

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
Oncologia e Patologia Sperimentale**

Ciclo XXVIII°

**Settore Concorsuale di afferenza: 06/A4
Settore Scientifico disciplinare: SSD MED 08**

**VALUTAZIONE DELLA
CLONALITA' GENICA DEL
CARCINOMA DELLA MAMMELLA
E SUO IMPATTO SULLA
RISPOSTA TERAPEUTICA**

Presentata da: Enrico Di Oto

Coordinatore Dottorato

Prof. Pier-Luigi Lollini

Relatore

Prof.ssa Maria Pia Foschini

Esame finale anno 2016

Indice Generale

Capitolo 1: Introduzione	3
Capitolo 2: Eterogeneità genetica di Her2 e suo impatto sull'andamento della malattia neoplastica mammaria	21
Capitolo 3: Carcinoma della mammella maschile: valutazione delle aneusomie a carico del cromosoma X.	45
Capitolo 4: Valutazione comparativa dell'analisi dell'espressione e dell'assetto genico di Her2 tramite IHC e FISH e la nuova doppia colorazione IHC-SISH.	59
Capitolo 5: Messa a punto e validazione di una metodica rapida per la diagnosi FISH.	77
Bibliografia.	93

Capitolo 1

La neoplasia mammaria, aspetti generali

Indice

Il carcinoma mammario	4
Epidemiologia.....	4
Diagnosi.....	5
Classificazione.....	6
Staging TNM.....	7
Carcinoma della mammella maschile.....	18
Terapia.....	19

1. Il carcinoma mammario

Le affezioni neoplastiche della mammella colpiscono sia pazienti di sesso femminile che maschile.

Circa il 30% delle neoplasie che colpiscono le donne è dato da carcinoma della mammella mentre nel sesso maschile tale valore è di circa 1%.^[1]

Dal punto di vista epidemiologico, grazie all'introduzione dei protocolli di screening di massa, si è assistito ad un incremento statistico dell'incidenza del carcinoma mammario, caratterizzato al contempo dalla riduzione della mortalità.

Tale fenomeno sembra essere legato sia alla diagnosi precoce di lesioni piccole ed ancora dotate di bassa aggressività, sia al continuo sviluppo delle terapie oncologiche.

Epidemiologia

Ad oggi sono stati individuati molteplici fattori predisponenti l'insorgenza del carcinoma mammario, siano essi geografici e ambientali, legati allo stile di vita o genetico - familiari.

Fattori geografici e ambientali

La neoplasia mammaria risulta essere maggiormente frequente nei paesi industrializzati come Stati Uniti, Europa Occidentale ed Australia, dove circa il 6% della popolazione femminile sviluppa un carcinoma mammario entro il 75° anno di età. Al contrario, nei paesi non industrializzati, come Africa e Sud Est Asiatico, il rischio appare essere un terzo ^[2].

Fattori legati allo stile di vita

Come la maggior parte delle lesioni neoplastiche, anche il carcinoma alla mammella è oggetto di predisposizione da parte di molti comportamenti e abitudini.

Ne sono un esempio l'associazione tra l'aumentato rischio di insorgenza in donne giovani e l'assunzione protratta di contraccettivi estrogenici; così' come per le terapie sostitutive ormonali nelle donne in post-menopausa.

Il fumo di sigarette non sembra essere correlato con la patologia neoplastica della mammella.

Sempre relativamente allo stile di vita è stato osservato un aumento lieve di rischio nelle pazienti soggette ad abuso di alcolici ed in caso di obesità.

Al contrario sembra essere stato osservato un ruolo protettivo da parte del regolare consumo di frutta e vegetali freschi e dallo svolgimento di regolare attività fisica.

Fattori genetico - familiari

Soggetti che sviluppano un carcinoma della mammella bilaterale ed in età giovanile (<40 anni) spesso hanno una storia familiare di carcinoma in cui risulti affetta una parente di primo grado (madre o sorella) ^[3].

Inoltre è stata osservata una forte componente genetica ereditaria alla base del carcinoma alla mammella (5-7% dei carcinomi mammari).

di questi la maggior parte è legata alle seguenti condizioni:

- Mutazione di BRCA 1 e/o BRCA 2 (presenti nei 2/3 dei casi)
- Mutazioni del gene ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) ³ o del gene CHEK2
- Sindrome di Li-Fraumeni (mutazione di p53)
- Sindrome di Cowden (mutazione del gene PTEN)
- Altre sindromi: atassia-teleangiectasia, sindrome di Peutz-Jeghers

2. Diagnosi

Il metodo più antico di diagnosi si basa sulla palpazione e, sebbene ancora valido, è affetto da una sensibilità piuttosto bassa poiché in grado di rilevare solo il 60% delle lesioni.

Attualmente la mammografia è l'indagine d'elezione per la diagnosi precoce in fase di screening del carcinoma alla mammella; essa permette infatti di rilevare la presenza di noduli inferiori al centimetro di diametro e, quindi, non palpabili, oltre che alterazioni morfo-strutturali come la presenza di micro calcificazioni ^[4].

Oggi è in discussione l'età in cui dovrebbe essere avviato lo screening mammografico. In uno studio condotto in Svezia si è osservata una riduzione della mortalità per tumore della mammella del 26% per le donne invitate ad effettuare lo screening mammografico e del 29% per quelle che lo hanno effettivamente eseguito con una riduzione maggiore nelle donne di età compresa tra 45 e 49 anni rispetto a quelle più giovani ^[5].

La risonanza magnetica (RMN) mammaria presenta una sensibilità maggiore nella diagnosi di carcinoma mammario rispetto alla mammografia, accanto ad una minore specificità e ciò comporta un più alto tasso di falsi positivi. A questo proposito diversi studi hanno dimostrato che globalmente in quasi il 50% dei casi la risonanza magnetica trova ulteriori reperti rispetto all'utilizzo della mammografia ed ecografia mammaria, che una paziente su cinque per questo motivo viene sottoposta a biopsia dei nuovi reperti ma solo in un caso su otto (12%) viene diagnosticato un ulteriore focolaio di carcinoma ^[6-8]. Inoltre, la RMN mammaria non è in grado di rilevare la presenza di micro calcificazioni ^[9,10] e l'impatto dello screening con RMN sulla sopravvivenza globale non è stato valutato in nessuno studio clinico randomizzato.

Classificazione

Lo spettro degli aspetti morfologici del carcinoma mammario si è modificato, nel corso degli ultimi anni, soprattutto in seguito all'introduzione dei programmi di screening ed all'applicazione di indagini di immunoistochimica e di biologia molecolare che hanno aumentato le conoscenze sulle varie forme di neoplasie mammarie. La classificazione anatomico-patologica del tumore della mammella secondo WHO 2003 ^[2] è stata rivista recentemente e la classificazione WHO 2012, ^[11] prevede i tipi istologici riportati nella Tabella 1.

<p>TUMORI EPITELIALI Carcinoma microinvasivo Carcinoma mammario infiltrante Carcinoma infiltrante di tipo non specifico (NST) Carcinoma lobulare infiltrante Carcinoma tubulare Carcinoma cribriforme Carcinoma mucinoso Carcinoma con caratteristiche midollari Carcinoma con differenziazione apocrina Carcinoma infiltrante micropapillare Carcinoma apocrino Carcinoma con differenziazione ad anello con sigillo Carcinoma metaplastico di tipo non speciale</p> <p>Tipi rari Carcinoma con caratteristiche neuroendocrine Carcinoma secretorio Carcinoma papillare invasivo Carcinoma a cellule aciniche Carcinoma mucoepidermoidale Carcinoma polimorfo Carcinoma oncocitico Carcinoma ricco in lipidi Carcinoma a cellule chiare ricche di glicogeno Carcinoma sebaceo Tumori tipo ghiandole salivari/annessi cutanei</p>	<p>Tumori epiteliali-mioepiteliali Precursori Carcinoma duttale in situ* Neoplasia lobulare** Carcinoma lobulare in situ classico Carcinoma lobulare in situ pleomorfo Iperplasia lobulare atipica Lesioni proliferative intraduttali* Iperplasia duttale usuale Lesioni con cellule a colonna comprendenti l'atipia epiteliale piatta Iperplasia duttale atipica Lesioni papillari Papilloma intraduttale Carcinoma papillare intraduttale Carcinoma papillare incapsulato Carcinoma papillare solido Proliferazioni epiteliali benigne Adenosi sclerosante Adenosi apocrina Adenosi microghiandolare Radial scars/lesione sclerosante complessa Adenomi</p>	<p>TUMORI MESENCHIMALI (ad esempio: angiosarcoma, ecc)</p> <p>TUMORI FIBROEPITELIALI Fibroadenoma Tumori fillodi (benigno, borderline, maligno) Amartoma</p> <p>TUMORI DEL CAPEZZOLO Adenoma del capezzolo Tumore siringomatoso Malattia di Paget del capezzolo</p> <p>LINFOMI MALIGNI</p> <p>TUMORI METASTATICI</p> <p>TUMORI DELLA MAMMELLA MASCHILE Ginecomastia Carcinoma invasivo Carcinoma in situ</p> <p>QUADRI CLINICI Carcinoma infiammatorio Carcinoma mammario bilaterale</p>
---	---	---

Tabella 1 Classificazione dei tumori della mammella secondo WHO2012.

Staging TNM

L'estensione della malattia viene descritta con criteri classificativi tradizionali ed il sistema TNM è il più frequentemente adottato. Dal gennaio 2010 è in uso il sistema di classificazione TNM rivisto dall'American Joint Committee on Cancer (AJCC-settima edizione) ^[12].

Tale modello di classificazione si basa sulla valutazione di alcuni parametri clinici e patologici quali

- Caratteristiche della neoplasia (T)
- Presenza ed estensione delle metastasi ai linfonodi regionali (N)

- Presenza di eventuali metastasi a distanza (M)

Caratteristiche della neoplasia (T)

Le dimensioni del tumore costituiscono un fattore prognostico indipendente molto importante che correla di per sé con la maggior sopravvivenza a 20 anni delle pazienti affette da lesioni sotto al centimetro di dimensioni (86%) rispetto a quelle con lesioni più grandi (69%). Le dimensioni della neoplasia correlano inoltre con l'incidenza di metastasi linfonodali.

Nonostante ciò anche nei tumori pT1a e pT1b la valutazione del rischio deve essere effettuata considerando anche altri parametri prognostici, quali lo stato dei linfonodi ascellari, i fattori biologici (Ki-67, stato dei recettori ormonali, stato di HER2, grading) e l'età della paziente.

Tumore primitivo (T):	T1c: tumore dalla dimensione compresa tra 1,1 cm e 2,0 cm
Tx: tumore primitivo non definibile	T2: tumore superiore a 2,0 cm ma non superiore a 5,0 cm nella dimensione massima
T0: non evidenza del tumore primitivo	T3: tumore superiore a 5,0 cm nella dimensione massima
Tis: carcinoma in situ:	T4: tumore di qualsiasi dimensione con estensione diretta alla parete toracica e/o alla cute (ulcerazione o noduli cutanei)(2)
Tis (DCIS) Carcinoma duttale in situ	T4a: estensione alla parete toracica (esclusa la sola aderenza/invasione del muscolo pettorale)
Tis (LCIS) Carcinoma lobulare in situ	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
Tis (Paget) Malattia di Paget del capezzolo non associata con carcinoma invasivo e/o in situ nel parenchima mammario sottostante(1)	T4c: presenza contemporanea delle caratteristiche di T4a e T4b
T1: tumore della dimensione massima fino a 2 cm	T4d : carcinoma infiammatorio(3)
T1mi: microinvasione della dimensione massima di 0,1 cm	
T1a: tumore dalla dimensione compresa tra 0,1 cm e 0,5 cm	
T1b: tumore dalla dimensione compresa tra 0,6 cm e 1,0 cm	

Tabella 2 Caratteristiche della neoplasia (T) secondo la classificazione clinica "TNM" AJCC 2009.

