorio è caratterizzato da alterazioni cutanee tipiche che coinvolgono un terzo o più della cute mammaria. È importante sottolineare che la diagnosi di carcinoma infiammatorio è fondamentale clinicamente. Le alterazioni della cute possono essere dovute al linfedema causato dagli emboli tumorali nei vasi linfatici, ma il riscontro istologico di tali emboli non è necessario per la diagnosi di carcinoma

*infiammatorio. Emboli tumorali nei linfatici non associati alle alterazioni cutanee dovrebbero essere categorizzati secondo il diametro tumorale*

*<sup>(4)</sup> cN1mi è raramente utilizzato ma può essere appropriato in rari casi dove il linfonodo sentinella sia stato effettuato prima dell'intervento chirurgico, molto verosimilmente questo si può verificare nei casi trattati con terapia neoadiuvante.*

*<sup>(5)</sup> I suffissi (sn) e (fn) dovrebbero essere aggiunti alla categoria N per denotare la conferma di metastasi basata sul linfonodo sentinella o su FNA/core biopsy, rispettivamente*

*<sup>(6)</sup> Clinicamente rilevabili= rilevati mediante studi di diagnostica per immagini (esclusa la linfoscintigrafia) o mediante esame clinico e con caratteristiche almeno sospette per malignità o presunta macrometastasi patologica in base ad agoaspirato con ago sottile ed esame citologico.*

La sigla “pT” significa valutazione patologica del tumore primitivo [9,58].

La sigla “pN” indica la valutazione patologica dei linfonodi regionali. La sigla “pM” indica invece metastasi a distanza [9,58].

L'ottava edizione AJCC fornisce indicazioni molto specifiche per la misurazione patologica della neoplasia e delle metastasi linfonodali. In particolare, nella valutazione dei linfonodi la presenza di cellule tumorali isolate (ITC), ovvero un gruppo di cellule di diametro uguale o inferiore a 200 micron o comprendente un numero di cellule uguale o inferiore a 200 cellule, non comporta un passaggio a pN1 bensì lo stadio pN resta pN0 (i+) [9]. Lo stadio pN1 indica la presenza di metastasi in 1-3 linfonodi ascellari omolaterali [9]. Nei casi in cui sono presenti delle micrometastasi ovvero degli aggregati di cellule tumorali contigue di dimensioni superiori a 0,2 mm e/o più di 200 cellule, ma non più grandi di 2 mm<sup>2</sup>, si utilizza la sigla pN1 (mi) [9]. Invece la dicitura pN2 viene adoperata in presenza di metastasi in 4-9 linfonodi ascellari omolaterali o in linfonodi mammari interni omolaterali agli esami strumentali in assenza di metastasi a livello ascellare. Infine, viene utilizzato pN3 in caso di metastasi in 10 o più linfonodi ascellari omolaterali (almeno uno delle dimensioni massime superiori a 2 mm) o metastasi nei linfonodi sotto-clavicolari [51] (Tab.11) [9].

### 1.5.5 Fattori prognostici e predittivi

I fattori predittivi forniscono informazioni riguardo alla possibile efficacia di una terapia antitumorale mentre i fattori prognostici correlano con la sopravvivenza della paziente [9]. Uno dei principali fattori prognostici è l'età della paziente; infatti, se la patologia viene diagnosticata prima dei 35 anni allora la prognosi tenderà ad essere peggiore [9]. Un altro fattore prognostico è la dimensione della massa tumorale sebbene non sia semplice definire un valore soglia al di sopra o al di sotto del quale la prognosi del tumore possa essere definita favorevole o sfavorevole, con l'eccezione delle neoplasie di piccole dimensioni [9]. Anche in caso di basso stadio di malattia (pT1a, pT1b), la valutazione del rischio non può prescindere dal considerare altri fattori come lo stato di HER2, dei linfonodi ascellari, dei recettori ormonali e dell'indice di proliferazione (Ki-67/MIB-1) [9]. È necessario tenere conto anche dello stato dei linfonodi ascellari e dell'età della paziente [9]. La presenza di micrometastasi o di cellule tumorali isolate nel linfonodo sentinella non sembra avere un impatto rilevante sulla prognosi [9].

Per i carcinomi mammari, è ormai imprescindibile valutare i profili di espressione genica e il gruppo molecolare di appartenenza di ciascun tumore (luminale A, luminale B, HER2-positivo non luminale, Basal-like), al fine di delineare il piano terapeutico più opportuno per ciascuna paziente [9].

Anche il grado istologico correla con la prognosi della paziente. Un alto grado istologico è un fattore prognostico sfavorevole [9].

Un altro fattore con valore prognostico è rappresentato dal tipo istologico del tumore [9]. Tuttavia, per il carcinoma lobulare i dati prognostici sono controversi [9]. La modalità di crescita e progressione di questo tumore è insidiosa e comporta spesso una diagnosi tardiva, inoltre questo istotipo è frequentemente multifocale [9]. Esistono molte varianti istologiche del carcinoma lobulare, quella classica si caratterizza per una prognosi più benigna rispetto al carcinoma lobulare solido o pleomorfo [9]. Un altro istotipo di carcinoma mammario che si caratterizza per una prognosi favorevole è il carcinoma tubulare [9].

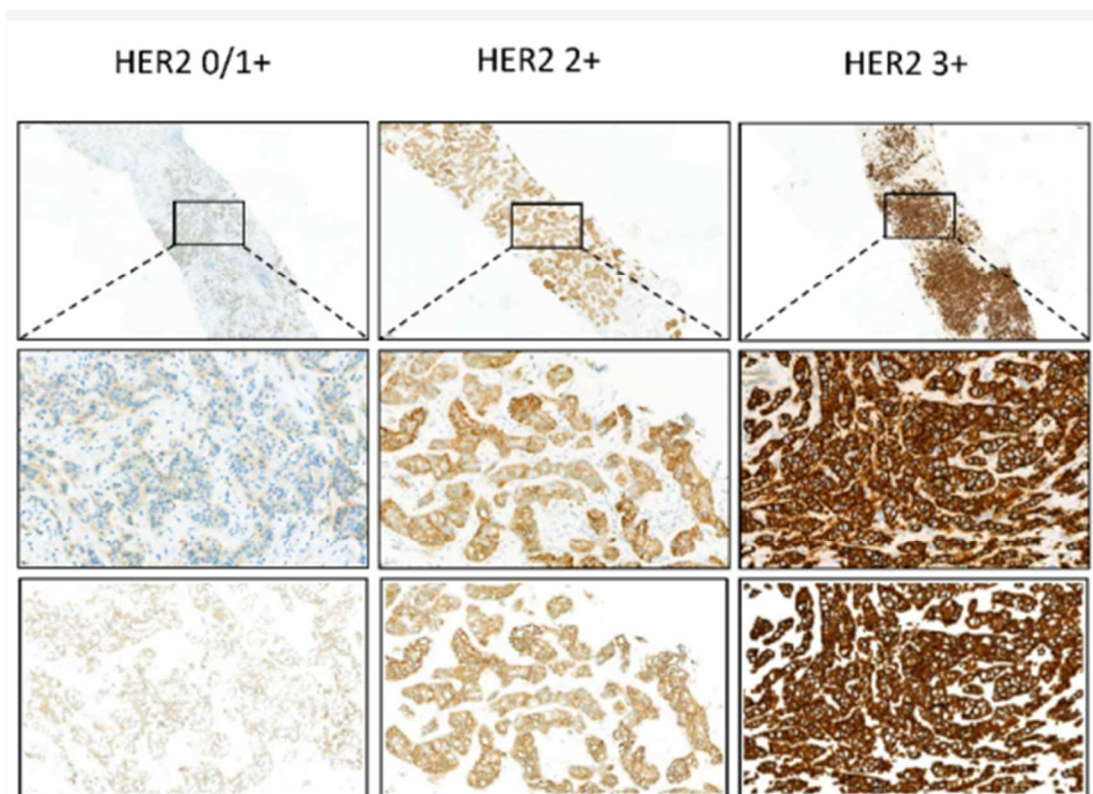
Negli ultimi anni diversi studi hanno dimostrato che anche la componente infiammatoria intratumorale è un fattore prognostico. I carcinomi mammari che presentano elevati livelli di linfociti infiltranti intratumorali (TILs) hanno una prognosi migliore rispetto alle neoplasie mammarie con minori livelli linfocitari intra-tumorali [9]. Nei carcinomi triplo negativi un elevato livello di TILs è associato a una prognosi migliore [59].

I carcinomi mammari HER2 positivi, oltre ai tripli negativi, sono i tumori mammari che mostrano il maggior grado di arricchimento dello stroma da parte dei linfociti. Il ruolo prognostico dei TILs è stato confermato da uno studio condotto su 476 pazienti con carcinoma mammario triplo negativo non trattati con chemioterapia. Nelle donne in cui la malattia era al primo stadio e il valore TILs era maggiore o uguale al 30% il tasso di sopravvivenza libera da recidiva a distanza era del 97%, il tasso di sopravvivenza privo di malattia a 5 anni era del 91% e la sopravvivenza globale era del 98% [9].

L'indice di proliferazione è un altro fattore prognostico. Viene misurato attraverso l'espressione del Ki-67/MIB-1. Indica la percentuale di nuclei di cellule tumorali che vengono colorati con l'anticorpo per la proteina MIB-1 codificata da gene MKI67 [9]. Sebbene il Ki-67/MIB-1 sia attualmente un fattore prognostico riconosciuto, esistono delle limitazioni. Ad oggi non è ancora stata definita una soglia di Ki-67/MIB-1 al di sopra o al di sotto della quale il tumore possa essere definito a bassa o ad elevata attività proliferativa al fine di predire l'efficacia di un trattamento chemioterapico o ormonale. Inoltre, i limiti di questo fattore prognostico riguardano anche la standardizzazione delle procedure di lettura del risultato [9]. È stato dimostrato che la riproducibilità del risultato è buona quando il valore del Ki-67/MIB-1 è <5% e >30%. Il panel di esperti del St. Gallen supporta la raccomandazione secondo cui i tumori con Ki-67/MIB-1 inferiore al 5% non necessitano di chemioterapia, mentre nei tumori in cui questo indice è maggiore del 30% serve chemioterapia o dovrebbe essere presa in considerazione la chemioterapia adiuvante. La maggioranza dei tumori ER-positivi in fase precoce è compresa in questi due estremi [9]. Il panel di esperti non ha potuto scegliere una soglia di Ki-67/MIB-1 tra il 10 e il 25% che possa essere coerente e utile per guidare la scelta dell'oncologo nell'aggiungere la chemioterapia nei carcinomi mammari ER-positivi con linfonodi negativi [9]. Uno studio

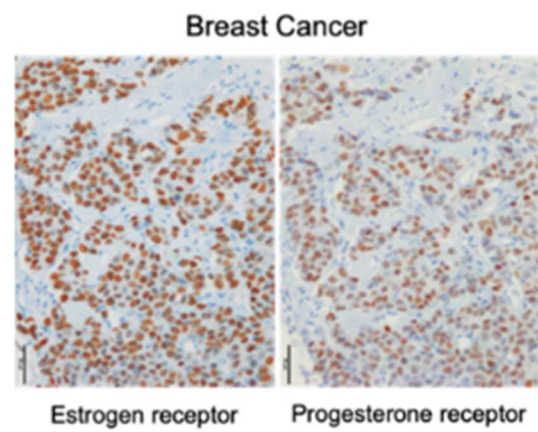
pubblicato nel 2009, condotto su 357 pazienti, ha concluso che il sottotipo luminale A è ER e/o PgR positivo, HER2 negativo e con Ki-67/MIB-1 inferiore a 14% mentre il sottotipo luminale B presenta le stesse caratteristiche, ma con indice proliferativo maggiore del 14% [9,60].

Un altro fattore prognostico riguarda l'espressione immunoistochimica di HER2 (corrispondente all'amplificazione genica di ERBB2), presente nel 13-15% dei carcinomi mammari. Questo elemento non è soltanto prognostico, ma anche predittivo dell'efficacia della terapia anti-HER2 [9]. La determinazione di questo fattore prognostico-predittivo, nella maggior parte dei laboratori vengono effettuate inizialmente con immunoistochimica e, nel caso di risultato equivoco (score 2+), con metodica di ibridazione *in situ* (Fluorescent *In Situ* Hybridization, FISH) per valutare l'amplificazione genica [9]. Lo score di HER2 è valutato in base alla colorazione di membrana. Il tumore è HER2-positivo se lo score in immunoistochimica è 3+ (colorazione intensa e completa di membrana in >10% delle cellule tumorali invasive) oppure 2+ (colorazione completa, ma moderata di membrana in >10% delle cellule tumorali invasive) con amplificazione confermata tramite metodica FISH. In passato se lo score HER2 risultava 2+ non amplificato, 1+ (colorazione debole, incompleta di membrana in >10% delle cellule tumorali) o score 0 (colorazione debole/appena percettibile, incompleta di membrana in ≤10% delle cellule tumorali), il tumore veniva considerato HER2-negativo. Tuttavia, nel 2023 si è svolto un congresso che ha rivoluzionato lo scenario prognostico-terapeutico dei tumori HER2 [61]. Sono state introdotte delle nuove categorie emergenti come HER2-low. Queste modifiche sono state apportate anche grazie ai dati di promettente attività antitumorale di nuove strategie anti-HER2 in pazienti con neoplasia HER2-low [9].



*Fig.5 Score IHC di HER2 in base a colorazione di membrana [62]*

Anche lo stato dei recettori ormonali ER e PgR è un fattore prognostico e predittivo [9]. Un esempio di colorazione immunoistochimica per questi recettori intracellulari è mostrato nella figura 6. Le raccomandazioni ASCO, per la determinazione immunoistochimica di ER e PgR considerano positivi i tumori con almeno l'1% delle cellule tumorali con nuclei positivi. Per l'ER (non PgR), se dall'1% al 10% dei nuclei delle cellule tumorali sono immunoreattivi, il campione deve essere refertato come ER "basso positivo". Tuttavia, ci sono dati limitati circa i benefici della terapia ormonale per tumori mammari con ER compreso tra il 10 e l'1% [63]. Un campione è considerato negativo quando la percentuale di nuclei di cellule tumorali immunoreattivi è inferiore all'1%. La valutazione dell'ER nei carcinomi duttali *in situ* è raccomandata come fattore predittivo per valutare il beneficio di una terapia ormonale mentre il test sul PgR è considerato facoltativo [63].



*Fig.6 Colorazione immunoistochimica ER e PgR [63]*

L'invasione vascolare non è universalmente accettata come fattore prognostico: è un fattore predittivo di peggiore sopravvivenza nelle pazienti con tumore mammario senza il coinvolgimento dei linfonodi e con altri fattori di rischio [9].

Anche la multifocalità tumorale potrebbe avere un valore prognostico. Con tale termine si indica la presenza di diversi focolai di tumore separati da parenchima sano. Sono definiti “nodi satelliti” del nodo principale le lesioni tumorali che distano meno di 5 mm dalla lesione principale e sono separati da parenchima non tumorale, mentre si definisce “carcinoma diffuso” un tumore a crescita lobulare che si diffonde in più quadranti [9]. È stato dimostrato che questo parametro è legato ad un impatto sulle metastasi linfonodali, aumento di recidiva e incremento della mortalità correlata al cancro [9]. La crescita multifocale e quella diffusa hanno un rischio di mortalità, rispettivamente, di 4,14 e 2,75 volte maggiore rispetto alla stessa neoplasia senza quel parametro e indipendentemente dall'immunofenotipo [9].

### **1.5.6 Categorie emergenti**

L'espressione di HER2 nel carcinoma mammario ha avuto un impatto significativo sul trattamento [61]. Un tempo, i tumori caratterizzati da amplificazione del gene ERBB2 e dall'over-espressione di HER2 erano categorizzati in un gruppo biologico specifico detto “HER2-positivo” (15-20% di tutti i carcinomi mammari). Questi tumori erano associati a peggiore prognosi e maggiore aggressività tumorale rispetto alle neoplasie HER2-



negative (il restante 80-85%). Questa osservazione ha motivato uno sforzo importante nella ricerca di farmaci specifici anti-HER2 [61]. Queste nuove strategie terapeutiche hanno rivoluzionato la prognosi dei carcinomi HER2 positivi, soprattutto negli stadi iniziali della malattia. Come già discusso precedentemente, la valutazione dello stato di HER2 è effettuata tramite metodica di immunoistochimica oppure con metodica FISH per rilevare l'amplificazione del gene ERBB2. Sebbene l'80% dei tumori siano stati classificati come HER2 negativi, la maggior parte di questi carcinomi esprimono comunque una certa quantità di proteina recettoriale e tra questi alcuni tumori rispondono a nuovi farmaci anti-HER2. Infatti, sono stati coniatati nuovi termini per definire il livello di espressione di HER2 in pazienti non positivi, ma con una bassa espressione della proteina [61].

Il termine "HER2-negativo" viene usato per indicare score immunoistochimici 0, 1+ e 2+ senza amplificazione del gene ERBB2 in FISH (definizione stabilita dalle linee guida ASCO/CAP 2018 [64]). Da questa categoria sono stati estrapolati i casi HER2 negativi, ma con risposta a trattamento con farmaci di nuova generazione: gli "HER2-low", tumori mammari con score 1+ o 2+ non amplificato in FISH [61].

Ultimamente, diversi trial stanno valutando la risposta a trattamento anti-HER per i casi "HER2-ultralow" ovvero i carcinomi con colorazione incompleta e debole/appena percettibile di membrana in  $\leq 10\%$  delle cellule tumorali (score 0) [61].

Infine, il termine "HER2-null" è stato introdotto per i tumori senza colorazione di membrana [61].

DESCRIZIONE COLORAZIONE	DENOMINAZIONE in base alle linee guida ASCO/CAP 2018	CONCLUSIONE in base alle linee guida ASCO/CAP 2018	CONCLUSIONE In base alle raccomandazioni della pratica clinica ESMO 2023	
-Assenza di colorazione	HER2-0	HER2-negativo	HER2-0	HER2-null*
-Colorazione incompleta e debole in ≤10% cellule tumorali invasive	HER2-0	HER2-negativo		HER2-ultralow (>0 <1+)*
-Colorazione incompleta e debole in >10% cellule tumorali invasive	HER2-1+	HER2-negativo	HER2-low	
-Colorazione completa di membrana da debole a moderata in >10% cellule tumorali invasive (FISH negativa)	HER2 2+ non amplificato	HER2-negativo	HER2-low	
-Colorazione di membrana completa da debole a moderata in >10% cellule tumorali invasive (FISH positiva)	HER2 2+ amplificato	HER2-positivo	HER2-positivo	
-Colorazione di membrana completa e intensa in >10% cellule tumorali invasive	HER2 3+	HER2-positivo	HER2-positivo	

Tab.12 Categorie HER2 in base alle linee guida ASCO/CAP 2018 e secondo il congresso ESMO 2023 sul tumore della mammella HER2-low [61]

\*la validazione di queste categorie dipende dai risultati dello studio DESTINY-BREAST06

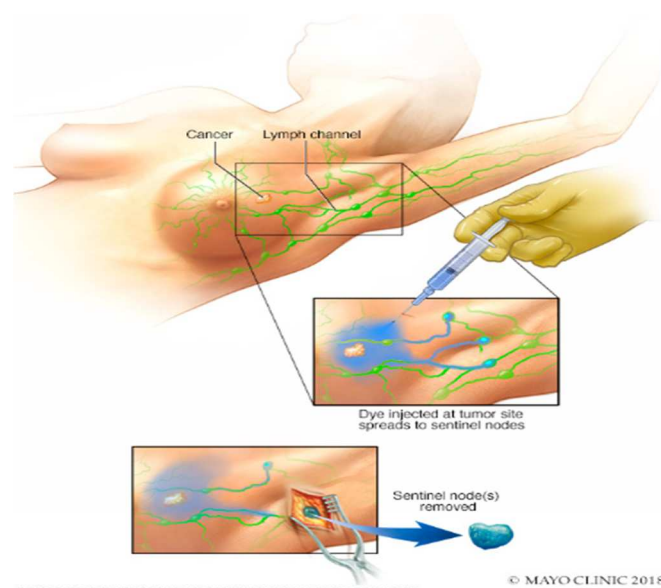
Un'altra categoria emergente è quella degli Er-low. Si tratta di neoplasie mammarie caratterizzate da livelli di ER compresi tra 1 e 9% e prognosi meno favorevole rispetto ai tumori ER-positivi (con livelli >10%). Si caratterizzano per una firma genomica del tipo basal-like e comportamento rispetto alla chemioterapia neo-adiuvante simile ai carcinomi TNBC [9]. Studi retrospettivi suggeriscono che gli esiti prognostici per i tumori ER-low siano intermedi tra gli ER negativi (<1%) e gli ER positivi (con positività >10%). Il panel di esperti del St.Gallen non è concorde sulla soglia ottimale di ER per dare inizio alla terapia endocrina [9].

## 1.6 VALUTAZIONE LINFONODI

La biopsia del linfonodo sentinella (LS) viene eseguita per determinare lo stato dei linfonodi ascellari nei pazienti affetti da carcinoma mammario qualora clinicamente sospetti per localizzazione di malattia [1]. Il linfonodo sentinella è il primo linfonodo regionale in cui le cellule del tumore metastatizzano attraverso i vasi linfatici. La valutazione dei linfonodi ascellari tramite biopsia del LS non è richiesta nei tumori maligni *in situ*, ma la sua esecuzione sarebbe ragionevole nel caso di tumori di grandi dimensioni e/o di grado elevato [1]. Il rischio che il LS risulti positivo in un carcinoma *in situ* è solo del 7-9%, ma la decisione sulla biopsia LS deve essere ponderata sul rischio di invasività del tumore mammario [1]. Il tasso di sottostima dei tumori mammari invasivi varia dal 20 al 38% e aumenta in presenza di fattori come una massa palpabile associata a elevata densità mammografica, età giovane della paziente, carcinoma duttale *in situ* scarsamente differenziato nella biopsia e maggiore estensione delle microcalcificazioni [1]. Lo stato dei linfonodi regionali rimane uno dei principali predittori prognostici a lungo termine per il carcinoma mammario. La dissezione dei linfonodi ascellari comporta linfedema dell'arto superiore nel 25% delle donne dopo l'intervento chirurgico, nel 15% delle donne sottoposte ad una radioterapia senza intervento chirurgico e inferiore al 10% in seguito a biopsia del linfonodo sentinella [64]. Nelle pazienti su cui si esegue una biopsia per il linfonodo sentinella, il linfedema è un problema che può presentarsi tra i 6 e i 12 mesi dopo l'intervento chirurgico. La biopsia del LS ha rimpiazzato la dissezione completa del linfonodo ascellare come trattamento standard per i tumori della mammella T1 e T2 N- a causa del minor rischio di linfedema pur mantenendo un beneficio clinico comparabile [65].

La valutazione del linfonodo sentinella viene effettuata con l'impiego di un tracciante radio-colloidale oppure con un colorante. Vengono iniettati nella mammella e drenano in modo rapido dal sito di inoculo al linfonodo così da permettere l'identificazione del linfonodo regionale sentinella durante la procedura chirurgica [65]. Si può utilizzare il colorante blu di isolfano che è tecnicamente semplice e non richiede attrezzature o procedure aggiuntive. Secondo Ang C.H. *et al.*, la biopsia LS con colorante blu è

applicabile nei centri che non dispongono di strutture interne per l'imaging di radioisotopi [65]. Il chirurgo, tramite un massaggio, favorisce la dilatazione dei vasi linfatici per permettere che il liquido si diffonda nel linfonodo sentinella e si attendono circa 15 minuti per assicurare che il colorante venga drenato nel sistema linfatico [66]. Viene poi eseguita un'incisione nella zona ascellare e si evidenzia il linfonodo marcato con colorante blu, ovvero il linfonodo sentinella [65] (Fig. 7) [67].



*Fig.7 Schematica rappresentazione colorante blu linfonodo sentinella [67]*

Se il sito dove la radioattività è maggiore si trova nel quadrante supero-esterno della mammella, allora il chirurgo asporta il linfonodo sfruttando la medesima incisione usata per la massa tumorale oppure esegue una seconda piccola incisione eseguita sotto l'ascella. Dopo la rimozione della massa tumorale, i margini del tumore vengono marcati con dei coloranti o contrassegnati da fili affinché il campione sia poi orientabile da parte del patologo (Fig. 8) [66].



Fig.8 Marcatura margini tumore [66]

Secondo Arif S.H. *et al.*, la tecnica dell'ampia escissione locale e la biopsia LS sfruttando il blu di metilene sono sicure ed efficaci specialmente in quei contesti nei quali manca la possibilità di usare i traccianti radiocolloiali [66]. Il tessuto tumorale rimosso e il LS sono inviati al reparto di Anatomia Patologica. I risultati dello studio ACOSOG Z0011, secondo il quale la dissezione ascellare linfonodale può essere omessa anche in presenza di 1-2 LS metastatici nei trattamenti chirurgici conservativi, hanno notevolmente ridotto la necessità di valutare intra-operatoriamente il LS. Pertanto, non vi sono indicazioni all'esame intraoperatorio del LS nel caso in cui la paziente venga sottoposta a chirurgia conservativa [68]. L'analisi istologica del linfonodo sentinella viene effettuata su tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina. Il linfonodo sentinella è tagliato secondo protocolli specifici. Se il LS è macroscopicamente metastatico, per la diagnosi è sufficiente preparare una singola sezione di tessuto in ematossilina/eosina, altrimenti viene effettuato un protocollo di taglio specifico che prevede 3 sezioni consecutive ogni 200 micron colorate con ematossilina-eosina intervallate da sezioni in bianco a diversi livelli per eventuali reazioni di IHC, secondo le raccomandazioni SIAPEC (Società Italiana di Anatomia Patologica e Citopatologia Diagnostica). Se ci fosse interessamento del livello più profondo, il linfonodo dovrebbe essere esaminato in toto [68].

Il patologo può avvalersi di un approfondimento immunoistochimico qualora vi siano, in ematossilina-eosina, cellule sospette, ma non diagnosticate per carcinoma oppure in caso di linfonodi asportati in seguito a chemioterapia neo-adiuvante [68].

## **1.7 TERAPIA**

Le diverse modalità di trattamento comprendono la chirurgia, la radioterapia, la terapia sistemica (farmaci citotossici e manipolazione ormonale) e il trattamento mirato anti-HER2 [69].

### **1.7.1 Chirurgia**

L'obiettivo primario nel trattamento del carcinoma mammario è controllare la malattia con l'obiettivo di ottenere la guarigione. Gli altri risultati desiderabili del trattamento includono: miglioramento della sopravvivenza, minimizzazione del rischio di metastasi a distanza e/o recidiva locale, controllo dei sintomi e con una buona qualità di vita [69].

La chirurgia è uno dei principali trattamenti per eradicare il tumore primario e ottenere il controllo della malattia. Esistono due tipi principali di procedure chirurgiche: chirurgia conservativa del seno (BCS) e mastectomia. La BCS, detta anche mastectomia parziale/segmentale, lumpectomia, ampia escissione locale o quadrantectomia, consente la rimozione del tessuto canceroso con simultanea conservazione del tessuto mammario intatto, spesso combinata con tecniche di chirurgia plastica chiamate oncoplastica [5]. Invece per mastectomia si intende la rimozione completa della ghiandola mammaria con successiva ricostruzione con protesi mammarie. La rimozione dei linfonodi interessati prevede la biopsia del linfonodo sentinella (SLNB) e la dissezione dei linfonodi ascellari (ALND) [5]. Anche se la BCS sembra essere molto più vantaggiosa per i pazienti, coloro che sono stati trattati con questa tecnica spesso tendono a necessitare di un'ulteriore mastectomia completa. Tuttavia, l'uso del BCS è per lo più correlato a un carico psicologico ridotto per il paziente, a un numero ridotto di complicanze postoperatorie ed a risultati estetici migliori [5]. L'aspetto estetico dopo BCT è determinato da fattori chirurgici quali: dimensione e posizionamento dell'incisione, gestione della cavità della lumpectomia ed estensione della dissezione ascellare (se necessaria). L'obiettivo finale è

ottenere un risultato esteticamente accettabile senza compromettere il controllo locale del tumore [69]. Nel pianificare l'incisione, il chirurgo deve prendere in considerazione la posizione del nodulo, il tipo di incisione, la profondità della massa cutanea e l'incisione deve essere vicina al nodulo per evitare il tunneling [69]. Un margine chirurgico adeguato è fondamentale e può essere ottenuto senza elevati tassi di rescissione con una pianificazione dettagliata e analizzando il margine intraoperatorio [69]. Nell'ambito della BCT, non è definito ciò che costituisce un margine adeguato di tessuto mammario macroscopicamente normale attorno al tumore [69]. Secondo uno studio retrospettivo condotto da Kearney *et al.* e pubblicato nel 1995, la resezione di 0,5-1 cm di tessuto macroscopicamente normale è risultata in un margine istologicamente negativo nel 95% dei casi (su una coorte di 239 pazienti) [64,70]. Per accertare la negatività di un margine, si è rivelata utile la valutazione del margine intraoperatorio tramite ispezione macroscopica in sala operatoria, con o senza esame intraoperatorio su tessuto congelato [69].

Nei casi in cui il tentativo di ricorrere alla BCT si associ ad elevati tassi di recidiva tumorale, allora la chirurgia conservativa è controindicata. Queste situazioni possono includere casi in cui la malattia è multicentrica o caratterizzata da microcalcificazioni mammografiche diffuse di aspetto maligno. La BCT è controindicata anche in presenza di un margine di resezione positivo persistente, precedente radioterapia alla mammella o alla parete toracica e in gravidanza [69].

### **1.7.2 Chemioterapia**

La chemioterapia è un trattamento sistemico del carcinoma della mammella e può essere neoadiuvante o adiuvante e viene scelta in base alle caratteristiche del tumore [5]. La chemioterapia neoadiuvante viene utilizzata in caso di carcinomi mammari localmente avanzati, carcinomi infiammatori della mammella, per ridurre le dimensioni del tumore e consentire la BCS o in piccoli tumori con sottotipi molecolari caratterizzati da prognosi negativa (HER2 positivi o TNBC) [5]. Questo trattamento può essere somministrato per via orale o endovenosa e prevede l'applicazione simultanea di diversi farmaci. Attualmente, il trattamento prevede la somministrazione secondo diverse combinazioni dei seguenti

farmaci: carboplatino, ciclofosfamide, 5-fluorouracile/capecitabina, taxani (paclitaxel, docetaxel) e antracicline (doxorubicina, epirubicina) [5].

Nonostante l'efficacia della chemioterapia, il suo utilizzo porta spesso ad effetti collaterali tra cui alopecia, nausea o vomito, diarrea, ulcere buccali, stanchezza/affaticamento, aumentata suscettibilità alle infezioni, depressione del midollo osseo combinata con leucopenia, anemia e facilità alla formazione di lividi o sanguinamento. Altri effetti collaterali meno frequenti comprendono cardiomiopatia, neuropatia, sindrome mano-piede e compromissione delle capacità cognitive [5]. Nelle donne più giovani potrebbero verificarsi anche interruzioni del ciclo mestruale e problemi di fertilità.

### 1.7.3 Radioterapia

La radioterapia è un trattamento locale del carcinoma mammario e viene solitamente somministrata dopo l'intervento chirurgico e/o la chemioterapia [5]. Tale trattamento viene eseguito per controllare localmente la malattia, riducendo al minimo la possibilità di recidiva [5,71]. Le tecniche più comuni includono la radioterapia mammaria (dopo l'operazione chirurgica), la radioterapia della parete toracica (di solito dopo la mastectomia) e il "boost del seno" ovvero radioterapia ad alte dosi come complemento dopo la chirurgia conservativa al seno [5].

Per quanto riguarda la radioterapia mammaria, si distinguono diversi tipi che includono la radioterapia intraoperatoria (IORT), la radioterapia 3D-conforme (3D-CRT), la radioterapia a intensità modulata (IMRT) e la brachiterapia, che si riferisce alla radiazione interna [5]. Alcuni degli effetti collaterali più comuni della radioterapia includono irritazione e oscuramento della pelle esposta a radiazioni, affaticamento e linfedema [5]. Nonostante questi effetti collaterali [5], ad oggi sono disponibili prove sufficienti che dimostrano che la radioterapia riduce la recidiva locale [72]. Questa riduzione dei tassi di recidiva non si è tradotta però in una riduzione della mortalità. Sono state suggerite molte spiegazioni per questa disparità, incluso l'effetto dannoso della radioterapia sul sistema immunitario [72]. Una panoramica degli effetti della radioterapia è stata pubblicata nel 1987 da Cuzick *et al.* in cui gli autori hanno evidenziato gli scarsi effetti della radioterapia sulla mortalità nei primi dieci anni di follow-up, ma con danni a lungo termine in



particolare con decessi per cause cardiache [72]. L'uso di tecniche di radioterapia ad alta precisione, come la radioterapia ad intensità modulata e l'irradiazione parziale della mammella, contribuiranno ad evitare l'irradiazione del cuore, con un ulteriore miglioramento del rapporto rischio-beneficio dell'uso della radioterapia [72].

Alcuni dati suggeriscono che la radioterapia successiva a mastectomia e/o chirurgia conservativa abbia un effetto positivo sulla sopravvivenza con un miglioramento del 9-10% nella sopravvivenza globale a 10 anni per i pazienti che sono stati sottoposti a radioterapia rispetto ai pazienti non trattati con radioterapia [72].

#### **1.7.4 Terapia endocrina**

La terapia ormonale può essere utilizzata come trattamento adiuvante e neoadiuvante in pazienti affetti da carcinoma mammario luminale [5]. Poiché i carcinomi mammari frequentemente esprimono il recettore estrogenico, il suo blocco attraverso la terapia ormonale è comunemente usato come modalità di trattamento [5]. La terapia endocrina ha l'obiettivo di ridurre i livelli di estrogeno e impedire alle cellule tumorali di essere stimulate dagli estrogeni [5]. I farmaci che bloccano i recettori per gli estrogeni includono modulatori selettivi del recettore per gli estrogeni (SERM) come il tamoxifene e il tomerifene, e degradatori selettivi del recettore (SERD) come il fulvestrant [5]. Queste molecole agiscono direttamente sul recettore mentre gli inibitori dell'aromatasi mirano ad abbassare i livelli circolanti di estrogeni [5,73]. Il trattamento endocrino è generalmente considerato la scelta terapeutica per le pazienti con tumori che esprimono i recettori degli estrogeni e con malattia avanzata, e per le pazienti di età avanzata non idonee a regimi chemioterapici aggressivi [73]. Circa il 50% dei carcinomi mammari ormono-positivi diventa resistente alla terapia ormonale durante il trattamento endocrino [5,74]. Spesso la terapia endocrina si associa a chemioterapia e tale combinazione comporta riduzione dei tassi di mortalità [5].

## 1.8. PATHWAY MOLECOLARI ASSOCIATI AL TUMORE MAMMARIO

Nonostante i numerosi sistemi di classificazione molecolare e istologica del carcinoma mammario, questi risultano insufficienti nell'inquadrare pienamente l'eterogeneità del carcinoma della mammella dal punto di vista biologico e clinico [75]. La comprensione dei meccanismi molecolari che sottendono allo sviluppo di questa patologia è migliorata negli ultimi anni, soprattutto, grazie all'impiego di nuovi saggi prognostici e tecniche molecolari [75]. Nonostante lo studio di caratteristiche come l'espressione genica, la variazione nel numero di copie geniche, la metilazione e i micro-RNA, ad oggi, questi parametri non sono ancora ben integrati nella pratica clinica. L'introduzione delle tecniche di sequenziamento genico di nuova generazione (NGS) ha rappresentato una nuova possibilità per decodificare la complessa e intricata eterogeneità del carcinoma mammario, comprendere i meccanismi molecolari alla base della patologia e fornire nuovi bersagli terapeutici [75].

Le cellule comunicano tra loro grazie alla produzione di molecole segnale che, tramite il legame con specifici recettori, attivano vie di segnalazione intracellulare. In questo modo, le cellule rispondono ai segnali del microambiente tissutale e si adattano ad esso [76]. Il complesso PI3K/AKT/mTOR rappresenta una via di segnalazione con un ruolo molto importante in numerose attività cellulari come il metabolismo, la crescita, la proliferazione, l'angiogenesi e l'apoptosi [76].

Un ligando interagisce con un recettore di membrana che, a sua volta, attiva la fosfatidil inositolo trifosfato chinasi (PI3K). Questo enzima, nella sua forma attiva, fosforila il fosfatidil inositolo difosfato (PIP<sub>2</sub>) per generare il Fosfatidil-inositolo trifosfato (PIP<sub>3</sub>) che recluta, attraverso domini specifici di plecstrina (domini PH), le protein-chinasi AKT (o PKB proteina chinasi B) e la proteina chinasi fosfoinositoide dipendente (PDK1) [76]. Quando AKT è reclutata, viene fosforilata dal complesso mTORC2 su uno specifico residuo di serina. In questo modo, la conformazione di AKT è modificata e PDK1 va a fosforilare un residuo di treonina [76]. L'AKT attiva fosforila a sua volta altre proteine target, si distacca dalla membrana cellulare e continua a trasdurre il segnale fosforilando

altri target nel citosol e nel nucleo cellulare. L'attività di fosforilazione è coinvolta in processi come la sopravvivenza cellulare, la crescita e la proliferazione [76].

Ci sono diverse tipologie di PI3K suddivise in diverse classi o categorie. La classe I dei PI3K è suddivisa in classe IA dei PI3K, classe IB dei PI3K e classe IC dei PI3K. Gli IA-PI3K sono eterodimeri, costituiti da un'unità regolatrice (p85 $\alpha$ , p85 $\beta$ , p85 $\gamma$ ) che attiva l'unità catalitica (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$ , p110 $\gamma$ ) [76,77]. Gli IA-PI3K sono presenti in molti tipi di tessuto e vengono attivati direttamente dai recettori di membrana accoppiati alla proteina G e dai recettori tirosin chinasi (RTK) [76].

Gli IB-PI3K sono eterodimeri contenenti la subunità regolatrice p101, che attiva la subunità catalitica p110 $\gamma$  [76,78].

I PI3K di classe II hanno tre isoforme: PI3KC2 $\alpha$  e PI3KC2 $\beta$  sono espressi nella maggior parte dei tessuti e degli organi, mentre PI3KC2 $\gamma$  è espresso solo nel fegato. Regolano la dinamica della membrana intracellulare e il traffico di membrana [76].

I PI3K di classe III hanno come unico membro identificato VPS34, che è collegato alla regolazione della fagocitosi, della pinocitosi, dello smistamento endosomiale e dell'autofagia [76].

La proteina chinasi serina/treonina AKT è la principale molecola a valle della via di segnalazione PI3K [76]. Esistono tre sottotipi (isoforme) di AKT: AKT1 (espresso nella maggior parte dei tessuti), AKT2 (espresso principalmente nei tessuti con elevata sensibilità all'insulina come fegato, pancreas, muscoli) e AKT3 (espresso nei tessuti del cervello e testicoli) [76]. Una volta attivato, AKT media la regolazione del ciclo cellulare, della crescita, della proliferazione e del metabolismo [76]. Uno dei principali substrati di AKT è la proteina chinasi che fosforila e inibisce la glicogeno sintasi (GSK3) e si trova a valle della via dipendente dalla PI3K che è stimolata dall'insulina e dai fattori di crescita, e della via di segnalazione Wnt necessaria per lo sviluppo embrionale [76]. AKT fosforilando GSK-3 lo inattiva e, di conseguenza, si verifica un aumento dell'assorbimento cellulare del glucosio e della sintesi del glicogeno portando ad una diminuzione dei livelli di zucchero nel sangue [76].

L'inibizione di GSK-3 innescata da fattori di crescita, attraverso l'attivazione di AKT, ha effetti antiapoptotici [76].

Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) è una proteina chinasi inattivata da una tossina batterica chiamata rapamicina. Nelle cellule esiste come due distinti complessi multiproteici: mTORC1 e mTORC2. mTORC1 è costituito da mTOR, proteina Raptor e mammifero Letale con SEC13 proteina 8 (mLST8) che interagisce direttamente con mTOR e ne potenzia l'attività chinasi [76]. Il complesso multiproteico mTORC1 promuove la crescita e la sopravvivenza cellulare stimolando l'assorbimento e il metabolismo dei nutrienti, promuovendo la produzione di ribosomi e la sintesi proteica [76].

Forkhead box other 1 (FoxO1) appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione forkhead accomunati dalla caratteristica di avere un dominio di legame al DNA conservato chiamato "Fox". I membri della famiglia FoxO svolgono un ruolo importante nella regolazione della transizione epitelio-mesenchimale (EMT) [76,79].

L'omologo della fosfatasi e della tensina (PTEN) è una fosfatasi specifica che de-fosforila le molecole PIP3 in PIP2 che non legano AKT il quale non può essere reclutato e fosforilato da mTORC2 [76]. Il risultato è che AKT non può essere attivato e la via di segnalazione PI3K/AKT/mTOR viene soppressa. PTEN agisce quindi come soppressore del tumore, inibendo la proliferazione cellulare. In molti tumori maligni, il gene PTEN ha subito mutazioni, con conseguente PTEN anormale, che non può esercitare il suo effetto inibitorio sulla via PIP3/AKT/mTOR [76].

Nei tumori della prostata, della mammella, dell'endometrio e del colon è stata rilevata la più alta incidenza di mutazioni PIK3CA con conseguente attivazione non regolata della segnalazione PI3K [76,80]. Questo aspetto ha fornito prove genetiche inconfutabili del ruolo centrale di questa via nella tumorigenesi [80].

Circa il 30-40% delle pazienti con carcinoma mammario presenta mutazioni PIK3CA che inducono un'iperattivazione dell'isoforma  $\alpha$  (p110 $\alpha$ ). Recentemente, la Food and Drug Administration (FDA) ha approvato il test su pazienti con carcinoma mammario con mutazioni PIK3CA utilizzando tessuto tumorale mammario e/o DNA tumorale circolante

[76]. Nella sequenza codificante, le mutazioni PIK3CA sono concentrate in tre hotspot, di cui due situati nel dominio elicoidale di p110 $\alpha$  e l'ultimo situato nel dominio catalitico. Le mutazioni dell'hotspot rappresentano le sostituzioni di singoli nucleotidi che determinano le sostituzioni di amminoacidi (E542 K, E545 K e H1047R) [76]. Queste mutazioni di hotspot inducono un guadagno di funzione con una rapida trasformazione e tumorigenicità [76]. Nelle pazienti con carcinoma mammario triplo negativo, i tassi di mutazione PIK3CA sono ridotti (16%) rispetto ai sottotipi HR+/HER2 (42%) e HER2+ (31%). Inoltre, nelle pazienti con carcinoma mammario avanzato HR+/HER2-, il 28% delle mutazioni PIK3CA sono state identificate nel DNA tumorale circolante [76]. La sovraespressione di HER2 e le mutazioni PIK3CA sono state osservate sia nei carcinomi mammari invasivi che nel carcinoma duttale *in situ*. Nelle lesioni neoplastiche intraepiteliali, le mutazioni PIK3CA hanno una frequenza ridotta [76]. EGFR, HER3 e HER4 sono amplificati e/o over-espressi in oltre il 20% dei carcinomi mammari. HER2 è il driver oncogenico di queste patologie ed è coinvolto nella genesi e nella progressione di questi tumori. EGFR e HER4 possono attivare PI3K dopo il loro legame con RTK, in particolare mediante trans-fosforilazione di HER3, che può agire come partner critico per HER2 nella genesi e nella progressione del tumore. Dopo la fosforilazione dei residui di tirosina all'interno del dominio citoplasmatico, avviene la dimerizzazione del recettore e vengono attivate varie vie di segnalazione coinvolte nella proliferazione cellulare, nella trascrizione, nella motilità e nell'inibizione dell'apoptosi [76].

## **1.9 EVOLUZIONE BIOLOGICA DEL TUMORE DURANTE L'EVOLUZIONE DELLA MALATTIA**

I pazienti affetti da carcinoma mammario metastatico ormono-dipendente spesso sperimentano un processo patologico che può estendersi per anni, comprendere molteplici metastasi in siti differenti e richiedere più trattamenti sistemici.

Diversi studi documentano la possibilità di una discordanza tra tumore primitivo e metastatico sia per quanto riguarda i recettori ormonali che, per quanto riguarda HER2, con tassi di discordanza compresi tra il 6% e il 48% a seconda degli studi [81-83].

Poiché la maggior parte delle decisioni terapeutiche mirate sono raccomandate sulla base di biomarcatori per i recettori ormonali e l'HER2, la ri-biopsia delle metastasi potrebbe quindi evidenziare un cambiamento nell'espressione di questi biomarcatori, con conseguente impatto sulle raccomandazioni di trattamento sistemico. I pazienti in cui nel tumore primario i recettori ormonali o HER2 sono negativi e i tumori successivi sono poi risultati positivi offrono una grande opportunità per un'ulteriore gestione sistemica con terapia ormonale o trattamenti mirati a HER2 [81]. Studi retrospettivi suggeriscono che, in seguito all'analisi delle metastasi, potrebbero essere necessari cambiamenti terapeutici nel 20% dei pazienti [81].

In uno studio comparativo, Jensen *et al.* hanno confrontato 119 casi di tumori primitivi e relative lesioni metastatiche per quanto riguarda la determinazione dello stato di espressione del recettore per l'estrogeno e l'HER2. L'espressione di estrogeno ed HER2 nei tumori primari, linfonodi ascellari e metastasi è stata valutata mediante immunistochimica e ibridazione *in situ* fluorescente (FISH), rilevando una discordanza tra il tumore primario e la corrispondente metastasi asincrona del 12% per quanto riguarda il recettore degli estrogeni e del 9% per quanto riguarda l'HER2 [82].

La discordanza nello stato di estrogeni, progesterone ed HER2 tra i tumori primari della mammella e malattia metastatica è stata ampiamente documentata da Yeung *et al.* attraverso una revisione di 47 studi di cui erano disponibili complessivamente più di tremila campioni di tessuto di tumore primitivo e metastatico. I tassi mediani di discordanza per ER, PgR ed HER2 sono stati rispettivamente del 14%, 21% e 10%. I tassi di discordanza erano più alti per le metastasi ossee rispetto agli altri siti (linfonodi, polmoni, fegato, cervello e tratto gastrointestinale) probabilmente a causa della tipologia di tessuto, mentre nei diversi siti di metastasi dove l'elaborazione dei tessuti è meno variabile, i tassi di discordanza simili suggerirebbero che il meccanismo di discordanza è veramente di natura biologica. La perdita di espressione del recettore è risultata più comune (9,17%) rispetto al guadagno (4,51%). In generale in tutti i siti HER2 aveva meno probabilità di mostrare discordanza rispetto a ER o PgR [83].

Uno studio condotto da Lower *et al.* e pubblicato nel 2017 si è focalizzato sui cambiamenti dei biomarcatori ER, PgR e HER2 tra la lesione primaria, la prima metastasi e la successiva lesione, riscontrando una discordanza tra la prima e la seconda metastasi di circa il 20% per i recettori ER e PgR e dell'11% per HER2 [81].

Nell'ambito della malattia metastatica la migliore sopravvivenza è stata individuata nei pazienti i cui tumori sono rimasti ER positivi, mentre la sopravvivenza significativamente peggiore ha caratterizzato quei pazienti i cui tumori sono rimasti ER negativi. I pazienti con discordanza ER tra la prima o la seconda metastasi hanno dimostrato una sopravvivenza intermedia. Risultati simili sono stati osservati anche per quanto concerne il PgR [81]. In questo lavoro non è risultata differenza nella sopravvivenza per i pazienti i cui tumori HER2 erano discordanti, in accordo con i risultati di altri studi [81].

Uno studio condotto da Ozen *et al.* ha mostrato tassi di discordanza per ER, PgR ed HER2 tra i siti di carcinoma mammario primario e metastatico rispettivamente del 17,8%, 45,4%, e 13,3%. Tuttavia, non ha riscontrato alcuna differenza significativa nella sopravvivenza globale dovuta alla discordanza nell'espressione dei recettori tra il tumore primario e le sedi metastatiche, sebbene sia stata osservata una tendenza verso una sopravvivenza peggiore nei pazienti con discrepanze nell'espressione di HER2 [84].

Anche lo studio di Niikura *et al.* ha riportato che i pazienti con stato discordante di HER2 tra tumore primario e metastasi avevano una sopravvivenza globale più breve rispetto ai pazienti con stato HER2 concordante [85].

La discordanza tra tumore primario e metastasi per quanto riguarda l'espressione dei recettori ormonali e di HER2 potrebbe riflettere non soltanto i cambiamenti della biologia del tumore, ma anche alterazioni nelle tecniche di valutazione patologica, differenze legate all'eterogeneità tumorale o all'effetto del trattamento [81,86].

Per quanto riguarda la variabilità nei metodi di campionamento, ad esempio, l'aspirazione con ago sottile o la biopsia rispetto all'estrazione chirurgica del tumore primario e il campionamento della recidiva possono contribuire alla discrepanza ed è noto che esiste una certa variabilità nella riproducibilità e accuratezza della colorazione immunoistochimica. Inoltre, con l'avvento della tecnologia di sequenziamento di nuova

generazione, è diventato maggiormente evidente che il carcinoma della mammella dimostra eterogeneità sia intratumorale che intertumorale. La discordanza nello stato recettoriale può essere legata anche all'evoluzione del genoma clonale per cui il clone con il fenotipo più aggressivo potrebbe potenzialmente avviare il processo metastatico [87].