Presenza ed estensione delle metastasi ai linfonodi regionali (N)

Al pari delle dimensioni della lesione, la presenza di linfonodi sede di metastasi all'esordio costituisce un fattore prognostico importante.

Difatti le pazienti positive per tale caratteristica incorrono più frequentemente (70% vs 20-30%) in recidive e sono caratterizzate da un minor tasso di sopravvivenza ai 5 anni.

ciò è confermato anche dal recente studio MIRROR da cui emerge il ruolo prognostico negativo anche della presenza di micro metastasi o di cellule isolate (tabella 3)^[13].

Linfonodi regionali (N): Nx: linfonodi regionali non valutabili (ad esempio, se precedentemente asportati) N0: linfonodi regionali liberi da metastasi N1: metastasi nei linfonodi ascellari omolaterali mobili (livello I-II) N2: 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(4) 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 clinicamente rilevabili(4) e in assenza di metastasi clinicamente evidenti nei linfonodi ascellari (livello I-II) N3: metastasi in uno o più linfonodi sottoclaveari omolaterali (livello III ascellare) con o senza coinvolgimento di linfonodi ascellari del livello I, II; o nei linfonodi mammari interni omolaterali clinicamente rilevabili(4) in presenza di metastasi nei linfonodi ascellari livello I-II clinicamente evidenti; o metastasi in uno o più linfonodi sovraclaveari omolaterali con o senza 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
---	---

Tabella 3 Presenza ed estensione delle metastasi ai linfonodi regionali (N) secondo la classificazione clinica "TNM" AJCC 2009.

Presenza di eventuali metastasi a distanza (M)

Metastasi a distanza (M):

Mx: metastasi a distanza non accertabili

M0: 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 evidenziati mediante biologia molecolare o microscopicamente nel sangue, midollo osseo o in altri tessuti diversi dai linfonodi regionali, di dimensioni non superiori a 0,2 mm in una paziente senza segni o sintomi di metastasi

M1: metastasi a distanza evidenziate mediante classici esami clinico e radiologico e/o istologicamente dimostrate di dimensioni superiori a 0,2 mm.

Tabella 4 Presenza di eventuali metastasi a distanza (M) secondo la classificazione clinica "TNM" AJCC 2009.

Accanto alla classificazione clinica è utilizzata la classificazione cosiddetta patologica, basata quindi sul riscontro diagnostico delle differenti caratteristiche della neoplasia (tabella 5):

<p>pT: Tumore primitivo</p> <p>La classificazione patologica del tumore primitivo corrisponde a quella clinica.</p> <p>pN: Linfonodi regionali</p> <p>pNx: i linfonodi regionali non possono essere definiti (ad esempio: non sono stati prelevati o sono stati rimossi in precedenza)</p> <p>pN0: non metastasi nei linfonodi regionali identificate istologicamente (aggiungere (sn) se la classificazione e' basata sul linfonodo sentinella senza la dissezione ascellare)</p> <p>Nota: si definiscono cellule tumorali isolate (isolated tumor cell= ITC) piccoli aggregati di cellule non più grandi di 0,2 mm o singole cellule tumorali</p>	<p>pN0 (mol-): non metastasi nei linfonodi regionali istologicamente accertate, RT-PCR (real time- polymerase chain reaction) (6) negativa</p> <p>pN0 (mol+): RT-PCR positiva(6) ma non metastasi nei linfonodi regionali all'istologia o all'immunoistochimica</p> <p>pN1: micrometastasi; o metastasi in 1-3 linfonodi ascellari omolaterali; e/o metastasi nei linfonodi mammari interni omolaterali rilevate con biopsia del linfonodo sentinella ma non clinicamente rilevabili(5)</p> <p>pN1mi: micrometastasi (di dimensioni superiori a 0,2 mm e/o più di 200 cellule, ma non più grandi di 2 mm)</p>	<p>pN2: metastasi in 4-9 linfonodi ascellari omolaterali; o in linfonodi mammari interni omolaterali clinicamente rilevabili(7) in assenza di metastasi nei linfonodi ascellari</p> <p>pN2a: metastasi in 4-9 linfonodi ascellari, includendo almeno una localizzazione tumorale delle dimensioni massime superiori a 2 mm</p> <p>pN2b: metastasi clinicamente rilevabili(7) nei linfonodi mammari interni in assenza di metastasi nei linfonodi ascellari</p> <p>pN3: metastasi in 10 o più linfonodi ascellari omolaterali; o in linfonodi sottoclavicolari (livello III ascellare) omolaterali; o metastasi clinicamente rilevabili(7) nei</p>
---	---	---

<p>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 metodi immunohistochimici. I linfonodi contenenti solo cellule tumorale isolate sono esclusi dalla conta totale dei linfonodi positivi ai fini della classificazione N, ma dovrebbero essere inclusi nel numero totale dei linfonodi esaminati.</p> <p>pN0 (i-): non metastasi nei linfonodi regionali all'istologia (con colorazione standard ematossilina eosina), negativo il metodo immunohistochimico</p> <p>pN0 (i+): presenza di cellule maligne (ITC) nei linfonodi regionali non superiori a 0,2 mm (evidenziate con ematossilina –eosina o con l'immunohistochimica)</p>	<p>pN1a: metastasi in 1-3 linfonodi ascellari, includendo almeno una metastasi delle dimensioni massime superiori a 2 mm</p> <p>pN1b: metastasi nei linfonodi mammari interni con metastasi microscopiche o macroscopiche rilevate con la biopsia del linfonodo sentinella ma non clinicamente rilevabili(5)</p> <p>pN1c: metastasi in 1-3 linfonodi ascellari e nei linfonodi mammari interni con metastasi microscopiche o macroscopiche rilevata con la biopsia del linfonodo sentinella ma non clinicamente rilevabili</p>	<p>linfonodi mammari interni omolaterali 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(5); o metastasi nei linfonodi sovraclaveari omolaterali</p> <p>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)</p> <p>pN3b: metastasi clinicamente rilevabili(7) nei linfonodi mammari interni omolaterali in presenza di metastasi in uno o più linfonodi ascellari positivi; o metastasi in più di tre linfonodi ascellari e nei linfonodi mammari interni con metastasi microscopiche o macroscopiche rilevate attraverso biopsia del linfonodo sentinella ma non clinicamente rilevabili(5);</p> <p>pN3c: metastasi nei linfonodi sovraclaveari omolaterali</p>
---	--	--

Tabella 5 Classificazione patologica secondo "TNM" AJCC 2009.

La combinazione delle caratteristiche elencate nel sistema TNM consentono la definizione dello stadio della neoplasia come segue (tabella 6):

Stadio 0	Tis	N0	M0
Stadio I A	T1	N0	M0
Stadio I B	T0	N1	
	T1	N1	
Stadio IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	
	T2	N0	
Stadio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	
Stadio IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	
	T2	N2	
	T3	N1	
	T3	N2	
Stadio IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	
	T4	N2	
Stadio IIIC	Ogni T	N3	M0
Stadio IV	Ogni T	Ogni N	M1

Tabella 6 Staging della neoplasia mammaria secondo AJCC 2009

I fattori prognostici indicati nel sistema TNM sono utili per prevedere la prognosi delle singole neoplasie. Accanto ad essi vengono, attualmente utilizzati altri fattori che sono utili come indicatori di risposta alla terapia.:

- Grado istologico
- Attività proliferativa (Ki67)
- Tipo istologico

- Invasione vascolare
- Stato di HER-2
- Stato dei recettori ormonali
- Età della paziente (< 35 anni: prognosi peggiore)

Grado istologico

La determinazione del grado istologico si basa su alcune caratteristiche peculiari della lesione quali:

1. Formazione di ghiandole: si definiscono come strutture con un lume centrale, delineate da cellule neoplastiche. Si assegna un punteggio di 1, quando più del 75% del tumore forma ghiandole; 2, quando le ghiandole costituiscono dal 10 al 75% del tumore; 3, quando sono meno del 10% della neoplasia.

2. Pleomorfismo nucleare: si definisce in relazione alla forma e dimensioni del nucleo e sulla presenza del nucleolo. Si assegna un punteggio di 1, ai nucleo meno pleomorfi (aspetto abbastanza omogeneo e regolare), 2, quando compare un nucleolo visibile, 3, quando è presente un marcato pleomorfismo nucleare e molteplici nucleoli.

3. Mitosi: si contano le mitosi su 10 campi microscopici a forte ingrandimento. Si assegna un punteggio di 1, quando le mitosi sono inferiori a 12; 2, quando sono tra 12 e 23; 3, quando sono più di 23.

Sommando i punteggi si ottiene il grado che viene classificato come segue:

- GX: non valutabile
- G1: punteggio totale tra 3 e 5; buona prognosi.
- G2: punteggio totale compreso tra 6 e 7: prognosi incerta
- G3: punteggio totale compreso tra 8 e 9; prognosi sfavorevole

Attività proliferativa

La determinazione dell'attività proliferativa della lesione avviene attraverso la valutazione percentuale di positività delle cellule per la proteina Ki67.

Sebbene alcuni studi abbiano mostrato come un'elevata positività possa essere un dato predittivo negativo sull'andamento clinico della patologia, ^[14,15]. ad oggi non è ancora stato definito un valore soglia in grado di classificare in maniera univoca le neoplasie alto e basso proliferative (figura 1)

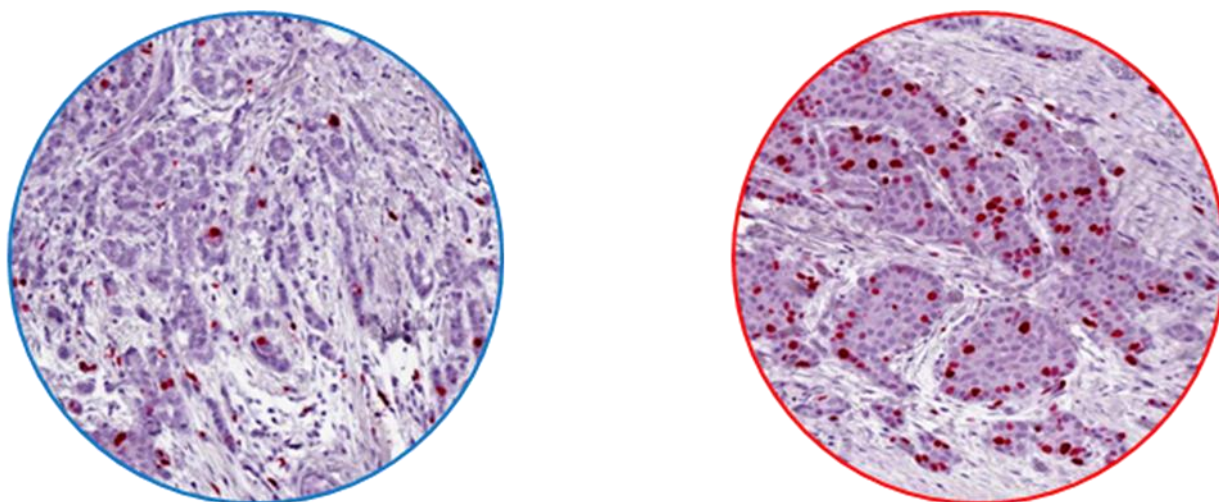


Figura 1 Immunoistochimica Ki67, basso proliferante (sx) alto proliferante (dx)

Tipo istologico

Indipendentemente dagli altri fattori prognostici gli istotipi tubulari, midollare, adenoido-cistico, apocrino, in assenza di interessamento linfonodale, hanno una prognosi più favorevole rispetto alle altre forme (figura 2) ^[16].