I tumori di pazienti che hanno precedentemente ricevuto un ormone adiuvante o un trattamento mirato a HER2 possono sviluppare una down-regolazione o una resistenza dei recettori [81,88].

Ad esempio, l'eradicazione selettiva delle cellule ER/PgR positive mediante terapia ormonale potrebbe selezionare una popolazione di cellule ER/PgR negative che nel tempo potrebbero rimetastatizzare [87].

Nonostante queste possibili spiegazioni, la vera causa della discordanza potrebbe essere difficile da definire [81,86].

I veri cambiamenti nella biologia del cancro sembrano comunque essere un evento raro sulla base dei dati di espressione genica attualmente disponibili; tuttavia, ciò non esclude il potenziale di alterazioni e mutazioni genomiche su scala più piccola. L'eterogeneità tra tumore primario e recidiva può essere dovuta a caratteristiche biologiche di nuova acquisizione che consentono alle cellule tumorali di spostarsi attraverso il sistema circolatorio e linfatico e metastatizzare [87].

Esiste inoltre la possibilità di cambiamento di espressione recettoriale ed HER2 legati al trattamento.

L'introduzione del trattamento anti-HER2 ha avuto un impatto importante sull'esito delle pazienti con carcinoma mammario HER2 positivo, sia in fase iniziale che avanzata. Il trattamento neoadiuvante è lo standard di cura per il carcinoma mammario localmente avanzato e nelle prime fasi della malattia consente tassi più elevati di chirurgia conservativa della mammella. Nell'ambito della terapia neoadiuvante, l'aggiunta di trastuzumab e, più recentemente, di pertuzumab, alla chemioterapia migliora significativamente il tasso di risposta patologica completa rispetto alla sola chemioterapia [85].

Sono stati riportati cambiamenti nell'espressione dei recettori ormonali ed HER2 su campioni tumorali da campioni chirurgici ottenuti dopo chemioterapia neoadiuvante,



rispetto alla biopsia iniziale. Tuttavia, la frequenza della discordanza nell'espressione/amplificazione di HER2 e l'impatto prognostico di tale discordanza rimangono poco chiari [85].

Il più grande studio che ha confrontato lo stato del recettore HER2 prima e dopo terapia neoadiuvante di Niikura *et al.*, ha riportato una discordanza del 21,4% della sovraespressione di HER2 tra biopsia e campione chirurgico [85]. In uno studio condotto da Miglietta *et al.* sull'evoluzione dello stato di espressione di HER2 dalla biopsia basale alla malattia residua dopo il trattamento neoadiuvante, il tasso complessivo di discordanza HER2 è stato del 26,4% ed è stato perlopiù rappresentato da casi di passaggio dal fenotipo HER2 0 a HER2-low e viceversa (dal fenotipo HER2-low a HER2 0). Nel dettaglio, delle pazienti con fenotipo HER2 0 alla biopsia, il 33,8% ha avuto una conversione al fenotipo HER2-low, mentre il 37,7% delle pazienti HER2-low ha mostrato una conversione a HER2 0. Lo stato HER2-positivo è risultato il più stabile, con solo il 2,7% di pazienti che ha mostrato un aumento o una perdita di positività HER2 [89]. Uno studio retrospettivo di Branco *et al.* ha valutato la sovraespressione e/o l'amplificazione di HER2 in pazienti con tumore alla mammella HER2-positivo sottoposti a chemioterapia neoadiuvante, con o senza trattamento anti-HER2 (trastuzumab e/o pertuzumab), sia nella biopsia diagnostica che nel campione chirurgico dopo trattamento, focalizzando l'attenzione sull'impatto prognostico della perdita di sovraespressione/amplificazione di HER2. Si è visto che, nei casi di tumore rimasti HER2-positivi, a cinque anni la sopravvivenza libera dalla malattia e la sopravvivenza globale erano rispettivamente del 70% e dell'84%, mentre per i pazienti i cui tumori diventavano HER2-negativi del 21% e del 50% [85]. Mittendorf *et al.* hanno riportato una perdita del 32% dell'amplificazione di HER2 dopo chemioterapia neoadiuvante più trastuzumab e Guarnieri *et al.* perdita di espressione di HER2 nel 40% dei pazienti dopo NACT da sola e nel 14,7% dei pazienti dopo NACT più trastuzumab; in entrambi questi studi pazienti con tumori HER2+ alla diagnosi ma senza amplificazione/sovraespressione di HER2 nella malattia residua hanno avuto una sopravvivenza libera da malattia peggiore rispetto a quelli che hanno mantenuto la malattia residua HER2-positiva [85]. Diverse motivazioni sono state suggerite per spiegare i

cambiamenti di HER2 dopo NAT. Alcune includono ragioni tecniche, come errore di campionamento, eterogeneità intratumorale, insidie preanalitiche e analitiche e metodi di amplificazione di HER2. L'IHC, utilizzata nella maggior parte degli studi, può essere influenzato dalla variazione nell'elaborazione e nella fissazione dei tessuti, nonché dalla variabilità intra e inter-osservatore. Al contrario, la valutazione di HER2 da parte di FISH ha meno probabilità di documentare la discordanza rispetto all'IHC. Infatti, Harris *et al.* hanno riportato un cambiamento del 12% nella sovraespressione di HER2 da parte di IHC, ma nessun cambiamento dall'analisi FISH [85]. Altri dati suggeriscono che la terapia neoadiuvante è la ragione principale della differenza di sovraespressione/amplificazione di HER2 nel tempo attraverso lo sviluppo di fenomeni di selezione clonale e lo sviluppo di meccanismi di resistenza indotti dalla chemioterapia e/o dalle terapie anti-HER2. Inoltre, poiché l'espressione di ER, PgR ed HER2 sono altamente dipendenti l'una dall'altra, la modulazione di un recettore può cambiare anche l'espressione di altri recettori [85].

Non è chiaro se le alterazioni di HER2 indotte dalla NAT in pazienti con carcinoma mammario primario influenzano la prognosi. Alcuni studi non descrivono alcun impatto sulla prognosi, ma altri riportano una peggiore sopravvivenza libera da malattia in pazienti con tumori con perdita di amplificazione di HER2 dopo NAT [85].

Complessivamente i risultati degli studi suggeriscono che è importante ripetere il test di HER2 dopo NAT. La sottopopolazione di tumori con perdita di sovraespressione di HER2 deve essere ulteriormente studiata al fine di definire meglio la prognosi e adattare successivamente la terapia adiuvante [85].

### 1.10 TERAPIE ANTI-HER2

Con la sigla “HER2” si indica il recettore di tipo 2 per il fattore di crescita epiteliale umano. Questo recettore svolge un ruolo fondamentale per la normale attività della cellula (Fig.9) [90].

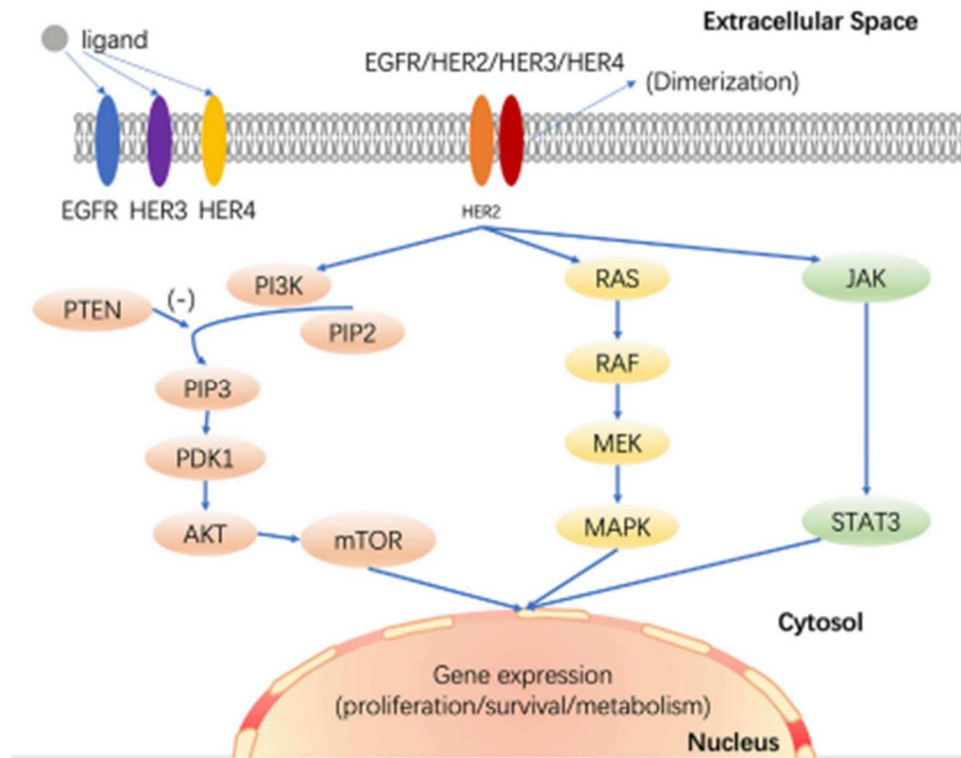


Fig.9 Vie di segnalazione recettori transmembrana EGF/HER [90]

Appartenente alla famiglia dei recettori tirosin chinasi trans membrana, HER2 è un recettore transmembrana composto da un dominio N-terminale extracellulare, un dominio transmembrana, un dominio intracellulare citoplasmatico con attività tirosina chinasi e una coda C-terminale [90]. Ci sono più di 11 ligandi extracellulari per i recettori HER1, HER3, HER4, ma HER2 non si lega in modo diretto con nessun ligando. Una subunità di HER2 forma un omodimero o un eterodimero con un altro recettore della famiglia HER oppure con EGFR. Il ligando entra in contatto con questo dimero recettoriale e vengono attivate diverse vie di segnalazione intracellulare che promuovono processi tumorali come la sopravvivenza, la proliferazione, l'alterazione metabolica tipica delle neoplasie, l'invasione, l'adesione e l'angiogenesi [90,91]. L'attività tumorale di HER2 è inibita da anticorpi monoclonali diretti contro il recettore. Sulla base

di questa inversione sono stati condotti studi sull'impiego di un anticorpo murino anti-HER2 chiamato 4D5 [92].

Circa il 25% dei tumori invasivi della mammella si caratterizzano per l'over-espressione di HER2 (score immunohistochimico 3+) oppure per amplificazione del gene ERBB2 rilevata tramite metodica FISH [90]. Questi aspetti sono legati all'aggressività della patologia e sono dunque fattori prognostici per le pazienti [90].

L'elevato tasso di espressione di HER2 nei carcinomi mammari lo ha reso un bersaglio di diversi tipi di farmaci [90]. Il primo farmaco mirato per l'HER2 autorizzato dalla FDA è stato un anticorpo monoclonale umanizzato anti-HER2 chiamato trastuzumab. Sebbene secondo Slamon *et al.*, il trastuzumab migliori significativamente la sopravvivenza libera dalla patologia nei pazienti con carcinoma mammario HER2-positivo, circa il 25% dei pazienti con malattia allo stadio iniziale avrà una recidiva entro il primo decennio dopo il trattamento [90].

Ad oggi, le terapie anti-HER2 includono, oltre al già citato trastuzumab, dei farmaci costituiti dallo stesso anticorpo coniugato con farmaci e agenti citotossici (per esempio il trastuzumab emtansine) e gli inibitori delle tirosin chinasi (lapatinib e neratinib). Grazie a queste opzioni terapeutiche, i pazienti affetti da tumore HER2 positivo hanno una migliore prognosi [90]. Nonostante l'efficacia del farmaco nel migliorare la sopravvivenza, si può verificare resistenza a trattamento per cui è necessario sviluppare nuovi farmaci per superare tale ostacolo [90].

Il trastuzumab è un anticorpo monoclonale umano ricombinante che si lega ad una regione (dominio IV) del segmento extra-cellulare di HER2. Inibisce la dimerizzazione del recettore e blocca, a monte, ogni cascata di segnalazione mostrata nella figura 9 [90].

Un altro anticorpo appartenente a questa categoria è il pertuzumab che agisce allo stesso modo del trastuzumab, ma legandosi ad una diversa regione (dominio II) del segmento extracellulare di HER2 [90]. Questi due anticorpi interagiscono con le cellule immunitarie per scatenare la citotossicità dipendente da anticorpo [90].

Le strategie terapeutiche sono valutate in base alla risposta della paziente alla terapia (Fig. 10) [1].

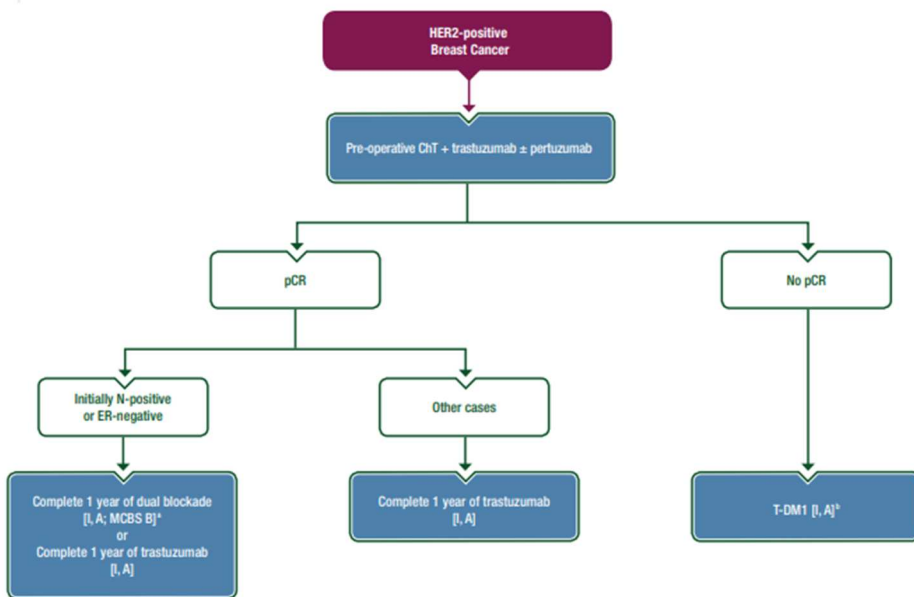


Fig.10 Trattamento carcinoma mammario HER2 positivo [1]

La somministrazione del trastuzumab in combinazione con la chemioterapia riduce del 50% il rischio di recidiva e mortalità rispetto alla sola chemioterapia traducendosi in un miglioramento del 10% sulla sopravvivenza libera da recidiva e del 9% nella sopravvivenza globale a 10 anni [1]. Il trastuzumab è approvato per le pazienti con carcinomi mammari N+ e diametro tumorale massimo di 1 cm. A causa del rischio di recidiva relativamente elevato, l'uso del trastuzumab dovrebbe essere considerato anche per le pazienti con tumori di piccole dimensioni, ma senza il coinvolgimento linfonodale [1]. Se il risultato di un test HER2 è equivoco e la stessa incertezza rimane anche dopo l'esecuzione della FISH, allora l'impiego dell'anticorpo può essere preso in considerazione, anche se il beneficio su queste pazienti non è ancora conosciuto [1].

Nonostante l'efficacia degli anticorpi monoclonali diretti contro HER2, si possono sviluppare diversi meccanismi di resistenza all'azione del farmaco. Si tratta di processi multifattoriali che possono essere correlati ad una diminuzione o perdita dell'espressione di HER2, elevata espressione della variante "p95" HER2 o perdita dell'oncosoppressore PTEN [90]. L'HER2 "p95" è una variante del recettore transmembrana HER2 priva del dominio N-terminale. Questo HER2 tronco è altamente tumorigenico e manca del dominio legante il trastuzumab. La segnalazione a valle di p95HER2 è costitutivamente

attiva e non viene inibita dal trattamento con gli anticorpi anti-HER2 (in quanto manca il loro sito di legame) [90,93]. Il gene oncosoppressore PTEN codifica per una proteina omologa delle fosfatasi e della tensina che attiva la via di segnalazione PI3K/AKT/mTOR. Questo effetto antagonista su PI3K può regolare negativamente la via di segnalazione PI3K/AKT/mTOR [90].

Un altro meccanismo di resistenza è rappresentato dalla mutazione S310F. Si tratta di una sostituzione di una serina con una fenilalanina in un componente del dominio extracellulare di HER2. Tale cambiamento influisce sul legame tra il pertuzumab e il recettore portando alla resistenza a questo farmaco [90,94]. Questa mutazione non rende però inefficace il trastuzumab [90].

Inoltre, è stato recentemente dimostrato che il complesso antigenico dei leucociti umano G (HLA-G) ostacola la citotossicità del farmaco anticorpale legandosi al recettore atipico della famiglia KIR sui linfociti natural killer (NK). Questo legame può fornire una spiegazione della resistenza del tumore mammario HER2 positivo al trattamento con il trastuzumab [90,95].

Il trastuzumab-emtansine (T-DM1) è un coniugato farmaco-anticorpo che combina l'anticorpo trastuzumab con l'azione citotossica di DM1 (un inibitore della polimerizzazione dei microtubuli) e viene utilizzato in seconda linea per il trattamento di pazienti resistenti al trastuzumab. Le due componenti del farmaco sono unite covalentemente grazie ad un legame tioetere stabile [90,96]. L'anticorpo si lega a HER2 e viene internalizzato nelle cellule tumorali e gli enzimi lisosomiali rompono il legame tra anticorpo e DM1: in questo modo l'agente citotossico viene scaricato direttamente nella cellula tumorale target che esprime HER2 dove agisce inducendo arresto mitotico e successiva apoptosi [90,97].

L'efficacia del T-DM1 è stata investigata da uno studio condotto da von Minckwitz *et al.* la cui analisi ha incluso pazienti con tumore mammario (da primo a terzo stadio) positivo per il recettore HER2 e caratterizzato da recidiva mammaria o ascellare in seguito a chemioterapia neo-adiuvante e terapia anti-HER2. I risultati hanno evidenziato una maggiore sopravvivenza libera dalla patologia (DFS) nel gruppo trattato con T-DM1

rispetto ai pazienti ai quali è stato somministrato trastuzumab. Inoltre, anche il rischio di recidiva è risultato del 10,5% nel gruppo trattato con T-DM1 e del 15,9% nel gruppo trastuzumab [97].

Nonostante l'efficacia del farmaco, la resistenza si manifesta rapidamente nelle pazienti responsive alla terapia [90]. Il farmaco coniugato, per esercitare il suo effetto, deve essere endocitato nella cellula tumorale mediante clatrina [90,98]. Una volta endocitato, il T-DM1 viene catabolizzato determinando la produzione del catabolita attivo a cui, però, le membrane lisosomiali sono impermeabili per cui è necessario un trasportatore di membrana [90].

Il farmaco anticorpo-coniugato T-DM1 è approvato per il trattamento di pazienti affetti da carcinoma della mammella metastatico HER2-positivo precedentemente trattati con trastuzumab o taxani (combinati o singolarmente) [99]. L'approvazione per l'impiego di tale farmaco si è basata sui risultati dello studio EMILIA, pubblicati nel 2012 [99,100], che hanno evidenziato una sopravvivenza libera da recidiva tumorale e una sopravvivenza globale maggiore nel gruppo trattato con T-DM [99].

Lo studio KAMILLA ha valutato la sicurezza e l'efficacia del T-DM1 in 2002 pazienti affetti da carcinoma mammario metastatico HER2 positivo. I partecipanti hanno ricevuto una dose di farmaco di 3,6 mg/kg per via endovenosa ogni 3 settimane. La valutazione dei tumori è stata effettuata, tramite tomografia o risonanza magnetica, allo screening e in seguito ogni 12 settimane durante la somministrazione della terapia [99]. I risultati dello studio KAMILLA hanno evidenziato come il T-DM1 fosse tollerabile con un profilo di sicurezza gestibile e privo di effetti collaterali imprevisti o nuovi. Gli eventi avversi più comuni associati all'uso del farmaco sono stati stanchezza, anemia e trombocitopenia [99]. Nonostante lo studio fosse principalmente focalizzato sulla tollerabilità del farmaco, sono stati evidenziati dati rilevanti anche per quanto riguarda l'efficacia terapeutica. I valori migliori di progressione libera da recidiva e sopravvivenza totale sono stati rilevati quando il T-DM1 è stato impiegato come terapia di seconda linea. Inoltre, questi valori sono diminuiti all'aumentare del numero di precedenti linee di trattamento in linea con l'evoluzione naturale della malattia [99].

Un farmaco anticorpo coniugato di seconda generazione è il trastuzumab-deruxtecan (T-Dxd o DS-8201) che è costituito da un anticorpo monoclonale anti-HER2 umanizzato (il trastuzumab) e un inibitore della topoisomerasi I [90]. Si caratterizza per un rapporto farmaco-anticorpo (Drug-Antibody ratio o DAR) di 7-8:1 [101]. Tale farmaco ha rivoluzionato lo scenario dei carcinomi mammari HER2, dal momento in cui è risultato efficace sia nei casi HER2 positivi (score 3+ e 2+ con amplificazioni in FISH) sia nei casi “HER2-low” con score 2+ senza amplificazione o score 1+. Infatti, con lo studio Destiny Breast03 il T-Dxd è stato approvato nei casi metastatici HER2+ in progressione dopo trattamento con altri farmaci anti-HER2, mentre grazie allo studio Destiny Breast-04 il farmaco è stato approvato nei casi “HER2-low”.

Una rappresentazione schematica del farmaco in tutte le sue componenti è mostrata nella figura 11[102].

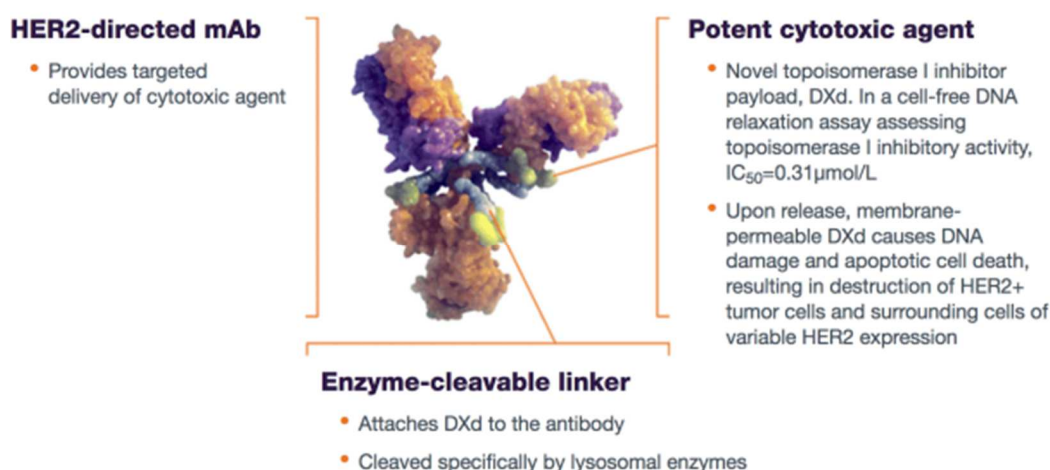


Fig.11 Rappresentazione schematica delle componenti del trastuzumab-deruxtecan [102]

### 1.11 STUDI DB-04, DAISY E DB-06

I carcinomi della mammella caratterizzati dall'amplificazione del gene ERBB2 e dall'over-espressione di HER2 (15-20% dei tumori mammari) trent'anni fa erano riconosciuti come un sottotipo biologico distinto, associato a peggiore prognosi e comportamento più aggressivo rispetto ai carcinomi privi di queste alterazioni molecolari [61,103]. Questa osservazione ha portato nel tempo a considerare HER2 come possibile bersaglio biologico e il conseguente sviluppo di farmaci diretti contro questa proteina di membrana ha



cambiato la prognosi dei pazienti affetti da carcinoma della mammella HER2 positivo [61, 104, 105, 106]. Nel 2005, in base ai risultati degli studi NSABP B-31 e N9831, la FDA ha approvato per il trattamento adiuvante dei carcinomi della mammella HER2 positivi l'uso del trastuzumab associato alla chemioterapia [106].

I tumori HER2 negativi, invece, data la mancanza dell'over-espressione della proteina e dell'amplificazione genica di ERBB2, sono stati tradizionalmente classificati e trattati in base all'espressione dei recettori ormonali [61,106,107]. Tuttavia, sebbene definiti HER2 negativi, la maggior parte di questi tumori è comunque caratterizzata da un'espressione rilevabile della proteina. Nonostante ciò, diversi studi hanno dimostrato come i tentativi di trattare i carcinomi a bassa espressione di HER2 con anticorpi monoclonali diretti contro questo recettore non abbiano mostrato alcun beneficio clinico [61, 106, 107].

Attualmente ci sono otto farmaci anti-HER2, approvati dalla FDA e/o dall'European Medicines Agency (EMA), che hanno reso il carcinoma della mammella HER2 positivo una patologia altamente curabile nelle fasi precoci e ne hanno migliorato la prognosi anche nel contesto metastatico [61]. Il beneficio in termini di sopravvivenza, ottenuto dalla somministrazione di questa tipologia di farmaco, è stato verificato sia nel contesto adiuvante che neoadiuvante, nonché nella prima e nella seconda linea di trattamento [103].

In questi ultimi anni, lo sviluppo di potenti farmaci anticorpo coniugati (antibody-drug conjugates, ADC) ha permesso di rendere bersagliabile anche i tumori con bassa espressione di HER2 [108].

Al meeting annuale ASCO 2022 sono stati presentati i risultati del DESTINY-Breast04 (DB-04) che hanno rappresentato una svolta storica nel carcinoma della mammella.

Nel periodo compreso tra il 27 dicembre 2018 e il 31 dicembre 2021, 713 pazienti con carcinoma mammario metastatico HER2-low sono stati sottoposti a screening per una potenziale inclusione nello studio DESTINY-Breast04 con l'obiettivo di individuare 480 pazienti con carcinoma ormono-positivo e 60 pazienti con carcinoma ormono-negativo. I pazienti effettivamente arruolati sono stati 557 di cui 494 con tumore positivo per i recettori ormonali e 63 con tumore negativo per i recettori ormonali, approssimando la

proporzione dei sottotipi ormonali osservata nei carcinomi mammari HER2-low [109]. Il DB-04 è uno studio di fase 3, randomizzato, a due gruppi e open label, che ha incluso pazienti affetti da carcinoma mammario HER2-low non resecabile o metastatico, che avevano ricevuto una o due linee di chemioterapia per la malattia metastatica o avevano avuto recidiva durante o entro 6 mesi dal termine della chemioterapia neo-adiuvante. Per l'inclusione nello studio, i pazienti con carcinoma ormono-positivo dovevano aver ricevuto almeno una linea di terapia endocrina [109].

I pazienti arruolati sono stati successivamente trattati in maniera casuale con trastuzumab deruxtecan o, come alternativa, chemioterapia. La randomizzazione è stata eseguita in base allo status di HER2-low (score immunohistochimico 1+ vs score immunohistochimico 2+ e FISH negativa), al numero di precedenti linee chemioterapiche per la malattia metastatica (1 vs 2) e allo status di ER e PgR (HR positivo trattato o non trattato precedentemente con terapia di CDK4/6 inibitori vs HR negativo) [109]. Il trastuzumab deruxtecan (T-DXd, coniugato farmaco-anticorpo) è stato somministrato per via intravenosa ogni 3 settimane a una dose di 5,4 mg per kg di peso corporeo e il trattamento chemioterapico è stato gestito in accordo alle linee guida del National Comprehensive Cancer Network [109].

L'obiettivo primario dello studio DB-04 è stata la valutazione della sopravvivenza libera dalla progressione (PFS) tra i pazienti affetti da carcinoma mammario HR positivo e HER2-low. Altri obiettivi chiave secondari sono stati la PFS in tutti i pazienti, la durata della risposta, la sopravvivenza globale (OS) nella coorte HR positiva e in tutti i pazienti e l'efficacia della terapia nella coorte HR negativa [109].

La PFS mediana nella coorte HR positiva HER2 low è risultata di 10,1 mesi nel gruppo trattato con T-DXd e di 5,4 mesi in quello con chemioterapia [109].

Per quanto riguarda gli HER2-low, nei pazienti con score immunohistochimico 2+ (ERBB2 non amplificato in FISH) la PFS mediana era di 10,1 mesi, mentre nei casi HER2 1+ era di 10,3. Relativamente alla precedente terapia con inibitori ciclina chinasi dipendenti 4 e 6 (CDK4/6i), nei pazienti pretrattati la PFS era di 10 mesi mentre nei pazienti senza precedente trattamento di 11,7 mesi [109].

Nella casistica globale inclusa nello studio, la PFS mediana è risultata quindi di 9,9 mesi nel gruppo trattato con T-DXd e 5,1 mesi nel gruppo trattato con chemioterapia [109]. Relativamente alla OS complessiva, questa è risultata di 23,4 mesi nel gruppo trattato con T-DXd e 16,8 mesi nel gruppo trattato con chemioterapia [109]. Globalmente la durata mediana della risposta alla terapia era 10,7 mesi nel gruppo trattato con T-DXd e 6,8 mesi nei pazienti trattati con chemioterapia [109]. La percentuale totale di pazienti con una risposta obiettiva confermata era del 52,3% nel gruppo T-DXd e del 16,3% nel gruppo trattato con chemioterapia [109].

Per quanto riguarda la coorte HR positiva (494 casi), la PFS mediana era di 8,5 mesi nei pazienti trattati con T-DXd e 2,9 mesi nei pazienti sottoposti a chemioterapia [109]. La OS nella coorte positiva per i recettori ormonali era di 23,9 mesi nel gruppo trattato con T-DXd e 17,5 mesi nel gruppo trattato con chemioterapia [109]. La percentuale di pazienti con una risposta obiettiva confermata nella coorte HR-positiva era del 52,6% nei pazienti trattati con T-DXd e del 16,3% nel gruppo trattato con un agente chemioterapico [109].

Relativamente alla coorte HR negativa (63 casi), la OS era di 18,2 mesi nei pazienti a cui era stato somministrato T-DXd e di 8,3 mesi nel gruppo trattato con chemioterapia [109]. La percentuale di pazienti con risposta obiettiva confermata (ORR) era 50,0% nella coorte HR+ trattata con T-DXd e 16,7% nella coorte HR- trattata con chemioterapia [109].

In base a questi risultati, lo studio DESTINY-Breast04 ha dimostrato che il trattamento dei carcinomi della mammella HER2-low con T-DXd rappresenta un approccio terapeutico con un'efficacia superiore alla chemioterapia non mirata [106,109]. Con l'utilizzo del T-DXd il rischio di progressione della malattia o di morte è stato inferiore di circa il 50% e il rischio di morte è risultato inferiore del 36% [106,109,110]. Il DB-04 ha evidenziato la possibilità di migliorare il trattamento per oltre la metà dei pazienti HER2 negativi [109].

Sulla base di questi importanti risultati la FDA ha approvato l'uso del T-DXd per il trattamento in seconda linea dei carcinomi della mammella metastatici HER2-low [108].

Gli esiti dello studio DB-04 non si sono limitati a dimostrare il beneficio derivante dal T-DXd, ma hanno anche evidenziato la rilevanza clinica della popolazione di pazienti con bassa espressione di HER2 (HER2-low) e supportato la necessità di ridefinire i sottogruppi dei carcinomi della mammella HER2 negativi [109].

Considerando il grande interesse per quanto riguarda la gestione dei tumori mammari HER2-low in seguito ai risultati del DB-04, contestualmente è stata rivolta l'attenzione agli aspetti non ancora del tutto noti del T-DXd. Sebbene la struttura generale T-DXd sia ben definita, i meccanismi d'azione e di resistenza allo stesso non sono ancora completamente chiari.

L'obiettivo dello studio di fase 2 DAISY è stato proprio la comprensione di questi meccanismi, allo scopo di portare ad una migliore selezione del trattamento per i pazienti e al potenziale sviluppo di strategie di trattamento combinatorio più efficaci [104].

Lo studio DAISY, pubblicato su Nature Medicine nel 2023, ha valutato l'efficacia del farmaco in pazienti affetti da carcinoma mammario metastatico suddivisi in base allo stato di espressione di HER2. Per quanto riguarda i criteri adottati per l'inclusione, i pazienti dovevano aver ricevuto almeno una linea di chemioterapia nel setting metastatico e avere un sito metastatico non osseo facilmente accessibile alla biopsia. Relativamente allo stato di HER2, i pazienti HER2 positivi dovevano essere stati precedentemente trattati con taxani e mostrato resistenza a trastuzumab e trastuzumab emtansine, mentre i pazienti HER2 negativi con score 2+ e FISH negativa o score 1+ dovevano aver già ricevuto antracicline e taxani. I pazienti con tumori HR positivi dovevano essere resistenti alla terapia endocrina e agli inibitori CDK [104].

Tra il 4 novembre 2019 e il 3 marzo 2021 nello studio DAISY sono stati arruolati 186 pazienti e assegnati ad una coorte specifica in relazione allo stato di HER2, definito sulla base della biopsia eseguita all'ingresso nello studio [104].

La prima coorte era costituita da 72 pazienti con carcinoma della mammella metastatico HER2 positivo (score immunohistochimico 3+ o 2+ con ERBB2 amplificato in FISH), il secondo gruppo era formato da 74 pazienti con carcinomi HER2-low (score immunohistochimico 2+ con FISH negativa o score 1+) e la terza coorte era rappresentata

da 40 pazienti HER2 0. I pazienti delle tre coorti hanno ricevuto, ogni 21 giorni, 5,4 mg di T-DXd per kg di peso corporeo fino a progressione della malattia o tossicità non accettabile [104].

Uno degli obiettivi principali dello studio DAISY è stata la valutazione del tasso di risposta obiettiva (ORR). Nella casistica globale, una risposta obiettiva è stata rilevata nel 48,6% dei pazienti (86 casi). Nello specifico delle tre coorti l'ORR è stata del 70,6% (48 casi) negli HER2 positivi, del 37,5% (27 casi) negli HER2-low e del 29,7% (11 casi) negli HER2 0 [104].

Altri obiettivi dello studio DAISY sono stati la valutazione, per le tre coorti, della durata della risposta, della PFS e del tasso di beneficio clinico [104].

La durata mediana della risposta è risultata essere di 9,7 mesi nella coorte HER2 positiva, 7,6 mesi negli HER2-low e 6,8 mesi negli HER2 0. La PFS mediana, dopo un follow-up mediano di 15,6 mesi, è stata di 11,1 mesi nei carcinomi HER positivi, 6,7 mesi nella coorte HER2-low e 4,2 mesi nel gruppo con score HER2 0. In relazione alle caratteristiche cliniche, i tumori HER2 positivi erano associati a una PFS più lunga e i carcinomi con score 0 a una PFS più breve [104]. In particolare, il T-DXd ha mostrato un'attività antitumorale anche nelle pazienti appartenenti alla coorte HER2 0, anche se l'entità dell'effetto del trattamento è stata minore rispetto alle altre due coorti di pazienti. Infatti, il tasso di beneficio clinico è risultato 85,3% nella coorte HER2 positiva, 56,9% nella coorte HER2-low e 35,1 % nella coorte HER2 0 [104].

Nello studio DAISY sono stati esaminati i modelli di espressione di HER2 nelle tre coorti come obiettivo esplorativo ed è stato anche valutato se la distribuzione spaziale di HER2 potesse predire la risposta al farmaco nei pazienti HER2 positivi [104].

Lo studio ha valutato la predittività dei livelli di espressione di HER2 anche per i pazienti della coorte HER2 0. L'espressione del gene ERBB2 è stata valutata mediante reazione a catena della polimerasi a trascrizione inversa (RT-PCR) in 24 campioni tumorali. Tra i pazienti con espressione di ERBB2 inferiore alla mediana, 5 su 14 hanno presentato una ORR, mentre dei pazienti con espressione di ERBB2 superiore alla mediana l'ORR è stata osservata in 3 casi su 10 [104].

31 carcinomi rappresentati da campioni ottenuti da biopsia basale di pazienti della coorte HER2 0 sono stati esaminati per quanto riguarda la valutazione di HER2 in immunohistochimica da due patologi che hanno rilevato un certo livello di espressione del recettore in 15 campioni. Di questi, 8 sono stati classificati come “HER2-ultralow” (score >0 e <1) e 7 come HER2-low con score 1+ [104].

Una risposta obiettiva confermata era stata osservata nel 40% (6 casi) dei 15 pazienti della coorte HER2 0 con espressione rilevabile della proteina, mentre tra i restanti 16 tumori HER2 0, del tutto privi di espressione proteica, è stata osservata una ORR del 25% (4 casi) [104].

I risultati dello studio DAISY hanno fornito prove a supporto del fatto che l'espressione di HER2 è un fattore determinante per l'efficacia del T-DXd.

Tuttavia, il T-DXd è risultato efficace sia in carcinomi HER2 positivi che in carcinomi a bassa espressione di HER2 ed è stata riscontrata una risposta obiettiva nel 29,7% dei pazienti con carcinomi della mammella HER2 0 [106].

Pertanto, quello che emerge dallo studio DAISY, è che è stata osservata, una modesta attività antitumorale anche nei pazienti con score 0 [104]. Ciò suggerisce che livelli anche molto bassi di HER2 potrebbero consentire l'efficacia del farmaco e/o che l'effetto del T-DXd potrebbe essere in parte mediato da meccanismi indipendenti da HER2 [104].

Nello studio DAISY il 48% dei vetrini cui era stato assegnato score 0 (15 casi) era comunque caratterizzato da un'espressione rilevabile di HER2 [104]. In un altro studio, il 67% dei 364 casi di cancro al seno classificati HER2 0 in immunohistochimica presentava un'espressione di HER2 rilevabile mediante l'utilizzo dell'immunofluorescenza quantitativa [104,111]. Nel complesso, questi dati suggeriscono quindi che, tra i carcinomi con score immunohistochimico 0, ci siano anche quei casi con un certo livello di espressione di HER2 e che un sottogruppo di questi sia sensibile al trattamento con T-DXd [104].

Sulla base di un'analisi traslazionale dello studio DAISY, Bardia ha affermato come l'attività del T-DXd possa essere legata alla distribuzione spaziale di HER2 all'interno del tumore. In particolare, nei casi in cui le cellule esprimenti HER2 siano raggruppate in

cluster la risposta potrebbe essere maggiore, mentre se queste cellule fossero spazialmente lontane potrebbe essere minore [112]. Il basso assorbimento del T-DXd suggerisce fortemente che l'attività del farmaco in queste cellule sia dovuta al cosiddetto "effetto spettatore", per cui il carico utile fornito alle cellule tumorali si diffonde attraverso le membrane cellulari nelle cellule tumorali vicine [112].

Sull'onda dei risultati del DESTINY-Breast04 sono stati avviati numerosi studi volti a indagare l'efficacia di terapie anti-HER2 in carcinomi della mammella HER2 negativi.

Uno studio attualmente in corso è il DESTINY-Breast06 (DB-06). Questo studio valuterà l'efficacia, la sicurezza e la tollerabilità di T-DXd rispetto alla chemioterapia scelta dallo sperimentatore in pazienti con carcinoma mammario positivo al recettore del fattore di crescita epidermico HER2 low, positivo al recettore ormonale (HR+), la cui malattia è progredita con la terapia endocrina in ambito metastatico [113]. Analogamente al DESTINY-Breast04, la metà dei pazienti riceverà T-DXd, mentre l'altra metà riceverà chemioterapia, opzione di trattamento comune per i carcinomi della mammella HR positivi e HER2 negativi come seconda linea dopo diverse terapie endocrine per la malattia metastatica [104].

Un aspetto fondamentale del DB-06 riguarda l'inclusione nello studio in base allo stato di HER2. A differenza del DB-04, nel DB-06 tutte le pazienti devono avere un'espressione storicamente confermata di HR positiva (positiva al recettore degli estrogeni e/o al recettore del progesterone), HER2-low (definita come IHC2+/ISH- e IHC 1+) o HER2 IHC >0 <1+, come determinato dai risultati dei test di laboratorio centrali, carcinoma mammario avanzato o metastatico [113]. Il concetto di terapia target per gli HER2-low, alla base del DB-04, viene ripreso e allargato ai casi con una espressione di HER2 ancora più bassa rispetto ai carcinomi della mammella con score 1+. Il termine "HER2-ultralow" è stato proposto per i carcinomi della mammella caratterizzati da uno score immunoistochimico >0 e <1+ e potrebbe essere confermato come sottogruppo responsivo al T-DXd nello studio DESTINY-Breast06 [61].

Infatti, l'obiettivo del DB-06 è valutare se T-DXd porti benefici nei pazienti con carcinoma mammario HR+ HER2-low e "ultralow" metastatico che hanno già ricevuto

terapie endocrine. Il fine è valutare se il farmaco può comportare un incremento della PFS e della OS rispetto alla chemioterapia standard. Questo studio verificherà anche se il T-DXd può essere associato a minori effetti collaterali o una migliore qualità della vita rispetto alle chemioterapie standard [114].



## 2. SCOPO del LAVORO

Alla luce del clima di attuale interesse per la gestione del carcinoma della mammella a bassa espressione di HER2 generato dai recenti studi (DB-04, DAISY e DB-06 attualmente in corso), lo scopo di questo lavoro è stato rivalutare una popolazione di tumori della mammella HER2 0 al fine di individuare quei casi che, pur rientrando in questo score immunohistochimico, potevano essere caratterizzati da una percentuale di cellule tumorali con una positività di membrana debole e incompleta compresa tra >0 e 10% e, nel contempo, individuare i casi con totale assenza di positività.

E' bene precisare che, attualmente, la terminologia HER2 low può essere utilizzata per definire il sottogruppo di tumori HER2 negativi con score 1+ o 2+ non amplificati secondo la definizione utilizzata nello studio DB-04, mentre i termini "HER2-ultralow" e "HER2-null" non compaiono ancora sul referto immunohistochimico, ma potrebbero essere utilizzati in futuro in base ai risultati dello studio DESTINY-Breast06 (DB-06) attualmente in corso.

In questo lavoro, abbiamo poi cercato di approfondire il pattern di espressione immunohistochimica per i tumori in cui è stata riscontrata debole e incompleta positività in  $\leq 10\%$  delle cellule tumorali.

Prendendo spunto dallo studio DAISY abbiamo quindi cercato di valutare la distribuzione spaziale delle cellule considerate positive in immunohistochimica. Infatti, la distribuzione spaziale delle cellule positive all'interno del tumore potrebbe, tramite l'effetto cosiddetto "bystander" o "spettatore", influenzare l'azione del farmaco sulle cellule tumorali HER2 negative.

I risultati dello studio DAISY mostrano, infatti, che nei casi in cui le cellule tumorali debolmente positive per HER2 sono raggruppate a cluster la risposta alla somministrazione del farmaco è maggiore rispetto ai casi in cui le cellule sono spazialmente isolate. E tale fenomeno risulterebbe dal fatto che la positività per HER2 permetterebbe alla componente anticorpale del farmaco di individuare le poche cellule tumorali che esprimono debolmente HER2. E grazie all'effetto bystander verrebbero colpite dal

farmaco anche le cellule tumorali limitrofe, indipendentemente dall'espressione dell'antigene HER2. La risposta al trattamento non risulterebbe quindi influenzata soltanto dalla presenza o assenza dell'antigene HER2, ma anche dalla sua distribuzione spaziale.

La rivalutazione dei carcinomi con score HER2 0 potrebbe rappresentare pertanto una modalità per ridefinire e allargare il pool di pazienti potenzialmente trattabili con terapie a base di coniugati farmaco-anticorpo come il trastuzumab deruxtecan.

### 3. MATERIALI E METODI

È stato condotto uno studio retrospettivo relativo a pazienti con carcinoma mammario invasivo e caratterizzazioni dei fattori prognostico-predittivi con HER2 noto, selezionati dal database dell'Anatomia Patologica dell'ASLCN2, attualmente Ospedale "Michele e Pietro Ferrero" di Verduno, nel periodo compreso dall'1 Gennaio 2018 al 31 Dicembre 2022.

I campioni, rappresentati da biopsie preoperatorie, pezzi operatori, e biopsie di ri-caratterizzazione di un sito metastatico, sono stati inseriti in forma anonimizzata in un database dedicato. Per ciascuno sono stati specificati i fattori prognostico-predittivi (ER, PgR, Ki-67/MIB-1 ed HER2).

Per la corretta determinazione dei recettori ormonali, Ki-67/MIB-1 e HER2 sono state tenute sotto controllo le varie fasi dall'allestimento alla lettura e interpretazione microscopica dei preparati.

In particolare, per l'ottimizzazione della valutazione dello stato HER2-low sono state seguite le procedure operative standard (SOP) che forniscono un esame critico dell'intero processo relativo all'HER2 comprendendo le fasi preanalitica, analitica e post-analitica.

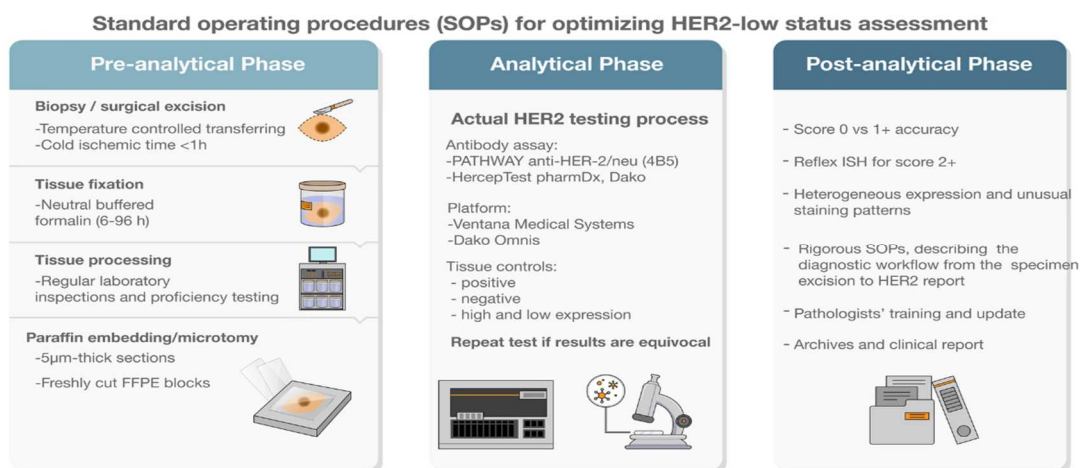


Fig.12 Procedure operative standard (SOP) per ottimizzare la valutazione dello stato di HER2-low [114]

Per quanto riguarda la fase preanalitica ci si è attenuti alle raccomandazioni relative, (GIPaM 2015) volte a ridurre al minimo il tempo di ischemia fredda, ovvero quello che

intercorre dall'escissione del tessuto al suo collocamento nel liquido di fissazione, variabile importante che può determinare un'alterata antigenicità dei tessuti. La standardizzazione di questo tempo entro l'ora sembra essere uno step molto importante al fine di garantire la conservazione dei livelli di espressione proteica finalizzati alla determinazione di target quali ER e PgR, ma anche degli altri marcatori (Ki-67/MIB-1 e HER2).

I campioni (biopsie e pezzi operatori) pervenuti presso il laboratorio di Anatomia Patologica, dopo valutazione macroscopica da parte del patologo sono stati fissati in formalina per un periodo di tempo compreso tra le 6 e le 72 ore. Dopodiché, il campione è stato incluso in paraffina e successivamente tagliato in sezioni di 2-4 µm di spessore.

Queste sezioni sono state colorate con ematossilina-eosina (EE) per l'osservazione morfologica ai fini diagnostici e con le tecniche di immunistochemica allestite sullo strumento DAKO Omnis per la valutazione dell'espressione proteica di ERα (clone EP1, Dako), PgR (clone 1294, Dako) e Ki-67 (clone MIB-1, Dako). Per la valutazione dell'espressione di HER2 è stato utilizzato il Kit HercepTest™ (Dako).

L'espressione di ER, PgR, Ki-67/MIB-1 e HER2 è stata valutata all'interno della componente di carcinoma invasivo seguendo le raccomandazioni ASCO/CAP in vigore attualmente.

In particolare, lo stato di ER è stato classificato come segue:

- ER positivo in caso di colorazione  $\geq 10\%$ ;
- ER low-positive in caso di colorazione compresa tra 1% e 9%;
- ER negativo in caso di colorazione  $< 1\%$ ;

Per quanto riguarda il recettore per il PgR è stato classificato secondo i seguenti criteri:

- PgR positivo in caso di colorazione  $\geq 1\%$ ;
- PgR negativo in caso di colorazione  $< 1\%$ ;

La valutazione del Ki-67/MIB-1 è stata fatta in accordo con le raccomandazioni dell'International Ki-67 Breast Cancer Working Group (IKWG), valutando, indipendentemente dall'intensità di colorazione, fino a 400 cellule di carcinoma invasivo in un massimo di quattro campi microscopici e includendo aree hotspot, nel caso del pezzo operatorio, mentre sulla biopsia è stata valutata l'intera sezione tumorale.