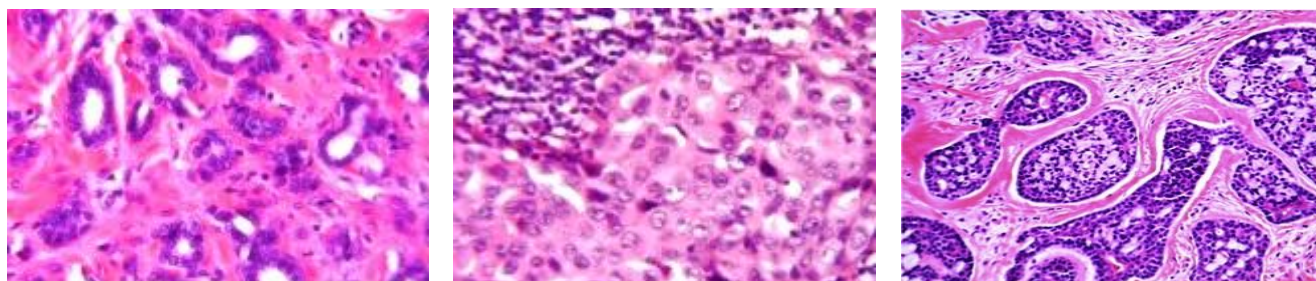


Figura 2 Colorazione in ematossilina-eosina di un carcinoma tubulare, un carcinoma midollare ed un carcinoma adenoido-cistico della mammella

Invasione vascolare

la presenza di cellule neoplastiche nei vasi è una caratteristica ancora oggi non universalmente accettata come fattore prognostico nonostante diversi studi ne attribuiscano un ruolo prognostico negativo ^[17-19].

Stato di HER2

L'acronimo Her2 indica un recettore tirosin-chinasico transmembrana della famiglia ErbB in grado, una volta attivato, di avviare un pathway di segnale per la crescita e la proliferazione cellulare.

Il gene che codifica per la proteina Her2 è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 17 (17q21-q22).

Una caratteristica della proteina Her2 è la capacità di dimerizzare non solo con altre proteine Her2 ma con più partner della famiglia ErbB ^[20,21]

La sovraespressione della proteina Her2 valutata con tecniche di immunistochemica (IHC) o la sua amplificazione genica è riscontrata in circa il 20% dei carcinomi della mammella e rappresenta un importante fattore predittivo di risposta alla terapia (trastuzumab, lapatinib, pertuzumab) nonché un altrettanto importante fattore prognostico ^[22]

Sia per quanto riguarda la valutazione della proteina sia per il gene Her2 vengono attualmente utilizzati i criteri raccomandati dalle linee guida ASCO/CAP ^[23] (tabella 7).

Affinchè un caso sia considerato positivo in IHC (3+) occorre presenti una colorazione di membrana circonferenziale completa in almeno il 10% delle cellule neoplastiche.

In caso di colorazione debole e incompleta, oppure in caso di assenza di colorazione il caso viene considerato negativo (1+ o 0).

Esiste tuttavia una situazione intermedia in cui la colorazione di membrana può essere o meno completa con intensità moderata; in tal caso si considera il preparato come equivoco (2+) con la necessità di un successivo approfondimento diagnostico con tecniche di ibridazione in situ (ISH).

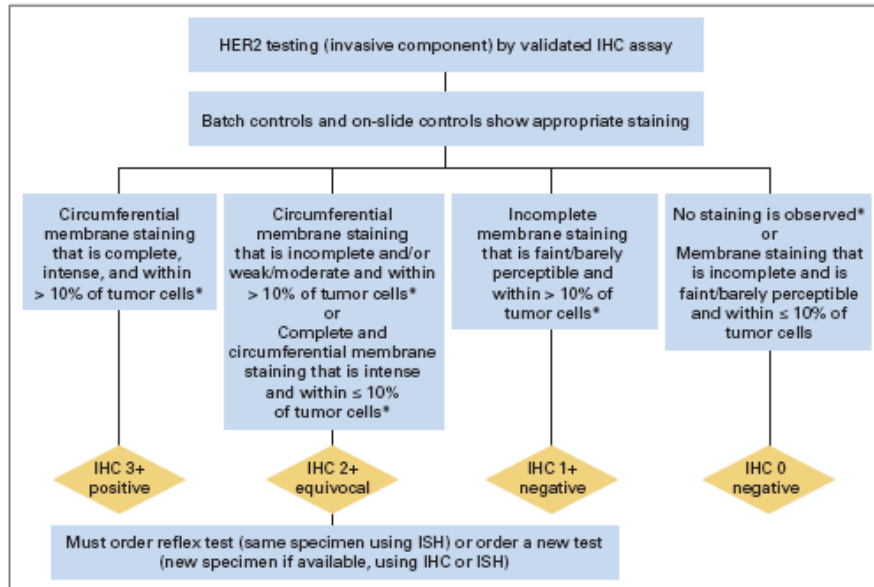


Tabella 7 Algoritmo di valutazione IHC di Her2 secondo ASCO/CAP 2013

L'utilizzo di tecniche ISH consente di visualizzare su sezione istologica il numero di copie del gene Her2 in una determinata area del preparato, selezionata in base alla precedente IHC per Her2.

Anche per la valutazione dell'assetto genico di Her2 vengono utilizzate le raccomandazioni ASCO/CAP (tabella 8) in cui viene riportato un pattern articolato di possibili situazioni.

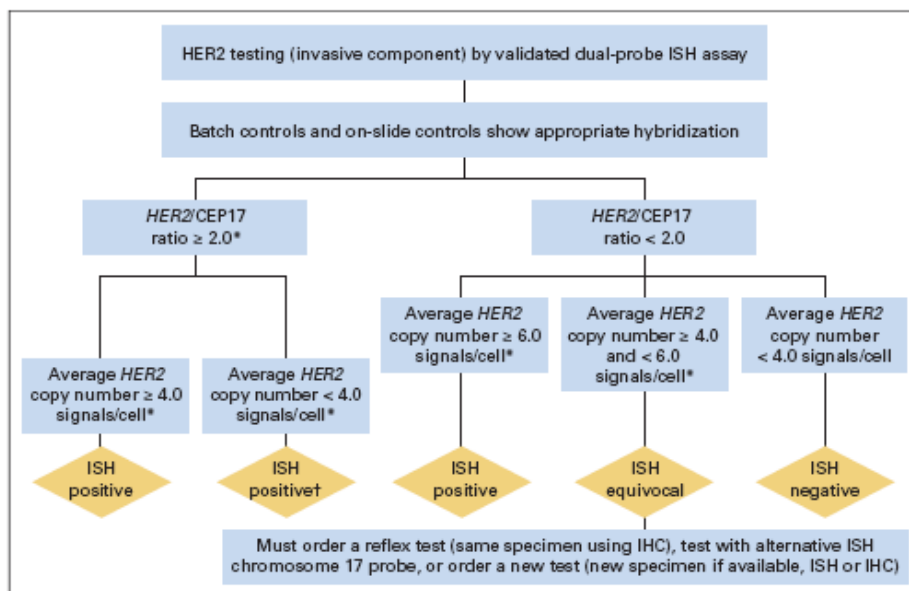


Tabella 8 Algoritmo di valutazione ISH di Her2 secondo ASCO/CAP 2013

Infatti, mentre un caso caratterizzato da un rapporto tra il numero di copie del gene Her2 ed il numero di copie del centromero del cromosoma 17 maggiore o

uguale a 2 è da considerarsi positivo; qualora tale rapporto sia minore di 2 occorre considerare anche la media dei segnali genici (figura 3).

Si vengono così a definire 3 possibili situazioni in cui un caso con un numero medio di segnali genici maggiore o uguale a 6 è da considerarsi positivo, un caso con un numero medio di geni Her2 minore di 4 è da considerarsi negativo, mentre un caso con un numero di segnali genici compreso tra 4 e 6 è da considerarsi equivoco con necessità di ripetere il test su altro materiale ovvero con altre metodiche complementari ^[23].

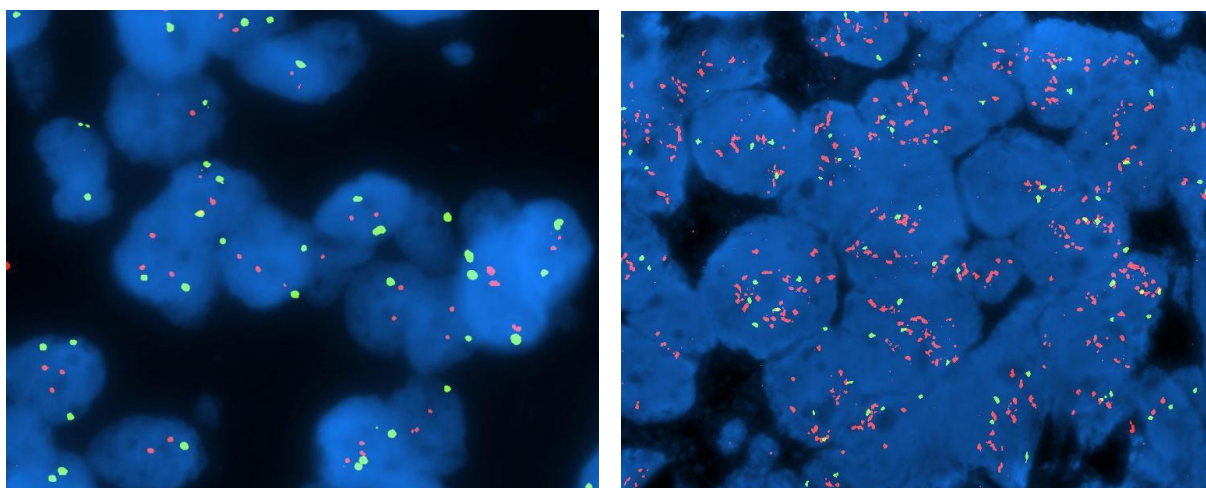


Figura 3 rispettivamente un caso con FISH negativa (ratio <2) ed un caso con FISH positiva (ratio>2)

Stato dei recettori ormonali

L'importanza nella definizione della positività all'indagine IHC per i recettori ormonali sia estrogenici che progestinici (ER, PgR) è dalla possibilità di trattamento specifico sia in caso di malattia metastatica che in neoadiuvante e adiuvante. Anche per marcatori ormonali si seguono specifiche raccomandazioni ASCO/CAP ^[24]. I tumori con elevati livelli di recettori sono quindi quelli che traggono maggior beneficio dalla terapia ormonale anche se molti fattori ne possono influenzare il grado di risposta (stato di HER-2, il grado istologico ed il Ki67).

Marcatori molecolari

Grazie all'applicazione delle tecniche IHC e di biologia molecolare è stato possibile identificare differenti tipologie di neoplasie con caratteristiche cliniche differenti:

- “Luminali A like”: neoplasie a prognosi favorevole caratterizzate dall’espressione dei recettori ormonali (ER e PgR), dalla negatività per HER2, e con un indice Ki67 basso (<14%);
- “Luminali B like”: neoplasie maggiormente aggressive con prognosi peggiore, si dividono a loro volta in due sottogruppi.
 - Luminali B like (HER2 negative): con espressione solo dell’ER, negatività per HER2 ed almeno il riscontro di un indice Ki67 elevato ovvero una condizione di negatività per il PgR.
 - Luminali B like (HER2 positive): con espressione solo dell’ER, positività per HER2 e qualsiasi valore sia di Ki67 che del PgR.
- Her 2 positive (non luminali): neoplasie con espressione di HER2 ed assenza di positività per i recettori ormonali (ER e PgR).
- Basal Like (triplo-negativo): neoplasie caratterizzate dall’assenza di espressione dei recettori ormonali e di HER2.

Nonostante ciò, data l’ampia eterogeneità che caratterizza il carcinoma della mammella è possibile ulteriormente creare dei sottogruppi a tale classificazione.

Per questo motivo sono ad oggi disponibili alcuni kit in grado di analizzare un numero via via maggiore di geni. In particolare l’ Oncotype Dx che analizza l’espressione di 21 geni su tessuto paraffinato (molecole di RNA con la metodica RT-PCR), mentre il test MammaPrint analizza 70 geni su tessuto fresco congelato. Tali kit sono ancora in fase di validazione per l’utilizzo clinico ed oggetto di studi prospettici ^[25-32].

3. Carcinoma della mammella maschile

Anche la popolazione maschile può essere affetta da carcinoma della mammella anche se con incidenza estremamente rara (1% circa).