Per quanto riguarda l'attribuzione dello score di HER2 sono state seguite le vigenti raccomandazioni ASCO/CAP che prevedono i seguenti score:

- Score 0: assenza di colorazione o colorazione di membrana incompleta, debole/ appena percettibile in  $\leq 10\%$  delle cellule tumorali;
- Score 1+: colorazione di membrana incompleta debole/appena percettibile in  $> 10\%$  delle cellule tumorali;
- Score 2+ (equivoco): colorazione completa della membrana da debole a moderata osservata in  $> 10\%$  delle cellule tumorali;
- Score 3+: colorazione di membrana circonferenziale, completa, intensa in  $> 10\%$  delle cellule tumorali;

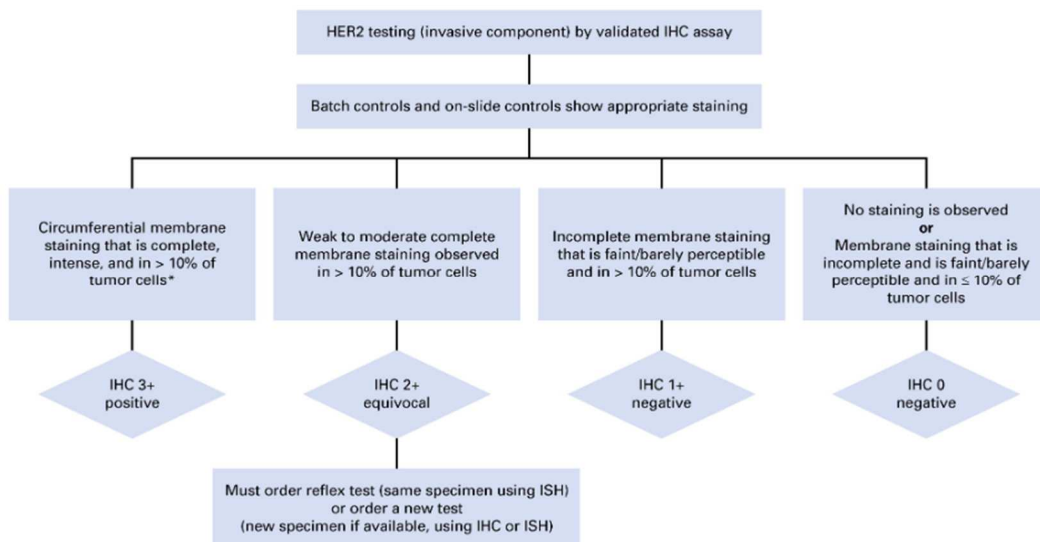


Fig. 13 Algoritmo per la valutazione dell'espressione di HER2 con metodica immunohistochimica (IHC) [64]

I campioni con colorazioni in immunohistochimica per HER2 considerate equivocate (score 2+) sono stati sottoposti a indagine con metodica FISH (ibridazione *in situ* fluorescente). Un approccio di questo tipo è stato anche utilizzato per alcuni sottotipi specifici di tumore della mammella con una colorazione immunohistochimica da moderata a intensa, ma incompleta (basolaterale o laterale), oppure con una colorazione immunohistochimica della membrana circonferenziale, intensa, ma in  $\leq 10\%$  delle cellule tumorali (eterogenea, ma limitata in estensione).

Pertanto, le sezioni di carcinoma invasivo a cui è stato attribuito score 2+ in immunohistochimica sono state approfondite con indagini FISH.

Per la FISH è stato utilizzato il kit HER2 IQFISH pharmDx (Dako Omnis), un saggio di ibridazione *in situ* in fluorescenza diretta, progettato per la determinazione quantitativa dell'amplificazione del gene HER2 in campioni tissutali di cancro mammario fissati in formalina e inclusi in paraffina. È costituito da una miscela di sonde di DNA marcate con Texas Red che copre una regione di 218 kb comprendente il gene HER2 sul cromosoma 17 e da una miscela di sonde di acido peptidonucleico (PNA) fluorescente dirette contro la regione centromerica del cromosoma 17 (CEN-17). L'ibridazione specifica dei due bersagli comporta la generazione di un segnale fluorescente rosso in corrispondenza di ciascun locus del gene HER2 e di un segnale fluorescente verde in corrispondenza del centromero di ciascun cromosoma 17.

La valutazione dell'amplificazione del gene HER2 tramite HER2 IQFISH pharmDx è un metodo interamente automatizzato eseguito dallo strumento Dako Omnis.

L'interpretazione dei risultati derivanti dalla lettura in FISH è stata eseguita sulla base delle raccomandazioni ASCO CAP 2018.

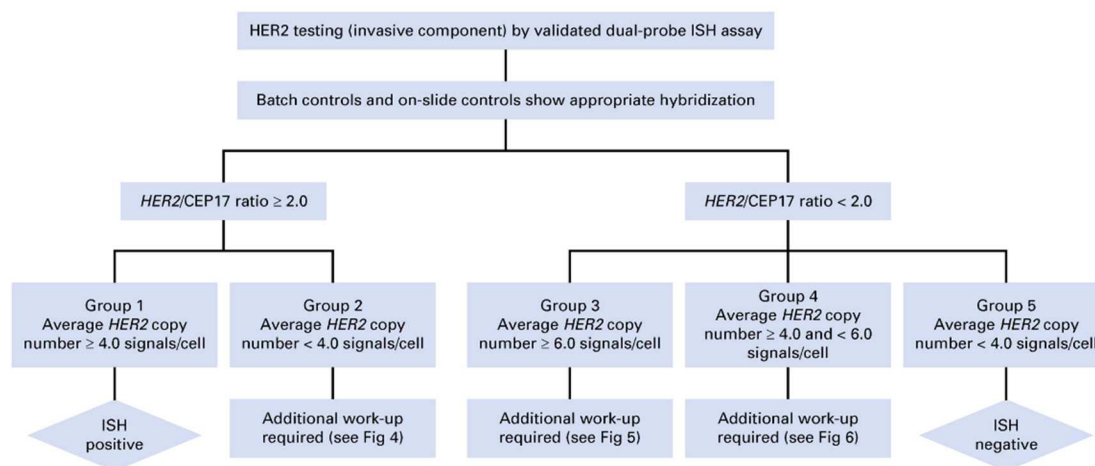


Fig.14 Algoritmo per la valutazione dell'amplificazione genica di HER2 mediante metodica di ibridazione *in situ* (ISH) [64]

Come mostrato in figura 14, l'analisi dei risultati ottenuti con la FISH ha portato alla suddivisione dei pazienti in diversi gruppi:

- Gruppo 1, FISH positiva: HER2/CEP17 maggiore o uguale a 4 e numero di copie HER2 uguale o maggiore di 4 segnali per cellula (Fig.14);
- Gruppo 2, necessari approfondimenti: HER2/CEP17 maggiore o uguale a 2 e numero di copie HER2 minore di 4 segnali per cellula (Fig.15);
- Gruppo 3, necessari approfondimenti: HER2/CEP17 minore di 2 e numero copie di HER2 uguale o maggiore di 6 segnali per cellula (Fig.16);
- Gruppo 4, necessari approfondimenti: HER2/CEP17 minore di 2 e numero di copie di HER2 maggiore o uguale a 4 e minore di 6 segnali per cellula (Fig.17);
- Gruppo 5, FISH negativa: HER2/CEP17 minore di 2 e numero di copie di HER2 minore di 4 segnali per cellula (Fig.14);

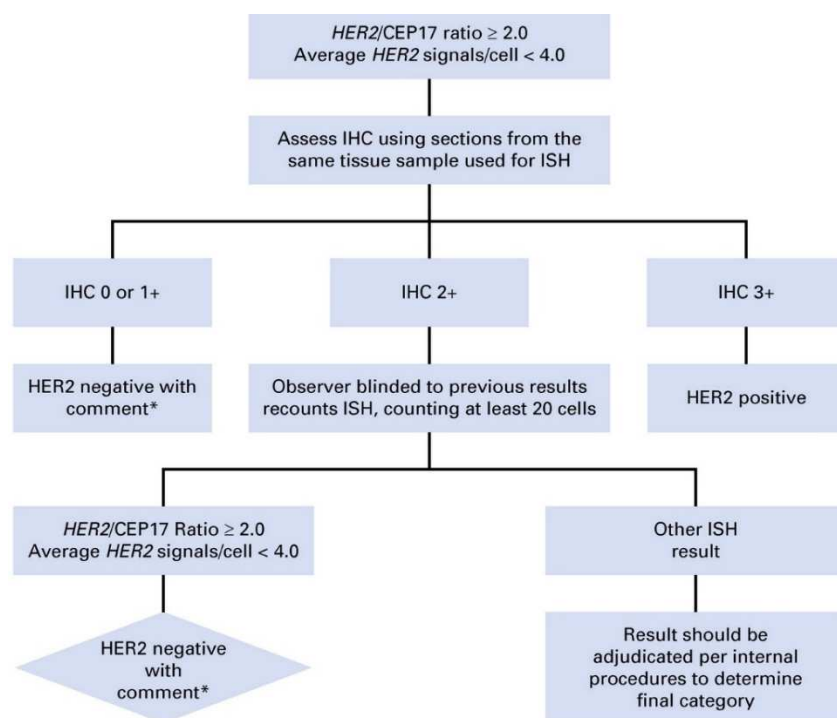


Fig. 15 Gruppo 2 casi con rapporto HER2/CEP17  $\geq 2,0$  e numero medio di copie di HER2 di  $< 4,0$  per cellula [64]

Nei casi rientranti nel gruppo 2 (Fig.15), in base alle raccomandazioni, lo score immunohistochimico per HER2 deve essere utilizzato per integrare la FISH e definire lo stato di HER2 (se lo score immunohistochimico è risultato 3+ allora il tumore è stato diagnosticato HER2-positivo, mentre se lo score immunohistochimico è risultato 0 o 1+, allora il tumore è stato refertato come HER2-negativo).

In questo studio l'immunohistochimica dell'HER2 è stata utilizzata come test primario e pertanto sono stati inviati alla FISH solo i casi già diagnosticati come equivoci (score 2+). Pertanto, il patologo ha seguito le raccomandazioni che prevedono un'ulteriore valutazione in FISH comprendente almeno 20 cellule, aggiornando eventualmente il risultato derivante dal nuovo conteggio. Se invece il precedente risultato in FISH viene confermato, allora il campione è stato considerato HER2 negativo, e riportato con un commento relativo.

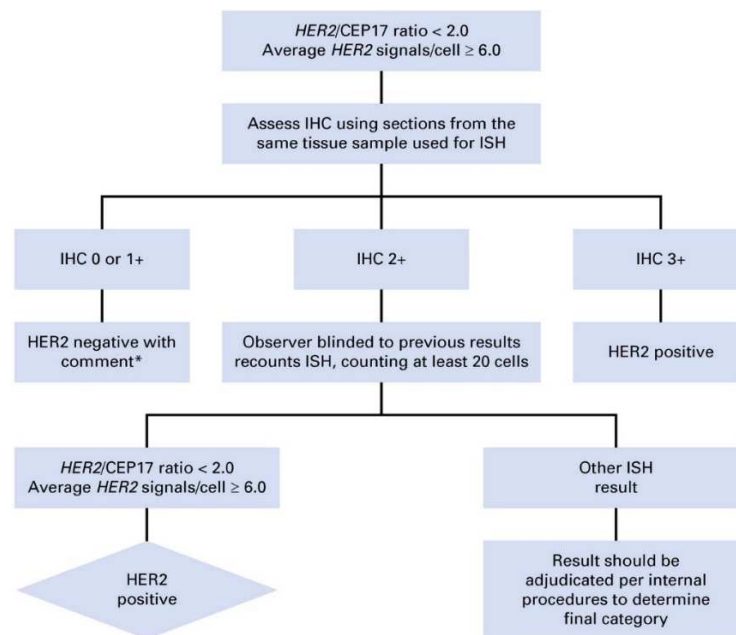


Fig.16 Gruppo 3 casi un rapporto HER2/CEP17 <2,0 e numero medio di copie di HER2 di ≥6,0 per cellula [64]



Anche nei casi rientranti nel gruppo 3 (Fig.16), il patologo ha eseguito un ulteriore conteggio comprendente almeno 20 cellule. Se il precedente risultato in FISH è risultato confermato allora il campione è stato considerato HER2 positivo e riportato sul referto un commento aggiuntivo.

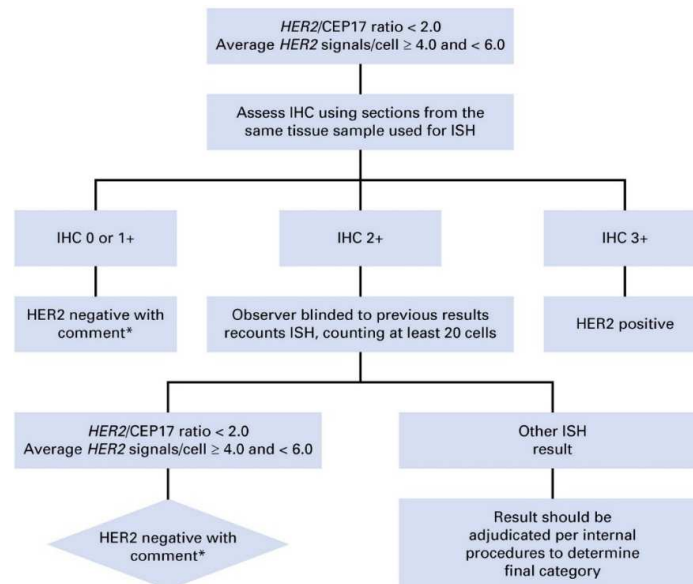


Fig.17 Gruppo 4 casi con rapporto HER2/CEP17 <2,0 e numero medio di copie di HER2 ≥4,0 e <6,0 per cellula [64]

Anche nei casi rientranti nel gruppo 4 (Fig.17), è stato eseguito un conteggio ulteriore in FISH comprendente almeno 20 cellule. Se il precedente esito in FISH è risultato confermato allora il campione è stato considerato HER2-negativo con commento.

Pertanto, in questo studio, considerati i risultati della valutazione immunohistochimica e dell'eventuale FISH, lo stato di HER2 è stato interpretato come segue:

- Positivo: in caso di punteggio 3+ in immunohistochimica e/o 2+ con amplificazione HER2 in FISH;
- Negativo: in caso di punteggio 0/1+ o 2+ in immunohistochimica in assenza di amplificazione di HER2 in FISH;

Ai fini di questo lavoro i casi HER2 interpretati come negativi sono stati ulteriormente sottoclassificati in:

- HER2-low positive: in caso di score immunoistochimico 1+ o 2+ in assenza di amplificazione in FISH;
- HER2 0: in caso di score immunoistochimico 0;

In questo studio, ci si è concentrati sulla casistica dei tumori refertati come HER2 0 dall'1 Gennaio 2018 al 31 Dicembre 2022. Questi casi sono stati oggetto di riletture tramite l'osservazione dei corrispondenti vetrini al microscopio. Una volta eseguita la rivalutazione microscopica, è stato fatto un tentativo per un'ulteriore sotto-classificazione come:

- HER2 0: con assenza di colorazione immunoistochimica;
- HER2 0: con colorazione di membrana incompleta, debole/appena percettibile in  $\leq 10\%$  delle cellule tumorali;

Inoltre, nei casi in cui è stata riscontrata una colorazione di membrana debole e incompleta (in meno del 10% delle cellule tumorali), la percentuale di positività è stata valutata distinguendo tra cellule tumorali disposte in forma isolata e cellule tumorali disposte a cluster (Tab.13).

STATO HER2		VALUTAZIONE		
		IHC	FISH	
POSITIVO		3+		
		2+	amplificata	
NEGATIVO	LOW	2+	non amplificata	
	POSITIVE	1+		
	HER2 0	0	RILETTURA	
			0% (assenza di colorazione)	
Colorazione di membrana incompleta e debole/appena percettibile in $\leq 10\%$ cellule tumorali			Cellule isolate	
			Cluster	

Tab.13 Modello utilizzato per la revisione della casistica HER2 score 0 inclusa nel nostro studio

Si è inoltre cercato di studiare per tutti i casi in cui si era in possesso del materiale biologico della sede tumorale primitiva e della sede metastatica l'evoluzione fenotipica tra malattia primitiva e metastatica.

## 4. RISULTATI

### 4.1 CASISTICA GENERALE

In questo studio, sono state incluse 890 determinazioni relative ai fattori prognostico-predittivi di carcinomi mammari invasivi con HER2 noto analizzati presso il reparto di Anatomia Patologica dell'Ospedale "Michele e Pietro Ferrero" di Verduno (ASL CN2) nel periodo compreso tra l'1 Gennaio 2018 e il 31 Dicembre 2022.

#### 4.1.1 Stato di ER e PgR

Per quanto riguarda lo stato di espressione dei recettori ormonali nella popolazione in esame (Tab.14), 774 casi (87%) sono risultati positivi per il recettore per gli estrogeni, e di questi 10 casi (1%) hanno mostrato un'espressione di tipo low (inferiore al 10% in immunohistochimica). I restanti 116 casi (13%) sono risultati negativi per i recettori estrogenici.

Per quanto riguarda il progesterone, 623 casi (70%) sono stati caratterizzati da positività recettoriale mentre i restanti 267 (30%) sono risultati negativi.

RECETTORE	CATEGORIA	n	%	
ESTROGENO	ER+ 774 casi (87%)	ER positivo	764	86%
		ER-low positivo	10	1%
	ER -	116	13%	
PROGESTERONE	PgR +	623	70%	
	PgR -	267	30%	

Tab.14 Stato di ER e PgR

Ad un'analisi complessiva relativamente allo stato di ER e PgR emerge quindi come le determinazioni positive per i recettori ormonali (HR+) rappresentano l'87% dei tumori analizzati (774 casi). Di questi, il 70% (621 casi) presenta positività anche per il recettore del progesterone mentre il rimanente 17% (153 casi) è caratterizzato esclusivamente dalla positività del recettore estrogenico. Inoltre, va sottolineato che i 10 casi ER low,

caratterizzati da bassi livelli di espressione per il recettore estrogenico (<10% in immunohistochimica) rientrano nei tumori ER positivi con recettore per progesterone negativo.

Le determinazioni negative per i recettori ormonali (HR-) rappresentano invece il 13% (116 casi) (Tab.15 e 16).

N= 890 casi	RECETTORI ORMONALI POSITIVI (HR+)		RECETTORI ORMONALI NEGATIVI (HR-)	
	N	%	n	%
ER+ e PgR+	621	70%	0	
ER+ e PgR-	153	17%	0	
ER- e PgR-	0		116	13%

Tab.15 Suddivisione dei casi in base all'espressione di ER e/o PgR

N= 890 casi	N	%
HR+	774	87%
HR-	116	13%

Tab.16 Suddivisione dei casi in base all'ormono-responsività.

#### 4.1.2 Ki-67/MIB-1

Per quanto riguarda la valutazione dell'indice proliferativo è stata calcolata la mediana interna del laboratorio. Sulla base di 880 determinazioni disponibili all'interno della casistica presa in esame, è stato ottenuto un valore pari a 18%. Questo riferimento è stato utilizzato in questo lavoro come discriminante tra carcinomi ad alto indice proliferativo e a basso indice proliferativo. Per 10 casi non è risultato disponibile il dato relativo al Ki-67/MIB-1 e ciò ha comportato l'esclusione di questi tumori dall'analisi.

Tenendo presente il 18% (mediana interna del laboratorio) come possibile valore discriminante per quanto riguarda l'attività proliferativa, sono stati individuati 468 casi (53%) ad alto indice proliferativo e 412 casi (47%) a basso indice proliferativo (Tab.17).

N= 880 casi	Cut-off	N	%
ALTO INDICE PROLIFERATIVO	Ki-67/MIB-1>18%	412	47%
BASSO INDICE PROLIFERATIVO	Ki-67/MIB-1≤18%	468	53%

Tab.17 Tumori a alto e basso indice proliferativo (sulla base della mediana interna del laboratorio)

Utilizzando invece come valore soglia il 20%, riferimento perlopiù utilizzato in termini generali in vari lavori presenti in letteratura, si possono identificare 389 casi (44%) ad alto indice proliferativo e 491 casi (56%) a basso indice proliferativo (Tab.18).

N= 880 casi	Cut-off	N	%
ALTO INDICE PROLIFERATIVO	Ki-67/MIB-1>20%	389	44%
BASSO INDICE PROLIFERATIVO	Ki-67/MIB-1≤20%	491	56%

Tab.18 Tumori ad alto e basso indice proliferativo (sulla base del valore 20%)

#### 4.1.3 HER2

Per quanto concerne la valutazione dell'HER2, sulle 890 determinazioni disponibili, 71 casi (8%) sono risultati essere positivi, con score immunostochimico 3+, 513 casi (58%) sono stati classificati con score immunostochimico 1+, 153 casi (17%) con score 2+ e 153 casi (17%) con score 0 (Tab.19).

	IHC HER2	n	%
N=890	Score 3+	71	8%
	Score 2+	153	17%
	Score 1+	513	58%
	Score 0	153	17%

Tab. 19 Stato di HER2 in base agli score di immunostochimica

Dei 153 tumori interpretati come equivoci (score 2+) in immunohistochimica, 144 (94%) sono stati inviati ad indagine con metodica FISH, mentre 9 casi (6%) non sono stati ulteriormente approfonditi in sede. Si tratta di alcuni casi biotici per cui si rimanda allo score attribuito al pezzo operatorio. Dei 144 tumori approfonditi con metodica FISH, 118 (77%) sono risultati negativi e quindi privi di amplificazione per il gene ERBB2 mentre 26 casi (17%) sono risultati FISH positivi (Tab.20).

<b>SCORE 2+</b> <b>N=153</b>	144 casi	<b>FISH AMPLIFICATA</b>	
		26 casi	17%
		<b>FISH NON AMPLIFICATA</b>	
		118 casi	77%
	9 casi	<b>FISH non eseguita</b>	
		6%	

*Tab.20 Risultato FISH dei casi con score 2+*

Quindi, in base allo stato di HER2 ulteriormente approfondito con metodica FISH, è stato possibile categorizzare 881 casi, che sono stati suddivisi in HER2 positivi (score 3+ e score 2+ con FISH positiva) e HER2 negativi (score 2+ con FISH negativa, score 1+ e score 0).

97 tumori (11%) sono risultati HER2 positivi. Di questi, 71 (8%) valutati con score immunohistochimico 3+ e 26 casi (3%) refertati con score 2+ e FISH positiva.

I restanti 784 casi (89%) sono risultati HER2 negativi. Di questi, 631 (72%) sono rientrati nella categoria emergente degli HER2-low. In particolare, 513 casi (58%) sono stati caratterizzati da score immunohistochimico 1+, mentre 118 (14%) presentavano score 2+ e FISH negativa.

Ai restanti 153 casi (17%) dei tumori HER2 negativi è stato attribuito score 0 (Tab.21).

	CATEGORIA	IHC	n	%	n	%
N=880	HER2 POSITIVO	Score 3+	71	8%	97	11%
		Score 2+ (a)*	26	3%		
	HER2-LOW (NEGATIVO)	Score 2+ (na)**	118	14%	631	72%
		Score 1+	513	58%		
	HER2 NEGATIVO	Score 0	153	17%	153	17%
						89%

Tab.21 Stato di HER2 dei tumori inclusi nello studio. \* amplificati. \*\* non amplificati

#### 4.1.4 HER2 e recettori romonali

Nella nostra casistica di 881 casi il gruppo di carcinomi HR+, che nel nostro studio è rappresentato dagli ER positivi è risultato costituito da 765 carcinomi (87%). Di questi, 69 sono risultati HER2 positivi (8%), con score 3+ o 2+ con FISH positiva; 570 (65%) sono risultati HER2-low con score 1+ e 2+ con FISH negativa, e 126 casi (14%) sono rientrati nello score 0.

Delle 881 determinazioni in studio 116 (13%) sono tumori HR-. Di questi, 28 casi (3%) sono stati rappresentati da tumori HER2 positivi, 61 casi (7%) sono risultati appartenere agli HER2 a bassa espressione e 27 casi (3%) a carcinomi con score 0 (Tab.22).



ER	CATEGORIA		n	%	CATEGORIA	HER2
(N=881)	765 casi (87%)	ER positivo	69	8%	HER2 positivo	(N=881)
		ER positivo	570	65%	HER2-low	
		ER positivo	126	14%	HER2 0	
	116 casi (13%)	ER negativo	28	3%	HER2 positivo	
		ER negativo	61	7%	HER2-low	
		ER negativo	27	3%	HER2 0	

Tab.22 Suddivisione dei casi ER positivi ed ER negativi in base allo stato di HER2

#### 4.1.5 Immunofenotipo

In base allo stato di ER, PgR e all'indice proliferativo Ki-67/MIB-1 si è provato a definire l'immunofenotipo di 871 casi. Sono stati esclusi dal conteggio 19 casi in quanto per 10 di essi non era disponibile il dato del Ki-67/MIB-1 e per i restanti 9 l'esito della FISH.