La neoplasia mammaria maschile, morfologicamente, mostra similitudini con quella femminile nella donna post-menopausa e come tale viene trattato.

Fattori predisponenti

- Ginecomastia: nel 40% circa dei carcinomi mammari maschili compare nel tessuto adiacente; ad oggi, tuttavia, non è però possibile quantificare il rischio di sviluppare cancro associato ai portatori di ginecomastia.
- Fattori ormonali: il riscontro di livelli elevati di estrogeni e prolattina è associato ad un aumentato rischio di insorgenza. Ciò si verifica anche in soggetti trattati con estrogeni per un pregresso carcinoma prostatico, in soggetti affetti da sindrome di Klinefelter (XXY) ed in pazienti con iperstrogenismo associato a cirrosi epatica.

Istologicamente si osserva la presenza di un carcinoma di tipo duttale, che può presentarsi sia in situ sia invasivo generalmente poco differenziato. Analogamente al carcinoma femminile, le cellule neoplastiche esprimono frequentemente recettori per estrogeno e progesterone. Inoltre nel 95% dei casi sono presenti anche i recettori per androgeno.

Per quanto riguarda i fattori prognostici e predittivi, ad oggi vengono mutuati gli stessi del carcinoma mammario femminile ^[33-36]

4. Terapia

Chemioterapia neoadiuvante

Il termine “neoadiuvante” si riferisce all’impiego preoperatorio dei farmaci citotossici.

L’approccio consente di utilizzare generalmente gli stessi regimi chemioterapici della fase adiuvante consentendo a pazienti con lesioni voluminose (>2cm) di poter essere sottoposte ad un intervento chirurgico meno demolitivo.

In caso di completa remissione al termine della terapia neoadiuvante si associa un minor rischio di recidiva locale.

Trattamento chirurgico

L'approccio chirurgico rappresenta il trattamento d'elezione nei pazienti con carcinoma mammario in situ o invasivo e può essere associato a radioterapia adiuvante.

La scelta tra chirurgia demolitiva e conservativa dipende da molteplici fattori tra cui, in primis, la natura della malattia neoplastica mammaria e la sua estensione.

Radioterapia

L'associazione tra radioterapia e chirurgia conservativa ha mostrato ottimi risultati già validati in numerosi studi. La possibilità di recidiva a 5 anni è ridotta al 4-8% con una mortalità sovrapponibile alle pazienti oggetto di mastectomia [37-41].

Trattamento oncologico sistemico

La terapia sistemica adiuvante oggi aumenta notevolmente la sopravvivenza dei pazienti operati di carcinoma alla mammella, sia per una miglior diagnosi e classificazione della neoplasia, che per la disponibilità di farmaci sempre più efficaci.

In particolare, accanto alle molecole tradizionali impiegate nella ormonoterapia, nelle terapie alchilanti e citotossiche ingenerale, sono state sviluppate strategie cosiddette mirate volte a colpire quei bersagli chiave della proliferazione cellulare.

In particolare l'avvento del Trastuzumab ha rappresentato un'importante milestone nella terapia mirata della patologia mammaria.

La terapia della fase metastatica

Il carcinoma mammario metastatico rappresenta oggi una sfida poiché, nonostante progressi sopracitati nella chemioterapia, la sopravvivenza media di questa categoria di pazienti varia tra 24 e 48 mesi.

Capitolo 2

Eterogeneità Genetica di Her2 e suo impatto sull'andamento della malattia neoplastica mammaria

Indice

Introduzione	22
Her2	23
Materiali e metodi.....	28
Selezione dei pazienti	28
Definizione di eterogeneità	29
Analisi FISH.....	29
Analisi Statistica	31
Risultati.....	31
Definizione di eterogeneità	31
Risultati complessivi per Cut-off.....	31
Correlazioni tra FISH e parametri clinico - patologici.....	36
Discussione e conclusioni	41

1. Introduzione

Il carcinoma alla mammella è una patologia caratterizzata dalla presenza di molteplici forme patologiche, un grado di risposta non omogeneo e differenze sostanziali nella sopravvivenza a lungo termine dei pazienti ^[1]

Il riscontro di tale grado di eterogeneità nel carcinoma mammario riflette l'odierna ed accettata nozione per cui non si tratta di un unico tipo di cancro con molteplici varianti ma che sotto il nome generico di neoplasia mammaria siano associate un'insieme di malattie neoplastiche della mammella e delle cellule che ne compongono la struttura. ^[2]

La forma più comunemente riscontrata di carcinoma mammario è quella duttale infiltrante (80%), la quale tuttavia non costituisce una categoria uniforme in relazione alle differenti caratteristiche che le cellule che la compongono possono assumere.

Allo stesso modo possono essere riscontrati anche differenti pattern di proliferazione e di comportamento a parità di morfologia.

La classificazione su base molecolare del carcinoma della mammella, infatti, fornisce un collegamento tra il comportamento delle cellule neoplastiche e la biologia del cancro stesso.

Ad oggi, oltre ai marcatori comunemente usati in routine (ER, PgR, Her2 e Ki67) è possibile stratificare i carcinomi della mammella anche per la positività alla CK5/6 ed a EGFR.

Grazie alla combinazione di questi biomarcatori è possibile distinguere tra 4 classi con differente andamento clinico, come descritto nel capitolo precedente. ^[6,7]

Al fine di fornire un dato clinicamente rilevante per il corretto management della paziente, vengono attualmente utilizzati dei marcatori predittivi quali ER e PgR ed Her2.

Sebbene la positività per ER e PgR, associata alla negatività per Her2 costituisca di per sé un dato prognostico positivo, la presenza di un'iperespressione di Her2, o di una sua amplificazione genica, indica generalmente una forma neoplastica aggressiva con una prognosi sfavorevole.

Questo fatto è stato però ribaltato dall'avvento delle nuoveteraie molecolari mirate a cui queste pazienti (Her2+) possono essere sottoposte con buoni tassi di risposta^[8-10].

Her2

Lo human epidermal growth factor receptor-2 (Her2) è un gene che mappa sul cromosoma 17, regioni q12-21, amplificato nel 20% circa dei casi di carcinoma della mammella.

La proteina HER2 rientra nel gruppo dei recettori transmembrana di tipo I per fattori di crescita, la cui funzione è di attivare vie di segnalazione intracellulare in risposta a segnali extracellulari.

La struttura generale di questi recettori consiste in un dominio recettoriale esterno, in un dominio transmembrana ed in un dominio tirosinchinasico intracellulare.

In seguito al legame con il ligando, queste proteine vanno incontro a dimerizzazione (omodimeri o eterodimeri) ed a successiva transfosforilazione dei residui tirosinici intracitoplasmatici.

Questi residui così modificati sono in grado di interagire con numerose proteine di segnale attivando svariati secondi messaggeri con differenti effetti biologici.

La proteina HER2 è quella dotata della maggior attività catalitica, a compensare l'assenza di un ligando specifico noto, e tende a formare prevalentemente eterodimeri che portano al compimento di uno stimolo proliferativo e di sopravvivenza della cellula.

Il ruolo di HER è stato ampiamente studiato nel tempo su modelli animali definendone un ruolo fondamentale nello sviluppo di molti organi e apparati (cervello, cute, polmone, apparato gastrointestinale, mammella).^[11-16]

La relazione tra un'aumentata espressione di HER2 e l'induzione neoplastica è ormai ben assodata.

I primi studi, infatti, risalgono agli inizi degli anni '80 in modelli animali e su linee cellulari umane^[17,18]. Nel 1987, Slamon e colleghi^[19] hanno dimostrato la correlazione tra la presenza di amplificazione del gene HER2 e l'andamento

aggressivo del carcinoma della mammella. Nel 1989 McKenzie e colleghi ^[20] hanno prodotto in laboratorio alcuni anticorpi specifici contro il recettore HER2 e negli anni seguenti molteplici studi hanno affrontato lo stesso argomento con risultati incoraggianti su linee cellulari e modelli murini ^[21-24].

Solo nel 1992 ^[25] vengono gettate le basi dell'applicabilità in medicina umana degli anticorpi monoclonali diretti contro HER2 grazie all'umanizzazione delle regioni variabili dell'anticorpo, riducendo così la reazione dell'ospite all'anticorpo stesso.

I primi dati in preclinica relativi all'impiego della terapia anticorpale specifica contro HER2 sono stati condotti da Baselga e colleghi ^[26] su xenografts di carcinoma della mammella in combinazione con paclitaxel e doxorubicina, i quali hanno evidenziato una completa regressione delle lesioni e, quindi, un aumentato effetto antineoplastico dei due farmaci. questi dati hanno costituito la base dei futuri studi clinici.

Fu sempre Slamon ^[27], infatti, che nel 2001 in uno studio condotto su una coorte di 469 pazienti affetta da carcinoma della mammella metastatico HER2 positivo dimostra i benefici della terapia con Herceptin.

Attualmente il Trastuzumab, nelle sue formulazioni commerciali, rappresenta il trattamento d'elezione anche in chemioterapia neoadiuvante delle pazienti con carcinoma della mammella HER2 positivo.

L'amplificazione genica è anche correlata nella maggior parte dei casi ad un'iper espressione della proteina recettoriale codificata con conseguente aumento delle vie di segnalazione che portano ad una spinta proliferativa e di sopravvivenza cellulare. Ciò si traduce in una neoplasia complessivamente più aggressiva con un prognosi non favorevole.

Con l'avvento del trastuzumab, un anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro la proteina Her2, la determinazione dello stato di Her2 in Immunoistochimica (IHC) e/o in ibridazione in situ (ISH) ha assunto un ruolo non solo prognostico ma anche di selezione dei pazienti eleggibili a terapia ^[19;28-32].

Per questo motivo la corretta valutazione dello status di Her2 è di fondamentale importanza per una corretta decisione clinico-terapeutica.

Uno dei problemi emergenti nella definizione del grado di positività di Her2 è l'eterogeneità genica, per almeno svariate ragioni:

1. L'eterogeneità può condurre a risultati discordanti tra ago biopsia/citologia e successivo pezzo operatorio, e tra il pezzo operatorio e le successive recidiva/metastasi.
2. L'eterogeneità può portare a differenti risultati sia all'interno di campionamenti differenti dello stesso tumore sia sullo stesso preparato tra laboratori diversi.
3. Ad oggi non è ancora ben chiaro la rilevanza del grado di eterogeneità sulla prognosi e sul grado di risposta al trastuzumab.

Per quanto riguarda il primo punto, molteplici studi concordano sull'elevata concordanza tra il dato ottenuto analizzando l'agobiopsia ed il successivo pezzo operatorio ^[33-35], mentre altrettanti descrivono variazioni nella positività per Her2 tra lesione primitiva e metastasi, ipotizzando una acquisizione o perdita di espressione/amplificazione genica, durante la progressione neoplastica ^[36-29].

Se è accettata la teoria per cui anche il carcinoma della mammella si sviluppa in seguito all'accumulo di molteplici alterazioni geniche, è altrettanto vero che queste discordanze sono imputabili proprio alla presenza di popolazioni cellulari con differente assetto biomolecolare all'interno dello stesso tumore; in particolare per quanto riguarda Her2.

Con il termine "eterogeneità genica di Her2", infatti, si descrive una condizione in cui coesistono sottopopolazioni multiple di cellule neoplastiche con profili di amplificazione distinti ^[40].

L'eterogeneità, inoltre, può presentarsi sia con cellule neoplastiche unite a formare dei cluster che a cellule sparse, mescolate tra loro.

La frequenza con cui si presenta questo fenomeno, ad oggi, non è ancora stata definita in modo univoco e varia molto in relazione al disegno sperimentale degli studi.

Andersson et al ^[41] hanno riportato solo 1 caso su 78 positivo per l'eterogeneità genica di Her2, ma la loro popolazione comprendeva solo 13 casi

Her2; Glockner e colleghi, invece, ^[42] riportano un dato di eterogeneità nel 36% dei casi analizzati. Altri studi ^[40,43,44] descrivono valori differenti compresi tra il 13% ed il 16%.