Nella definizione degli immunofenotipi sono stati considerati come valori soglia di Ki-67/MIB-1 sia il 18% (mediana del laboratorio), sia il 20% (indicato genericamente dal panel di esperti del St.Gallen).

La suddivisione immunofenotipica ottenuta utilizzando come valore soglia di Ki-67/MIB-1 il 18% ha visto 759 casi (87%) rientrare nella categoria dei luminali. Questi, a loro volta, sono stati rappresentati da 404 luminali A (46%), e da 68 luminali B HER2 positivi (8%) e 287 luminali B HER2 negativi (33%).

I restanti 112 casi (13%) dei tumori della nostra casistica sono stati definiti come carcinomi non luminali. Di questi 85 casi (10%) rappresentati dai carcinomi triplo negativi e 27 casi (3%) dai tumori non luminali HER2 positivi (Tab.23).

N=871	IMMUNOFENOTIPO		Ki-67/MIB-1 Cut-off 18%		Ki-67/MIB-1 Cut-off 18%	
			n	%	n	%
	Luminali 759 casi (87%)	Luminali A	404	46%	433	49%
Luminali B HER2+		68	8%	68	8%	
Luminali B HER2-		287	33%	258	30%	
Non luminali 112 casi (13%)	TNBC	85	10%	85	10%	
	HER2 positivi non luminali	27	3%	27	3%	

Tab.23 Immunofenotipi (cut-off Ki-67/MIB-1 18% e 20%)

Inoltre abbiamo provato a caratterizzare gli immunofenotipi nella nostra casistica anche utilizzando come valore soglia di Ki-67/MIB-1 il 20% indicato dal St.Gallen.

In questo caso abbiamo individuato 433 tumori luminali A e 258 tumori luminali B, osservando come 29 casi passino dai luminali B HER2 negativi ai luminali A (Tab.24).

IMMUNOFENOTIPO	Luminali B HER2+	Luminali B HER2-	Luminali A
		29 casi	
Cut-off Ki-67/MIB-1 18%	68	287	404
Cut-off Ki-67/MIB-1 20%	68	258	→ 433

Tab.24 Variazione immunofenotipi con diversi valori soglia di Ki-67/MIB-1

#### 4.2 HER2 SCORE 0

Questo studio si è focalizzato in particolare sui carcinomi refertati con HER2 score 0.

Nella casistica presa in esame, che ha incluso 890 determinazioni di HER2, sono stati individuati 153 casi di HER2 caratterizzati da score 0 in immunohistochimica (17%). Queste 153 determinazioni sono attribuibili a 138 pazienti, le cui caratteristiche clinico-patologiche sono state desunte dalle informazioni presenti all'interno del data-base dell'Anatomia Patologica (Tab.25).

Per quanto riguarda il genere, dei 138 pazienti, 136 (99%) sono di genere femminile mentre 2 (1%) di genere maschile.

L'età media e mediana alla diagnosi sono risultate rispettivamente 65 e 68 anni.

Relativamente all'istologia dei tumori, 94 casi (62%) sono stati attribuiti a istotipo non speciale (NST), 31 casi (20%) a carcinomi lobulari, 11 casi (7%) a carcinomi mucinosi e 8 casi (5%) a carcinomi metaplastici. I restanti 9 casi (6%), indicati nella tabella 12 con la dicitura "altro", erano costituiti da istotipi meno comuni, più precisamente 3 carcinomi apocrini, 2 carcinomi adenoideo-cistici, 2 carcinomi di istotipo misto, 1 carcinoma a cellule ad anello con castone e 1 carcinoma papillare.

Per quanto riguarda il grado istologico, 45 casi (29%) sono stati inquadrati come carcinomi di basso grado (G1), 70 casi (46%) di grado intermedio (G2) e 34 casi (22%) di grado elevato (G3) (Tab.25).

	CARATTERISTICHE			VARIABILI	n	%
PAZIENTI (N=138)	SESSO			F	136	99%
				M	2	1%
	ETA'	Media (Min-Max)	65 (26-94)			
Mediana		68				
TUMORI (N=153)	DIAGNOSI ISTOLOGICA			Non speciale	94	62%
				Lobulare	31	20%
				Mucinoso	11	7%
				Metaplastico	8	5%
				Altro	9	6%
	GRADO ISTOLOGICO ALLA DIAGNOSI			G1	45	29%
				G2	70	46%
				G3	34	22%
n.d. (mts)				4	3%	

Tab.25 Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti con HER2 0

Relativamente al materiale esaminato, i 153 tumori in esame erano rappresentati da 120 prelievi da pezzo operatorio (78% dei casi), da 29 biopsie a livello del sito primitivo (19%) e da 4 biopsie eseguite su localizzazione metastatica (3%) (Tab.26).

TUMORI HER2 0 (N=153)	MATERIALE ESAMINATO		n	%
	PEZZO OPERATORIO		120	78%
	BIOPSIA	Sito primitivo	29	19%
		Sito metastatico	4	3%

Tab.26 Tipologia di materiale dei tumori HER2 0

Dei 120 casi rappresentati da pezzi operatori è stata considerata anche la valutazione dei parametri T e N. Per quanto riguarda la dimensione della neoplasia, 85 casi (71%) sono

stati inquadrati come T1, 31 casi (26%) come T2, 1 caso (1%) come T3 e 3 casi (2%) come T4.

Relativamente allo stato linfonodale, 9 casi (7%) sono risultati Nx, 80 casi (67%) N0, 25 casi (21%) N1 e 6 casi (5%) N2 (Tab.27).

PEZZI OPERATORI (N=120)	STADIAZIONE		n	%
	T	T1		85
T2			31	26%
T3			1	1%
T4			3	2%
N	Nx		9	7%
	N0		80	67%
	N1		25	21%
	N2		6	5%

Tab.27 T e N dei pezzi operatori con score HER2 0

#### 4.2.1 Immunofenotipo HER2 0

I 152 casi di tumori HER2 0 di cui era noto il valore dell'indice di proliferazione cellulare Ki-67/MIB-1 sono stati suddivisi sulla base dell'immunofenotipo utilizzando il 18% come valore soglia (mediana interna del laboratorio).

127 casi (84%) sono stati ascrivibili al gruppo dei luminali, di cui 89 luminali A (59% del totale) e 38 luminali B HER2 negativi (25%). Il gruppo dei carcinomi triplo negativi è risultato costituito dai restanti 25 casi (16%).

Utilizzando invece come valore soglia il 20% (indicato come cut-off dal St. Gallen), la ripartizione nei diversi immunofenotipi ha individuato 93 luminali A (62%) e 34 luminali B HER2 negativi (22%), con variazione quindi dell'immunofenotipo per quattro carcinomi. Non è stata riscontrata nessuna variazione per i carcinomi triplo negativi (Tab.28).

IMMUNOFENOTIPO			Cut-off KI-67/MIB-1 18%	Cut-off KI-67/MIB-1 20%
			n (%)	n (%)
N=152 tumori	Luminali 127 casi 84%	Luminali A	89 (59%)	93 (62%)
		Luminali B HER2-	38 (25%)	34 (22%)
	Non luminali 25 casi 16%	TNBC	25 (16%)	25 (16%)

Tab.28 Immunofenotipo HER2 0 (cut-off Ki-67: 18% e 20%)

#### 4.2.2. Evoluzione score HER2 0 nella storia clinica dei pazienti

Le 153 determinazioni immunoistochimiche valutate come HER2 0 sono risultate attribuibili a 138 pazienti. Di questi, in 53 casi è stato possibile, tramite una ricerca nell'archivio dati, risalire a più determinazioni di HER2 su diversi materiali a disposizione, costituiti da biopsie del sito primitivo della patologia e/o pezzi operatori e/o biopsie di localizzazioni metastatiche eseguite nel corso della storia clinica dei pazienti. Si è tentato quindi di analizzare la variazione dello stato di espressione di HER2 nel corso della patologia.

In 13 pazienti (25%) il tumore è stato caratterizzato da score 0 nelle varie determinazioni, in 33 pazienti (62%) è stata osservata, nella progressione della patologia, una variazione dello score HER2 da 1+ a 0 e in 7 pazienti (13%) da 0 a 1+ (Tab.29).

		VARIAZIONE SCORE HER2	n	%
N=53 tumori		Score 0 → Score 0	13	25%
		Score 1+ → Score 0	33	62%
		Score 0 → Score 1+	7	13%

Tab.29 Analisi variazione score in pazienti con più determinazioni HER2, di cui almeno una con score 0

#### 4.2.3 Evoluzione HER2, ER e Ki-67/MIB-1 tra biopsia e pezzo operatorio

Per 42 pazienti è stato possibile analizzare la variazione dello stato di espressione di HER2, ER e KI-67/MIB-1 tra la biopsia primitiva e il pezzo operatorio.

Per quanto riguarda l'HER2, 10 tumori (24%) sono stati definiti come score 0 in entrambi i materiali, 30 (71%) sono stati caratterizzati, nel passaggio dalla biopsia al pezzo operatorio, da una variazione dello score HER2 da score 1+ a 0, e 2 (5%) da score 0 a 1 (Tab.30).

N=42 tumori	VALUTAZIONE HER2		n	%
	BIOPSIA	PEZZO OPERATORIO		
	Score 0 →	Score 0	10	24%
	Score 1+ →	Score 0	30	71%
	Score 0 →	Score 1+	2	5%

*Tab.30 Evoluzione score HER2 tra biopsia e pezzo operatorio*

Per 40 pazienti è stata studiata anche l'evoluzione dello stato di espressione del recettore estrogenico e dell'indice proliferativo tra biopsia e pezzo operatorio. Sono stati esclusi 2 pazienti perché presentavano tumori con doppia componente, sulla quale i recettori e l'indice proliferativo sono variati in modo differente.

38 tumori (95%) hanno presentato lo stesso stato di ER nelle due tipologie di materiale. In particolare, 31 tumori (77,5%) sono risultati rimanere ER positivi e 7 (17,5%) ER negativi. 2 tumori (5%) sono stati invece caratterizzati per una negativizzazione per quanto concerne la valutazione del recettore estrogenico nel passaggio da biopsia a pezzo operatorio (Tab.31).

N=40 tumori	VALUTAZIONE ER		n	%
	BIOPSIA	PEZZO OPERATORIO		
	ER+ →	ER+	31	77.5%
	ER- →	ER-	7	17.5%
	ER+ →	ER-	2	5%

Tab.31 Espressione ER tra biopsia e pezzo operatorio.

Per quanto riguarda il Ki-67/MIB-1 nel campionamento biotico e nel prelievo da intervento operatorio, in 3 tumori (7.5%) il valore è rimasto costante, mentre, nel passaggio tra biopsia e pezzo operatorio, in 18 tumori (45%) è aumentato e in 19 tumori (47.5%) è diminuito.

La variazione dell'indice di proliferazione è risultata compresa, nei campioni in esame, tra 1 e 36% (Tab.32).

Caso	KI-67/MIB-1		Variazione %
	Biopsia	Pezzo operatorio	
1	38%	38%	-
2	5%	5%	-
3	21%	21%	-
4	38%	2%	36%
5	40%	18%	22%
6	25%	4%	19%
7	50%	35%	15%
8	6%	21%	15%
9	18%	4%	14%
10	22%	10%	12%
11	7%	18%	11%
12	23%	12%	11%
13	35%	25%	10%
14	5%	15%	10%
15	12%	2%	10%
16	26%	35%	9%
17	22%	30%	8%
18	16%	8%	8%
19	15%	23%	8%
20	5%	12%	7%



21	38%	45%	7%
22	3%	10%	7%
23	15%	10%	5%
24	35%	40%	5%
25	30%	35%	5%
26	70%	65%	5%
27	10%	5%	5%
28	85%	80%	5%
29	12%	8%	4%
30	6%	3%	3%
31	10%	7%	3%
32	8%	5%	3%
33	5%	8%	3%
34	7%	10%	3%
35	28%	30%	2%
36	30%	28%	2%
37	25%	26%	1%
38	5%	6%	1%
39	21%	22%	1%
40	15%	16%	1%

*Tab.32 Valori Ki-67/MIB-1 biopsia e pezzo operatorio*

#### **4.3 RIVALUTAZIONE CASI HER2 0**

Alla luce dei risultati del recente studio DESTINY-Breast04 e in attesa della conclusione dello studio DESTINY-Breast06, abbiamo ritenuto interessante effettuare una rilettura del risultato immunohistochimico relativo all'HER2 dei 153 vetrini caratterizzati da score 0 all'atto della refertazione diagnostica.

Ponendo particolare attenzione al rilevamento della minima percentuale di cellule tumorali caratterizzate da positività di membrana debole/appena percettibile e incompleta, la revisione microscopica dei casi inclusi in questo studio ha permesso una suddivisione dei 153 tumori HER2 0 in 124 carcinomi "HER2-null" (83%), caratterizzati da score immunohistochimico 0 con assenza totale di colorazione e in 29 carcinomi "HER2-ultralow" (19%), cioè con score immunohistochimico 0, ma una percentuale di cellule tumorali con positività di membrana debole/appena percettibile e incompleta inferiore o uguale al 10% (Tab. 33).

HER 2 SCORE 0 (N=153)	RIVALUTAZIONE IMMUNOISTOCHEMICA	n	%
	“HER2-ultralow” (colorazione di membrana debole/appena percettibile e incompleta in $\leq 10\%$ )	29	19%
	“HER2-null” (assenza di colorazione IHC)	124	83%

Tab.33 Rivalutazione immunoistochimica casi HER2 0

Per quanto riguarda i tumori con espressione di HER2 “ultralow” si è cercato inoltre di caratterizzare il pattern di colorazione immunoistochimica, andando a distinguere tra positività in cellule disposte in forma isolata (Fig.18) e positività in cellule raggruppate in cluster (Fig19).

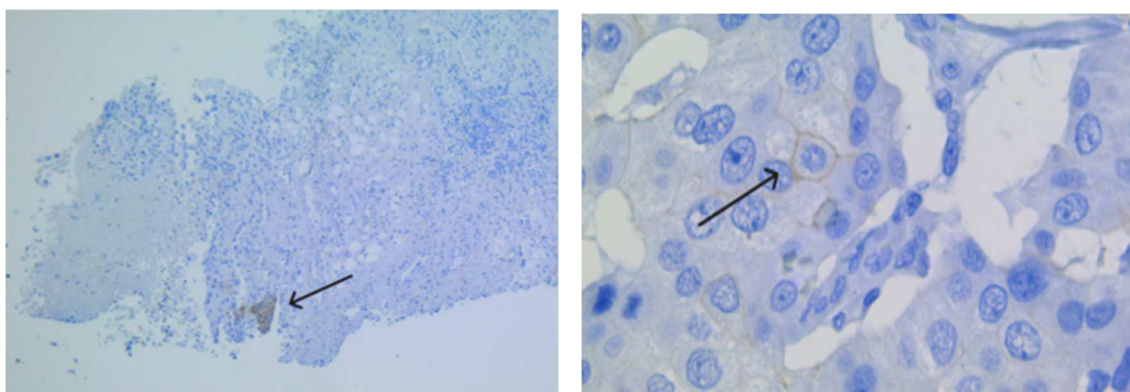


Fig.18 (a sinistra) Cluster cellulare con espressione “ultralow” di HER2(10x)

Fig.19 (a destra) Positività “ultralow” di HER2 in cellule isolate (60x)

Di questi 29 tumori “HER2 ultralow”, 27 casi (93%) sono risultati caratterizzati da un pattern di colorazione immunoistochimica a carico di cellule con positività di membrana debole/appena percettibile e incompleta disposte in piccoli gruppi e solo 2 casi (7%) hanno mostrato questo tipo di positività in cellule isolate (Tab.34).

HER2-ultralow  N= 29	RIVALUTAZIONE MICROSCOPICA		N (%)
	PATTERN	cluster	27 (93%)
		isolate	2 (7%)

*Tab.34 Risultati revisione vetrini casi HER2 0*

Volendo individuare un valore soglia per dettagliare al meglio questi casi caratterizzati da percentuali di positività così basse, si potrebbe considerare il 5% una possibile soglia discriminante tra valori di HER2 più vicino al “null” piuttosto che allo score 1+.

Così facendo, dopo una ulteriore analisi dei 29 carcinomi inquadrabili come “HER2 ultralow”, 19 casi (66%) hanno presentato colorazione di membrana non completa e debole in  $\leq 5\%$  delle cellule tumorali, mentre 10 casi (34%) sono risultati caratterizzati da debole e incompleta positività in  $>5\%$  delle cellule tumorali (Tab.35). Nello specifico, 6 casi sono stati reinterpretati con positività di membrana debole e incompleta nell’8% delle cellule tumorali e per 3 casi la percentuale di immunoreattività è risultata del 9%, al limite dello score 0 di appartenenza (Tab.35).

% Cellule positive	“HER2-ultralow” N (%)
$\leq 5\%$	19 (66%)
$>5\%$	10 (34%)

*Tab.35 Casi “HER2-ultralow” suddivisi in base a un valore intermedio di positività (5%)*

#### 4.4 CASI PARTICOLARI

Per quanto riguarda l’analisi della variazione dei fattori prognostico-predittivi tra biopsia e pezzo operatorio, dei 53 casi di cui sono risultate disponibili più valutazioni di HER2 all’interno del database sono stati esclusi 11 pazienti. Si tratta di casi particolari per i quali il materiale esaminato non ha permesso una definizione lineare della variazione di HER2 tra biopsia e pezzo operatorio.

	Score HER2 Biopsia primitivo	Score HER2 Pezzo operatorio	Score HER2 mts
1		0	1+
2	0		1+
3	1+		0
4		1+ 0	
5	1+	0 1+	0
6	1+ 0		
7	1+ 0		
8	1+		0
9		0 0	
10		0 0	
11		0 0	

*Tab.36 Casi particolari: campioni disponibili e relativo score HER2*

Per 2 pazienti erano disponibili i dati di 2 biopsie da carcinoma primitivo (casi 6 e 7) mentre per 5 pazienti erano disponibili i risultati di HER2 su 2 campionamenti da pezzo operatorio (casi 4-5-9-10 e 11).

Come si può vedere, fatta eccezione per i casi 9, 10 e 11 che hanno determinazioni HER2 sempre all'interno dello score 0, per gli altri otto casi è evidente come ci sia, nell'arco temporale delle determinazioni eseguite, almeno un risultato con score 1+ (Tab. 36)

## 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il carcinoma della mammella rappresenta una delle più frequenti patologie tumorali riscontrate nelle donne [2, 106, 115]. A partire dall'inizio del ventunesimo secolo il trattamento di questa patologia è gradualmente cambiato, passando dalla medicina empirica alla medicina basata sull'evidenza, spostandosi infine nella direzione della medicina di precisione [106,115]. L'approccio terapeutico, dalla chemioterapia, agli anticorpi monoclonali, agli inibitori tirosin-chinasici, fino ai coniugati farmaco-anticorpo (antibody-drug conjugates, ADC), ha fatto sì che la prognosi del carcinoma della mammella avanzato sia col tempo considerevolmente migliorata [106].

Strettamente legata alla scelta della terapia e alla prognosi è la classificazione molecolare del carcinoma della mammella [106]. In questo contesto, il test HER2 svolge un ruolo cruciale nel guidare la gestione clinica delle pazienti con carcinoma mammario [114].

Un'elevata espressione di HER2 può portare a proliferazione cellulare incontrollata e alla crescita del tumore con conseguenti tassi di sopravvivenza più bassi e possibilità di recidive [106]. Il test HER2 con il relativo sistema di score è stato originariamente sviluppato per predire la risposta alle terapie anti-HER2 come il trastuzumab [114].

Fino a poco tempo fa mancavano terapie efficaci mirate a HER2 per i tumori HER2 negativi. Per questo motivo in passato non c'era alcuna differenza nel trattamento del tumore tra i pazienti con bassa espressione di HER2 e i pazienti HER2 0. Infatti, gli studi avevano dimostrato che i farmaci tradizionali anti-HER2 non portavano beneficio clinico in queste categorie [114].

Tuttavia, l'avvento di nuovi coniugati anticorpo-farmaco (ADC), come il trastuzumab deruxtecan (T-DXd), che rilasciano agenti citotossici alle cellule con bassi livelli di HER2, ha aperto una nuova opzione terapeutica per questa consistente popolazione di pazienti [114].

Questa evoluzione ha generato discussioni in ambito clinico e patologico su argomenti relativi alla biologia del tumore mammario, alla diagnostica di particolari categorie di pazienti e alla gestione clinica di questa malattia, producendo diversi studi in questo ambito. Negli ultimi anni l'attenzione dei ricercatori si è quindi concentrata sui sottotipi

a bassa espressione di HER2 e sulle relative caratteristiche clinico patologiche, biologiche e molecolari. Dall'approvazione di T-DXd per le pazienti con tumore in stadio avanzato o metastatico con HER2-basso, la distinzione tra punteggi di 0 o 1+ in immunohistochimica ha acquisito un significato clinico, in quanto aiuta a identificare i pazienti che possono trarre beneficio da questo trattamento [114].

Secondo la ESMO Scale of Clinical Actionability for molecular Targets (ESCAT), che consente di classificare le alterazioni molecolari in base alla loro evidenza di azione in uno specifico tipo di cancro, la bassa espressione di HER2 (HER2-low) rappresenta un'alterazione di livello due, che necessita ancora di studi prospettici di conferma, ma per la quale è disponibile evidenza di efficacia [115].

Come affermato dal professor Viale durante un intervento relativo al management multidisciplinare del carcinoma mammario tenutosi a dicembre 2023, la gestione del carcinoma mammario sta subendo una vera e propria rivoluzione. Per più di 30 anni i patologi hanno avuto a disposizione come biomarcatori predittivi solamente il recettore estrogenico e l'HER2. Negli ultimi tempi è esplosa l'era dei biomarcatori cosiddetti "teragnostici" la cui valutazione si traduce istantaneamente in un'indicazione terapeutica. In questo nuovo contesto, HER2-low è un elemento importante. Tradizionalmente, il patologo ha sempre considerato HER2 come un bersaglio specifico di terapie mirate che inibiscono il pathway dell'HER2 e stimolano l'immunità del paziente. Ora, con l'emergere della bassa e addirittura "ultrabassa" espressione di HER2, il recettore di membrana non sarà più considerato un target, ma una sorta di stratagemma per permettere l'ingresso di farmaci ADC (coniugati farmaco-anticorpo) di nuova generazione nella cellula tumorale [116].

Circa trent'anni fa i tumori alla mammella caratterizzati da positività/amplificazione del gene ERBB2 (HER2 positivi, 15-20% di tutti i casi) erano riconosciuti come un sottotipo biologico distinto, con comportamento aggressivo e prognosi peggiore rispetto ai tumori privi di queste alterazioni molecolari (HER2 negativi, 80-85% di tutti i casi) [61]. Tuttavia si è visto che circa la metà dei carcinomi della mammella HER2 negativi si caratterizza per un'espressione rilevabile della proteina [108]. Si stima infatti che circa il

60% dei casi di tumori HR positivi/HER2 negativi e il 40% dei casi triplo negativi (TNBC) mostrino un'espressione di HER2 classificata con score 1+ o 2+ non amplificato rientrando nella categoria HER2-low [118]. Il numero di casi trattabili con terapie anti-HER2 si amplia in modo considerevole se si considerano, oltre i tumori HER2 positivi, anche le neoplasie HER2-low, stimate intorno al 50% [108,117].

Il nostro progetto ha individuato una percentuale di HER2 negativi dell'89%, in linea con i dati ESMO, confermando come la maggior parte dei carcinomi della mammella risulti negativa per HER2.

Nel nostro studio su 881 determinazioni di cui era disponibile, per i casi refertati con score 2+, anche l'esito della FISH, i tumori risultati HER2 negativi sono stati caratterizzati da score 0 nel 17% dei casi, da score 1+ nel 58% e da score 2+/non amplificato nel 14%. Quindi 631 tumori (72%) sono stati definiti da score immunoistochimico nello spettro di negatività per HER2 pur mantenendo una rilevabile espressione della proteina e ricadendo quindi nella categoria emergente degli HER2-low. Di questo gruppo di carcinomi, 570 casi sono risultati positivi per i recettori ormonali, mentre i restanti 61 sono risultati negativi. Questi dati sono in accordo con le proporzioni del sottotipo recettoriale nei tumori HER2-low inclusi nello studio DESTINY-Breast04 (DB-04) [117].

La possibilità di trattare efficacemente un gruppo tanto ampio di carcinomi mammari rappresenta uno stimolo importante per lo sviluppo di ulteriori studi sui tumori HER2-low. Punto focale della ricerca clinica in questo ambito è stato proprio lo studio DESTINY-Breast04, che ha evidenziato come il farmaco trastuzumab deruxtecan (T-DXd) porti ad un miglioramento significativo in termini di OS e PFS rappresentando una opzione terapeutica vantaggiosa nei carcinomi della mammella HER2-low precedentemente trattati [106].

Quindi sulla base dei risultati dello studio DB-04, il 72% dei carcinomi della mammella inclusi nel nostro lavoro potrebbe essere potenzialmente candidato a questa terapia, appartenendo alla categoria HER2-low.

Nella nostra casistica il 17% dei tumori è stato refertato con score immunohistochimico 0 (assenza di colorazione o colorazione debole/incompleta in <10%). Mentre nello studio DB-04 non sono stati inclusi casi con score 0, i risultati del DESTINY-Breast06 attualmente in corso potrebbero far luce su potenziali benefici della terapia con trastuzumab deruxtecan per una parte di questi pazienti [114]. Nel DB-06, infatti, sono stati inclusi tumori “HER2-ultralow”. Questo termine, utilizzato per indicare carcinomi caratterizzati da uno score immunohistochimico >0 e <1, potrebbe diventare, in futuro, un termine approvato se questa categoria emergente dovesse essere definita targettabile dagli attesi risultati dello studio DB-06 che include carcinomi con questo score immunohistochimico [61]. La dicitura “HER2-null” è stata invece utilizzata per carcinomi della mammella HER2 0 privi di colorazione immunohistochimica e potrebbe essere usata per distinguere questo gruppo di tumori (non inclusi nel DB-06) dagli “HER2-ultralow” [61].

Lo studio DAISY ha indagato i meccanismi di azione del trastuzumab deruxtecan in pazienti con carcinoma mammario pretrattato, con setting metastatico ed espressione variabile di HER2. Nello studio DAISY è emerso che 15 casi con score 0 sono risultati, in una revisione esterna, caratterizzati da un’espressione immunohistochimica incompleta e debole/appena percettibile della proteina (HER2-ultralow) in 8 casi e addirittura da score immunohistochimico 1+ in 7 casi [104].

Nel nostro studio, la riletture dei 153 tumori con score immunohistochimico 0 ha evidenziato che 124 casi (81%) non presentavano alcuna colorazione in nessuna cellula tumorale rientrando quindi negli “HER2-null”, mentre 29 casi (19%) presentavano un pattern di incompleta e debole/appena percettibile positività in ≤10% delle cellule tumorali appartenendo agli “HER2-ultralow”.

La presenza di immunoreattività relativa a HER2 in una parte di tumori refertati con score immunohistochimico 0 è documentata recentemente da uno studio condotto da Moutafi *et al.* e pubblicato nel 2022. Questo lavoro ha valutato l’espressione bassa o “ultrabassa” di HER2 su un pool di 367 casi di carcinoma mammario con score 0 utilizzando



l'immunofluorescenza quantitativa. Dai risultati è emerso come il 67% dei tumori inclusi sia risultato caratterizzato da espressione rilevabile della proteina [111].

Alla luce del risultato dello studio di Moutafi *et al.*, il sottogruppo “HER2-ultralow”, che nel nostro lavoro è risultato costituito da 29 casi (19% degli score 0 totali), potrebbe essere sottostimato in quanto è stato ottenuto tramite una rivalutazione microscopica di preparati immunohistochimici e non con l'ausilio di tecniche con diversa e probabilmente maggiore sensibilità. Tuttavia, occorre tenere presente che, allo stato attuale e in assenza di validazione, nessuna tecnologia alternativa per la valutazione dell'espressione di HER2-low è pronta per l'uso nella pratica clinica [61].

Se i risultati del DB-06 confermassero l'efficacia del trastuzumab deruxtecan anche sui pazienti con score immunohistochimico  $>0$  e  $<1$  allora, per quanto riguarda il nostro studio, lo spettro di carcinomi mammari potenzialmente trattabili con questa terapia si allargherebbe anche ai 29 casi con espressione “ultrabassa” di HER2.

La casistica “HER2-ultralow” del nostro studio è risultata caratterizzata da diverse percentuali di cellule tumorali con incompleta e debole/appena percettibile immunoreattività. Nello specifico, dei 29 casi inquadrabili come HER2-ultralow, 19 (66%) sono risultati caratterizzati da una colorazione di membrana non completa e debole/appena percettibile in  $\leq 5\%$  delle cellule tumorali, mentre 10 casi hanno presentato questo tipo di immunocolorazione in  $>5\%$  delle cellule tumorali, con un livello di positività immunohistochimica quindi più prossimo allo score 1+.

In particolare, sei casi refertati genericamente come HER2 0, sono stati reinterpretati con positività di membrana incompleta debole/appena percettibile nell'8% delle cellule tumorali e in tre casi la percentuale di immunoreattività è risultata del 9%, al limite dello score di appartenenza.

La difficile gestione di casi con percentuali di positività al limite dello score, caratterizzati da un profilo di positività intermedio tra 0 e 1+, è stata recentemente oggetto di discussione. Tra il 2022 e il 2023 la Società Europea di Oncologia Medica (ESMO) ha tenuto un incontro virtuale per la costruzione di un consenso incentrato sul cancro al seno con HER2 basso. Il consenso prevedeva un approccio multidisciplinare con un gruppo di

trentadue esperti nella gestione del cancro al seno, provenienti da nove diversi paesi. Il consenso ESMO ha portato a sviluppare diverse opinioni di esperti su argomenti come definizione, diagnosi e gestione del carcinoma della mammella HER2-low.

L'assegnazione dello score per questi tumori sembra essere una questione più clinica che patologica perché la refertazione di un caso con score 1+, piuttosto che 0, influenza le opzioni terapeutiche e permette al paziente di ricevere una terapia dalla quale potrebbe trarre un beneficio. Infatti, fino a poco tempo fa i carcinomi mammari con score HER2 0 o 1+ erano entrambi considerati come appartenenti allo spettro degli HER2 negativi, ma l'emergere del concetto HER2-low e di nuovi farmaci ha reso significativa e importante la distinzione tra questi punteggi immunohistochimici. Attualmente non sono disponibili evidenze sufficienti per raccomandare la migliore modalità per classificare questi casi. Sebbene non esista un protocollo per classificare i casi con score intermedio tra 0 e 1+, ci sono diverse pratiche che potrebbero aiutare nell'interpretazione, tra cui l'attenzione ai fattori pre-analitici, la valutazione del vetrino dell'immunohistochimica con un elevato ingrandimento, la revisione da parte di un altro patologo, l'utilizzo di controlli con una gamma di espressione proteica che includa casi con score 1+ [61].

Nello studio DAISY si è valutato, in pazienti di diverse coorti caratterizzate in base allo status di HER2, se la distribuzione spaziale delle cellule con incompleta e debole/appena percettibile espressione di HER2 possa predire la risposta al farmaco. Sulla base di un'analisi traslazionale dello studio, Bardia ha affermato che l'attività del trastuzumab deruxtecan risulta correlabile alla distribuzione spaziale di HER2, suggerendo che l'attività del farmaco in queste cellule possa essere dovuta all'“effetto spettatore”, per cui il carico utile di agente citotossico fornito alle cellule tumorali debolmente HER2 positive si diffonde attraverso le membrane cellulari nelle cellule tumorali vicine HER2 negative. In particolare, se le cellule che esprimono in modo incompleto e debole/appena percettibile HER2 sono distanti e isolate il tasso di risposta è basso mentre se sono raggruppate in cluster (almeno cinque cellule contigue) la risposta è maggiore [112].

Lo studio DAISY fornisce quindi prove che la risposta al trattamento con trastuzumab deruxtecan non è influenzata soltanto dalla presenza o assenza di HER2, ma anche dalla

distribuzione all'interno del tumore. Secondo Bardia questo risultato motiverà i ricercatori ad esaminare maggiormente il pattern spaziale dell'antigene [112].

Nel nostro studio, i 29 casi caratterizzati da score immunohistochimico  $>0$  e  $<1$  sono stati valutati anche dal punto di vista del pattern di positività, distinguendo in base a un'espressione su cellule isolate o su piccoli gruppi, costituiti da almeno cinque cellule contigue (clusters). È emerso come la quasi totalità degli HER2-ultralow (93%) sia risultata caratterizzata da immunoreattività incompleta e debole/appena percettibile in cluster di cinque o più cellule tumorali raggruppate.

In seguito alla determina dell'AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco), a partire dal 21 dicembre 2023 è possibile utilizzare, in regime di rimborsabilità del sistema sanitario nazionale, il farmaco T-DXd in monoterapia per il trattamento di pazienti adulti con cancro della mammella HER2-low non resecabile o metastatico, che hanno ricevuto precedente chemioterapia per malattia metastatica o che hanno sviluppato recidiva della malattia durante o entro 6 mesi dal completamento della chemioterapia adiuvante.

Oggi è quindi possibile trattare con questo farmaco i carcinomi mammari HER2 positivi, gli HER2-low e forse, in futuro, se i risultati del DESTINY-Breast06 dovessero fornire una conferma, anche i carcinomi mammari "HER2-ultralow" con score immunohistochimico  $>0$  e  $<1$ .

Questo progresso clinico ha messo in luce, tuttavia, la necessità di una nuova sfida.

Il limite inferiore dei livelli di HER2 clinicamente rilevanti non è ancora stato chiarito. I test immunohistochimici attualmente in uso sono stati progettati per identificare la over-espressione di HER2 in un contesto dove lo score 0 non coincide con la totale assenza del recettore di membrana nelle cellule tumorali. Alla luce dei recenti risultati clinici appare quindi evidente la necessità di individuare nel prossimo futuro nuove tecniche e/o strumentazioni che permettano, se possibile, una migliore identificazione dei pazienti eleggibili per la terapia. Per quanto riguarda la rilevazione quantitativa dell'espressione di HER2-low sarà necessaria l'implementazione di nuove metodologie di valutazione dello stato di HER2 che permettano di superare le fisiologiche limitazioni dell'osservazione microscopica dei vetrini su cui è stata eseguita la colorazione e le limitazioni intrinseche al

saggio immunohistochimico stesso. L'immunohistochimica nasce infatti come tecnica di tipo semi-quantitativo, per distinguere i casi positivi da quelli negativi e non in grado di rilevare con sensibilità elevata i bassi livelli di espressione della proteina.

Inoltre, lo stato di espressione di HER2 si caratterizza spesso per l'elevata eterogeneità su campioni provenienti dallo stesso paziente ma di tipologia differente e prelevati in momenti diversi. La variabilità spaziale e l'evoluzione temporale dell'espressione di HER2 sono fenomeni noti, che comprendono non solo le variazioni nei livelli di espressione, ma anche il fenomeno del cambiamento dello stato di HER2 o della perdita di espressione, che può verificarsi come conseguenza della terapia mirata o in seguito al trattamento neoadiuvante [114]. Attraverso la valutazione del tumore primitivo e di corrispondenti campioni metastatici, diversi studi hanno dimostrato che lo stato di HER2-low può cambiare durante l'evoluzione della patologia [117]. Ad esempio, lo studio di Tarantino *et al.* ha valutato l'evoluzione di HER2 tra il tumore primitivo e la prima biopsia effettuata nel setting avanzato in 232 pazienti. Il 44% dei tumori primitivi con score 0 presentava un passaggio a 1+ al momento della recidiva e il 22% dei tumori primitivi con HER2-low (1+ o 2+ e FISH negativa) si caratterizzava per un passaggio a score 0 [61,118]. Esiste tuttavia l'eventualità che tali variazioni non siano attribuibili esclusivamente a fattori biologici, ma siano intrinseche alla definizione stessa di HER2-low. Un recente studio di Geukens *et al.* in cui sono stati prelevati e valutati siti metastatici multipli in un programma di autopsia rapida ha fornito alcune informazioni su questa tematica. Sono stati analizzati un totale di 306 campioni riferibili a 10 pazienti. Sull'intero pool di pazienti inclusi nello studio, 2 casi presentavano una mancanza di espressione HER2 omogenea ed erano perciò concordanti per lo score. Gli altri 8 pazienti presentavano eterogeneità nell'espressione di HER2 da score 0 a score 2+ (con FISH negativa). Il punteggio immunohistochimico è risultato variabile anche analizzando depositi metastatici provenienti da un singolo organo.

Questi risultati evidenziano la necessità di non limitarsi all'analisi immunohistochimica di HER2 su un singolo campione metastatico in una popolazione di presunti pazienti HER2 0 [117].

Nel nostro studio, in cui sono stati inclusi 138 pazienti con score 0, per 53 pazienti è stato possibile reperire, all'interno del database aziendale, le determinazioni immunoistochimiche di HER2 relative a prelievi da biopsia primitiva, campione operatorio e/o metastasi a distanza. Di questo gruppo di soggetti con più determinazioni HER2, 13 pazienti (25%) hanno presentato concordanza per score 0 nelle varie determinazioni eseguite. Per 40 pazienti (75%) la valutazione HER2 ha avuto score diversi a seconda delle sedi e/o dei momenti del prelievo. In particolare, per 33 pazienti (62%), nella progressione della patologia tumorale, lo score immunoistochimico ha mostrato una conversione da score 1+ a 0, mentre 7 pazienti (13%) sono stati caratterizzati per un passaggio da score 0 a score 1+.

Per 42 casi con più di una determinazione di HER2 disponibile, è stato possibile analizzare l'evoluzione dello stato di espressione del recettore tra la biopsia diagnostica e il pezzo operatorio. I risultati hanno evidenziato come la maggioranza, 30 pazienti (71%), abbia mostrato una conversione da score 1+ a 0, 10 pazienti (24%) abbiano presentato score 0 per entrambi i campioni e solo 2 pazienti (5%) siano risultati caratterizzati da un passaggio da score 0 a score 1+ nella progressione della definizione immunoistochimica dalla biopsia al pezzo operatorio.

A fronte di questi dati, è necessario ricordare che la maggiore efficacia del trastuzumab deruxtecan (mostrata dai risultati dello studio DESTINY-Breast04) rispetto ad altri chemioterapici, è risultata convalidata in diversi tipi di campioni oncologici [117].

L'espressione di HER2, di per sé quindi già caratterizzata da un'intrinseca eterogeneità, viene in aggiunta valutata in contesti in cui l'osservazione immunoistochimica delle sezioni tissutali da parte di patologi diversi potrebbe portare a risultati non completamente sovrapponibili. Inoltre, è importante sottolineare come, secondo la letteratura, una percentuale significativa di campioni refertati con score 0, a seguito di una rivalutazione nell'ottica HER2-low, sia stata riclassificata con score 1+.

Questo evidenzia l'importanza di ripetere, in base alla disponibilità di successivi prelievi di tumore, il test immunoistochimico, in particolare per quei casi con in storico uno score 0 [117].

La recente presentazione dei risultati dello studio DB-04 ha richiamato l'attenzione del patologo relativamente al riconoscimento della bassa espressione di HER2, in particolare sul limite inferiore di espressione di questa proteina. Infatti i test immunoistochimici attualmente in uso sono stati progettati per identificare la over-espressione di HER2 in un contesto dove lo score 0 non coincide con la totale assenza del recettore di membrana nelle cellule tumorali. E' verosimile che in futuro potrà rivelarsi utile lo sviluppo di tecnologie con elevata sensibilità, in grado di individuare anche esigue quantità di HER2 per una migliore e più accurata selezione dei pazienti candidabili a terapia mirata. Tra i nuovi approcci potrebbero acquisire importanza la biopsia liquida, le tecniche omiche e il digital imaging [116].

La biopsia liquida non è una metodica dalla valenza diagnostica, ma consente di effettuare analisi su cellule, proteine e acidi nucleici di origine tumorale ottenuti da liquidi corporei (generalmente sangue), per l'identificazione di marcatori prognostici o predittivi [119]. Le cellule tumorali circolanti (CTC) rappresentano un gruppo eterogeneo di cellule derivanti dalla malattia primitiva o metastatica e sono presenti nel flusso sanguigno. Gruppi di studio appartenenti alla Società Internazionale di Biopsia Liquida (ISLB) hanno proposto applicazioni cliniche per le CTC con particolare riferimento al loro conteggio nei pazienti affetti da carcinoma mammario [117]. L'espressione di HER2 nelle CTC potrebbe costituire un'arma fondamentale per permettere la stratificazione dei pazienti sul livello di espressione del recettore [117]. È stata osservata una OS minore nei carcinomi mammari caratterizzati da una forte colorazione di HER2 con  $\geq 1$  CTC rispetto ai casi con colorazione immunoistochimica di HER2 da debole a moderata e privi di segnali per la rilevazione di CTC [117]. La valutazione di HER2 sulle CTC potrebbe integrare la valutazione del caso e fornire una prospettiva dinamica aggiuntiva alle informazioni statiche ottenute dall'analisi del tessuto tumorale [117]. Sulla base di questi concetti, lo stato di espressione di HER2 sulle CTC potrebbe fornire informazioni anche nei casi di carcinomi mammari HER2-low anche se, ad oggi, non sono disponibili dati robusti a questo proposito [117].

Diverse nuove tecnologie sono in fase di sviluppo per ottenere risultati quantitativi e riproducibili nel rilevamento dell'espressione di HER2 in un intervallo più basso rispetto alle metodiche standard (immunoistochimica e FISH).

Un'altra nuova frontiera potrebbe essere rappresentata dall'intelligenza artificiale che sta emergendo nella patologia oncologica predittiva. Per quanto riguarda la valutazione della bassa espressione di HER2, dati recenti, ottenuti tramite metodi basati sull'intelligenza artificiale, hanno mostrato che la patologia digitale e computazionale potrebbe fornire indicazioni sul numero e sulla distribuzione delle cellule esprimenti HER2 nel carcinoma mammario [117]. Sebbene ad oggi esistano diverse piattaforme che offrono questo tipo di analisi, anche se per lo più in ambito di ricerca accademica, gli algoritmi della patologia digitale si trovano davanti ad una serie di sfide notevoli [117]. Variazioni anche minime nei processi preanalitici come la preparazione dei vetrini, le procedure di colorazione, la manipolazione dei campioni di tessuto possono introdurre discrepanze nella qualità del colore e delle immagini che, a loro volta, possono influenzare la qualità dei vetrini digitalizzati e l'accuratezza dell'analisi [117]. È pertanto necessario porre particolare attenzione al minimo dettaglio della fase preanalitica per garantire affidabilità nella patologia digitale [117]. Inoltre, la mancanza di standardizzazione tra i diversi algoritmi di machine learning rappresenta un ulteriore ostacolo costituendo problemi di interoperabilità e impedendo l'integrazione della patologia digitale in ambito clinico.

Il raggiungimento di un consenso su pratiche standardizzate è fondamentale per migliorare l'efficienza e applicabilità della patologia digitale [117]. Un altro aspetto problematico in questo ambito è rappresentato dall'assenza di studi clinici prospettici che valutino le performance di queste metodiche innovative in scenari legati al carcinoma mammario HER2-low [117].

In ambito molecolare sono stati proposti test basati sull'espressione genica dell'mRNA di HER2 per una misurazione più diretta dell'espressione della proteina e per fornire una valutazione quantitativa dell'amplificazione del gene ERBB2 [117]. Sono disponibili kit che permettono test di HER2 basati su RT-PCR che, seppur non convalidati in studi clinici, offrono risultati standardizzati e riproducibili [117].

Un altro test basato sulla trascrittomica è il sistema NanoString nCounter che fornisce, grazie all'impiego di sonde specifiche progettate per contare le singole molecole di mRNA, una quantificazione sensibile e accurata dei livelli di espressione di HER2 e consente la simultanea valutazione di altri geni rilevanti.

Un ulteriore potente strumento per la valutazione di HER2 è rappresentato dalle tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS) che permettono il sequenziamento simultaneo di molte molecole di DNA e RNA e forniscono informazioni sull'amplificazione e sullo stato mutazionale di HER2. I test basati sull'mRNA hanno il vantaggio di superare alcune limitazioni immunohistochimiche come la variabilità inter-osservatore e l'eterogeneità dei tessuti [117].

Sicuramente, alla luce di tutte queste considerazioni, emerge come il ruolo del patologo risulti non scindibile da uno sviluppo professionale continuo. Nel consenso ESMO 2022-2023 è stata sottolineata l'importanza della formazione necessaria ai patologi per consentire all'interno di un panorama scientifico in evoluzione, le giuste strategie di targeting per lo stato di espressione di HER2. L'importanza e il beneficio della formazione del patologo sono stati messi in evidenza da uno studio internazionale di Rüschoff et al. che paragonava i tassi di concordanza per HER2 prima e dopo un corso di formazione.

Da questo studio e da diverse altre considerazioni emerge come una continua rifinitura e revisione delle linee guida per l'assegnazione dello score, la partecipazione a corsi di formazione e una discussione collegiale sui casi limite o ambigui dovranno far parte integrante dello sviluppo professionale del patologo nell'attuale contesto di evoluzione delle terapie target anti-HER2.

Con la comparsa della categoria HER2-low il patologo oggi si trova a dover identificare le sottili sfumature delle dinamiche di espressione di HER2 in un intervallo più ampio. Risultano quindi fondamentali un rigoroso controllo qualità, chiare linee guida di valutazione e refertazione e implementazioni nella formazione per analizzare al meglio l'espressione del marcatore [117].

La figura dell'anatomopatologo, tradizionalmente curatore della preanalitica, dei saggi analitici e dell'interpretazione dei test, deve prestare, laddove possibile, ulteriore cura a



tutte queste fasi per effettuare analisi il più possibili accurate e deve imparare a familiarizzare con il concetto di bassa espressione di HER2 in oncologia mammaria e riconoscere la rilevanza di possibili trattamenti per i pazienti [117].

Al patologo compete la formulazione di un referto corredato dell'esatta categoria di score e includere eventualmente anche la percentuale di cellule con una debole/appena percettibile e incompleta espressione di HER2. Risulta inoltre fondamentale la rivalutazione della malattia avanzata per confermare la diagnosi, considerando tuttavia che anche i tumori primitivi, nei casi in cui i siti metastatici non siano abbastanza informativi, possono essere una fonte di informazioni altrettanto preziosa sullo stato di HER2-low [117].

L'anatomopatologo deve essere pronto ad accogliere sviluppi sia derivanti semplicemente da score immunoistochimici e categorie emergenti (HER2-ultralow) quanto da tecniche innovative ed evidenze di efficacia terapeutica per questi pazienti [117].

In conclusione, citando le parole del professor Viale, "sebbene l'approvazione di una nuova terapia farmacologica per una patologia dall'elevata mortalità sia certamente positiva, si intravedono problematiche future. Infatti, presto o tardi i farmaci ADC come T-DXd saranno disponibili nella stessa popolazione di pazienti e nella stessa linea di trattamento. In aggiunta, diminuiranno le differenze che ci sono con le vecchie terapie e verranno controllati meglio gli effetti collaterali. In questo contesto di un futuro non troppo lontano l'oncologo potrebbe trovarsi di fronte ad un algoritmo terapeutico caratterizzato da più opzioni nella stessa linea e popolazione di pazienti. Pertanto, il patologo, accurato nell'identificare i pazienti candidati ai trattamenti, dovrà imparare a valutare non tanto il beneficio di un farmaco, ma quale tra i possibili farmaci può portare a un beneficio migliore per il paziente [116].

## 6. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

[1] Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2019;30(8):1194-1220.

[2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249.

[3] World Health Organization. Global breast cancer initiative. [Internet]. Geneva: World Health Organization;  
Available from: <https://www.who.int/initiatives/global-breast-cancer-initiative>

[4] Aiom. I numeri del cancro in Italia. [Internet]. [Publisher location unknown]: Aiom; [year]. Available from: <https://www.aiom.it/i-numeri-del-cancro-in-italia/>

[5] Lukaszewicz S, Czeczulewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanislawek A. Breast cancer epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies—an updated review. *Cancers.* 2021;13(17):4287.

[6] Hormones E, BCC Group, et al. Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *Lancet Oncol.* 2013;14(10):1009–1019.

[7] Admoun C, Mayrovitz HN. The etiology of breast cancer. *Exon Publications.* 2022:21–30.

- [8] Yousef AJA. *Male breast cancer: epidemiology and risk factors*. In: *Seminars in Oncology*. Elsevier; 2017. p. 267–272.
- [9] Guida L. *Linee guida aiom 2021 - neoplasie della mammella*. [Internet]. [Publisher location unknown]: AIOM; 2021.  
Available from: <https://www.aiom.it/linee-guida-aiom-2021-neoplasie-della-mammella/>
- [10] Dyrstad SW, Yan Y, Fowler AM, Colditz GA. *Breast cancer risk associated with benign breast disease: systematic review and meta-analysis*. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;149:569–575.
- [11] Wu H-C, Do C, Andrulis IL, John EM, Daly MB, Buys SS, Chung WK, Knight JA, Bradbury AR, Keegan TH, et al. *Breast cancer family history and allele-specific DNA methylation in the Legacy Girls Study*. *Epigenetics*. 2018;13(3):240–250.
- [12] Cipollini G, Tommasi S, Paradiso A, Aretini P, Bonatti F, Brunetti I, ... Caligo MA. *Genetic alterations in hereditary breast cancer*. *Ann Oncol*. 2004;15(Suppl 1):i7-i13.
- [13] U. P. S. T. Force\*. *Genetic risk assessment and BRCA mutation testing for breast and ovarian cancer susceptibility: recommendation statement*. *Ann Intern Med*. 2005;143(5):355–361.
- [14] Ferla R, Calo V, Cascio S, Rinaldi G, Badalamenti G, Carreca I, Surmacz E, Colucci G, Bazan V, Russo A. *Founder mutations in BRCA1 and BRCA2 genes*. *Ann Oncol*. 2007;18(2007):vi93–vi98.
- [15] Narod SA. *Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer*. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(11):669–676.