Come è noto in letteratura il grado di risposta al trastuzumab è quanto mai variabile (tabella 9) con una percentuale variabile tra il 10% ed il 73% ^[45-52].

Study	Study Population	Percent who had Previous Chemotherapy for Metastatic Breast Cancer	Drug(s) Used	Overall Response Rate (95% CI)
Baselga et al. [N Engl J Med. 366(2):109-19, 2012.]	406	0%	Trastuzumab with chemotherapy (docetaxel)	69%
Blackwell et al. [J Clin Oncol. 28(7):1124-30, 2010.]	296 women who progressed on chemotherapy with trastuzumab	100%	Trastuzumab with lapatinib	10% (3-12%)
Andersson et al. [J Clin Oncol. 29(3):264-71, 2011.]	284	0%	Trastuzumab with chemotherapy (docetaxel)	59%
Valero et al. [J Clin Oncol. 29(2):149-56, 2011.]	263	0%	Trastuzumab with chemotherapy (doxetaxel)	<u>73%</u>
			Trastuzumab with chemotherapy	<u>73%</u>
Slamon et al. [N Engl J Med. 344(11):783-92, 2001.]	235	0%	Trastuzumab with chemotherapy (anthracycline & clophosphamide; or paclitaxel)	<u>50%</u> (44-57%)

Robert et al. [J Clin Oncol. 24(18):2786-92, 2006.]	196	47%	Trastuzumab with chemotherapy (paclitaxel)	36% (26-46%)
			Trastuzumab with chemotherapy (paclitaxel plus carboplatin)	52% (41-62%)
Study	Study Population	Percent who had Previous Chemotherapy for Metastatic Breast Cancer	Drug(s) Used	Overall Response Rate—Percent who Responded to Treatment
Tripathy et al [J Clin Oncol. 22(6):1063-70, 2004.]	154 women who progressed on chemotherapy alone	100%	Trastuzumab with chemotherapy	14%
	93 women who progressed on chemotherapy and trastuzumab	100%		11%
Seidman et al. [J Clin Oncol. 26(10):1642-9, 2008.]	178	54%	Trastuzumab with chemotherapy (paclitaxel)	Paclitaxel weekly: 55% (45-65%)
				Paclitaxel every 3 weeks:
				58% (46-69%)

Tabella 9 Risposta al trattamento con trastuzumab

In tal caso, oltre alle differenti caratteristiche generali delle neoplasie trattate, un parametro che potrebbe influenzare la risposta potrebbe essere proprio anche l'eterogeneità genica a carico di Her2.

Al fine di definire come “eterogeno” un caso si sono susseguite nel tempo molteplici indicazioni senza però alcun riscontro clinico.

Nel 2007 le linee guida ASCO/CAP^[53] definivano un caso eterogeneo qualora mostrasse la presenza di una percentuale di nuclei neoplastici con differente assetto genico tra il 5% ed il 50% dei nuclei esaminati. Nel 2009 questo cut-off è stato rivisto dal pannello di esperti del CAP, i quali hanno indicato come valore soglia per l'eterogeneità, il riscontro di una popolazione con differente assetto genico nel 45%-50% dei nuclei neoplastici^[54].

Recentemente, con l'aggiornamento delle linee guida ASCO/CAP 2013^[55] si definisce eterogeneo un caso in cui sia presente un cluster di nuclei neoplastici con differente assetto genico corrispondente ad almeno il 10% del totale della lesione sul vetrino analizzato.

In aggiunta occorre citare anche la SIGU (Società Italiana di Genetica Umana), la quale consiglia di riportare separatamente ciascuna popolazione con differente assetto genico^[56].

Fate queste premesse lo scopo del progetto è quello di valutare il ruolo dell'eterogeneità genica di Her2 sull'andamento della malattia neoplastica mammaria definendo un valore soglia correlabile con il differente comportamento clinico.

2. Materiali e metodi

Selezione dei pazienti

Per il presente progetto sono stati inizialmente valutati dall'archivio dell'Unità Operativa di Anatomia Patologica "M. Malpighi", Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie tutti i casi in cui fosse presente l'analisi FISH nel periodo tra il 2008 ed il 2012. Dei 2072 casi presenti in quel intervallo temporale, sono stati selezionati solo i casi con diagnosi di carcinoma duttale infiltrante di grado istologico II e III risultati essere 740, di cui 184 con una componente generalmente definibile eterogenea e 556 privi di eterogeneità.

Dei 740 casi sono stati mantenuti quelli di cui fossero a disposizione i seguenti parametri: età all'intervento, localizzazione e sede, presenza di carcinoma in situ,

diagnosi, dimensioni del nodulo, presenza di metastasi linfonodali all'intervento, distanza dai margini, presenza di emboli neoplastici, assetto immunohistochimico (ER-PgR-Ki67-Her2).

Tale restrizione ha portato all'ottenimento di una casistica complessiva di 211 casi.

Dal punto di vista istologico tutti i casi sono stati rivalutati al fine di rendere le diagnosi omogenee alle recenti linee guida ^[55,57].

Per quanto riguarda la valutazione dell'andamento della patologia si è deciso di considerare il follow-up chirurgico definendo come tempo di un evento secondario quello del relativo intervento.

Definizione di eterogeneità

Non essendo al momento disponibile una definizione univoca e clinicamente validata di eterogeneità genica per quanto riguarda l'amplificazione di Her2 nel carcinoma della mammella, si è scelto di analizzare la casistica con 3 differenti valori di cut-off: 10%^[55], 20% e 30%^[53] di cellule sia sparse che a cluster con differente assetto genico.

Analisi FISH

L'analisi FISH è stata eseguita seguendo il protocollo di Graziano et al. ^[42]:

da ciascun caso è stata ottenuta una sezione istologica in bianco dello spessore di 5 micron posta su vetrino polarizzato.

Dopo una prima incubazione in stufa a secco a 56°C per almeno 2 ore, le sezioni sono state sparaffinate in 3 cambi di Bioclear (Agente chiarificante a base di terpeni naturali, Bio-Optica, Milano (IT)) di 15 minuti ciascuno.

In seguito si procede con una rapida asciugatura all'aria e con una reidratazione parziale in due cambi successivi di etanolo assoluto, seguita da una successiva asciugatura all'aria.

I campioni così processati possono essere sottoposti ai successivi trattamenti termico e protesico, rispettivamente in SSC2X (tampone salino sodio citrato a pH

7) a 75°C per 10-12 minuti, ed in una soluzione di Proteinasi K in SSC2x alla concentrazione di 0.25mg/ml a 45°C per 10-12 minuti.

Ne segue un lavaggio in tampone, una successiva disidratazione in scala di alcoli (etanolo 70%-80%-100%) per 1-2 minuti ciascuno e l'asciugatura all'aria.

La fase successiva prevede l'apposizione di un'idonea quantità di sonda molecolare (tra i 5 ed i 10 microlitri) su un'area rappresentativa della lesione selezionata preferibilmente in base alla positività IHC per Her2 ovvero sulla sezione colorata in ematossilina-eosina.

La sonda utilizzata per la valutazione dell'amplificazione di Her2, ON HER2/CEP17 dual colour probe (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, The Netherlands), è caratterizzata dall'assenza di sequenze ripetute e dall'emissione in spectrum orange (segnali genici) e spectrum green (segnali centromerici).

Una volta apposta la sonda il vetrino viene coperto con un coprioggetto, sigillato con una collante vinilico (Rubber Cement) e posto su piastra di ibridazione per essere sottoposto al ciclo di denaturazione (75-80°C per 10-15 minuti) ed ibridazione (37°C o/n).

Il giorno successivo, si procede con la fase post-ibridazione che prevede la rimozione del coprioggetto in un lavaggio di SSC2X a RT, un lavaggio di stringenza in una soluzione di NP40 in SSC2X allo 0.5% a 73°C per 2 minuti per rimuovere la quota eccedente di sonda molecolare e quei filamenti che non si sono appaiati correttamente, una disidratazione in scala di alcoli ed il contrasto dei nuclei con DAPI/Antifade (soluzione di 4',6'-diamidino-2-phenylindole in antifade alla concentrazione di 1 µg/mL, Kreatech Diagnostics, Amsterdam, The Netherlands).

La valutazione dei preparati sottoposti ad indagine FISH è stata effettuata con piattaforma di microscopia a fluorescenza Olympus BX 61 (Olympus, Melville, NY) valutando almeno 60 nuclei neoplastici per ciascun preparato.

Ogni caso è stato caratterizzato riportando il numero medio di segnali genici di Her2, il numero medio di segnali centromerici del cromosoma 17, il rapporto tra Her2/CEP17 e la percentuale di nuclei neoplastici con differente assetto genico

rispetto alla popolazione maggiormente rappresentata. L'interpretazione dei dati è stata effettuata seguendo le raccomandazioni ASCO/CAP2013 ^[39].

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando software disponibili on line (Quick-Cals by GraphPad).

Al fine di valutare eventuali correlazioni tra i dati FISH e le caratteristiche clinico - patologiche è stato applicato il Test del Chi quadro considerando valori di P inferiori allo 0.05 come significativi.

3.Risultati

Definizione di eterogeneità

Andando a stratificare la casistica di 211 pazienti si sono ottenute le seguenti percentuali di eterogeneità (sul totale dei 740 casi di carcinoma duttale infiltrante di gradi II e III presenti in archivio)

- Soglia del 10%: 24% (184/740) dei casi risulterebbe eterogeneo.
- Soglia del 20%: 14% (102/740) dei casi risulterebbe eterogeneo.
- Soglia del 30%: 10% (81/740) dei casi risulterebbe eterogeneo.

Confrontando i valori con la media dei dati assegnati dalla letteratura, si ottiene una maggiore somiglianza con il cut-off del 20%

Risultati complessivi per cut-off

Di seguito verranno riportati i risultato per la popolazione stratificata con i 3 valori soglia analizzati.

La popolazione di controllo, invece, è stata mantenuta costante e complessivamente comprendeva 109 casi di carcinoma duttale infiltrante della mammella.

Di questi 12 (11.1%) erano caratterizzati per la presenza di un evento secondario chirurgicamente rilevabile. In 57 casi (54%) il carcinoma era localizzato nella

mammella destra, mentre in 49 (46%) nella mammella sinistra. La dimensione media del nodulo neoplastico era di cm 1.82 (range 0.1cm – 7cm).

Il grado istologico maggiormente rappresentato era il grado II, 55 casi (52%) seguito dal grado III, 35 casi (32%).

L'analisi FISH ha riportato l'amplificazione del gene Her2 in 14 casi (12%) mentre assenza di amplificazione genica in 95 casi (88%).

12 casi (11%) erano risultati negativi per l'IHC ER e Pgr, mentre i restanti 97 (89%) mostravano la positività per entrambi i recettori ovvero per almeno uno dei due. il Ki67 è risultato maggiore del 20% in 48 casi (44%).

L'età media dei pazienti di controllo era di 60.5 anni (range 26-90).

Il tempo medio libero da re-intervento era di 967.3 giorni (range 289gg – 2729gg) con il riscontro di metastasi extralinfonodali in 10 casi sui 12 con eventi secondari (83%) (tabella 10).

Campione di controllo privo di eterogenità genica di Her2							
Totale casi	109						
Secondarismi	Presenza		12	Grading	Grado II		55
	Assenza		97		Grado III		35
Polarità	Mammella Dx		57	FISH	Amplificazione		14
	Mammella SX		49		Assenza di Amplificazione		95
Età media	media	min.	max.	Er e PgR	Entrambi negativi		12
	60,5	26	90		Almeno uno positivo		97
Tempo medio libero da reintervento	media	min.	max.	Ki 67	> 20%		48
	967,3 gg	289 gg	2729 gg		< 20%		61
Dimensione della lesione	media	min.	max.	Sede di metastasi	Linfondali		2
	1,82 cm	0,1 cm	7,0 cm		Extra linfonodali		10

Tabella 10 Caratteristiche della popolazione omogena di controllo

Cut-off 10%

Definendo eterogeneo un caso che presenti almeno il 10% dei nuclei neoplasti con un differente assetto genico si ottengono i seguenti risultati:

154 casi sui 740 risultano eterogenei; di questi 18 (11.6%) erano caratterizzati per la presenza di eventi secondari chirurgicamente rilevati.

In 65 casi (42%) il carcinoma era localizzato nella mammella destra, mentre in 82 (53%) nella mammella sinistra. La dimensione media del nodulo neoplastico era di cm 1.99 (range 0.3 cm – 8cm).

Il grado istologico maggiormente rappresentato era il grado III, 67 casi (43%) seguito dal grado II, 63 casi (40%).

L'analisi FISH ha riportato l'amplificazione del gene Her2 in 34 casi (21%) mentre assenza di amplificazione genica in 120 casi (78%).

22 casi (14%) erano risultati negativi per l'IHC ER e Pgr, mentre i restanti 132 (89%) mostravano la positività per entrambi i recettori ovvero per almeno uno dei due. il Ki67 è risultato maggiore del 20% in 48 casi (31%).

L'età media dei pazienti di controllo era di 59.9 anni (range 33-88). Il tempo medio libero da re-intervento era di 1004 giorni (range 90 gg – 2846 gg) con il riscontro di metastasi extralinfonodali in 18 casi sui 18 con eventi secondari (100%) (tabella 11).

Campione eterogeneo per il cut-off del 10%						
Totale casi	154					
Secondarismi	Presenza	18		Grading	Grado II	63
	Assenza	136			Grado III	67
Polarità	Mammella Dx	65		FISH	Amplificazione	34
	Mammella SX	82			Assenza di Amplificazione	120
Età media	media	min.	max.	Er e PgR	Entrambi negativi	22
	59,9	33	88		Almeno uno positivo	132
Tempo medio libero da reintervento	media	min.	max.	Ki 67	> 20%	48
	1004 gg	90 gg	2846 gg		< 20%	106
Dimensione della lesione	media	min.	max.	Sede di metastasi	Linfondali	0
	1,99 cm	0,3 cm	8,0 cm		Extra linfonodali	18

Tabella 11 Caratteristiche della popolazione eterogenea per il cut-off del 10%

Cut-off 20%

Definendo eterogeneo un caso che presenti almeno il 20% dei nuclei neoplasti con un differente assetto genico si ottengono i seguenti risultati:

102 casi sui 740 risultano eterogenei; di questi 14 (13%) erano caratterizzati per la presenza di eventi secondari chirurgicamente rilevati. In 43 casi (43%) il carcinoma era localizzato nella mammella destra, mentre in 59 (57%) nella mammella sinistra. La dimensione media del nodulo neoplastico era di cm 2.09 (range 0.3 cm – 8cm).

Il grado istologico maggiormente rappresentato era il grado III, 51 casi (50%) seguito dal grado II, 31 casi (30%).

L'analisi FISH ha riportato l'amplificazione del gene Her2 in 46 casi (45%) mentre assenza di amplificazione genica in 56 casi (55%).

16 casi (15%) erano risultati negativi per l'IHC ER e Pgr, mentre i restanti 86 (85%) mostravano la positività per entrambi i recettori ovvero per almeno uno dei due. il Ki67 è risultato maggiore del 20% in 68 casi (66%).

L'età media dei pazienti di controllo era di 60.5 anni (range 36-88).

Il tempo medio libero da re-intervento era di 1251.1 giorni (range 222 gg – 2744 gg) con il riscontro di metastasi extralinfonodali in 12 casi sui 14 con eventi secondari (85%) (tabella 12).

Campione eterogeneo per il cut-off del 20%						
Totale casi	102					
Secondarismi	Presenza	14	Grading	Grado II	31	
	Assenza	88		Grado III	51	
Polarità	Mammella Dx	43	FISH	Amplificazione	46	
	Mammella SX	59		Assenza di Amplificazione	56	
Età media	media	min.	max.	Er e Pgr	Entrambi negativi	16
	60,5	36	88		Almeno uno positivo	86
Tempo medio libero da reintervento	media	min.	max.	Ki 67	> 20%	68
	1251,1 gg	222 gg	2744 gg		< 20%	34
Dimensione della lesione	media	min.	max.	Sede di metastasi	Linfondali	2
	2,09 cm	0,3 cm	8,0 cm		Extra linfonodali	12

Tabella 12 Caratteristiche della popolazione eterogenea per il cut-off del 20%

Cut-off 30%

Definendo eterogeneo un caso che presenti almeno il 30% dei nuclei neoplasti con un differente assetto genico si ottengono i seguenti risultati:

81 casi sui 740 risultano eterogenei; di questi 9 (11%) erano caratterizzati per la presenza di eventi secondari chirurgicamente rilevati. In 33 casi (40%) il carcinoma era localizzato nella mammella destra, mentre in 43 (53%) nella mammella sinistra. La dimensione media del nodulo neoplastico era di cm 2.04 (range 0.3 cm – 8cm).

Il grado istologico maggiormente rappresentato era il grado III, 41 casi (57%) seguito dal grado II, 23 casi (28%).

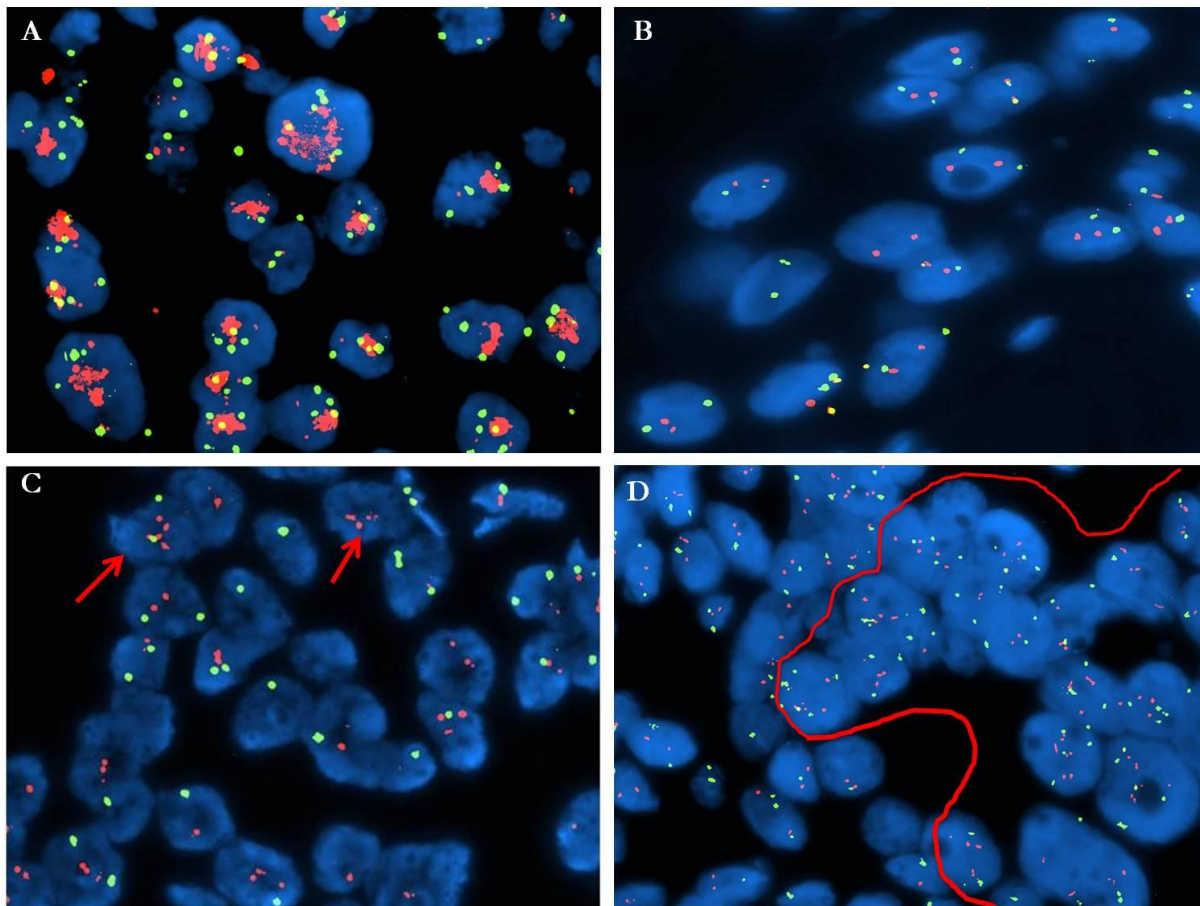
L'analisi FISH ha riportato l'amplificazione del gene Her2 in 31 casi (39%) mentre assenza di amplificazione genica in 50 casi (62%).

14 casi (17%) erano risultati negativi per l'IHC ER e Pgr, mentre i restanti 87 (83%) mostravano la positività per entrambi i recettori ovvero per almeno uno dei due. il Ki67 è risultato maggiore del 20% in 57 casi (70%).

L'età media dei pazienti di controllo era di 60 anni (range 37-87). Il tempo medio libero da re-intervento era di 878 giorni (range 90 gg – 2846 gg) con il riscontro di metastasi extralinfonodali in 9 casi sui 9 con eventi secondari (100%) (tabella 13).

Campione eterogeneo per il cut-off del 30%						
Totale casi	81					
Secondarismi	Presenza	9		Grading	Grado II	23
	Assenza	72			Grado III	41
Polarità	Mammella Dx	33		FISH	Amplificazione	31
	Mammella SX	43			Assenza di Amplificazione	50
Età media	media	min.	max.	Er e PgR	Entrambi negativi	14
	60	37	87		Almeno uno positivo	87
Tempo medio libero da reintervento	media	min.	max.	Ki 67	> 20%	57
	878 gg	90 gg	2846 gg		< 20%	24
Dimensione della lesione	media	min.	max.	Sede di metastasi	Linfondali	0
	2,04 cm	0,3 cm	8,0 cm		Extra linfonodali	9

Tabella 13 Caratteristiche della popolazione eterogenea per il cut-off del 30%



Pannello 1: A) FISH HER2 omogeneamente amplificata; b) FISH HER2 omogeneamente non amplificata; c) FISH HER2 con eterogeneità a cellula singola (freccie rosse); D FISH HER2 con eterogeneità a “cluster” (a destra della linea rossa).

Correlazioni tra FISH e parametri clinico - patologici

L'analisi statistica è stata condotta con il test del Chi quadro per ciascuna delle tre popolazioni ottenute stratificando per le differenti percentuali di eterogeneità, confrontandole con la popolazione di controllo per i seguenti parametri: capacità di metastatizzare, localizzazione della lesione, stato di amplificazione del gene Her2, valore del Ki67, positività ad almeno un recettore ormonale.

Cut-off 10%

Sono state confrontate due coorti di cui una di controllo costituita da 109 casi non eterogenei per l'amplificazione dei Her2 ed una selezionata in base alla presenza di

almeno il 10% di nuclei neoplastici con differente assetto genico di Her2 rispetto alla popolazione maggioritaria costituita da 154 casi.

Non sono state trovate differenze statisticamente significative per $p < 0.5$ tra i casi eterogenei e quelli omogenei rispetto alla capacità della neoplasia di dare metastasi (χ^2 0.029, gl 1, p 0.43), alla sua localizzazione (χ^2 1.929, gl 1, p 0.08), allo stato dei recettori ormonali (χ^2 0.233, gl 1, p 0.3) ed alla positività al Ki67 (χ^2 1.51, gl 1, p 0.11).

Una correlazione statistica è stata riscontrata tra la presenza di una popolazione eterogenea e l'amplificazione del gene Her2 (χ^2 2.646, gl 1, p 0.05).

Cut-off 20%

Sono state confrontate due coorti di cui una di controllo costituita da 109 casi non eterogenei per l'amplificazione dei Her2 ed una selezionata in base alla presenza di almeno il 20% di nuclei neoplastici con differente assetto genico di Her2 rispetto alla popolazione maggioritaria costituita da 102 casi.