[16] C. G. *on Hormonal Factors in Breast Cancer, et al. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118,964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. Lancet Oncol.* 2012;13(11):1141–1151.

[17] C. G. *on Hormonal Factors in Breast Cancer, et al. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50,302 women with breast cancer and 96,973 women without the disease. Lancet.* 2002;360(9328):187–195.

[18] Husby A, Wohlfahrt J, Øyen N, Melbye M. *Pregnancy duration and breast cancer risk. Nat Commun.* 2018;9(1):4255.

[19] Mokhtary A, Karakatsanis A, Valachis A. *Mammographic density changes over time and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. Cancers.* 2021;13(19):4805.

[20] Kim EY, Chang Y, Ahn J, Yun J-S, Park YL, Park CH, Shin H, Ryu S. *Mammographic breast density, its changes, and breast cancer risk in premenopausal and postmenopausal women. Cancer.* 2020;126(21):4687–4696.

[21] Duffy SW, Morrish OW, Allgood PC, Black R, Gillan MG, Willsler P, Cooke J, Duncan KA, Michell MJ, Dobson HM, et al. *Mammographic density and breast cancer risk in breast screening assessment cases and women with a family history of breast cancer. Eur J Cancer.* 2018;88:48–56.

[22] Ng J, Shuryak I. *Minimizing second cancer risk following radiotherapy: current perspectives. Cancer Manag Res.* 2014:1–11.

[23] Hilakivi-Clarke L. *Maternal exposure to diethylstilbestrol during pregnancy and increased breast cancer risk in daughters. Breast Cancer Res.* 2014;16:1–10.

[24] Palmer JR, Wise LA, Hatch EE, Troisi R, Titus-Ernstoff L, Strohsnitter W, Kaufman R, Herbst AL, Noller KL, Hyer M, et al. Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(8):1509–1514.

[25] Chen X, Wang Q, Zhang Y, Xie Q, Tan X. Physical activity and risk of breast cancer: a meta-analysis of 38 cohort studies in 45 study reports. *Value Health.* 2019;22(1):104–128.

[26] Thune I, Brenn T, Lund E, Gaard M. Physical activity and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 1997;336(18):1269–1275.

[27] Kolb R, Zhang W. Obesity and breast cancer: a case of inflamed adipose tissue. *Cancers.* 2020;12(6):1686.

[28] Wang X, Hui T-L, Wang M-Q, Liu H, Li R-Y, Song Z-C. Body mass index at diagnosis as a prognostic factor for early-stage invasive breast cancer after surgical resection. *Oncol Res Treat.* 2019;42(4):190–196.

[29] Fiolet T, Srour B, Sellem L, Kesse-Guyot E, All`es B, M`ejean C, Deschasaux M, Fassier P, Latino-Martel P, Beslay M, et al. Consumption of ultra-processed foods and cancer risk: results from NutriNet-Sant`e prospective cohort. *BMJ.* 2018;360.

[30] Atoum M, Alzoughool F. Vitamin D and breast cancer: latest evidence and future steps. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research.* 2017;11.

[31] Huss L, Butt ST, Borgquist S, Elebro K, Sandsveden M, Rosendahl A, Manjer J. Vitamin D receptor expression in invasive breast tumors and breast cancer survival. *Breast Cancer Research.* 2019;21(1):1–13.

[32] Zeinomar N, Knight JA, Genkinger JM, Phillips K-A, Daly MB, Milne RL, Dite GS, Kehm RD, Liao Y, Southey MC, et al. Alcohol consumption, cigarette smoking, and familial breast cancer risk: findings from the prospective family study cohort (PROF-SC). *Breast Cancer Research*. 2019;21:1–14.

[33] Gram IT, Park S-Y, Kolonel LN, Maskarinec G, Wilkens LR, Henderson BE, Marchand LL. Smoking and risk of breast cancer in a racially/ethnically diverse population of mainly women who do not drink alcohol: the MEC study. *Am J Epidemiol*. 2015;182(11):917–925.

[34] Videnros C, Selander J, Wiebert P, Albin M, Plato N, Borgquist S, Manjer J, Gustavsson P. Investigating the risk of breast cancer among women exposed to chemicals: A nested case–control study using improved exposure estimates. *Int Arch Occup Environ Health*. 2020;93:261–269.

[35] Stevanato KP, Pedroso RB, Agnolo CMD, Dos Santos L, Pelloso FC, de Barros Carvalho MD, Pelloso SM. Use and applicability of the Gail model to calculate breast cancer risk: a scoping review. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2022;23(4):1117.

[36] Gail model for breast cancer risk. [Internet].

Available from: <https://www.mdcalc.com/calc/3647/gail-model-breast-cancer-risk>

[37] Breast cancer risk assessment tool. [Internet].

Available from: <https://bcrisktool.cancer.gov/>

[38] Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC). Breast: Mammography. In: *Screening Guide*. Available from: <https://www.airc.it/cancro/prevenzione-tumore/guida-agli-screening/seno-mammografia>

[39] Non tutti i seni sono uguali. [Internet].

Available from: <https://senologiadiagnostica.it/non-tutti-i-seni-sono-uguali/>

[40] Vedantham S, Karellas A, Vijayaraghavan GR, Kopans DB. Digital breast tomosynthesis: state of the art. *Radiology*. 2015;277(3):663–684.

[41] Diagnosticacmc. Tomosintesi: cos'è, come si esegue, risultati e rischi. [Internet]. Available from: <https://diagnosticacmc.it/news/tomosintesi-cose-come-si-esegue-risultati-e-rischi/>

[42] Skaane P, Bandos AI, Gullien R, Eben EB, Ekseth U, Haakenaasen U, Izadi M, Jepsen IN, Jahr G, Krager M, et al. Comparison of digital mammography alone and digital mammography plus tomosynthesis in a population-based screening program. *Radiology*. 2013;267(1):47–56.

[43] Jochelson MS, Lobbes MB. Contrast-enhanced mammography: state of the art. *Radiology*. 2021;299(1):36–48.

[44] Cheung Y-C, Lin Y-C, Wan Y-L, Yeow K-M, Huang P-C, Lo Y-F, Tsai H-P, Ueng S-H, Chang C-J. Diagnostic performance of dual-energy contrast-enhanced subtracted mammography in dense breasts compared to mammography alone: interobserver blind-reading analysis. *Eur Radiol*. 2014;24:2394–2403.

[45] AIOM. Raccomandazioni per l'implementazione del test BRCA predittivo e preventivo nei tumori della mammella, dell'ovaio, del pancreas e della prostata. [Internet]. Available from: <https://www.aiom.it/raccomandazioni-per-limplementazione-del-test-brca-predittivo-e-preventivo-nei-tumori-della-mammella-dellovaio-del-pancreas-e-della-prostata/>

[46] Ren W, Chen M, Qiao Y, Zhao F. Global guidelines for breast cancer screening: a systematic review. *Breast*. 2022;64:85-99.

[47] Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*. 2010;10(10):955-960.

- [48] Stingl, J., & Caldas, C. (2007). *Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis*. *Nature Reviews Cancer*, 7(10), 791-799.
- [49] Li CI, Uribe DJ, Daling JR. *Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer*. *Br J Cancer*. 2005;93(9):1046-1052.
- [50] *Breast Tumours*. In: *WHO Classification of Tumours, 5th Edition, Volume 2*. WHO Classification of Tumours Editorial Board. 2019.
- [51] Orrantia-Borunda E, Anchondo-Nuñez P, Acuña-Aguilar LE, Gómez-Valles FO, Ramírez-Valdespino CA. *Subtypes of breast cancer*. *Breast Cancer [Internet]*. 2022.
- [52] Prat, A., Parker, J. S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J. I., ... & Perou, C. M. (2010). *Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer*. *Breast cancer research*, 12(5), 1-18.
- [53] Adaniel C, Jhaveri K, Heguy A, Esteva FJ. *Genome-based risk prediction for early stage breast cancer*. *Oncologist*. 2014;19(10):1019-1027.
- [54] Paik, S., Shak, S., Tang, G., Kim, C., Baker, J., Cronin, M., ... & Wolmark, N. (2004). *A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer*. *New England Journal of Medicine*, 351(27), 2817-2826.
- [55] Ma XJ, Salunga R, Dahiya S, Wang W, Carney E, Durbecq V, ... Sgroi D. *A five-gene molecular grade index and HOXB13: IL17BR are complementary prognostic factors in early stage breast cancer*. *Clin Cancer Res*. 2008;14(9):2601-2608.



[56] Jerevall PL, Ma XJ, Li H, Salunga R, Kesty NC, Erlander MG, ... Stål O. Prognostic utility of HOXB13: IL17BR and molecular grade index in early-stage breast cancer patients from the Stockholm trial. *Br J Cancer*. 2011;104(11):1762-1769.

[57] Cancer Research UK. [Internet].

Available from: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/>

[58] Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C, editors. *TNM classification of malignant tumours*. John Wiley & Sons; 2017.

[59] Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eeno F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: Big 02-98. *J Clin Oncol*. 2013;31(7):860–867.

[60] Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(10):736–750.

[61] Tarantino P, Viale G, Press M, Hu X, Penault-Llorca F, Bardia A, et al. ESMO Expert Consensus Statements (ECS) on the definition, diagnosis, and management of HER2-low breast cancer. *Ann Oncol*. 2023;34(8):645–659.

[62] Yao Q, Hou W, Wu K, Bai Y, Long M, Diao X, et al. Using whole slide gray value map to predict HER2 expression and FISH status in breast cancer. *Cancers*. 2022;14(24):6233.

[63] Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, et al. *Estrogen and progesterone receptor testing in breast cancer: ASCO/CAP guideline update*.

[64] Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JM, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline focused update. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2018;142(11):1364–1382.

[65] Ang C, Tan M, Teo C, Seah D, Chen J, Chan M, et al. Blue dye is sufficient for sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *Journal of British Surgery*. 2014;101(4):383–389.

[66] Arif SH, Mohammed AA. Wide local excision and sentinel lymph node biopsy in early breast cancer in Duhok city. *Annals of the College of Medicine, Mosul*. 2020;42(1):19–26.

[67] Mayo Clinic. [Internet].

Available from: <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/sentinel-node-biopsy/about/pac-20385264#dialogId11957706>

[68] SIAPEC. [Internet].

Available from:

<https://www.siapec.it/wp-content/uploads/2022/01/RACCOMANDAZIONI-GIPAM-linfonodo-sentinella-FINAL.pdf>

[69] Rahman GA. Breast conserving therapy: a surgical technique where little can mean more. *Journal of Surgical Technique and Case Report*. 2011;3(1).

[70] Miyamura Y, Kagara N, Miyake T, Tanei T, Naoi Y, Shimoda M, Shimazu K, Kim SJ, Noguchi S. Drainage of tumor-derived DNA into sentinel lymph nodes in breast cancer patients. *Pathol Oncol Res*. 2019;25:1635–1643.

[71] Yang TJ. Radiation therapy in the management of breast cancer. *Surg Clin North Am*. 2013;93(2):455-71.

[72] Joshi SC, Khan F, Pant I, Shukla A. Role of radiotherapy in early breast cancer: an overview. *Int J Health Sci.* 2007;1(2):259.

[73] Lumachi F, Luisetto G, Basso SMM, Basso U, Brunello A, Camozzi V. Endocrine therapy of breast cancer. *Curr Med Chem.* 2011;18(4):513–522.

[74] Drăgănescu M, Carmocan C. Hormone therapy in breast cancer. *Chirurgia.* 2017;112(4):413–417.

[75] Rakha EA, Green AR. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. *Pathology.* 2017;49(2):111-119.

[76] Miricescu D, Totan A, Stanescu-Spinu II, Badoiu SC, Stefani C, Greabu M. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in breast cancer: From molecular landscape to clinical aspects. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 26;22(1):173.

[77] Yudushkin. Getting the Akt Together: Guiding Intracellular Akt Activity by PI3K. *Biomolecules.* 2019;9(1):67.

[78] Yu X, Long YC, Shen HM. Differential regulatory functions of three classes of phosphatidylinositol and phosphoinositide 3-kinases in autophagy. *Autophagy.* 2015 Oct;11(10):1711-1728.

[79] Ma Z, Xin Z, Hu W, Jiang S, Yang Z, Yan X, Li X, Yang Y, Chen F. Forkhead box O proteins: Crucial regulators of cancer EMT. *Semin Cancer Biol.* 2018 Oct;50:21-31.

[80] Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:127-150.

[81] Lower EE, Khan S, Kennedy D, Baughman RP. *Discordance of the estrogen receptor and HER-2/neu in breast cancer from primary lesion to first and second metastatic site. Breast Cancer (Dove Med Press).* 2017;9:515-520.

[82] Jensen JD, Knoop A, Ewertz M, Laenkholm AV. *ER, HER2, and TOP2A Expression in Primary Tumor, Synchronous Axillary Nodes, and Asynchronous Metastases in Breast Cancer. Breast Cancer Res Treat.* 2012 Aug;132(3):511-521.

[83] Yeung C, Hilton J, Clemons M, Mazzarello S, Hutton B, Haggar F, Addison C, Kuchuk I, Zhu X, Gelmon K. *Estrogen, Progesterone, and HER2/neu Receptor Discordance Between Primary and Metastatic Breast Tumours – A Review. Cancer Metastasis Rev.* 2016 Sep;35(3):427-437.

[84] Karagöz Özen DS, Ozturk MA, Aydin O, Turna ZH, Ilvan S, Ozguroglu M. *Receptor expression discrepancy between primary and metastatic breast cancer lesions. Oncol Res Treat.* 2014;37(11):622-626.

[85] Branco FP, Machado D, Silva FF, André S, Catarino A, Madureira R, Pinto JM, Godinho JP, Simões PD, Brito M. *Loss of HER2 and Disease Prognosis after Neoadjuvant Treatment of HER2+ Breast Cancer. Am J Transl Res.* 2019 Sep 15;11(9):6110.

[86] Lower EE, Khan S. *Biomarker Discordance: Why It Occurs and Why It Is Important. Cancer Biomark.* 2013;12(6):219-230.

[87] McAnena PF, McGuire A, Ramli A, Curran C, Malone C, McLaughlin R, Barry K, Brown JA, Kerin M. *Breast cancer subtype discordance: impact on post-recurrence survival and potential treatment options. BMC Cancer.* 2018 Jan 5;18(1):1-8.

[88] Dieci MV, Barbieri E, Piacentini F, Ficarra G, Bettelli S, Dominici M, Conte P, Guarneri V. Discordance in receptor status between primary and recurrent breast cancer has a prognostic impact: a single-institution analysis. *Ann Oncol.* 2013 Jan;24(1):101-108.

[89] Miglietta F, Griguolo G, Bottosso M, Giarratano T, Lo Mele M, Fassan M, Cacciatore M, Genovesi E, De Bartolo D, Vernaci G. HER2-low-positive breast cancer: evolution from primary tumor to residual disease after neoadjuvant treatment. *NPJ Breast Cancer.* 2022;8(1):66.

[90] Wu X, Yang H, Yu X, Qin JJ. Drug-resistant HER2-positive breast cancer: Molecular mechanisms and overcoming strategies. *Front Pharmacol.* 2022;13:1012552.

[91] Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Feb;2(2):127-137.

[92] Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, Mackey J, Glaspy J, Chan A, Pawlicki M, et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2011 Oct 20;365(14):1273-1283.

[93] Scaltriti M, Chandarlapaty S, Prudkin L, Aura C, Jimenez J, Angelini PD, Sánchez G, Guzman M, Parra JL, Ellis C, et al. Clinical benefit of lapatinib-based therapy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast tumors coexpressing the truncated p95HER2 receptor. *Clin Cancer Res.* 2010 May 1;16(9):2688-2695.

[94] Zhang Y, Wu S, Zhuang X, Weng G, Fan J, Yang X, Xu Y, Pan L, Hou T, Zhou Z, et al. Identification of an activating mutation in the extracellular domain of HER2 conferring resistance to pertuzumab. *OncoTargets Ther.* 2019 Dec 6;12:11597.

[95] Zheng G, Guo Z, Li W, Xi W, Zuo B, Zhang R, Wen W, Yang AG, Jia L. Interaction between HLA-G and NK Cell Receptor KIR2DL4 Orchestrates HER2-Positive Breast Cancer Resistance to Trastuzumab. *Signal Transduct Target Ther.* 2021 Aug 27;6(1):236.

[96] Girish S, Gupta M, Wang B, Lu D, Krop IE, Vogel CL, Burris HA 3rd, LoRusso PM, Yi JH, Saad O, et al. (2012). Clinical pharmacology of trastuzumab emtansine (T-DM1): an antibody–drug conjugate in development for the treatment of HER2-positive cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 69(5), 1229-1240.

[97] Von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, Loibl S, Mamounas EP, Untch M, Wolmark N, Rastogi P, Schneeweiss A, Redondo A, et al. (2019). Trastuzumab emtansine for residual invasive HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, 380(7), 617-628.

[98] Kalim M, Chen J, Wang S, Lin C, Ullah S, Liang K, Ding Q, Chen S, Zhan J. (2017). Intracellular trafficking of new anticancer therapeutics: antibody–drug conjugates. *Drug Des Devel Ther*, 11, 2265-2276.

[99] Montemurro F, Ellis P, Anton A, Wuerstlein R, Delaloge S, Bonnetterre J, Quenel-Tueux N, Linn SC, Irahara N, Donica M, et al. (2019). Safety of trastuzumab emtansine (T-DM1) in patients with HER2-positive advanced breast cancer: primary results from the KAMILLA study cohort 1. *European Journal of Cancer*, 109, 92–102.

[100] Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, Pegram M, Oh DY, Diéras V, Guardino E, et al. (2012). Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 367(19), 1783-1791.

[101] Ogitani Y, Hagihara K, Oitate M, Naito H, Agatsuma T. (2016). Bystander killing effect of DS-8201a, a novel anti-human epidermal growth factor receptor 2 antibody–drug conjugate, in tumors with human epidermal growth factor receptor 2 heterogeneity. *Cancer Sci*, 107(7), 1039-1046.

[102] ADC Review, *Trastuzumab deruxtecan — drug description*.

Available at: <https://www.adcreview.com/trastuzumab-deruxtecan-drug-description/>

[103] Venetis K, Crimini E, Sajjadi E, Corti C, Guerini-Rocco E, Viale G, Curigliano G, Criscitiello C, Fusco N. (2022). *HER2 low, ultra-low, and novel complementary biomarkers: expanding the spectrum of HER2 positivity in breast cancer*. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 834651.

[104] Mosele F, Deluche E, Lusque A, Le Bescond L, Filleron T, Pradat Y, Ducoulombier A, Pistilli B, Bachelot T, Viret F, et al. (2023). *Trastuzumab deruxtecan in metastatic breast cancer with variable HER2 expression: the phase 2 daisy trial*. *Nature Medicine*, 29(8), 2110–2120.

[105] Martínez-Sáez O, Prat A. (2021). *Current and future management of HER2-positive metastatic breast cancer*. *JCO Oncology Practice*, 17(10), 594–604.

[106] Jiang M, Liu J, Li Q, Xu B. (2023). *The trichotomy of HER2 expression confers new insights into the understanding and managing for breast cancer stratified by HER2 status*. *International Journal of Cancer*, 153(7), 1324–1336.

[107] Tarantino P, Hamilton E, Tolaney SM, Cortes J, Morganti S, Ferraro E, Marra A, Viale G, Trapani D, Cardoso F, et al. (2020). *HER2-low breast cancer: pathological and clinical landscape*. *Journal of Clinical Oncology*, 38(17), 1951–1962.

[108] Nicolò E, Tarantino P, Curigliano G. (2023). *Biology and treatment of HER2-low breast cancer*. *Hematology/Oncology Clinics*, 37(1), 117–132.

[109] Modi S, Jacot W, Yamashita T, Sohn J, Vidal M, Tokunaga E, Tsurutani J, Ueno NT, Prat A, Chae YS, et al. (2022). Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-low advanced breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 387(1), 9–20.

[110] Zhang H, Karakas C, Tyburski H, Turner BM, Peng Y, Wang X, Katerji H, Schiffhauer L, Hicks DG. (2022). HER2-low breast cancers: Current insights and future directions. *Seminars in Diagnostic Pathology*.

[111] Moutafi M, Robbins CJ, Yaghoobi V, Fernandez AI, Martinez-Morilla S, Xirou V, Bai Y, Song Y, Gaule P, Krueger J, et al. (2022). Quantitative measurement of HER2 expression to subclassify ERBB2 unamplified breast cancer. *Laboratory Investigation*, 102(10), 1101–1108.

[112] Results suggest the efficacy of trastuzumab deruxtecan is influenced by the spatial distribution of HER2 in breast tumour cells (2022).

Available at: <https://dailyreporter.esmo.org/esmo-breast-cancer-2022/highlights/results-suggest-the%20efficacy-of-trastuzumab-deruxtecan-is-influenced-by-the-spatial-distribution-of-her2-in-breast-tumour-cells>

[113] Zeneca A. (2023). Study of trastuzumab deruxtecan (T-DXd) vs investigator's choice chemotherapy in HER2-low, hormone receptor positive, metastatic breast cancer (DB-06). Available at: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04494425>

[114] Ivanova M, Porta FM, D'Ercole M, Pescia C, Sajjadi E, Cursano G, De Camilli E, Pala O, Mazzarol G, Venetis K, et al. (2023). Standardized pathology report for HER2 testing in compliance with 2023 ASCO/CAP updates and 2023 ESMO consensus statements on HER2-low breast cancer. *Virchows Archiv*, 1–12.



[115] Crimini E, Repetto M, Aftimos P, Botticelli A, Marchetti P, Curigliano G. (2021). *Precision medicine in breast cancer: From clinical trials to clinical practice. Cancer Treatment Reviews*, 98, 102223.

[116] Viale G. (2023). *The evolution of pathological anatomy in the era of predictive genomics, immunotherapy and ADCs: main problems of the present and future challenges webinar andromeda e20srl 2023 multidisciplinary management of breast cancer 13 and 20 december (7th ed.)*

program available:

<https://storage.builderall.com/franquias/2/6123180/editor-html/12031937.pdf>

[117] Marchio C. *Clinical interview rethinking "HER2" differently. 2023. Available from:* [https://www.medicacom.it/webapp\\_clinical/index-standalone.html](https://www.medicacom.it/webapp_clinical/index-standalone.html)

[118] Tarantino P, Gandini S, Nicolò E, Trillo P, Giugliano F, Zagami P, Vivanet G, Bellerba F, Trapani D, Marra A, et al. (2022). *Evolution of low HER2 expression between early and advanced-stage breast cancer. European Journal of Cancer*, 163, 35–43.

[119] Available at: <https://media.aiom.it/userfiles/files/doc/op-paz-fond/2018/Biopsia-liquida.pdf>

## 7. RINGRAZIAMENTI

Eccomi dunque alla fine di questo tortuoso cammino.

Ringrazio il relatore Prof. Salvatore Sutti per la gentilezza, disponibilità e competenza che mi ha fornito prima, durante e alla fine di questo percorso.

Ringrazio tutto lo staff dell'anatomia Patologica dell'Ospedale "Michele e Pietro Ferrero" di Verduno per avermi accolto, aiutato e sostenuto per più di otto mesi.

Ringrazio il direttore Dr. Marco Pagano per la disponibilità, la cortesia e la gentilezza nel concedermi questa preziosa opportunità di tirocinio e crescita personale.

Ringrazio vivamente la Dott.ssa Maria Cristina Vivaldo senza la quale questa tesi non sarebbe mai stata scritta e ideata.

Ringrazio le Dott.sse Federica Filipello e Margherita Vanzino per l'aiuto nella comprensione degli aspetti più clinici di questo lavoro.

Ringrazio i Dr. Flavio Fraire e Martino Bosco per la gentilezza dimostratami ogni giorno anche solo per un saluto o quattro chiacchiere.

Ringrazio il coordinatore TSLB Dott.ssa Monica Costamagna, e il personale OSS e TSLB per avermi accolto in questa famiglia e aiutato nel recupero di più di 160 vetrini dall'archivio.

Infine ringrazio i miei genitori. Siete le persone più importanti che ho.