Non sono state trovate differenze statisticamente significative per $p < 0.5$ tra i casi eterogenei e quelli omogenei rispetto alla capacità della neoplasia di dare metastasi (χ^2 0.152, gl 1, p 0.34), alla sua localizzazione (χ^2 2.40, gl 1, p 0.06) ed allo stato dei recettori ormonali (χ^2 0.26, gl 1, p 0.4).

Una correlazione statistica è stata riscontrata tra la presenza di una popolazione eterogenea e l'amplificazione del gene Her2 (χ^2 25.37, gl 1, $p < 0.01$). la positività al Ki67 (χ^2 7.99, gl 1, $p < 0.01$).

Cut-off 30%

Sono state confrontate due coorti di cui una di controllo costituita da 109 casi non eterogenei per l'amplificazione dei Her2 ed una selezionata in base alla presenza di almeno il 30% di nuclei neoplastici con differente assetto genico di Her2 rispetto alla popolazione maggioritaria costituita da 81 casi.

Non sono state trovate differenze statisticamente significative per $p < 0.5$ tra i casi eterogenei e quelli omogenei rispetto alla capacità della neoplasia di dare metastasi

(χ^2 0.0, gl 1, p 0.49), alla sua localizzazione (χ^2 1.56, gl 1, p 0.10) ed allo stato dei recettori ormonali (χ^2 0.76, gl 1, p 0.19).

Una correlazione statistica è stata riscontrata tra la presenza di una popolazione eterogenea e l'amplificazione del gene Her2 (χ^2 16.57, gl 1, p<0.01) e la positività al Ki67 (χ^2 9.91, gl 1, p<0.01).

Successivamente sono state confrontate le tre casistiche, in relazione al campione di controllo, per valutare l'impatto dell'eterogeneità sulla progressione di malattia, intesa come presenza di un evento chirurgico secondario.

Come mostrato in figura 4 nell'ambito della popolazione di controllo, indipendentemente da tipo istologico e trattamento ricevuto, i casi con amplificazione genica di Her2 hanno una probabilità maggiore rispetto ai casi non amplificati di andare incontro ad un evento secondario chirurgicamente rilevante (χ^2 17.162, gl 1, p<0.01).

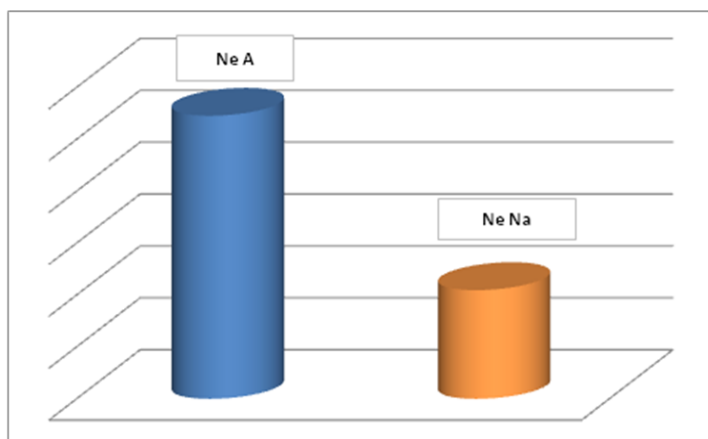


Figura 4 Eventi chirurgici secondari nella popolazione non eterogenea di controllo. casi non eterogenei amplificati (Ne A e non eterogenei non amplificati (Ne Na)

Cut-off 10%

Come si evidenzia in figura 5, stratificando per il cut-off del 10%, si ottengono 4 classi distinte per il differente livello di amplificazione del gene Her2.

Le prime due, agli estremi del grafico, sono rappresentate dai casi di controllo; le due centrali rispettivamente dai casi complessivamente amplificati ma eterogenei e dai casi complessivamente non amplificati ed eterogenei.

Sono state riscontrate differenze significative rispetto alla presenza di eventi secondari tra i casi amplificati ma non eterogenei ed i casi amplificati ed eterogenei (χ^2 5.39, gl 1, p<0.01) i quali mostrano un minor tasso di recidive rispetto ai primi.

Questa categoria mostra differenze significative, ma con minor grado statistico, anche con i casi non amplificati non eterogenei (χ^2 3.32, gl 1, p 0.03) che mostrano un numero più basso di recidive, mentre non ci sono differenze statisticamente significative con i casi non amplificati ma eterogenei (χ^2 0.003, gl 1, p 0.4).

Per quanto riguarda i casi non amplificati eterogenei essi mostrano differenze significative con i casi amplificati non eterogenei (χ^2 3.62, gl 1, p 0.02) dai quali si differenziano per minor numero di eventi secondari; mentre la differenza è statisticamente più debole con i casi non amplificati non eterogenei (χ^2 2.59, gl 1, p 0.05).

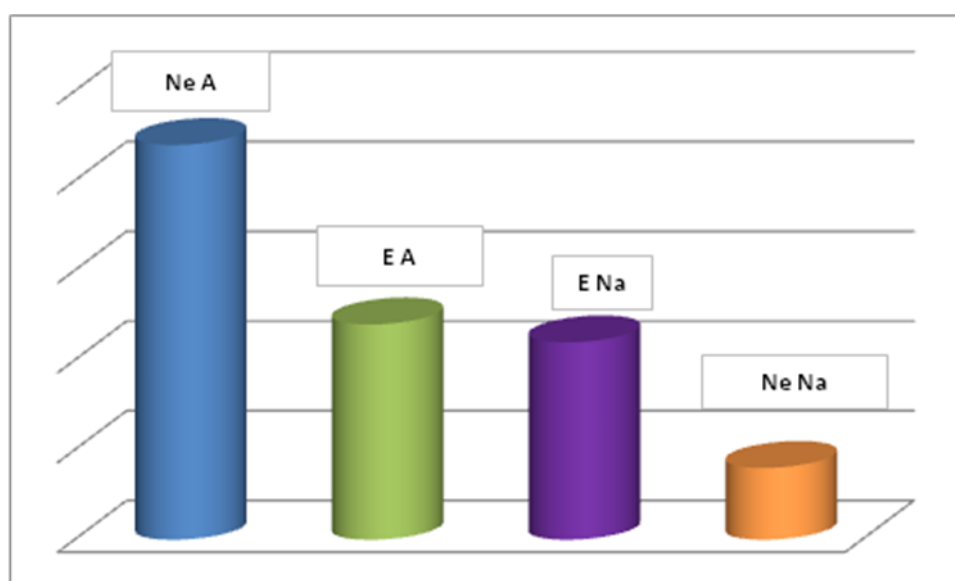


Figura 5 Eventi chirurgici secondari per i casi non eterogenei amplificati (Ne A), eterogenei amplificati (E A), eterogenei non amplificati (E Na) e non eterogenei non amplificati (Ne Na) considerando il cut-off del 10%

Cut-off 20%

Come si evidenzia in figura 6, stratificando per il cut-off del 20%, si ottengono 4 classi distinte per il differente livello di amplificazione del gene Her2.

Le prime due, agli estremi del grafico, sono rappresentate dai casi di controllo; le due centrali rispettivamente dai casi complessivamente amplificati ma eterogenei e dai casi complessivamente non amplificati ed eterogenei.

Non sono state riscontrate differenze significative rispetto alla presenza di eventi secondari tra i casi amplificati ma non eterogenei ed i casi amplificati ed eterogenei (χ^2 2.21, gl 1, p 0.06) anche mostrando un minor tasso di recidive rispetto ai primi.

Questa categoria mostra differenze significative con i casi non amplificati non eterogenei (χ^2 4.14, gl 1, p 0.02) che mostrano un numero più basso di recidive, mentre non ci sono differenze statisticamente significative con i casi non amplificati ma eterogenei (χ^2 0.46, gl 1, p 0.2).

Per quanto riguarda i casi non amplificati eterogenei essi mostrano differenze significative con i casi amplificati non eterogenei (χ^2 5.49, gl 1, p<0.01) dai quali si differenziano per minor numero di eventi secondari; mentre la differenza non è statisticamente significativa con i casi non amplificati non eterogenei (χ^2 1.31, gl 1, p 0.125).

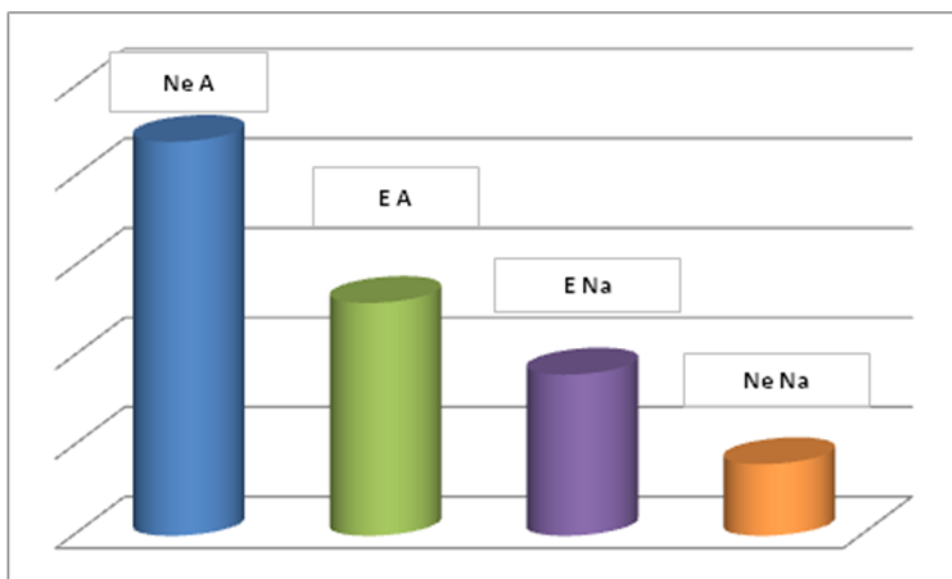


Figura 6 Eventi chirurgici secondari per i casi non eterogenei amplificati (Ne A), eterogenei amplificati (EA), eterogenei non amplificati (E Na) e non eterogenei non amplificati (Ne Na) considerando il cut-off del 20%

Cut-off 30%

Come si evidenzia in figura 7, stratificando per il cut-off del 30%, si ottengono 4 classi distinte per il differente livello di amplificazione del gene Her2.

Le prime due, agli estremi del grafico, sono rappresentate dai casi di controllo; le due centrali rispettivamente dai casi complessivamente amplificati ma eterogenei e dai casi complessivamente non amplificati ed eterogenei.

Sono state riscontrate differenze significative rispetto alla presenza di eventi secondari tra i casi amplificati ma non eterogenei ed i casi amplificati ed eterogenei (χ^2 2.87, gl 1, p 0.04) i quali mostrano un tasso di recidive leggermente minore rispetto ai primi.

Questa categoria mostra differenze significative, anche con i casi non amplificati non eterogenei (χ^2 3.32, gl 1, p 0.03) che mostrano un numero più basso di recidive, mentre non ci sono differenze statisticamente significative con i casi non amplificati ma eterogenei (χ^2 0.001, gl 1, p 0.48) pur riscontrando in quest'ultima categoria un numero minore di eventi secondari.

Per quanto riguarda i casi non amplificati eterogenei essi non mostrano differenze significative con i casi amplificati non eterogenei (χ^2 2.12, gl 1, p 0.07) anche se si differenziano per minor numero di eventi secondari; mentre la differenza è statisticamente significativa con i casi non amplificati non eterogenei (χ^2 4.20, gl 1, p 0.02).

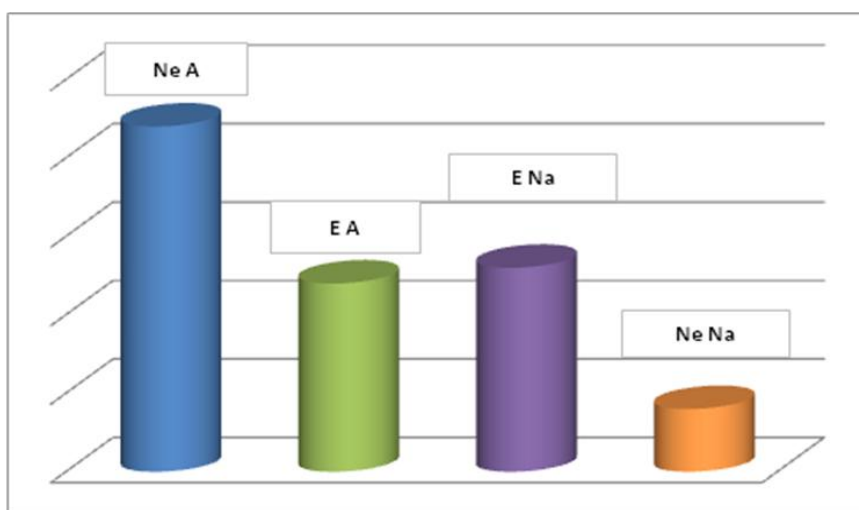


Figura 7 Eventi chirurgici secondari per i casi non eterogenei amplificati (Ne A), eterogenei amplificati (E A), eterogenei non amplificati (E Na) e non eterogenei non amplificati (Ne Na) considerando il cut-off del 30%

4. Discussione e conclusioni.

L'instabilità genetica è un fenomeno che coinvolge anche il carcinoma della mammella durante le fasi di trasformazione e progressione neoplastica. A causa di questo fenomeno possono insorgere cloni cellulari con differente asseto genico ^[43].

L'eterogeneità genetica di Her2 nella patologia neoplastica mammaria è un fenomeno ormai noto e accettato ^[35-44] anche se, ad oggi, non è ben chiaro né il suo impatto sulla clinica, né il sistema di valutazione.

Ne sono un esempio le linee guida succedutesi nel tempo dal 2007 ad oggi, le quali hanno mutato anche radicalmente il cut-off per definire un caso "eterogeneo" sino ad andare in apparente contrasto tra FISH e IHC ^[52].

Con questo progetto abbiamo voluto valutare il ruolo di differenti livelli di eterogeneità in relazione all'impatto sulla storia della malattia confrontando le popolazioni di casi definiti via via come "eterogenei" per l'amplificazione del gene Her2 con una popolazione di controllo priva di eterogeneità genica.

Abbiamo quindi stratificato la casistica per 3 differenti cut-off (10%,20% e 30%) andando poi a valutare la correlazione tra la presenza di un clone eterogeneo ed i parametri bio-molecolari e patologici della neoplasia; nonché la capacità del dato di predire l'andamento della malattia indipendentemente da trattamento ed istotipo.

Ad eccezione della popolazione stratificata al 10%, le altre due mostrano una correlazione statisticamente significativa tra la presenza di cloni eterogenei sia con lo stato complessivo di amplificazione del gene Her2 ^[45] sia con valori di Ki67 > 20%, indicando potenzialmente un comportamento più aggressivo rispetto al campione di controllo.

Altre correlazioni non sono state trovate suggerendo la possibile insorgenza precoce del clone di cellule con differente assetto genico durante la fase di sviluppo neoplastico.

Per quanto riguarda la possibilità di prevedere l'andamento della patologia neoplastica della mammella in base al grado di eterogeneità di Her2 indipendentemente dalla terapia e dal grado istologico, ciascun cut-off fornisce indicazioni differenti.

Partendo da una popolazione di controllo che rappresenta i dati riportati in letteratura con differenze significative tra i casi amplificati e i non amplificati nel dare un evento secondario, utilizzando un cut-off del 10% di cellule sia coese che sparse con differente assetto genico si può prevedere un miglior andamento per i casi amplificati (ratio>2) ma caratterizzati al loro interno da una popolazione non amplificata, rispetto ai casi amplificati omogeneamente ($p>0.01$); con una prognosi comunque peggiore rispetto ai casi non amplificati non eterogenei ($p < 0.05$).

Anche i casi non amplificati eterogenei mostrano una miglior prognosi rispetto alla popolazione di controllo amplificata ($p<0.05$) e peggiore rispetto a quella non amplificata ($p > 0.05$).

In questo contesto i casi eterogenei, siano essi amplificati o non amplificati, vengono a formare una classe a sé stante, con prognosi intermedia, senza che vi siano differenze statisticamente significative tra loro (p 0.4).

Utilizzando invece un cut-off intermedio del 20% si ottengono dati differenti.

Sebbene numericamente i casi amplificati ed eterogenei mostrino un numero di recidive minore sia rispetto agli amplificati di controllo sia rispetto agli eterogenei non amplificati (probabilmente per effetto del trattamento con trastuzumab) non sono riscontrate differenze significative con queste due categorie (p 0.06 e p 0.2).

Al contrario si conferma la differenza significativa con i casi non amplificati di controllo (p<0.05).

Per quanto riguarda i casi non amplificati ma eterogenei, essi mostrano un differenza significativa con i casi amplificati di controllo (p <0.01) ma non con gli omologhi omogenei (p 0.12). I dati suggeriscono, quindi, che un valore soglia del 20% porti a collocare la categoria degli eterogenei in posizione intermedia tra quelle oggi riconosciute, ma in grado di predire solamente una prognosi peggiore rispetto ad una condizione di non amplificazione del gene Her2.

Portando infine il valore soglia al 30% si confermano le differenze significative riscontrate tra i casi amplificati ed eterogenei ed i casi amplificati di controllo (p<0.05) e con i casi non amplificati di controllo (p<0.05). Non ci sono differenze significative con i casi eterogenei non amplificati (p 0.48) confermando la presenza di un'unica classe nuova, indipendente dallo stato di amplificazione, definibile come "Eterogenea".

Quest'ultima classe di casi non amplificati ma eterogenei, non mostrano una differenza significativa con i casi amplificati di controllo (p 0.07) mentre si differenziano dai casi non amplificati (p<0.05).

Questa discordanza minore viene interpretata come un possibile effetto del minor numero di casi rientranti nella categoria degli eterogenei (81) rispetto alle altre due classi.

Con un valore del 30% si riesce a dare un'indicazione di miglior prognosi solo per i casi amplificati ed eterogenei rispetto ai casi amplificati in toto.

Occorre infine considerare il fatto che i pazienti risultati HER2 positivi in FISH, indipendentemente dallo stato di eterogeneità, sono stati sottoposti a terapia specifica con Trastuzumab. I dati ottenuti, quindi, sono da confermarsi in relazione alla valutazione clinica del follow-up e da armonizzare sulla base della strategia terapeutica a cui sono stati sottoposti i pazienti.

Quello che emerge da questo studio è che il riscontro di una popolazione di cellule con differente assetto genico rispetto al contesto fornisce comunque informazioni aggiuntive tali da creare una classe indipendente di carcinomi della mammella, indipendentemente dal valore soglia utilizzato.

Infatti, come già riportato dalla letteratura ^[53-55], la presenza di un clone di cellule amplificato fornisce la neoplasia di un fenotipo più aggressivo con una prognosi generalmente peggiore.

In conclusione, sebbene lo studio necessiti di un approfondimento clinico-terapeutico della casistica analizzata, possiamo ipotizzare che in un contesto di amplificazione (ratio >2) il riscontro di una sottopopolazione non amplificata possa essere un fattore prognostico favorevole; al contrario in casi FISH negativi per l'amplificazione di Her2, il reperimento di una popolazione anche solo del 10% di cellule amplificate sia indicativo di un andamento più aggressivo della patologia che dovrebbe quantomeno essere monitorata in maniera più stringente se non valutata per il trattamento con il trastuzumab.

Capitolo 3

Carcinoma della mammella maschile: valutazione delle aneusomie a carico del cromosoma X.

Indice

Introduzione	46
Materiali e metodi.....	47
Selezione dei pazienti	47
Ibridazione in situ fluorescente (FISH)	47
Indagini immunohistochimiche	49
Analisi Statistica	49
Risultati.....	51
Risultati FISH	51
Correlazioni tra FISH e parametri clinico - patologici.....	55
Discussione e conclusioni	57

1 Introduzione

Il carcinoma alla mammella maschile rappresenta una forma rara (1%) e aggressiva di neoplasia mammaria. ^[1-2-3-4].

A causa della bassa incidenza, ad oggi, non è stato possibile definire una caratterizzazione pari a quella avvenuta nel carcinoma della mammella femminile; da ciò ne consegue che i pazienti di sesso maschile vengono trattati allo stesso modo delle donne in post-menopausa. ^[1-2].

Nel 1964 Jackson ^[5] descrisse la presenza di una maggior incidenza di carcinoma mammario nei pazienti affetti da sindrome di Klinefelter (47XXY), indicando un potenziale ruolo dell'aumentato numero di copie del cromosoma X nella trasformazione neoplastica dell'epitelio mammario maschile.

Ad oggi il ruolo di tale guadagno cromosomico nei pazienti di sesso maschile è stato investigato diffusamente nel carcinoma prostatico dove risulta correlato ad una ridotta risposta alla terapia antiandrogenica e ad una maggior incidenza di recidive. ^[6-8].

Al contrario si conosce molto poco per quanto riguarda il ruolo di X nella patologia neoplastica della mammella.

Nakopoulou et. al nel 2007 ^[1] hanno descritto la correlazione tra la polisomia a carico del cromosoma X, il grado istologico della neoplasia e la sua prognosi sfavorevole nel carcinoma duttale infiltrante della mammella femminile, suggerendo un'implicazione del cromosoma X nella sopravvivenza cellulare e nell'aggressività della neoplasia.

Sul ruolo del cromosoma X nel carcinoma mammari maschile, invece, non si sa nulla.

Con questo studio ci siamo quindi proposti di investigare con tecniche di ibridazione in situ fluorescente (FISH) le aberrazioni numeriche a carico di X nei carcinomi mammari maschili invasivi in relazione a tessuto epiteliale normale e alla condizione patologica di ginecomastia.

2. Materiali e metodi

Selezione dei pazienti

Data la bassissima incidenza della malattia sono stati selezionati dall'archivio dell'Unità Operativa di Anatomia Patologica "M. Malpighi", Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie 20 casi di carcinoma duttale infiltrante della mammella maschile e 10 casi di ginecomastia provenienti da pazienti senza alcuna storia clinica di pregresse o successive neoplasie.

I casi erano costituiti da tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina in quantità adeguata per essere sottoposti alle analisi successive.

Per quanto riguarda i casi di neoplasia uno dei criteri di selezione, accanto alla disponibilità di materiale e di un lungo follow up, era la presenza di tessuto non neoplastico identificato nella cute dei pazienti.

Al fine di attualizzare le diagnosi, tutti e 30 i casi sono stati rivalutati secondo i criteri oggi in uso ^[7-8-9]

Dei 20 casi di carcinoma mammario erano anche disponibili i dati immunoistochimici di ER, PgR e l'eventuale interessamento linfonodale all'esordio.

Ibridazione in situ fluorescente (FISH).

L'analisi FISH è stata condotta su tutti e 30 i casi selezionati, con sonde specifiche per il gene degli Androgeni ed il Centromero del cromosoma X (ON AR (Xq12) / SE X, Kreatech Diagnostics, Amsterdam, The Netherlands).

Le sezioni di tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina tagliate dello spessore di 5µm e poste su vetrino polarizzato sono dapprima state sparaffinate in bagno di xilolo sequenziale e poi parzialmente reidratati in etanolo assoluto.

Successivamente le sezioni sono state sottoposte a trattamento termico ed enzimatico per poi essere idonee alla fase di denaturazione e ibridazione overnight della sonda molecolare con il DNA target.

Il giorno successivo si è proceduto con un lavaggio di stringenza per rimuovere la sonda non legata correttamente e quella in eccesso, con la disidratazione in scala di alcoli e con il contrasto nucleare con DAPI/Antifade (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, The Netherlands)^[10].

La valutazione dei casi è stata condotta a cieco da tre operatori (due biologi ed un patologo) su piattaforma di microscopia a fluorescenza Olympus BX 61 (Olympus, Melville, NY) valutando almeno 100 nuclei neoplastici per singolo caso. Come controllo interno, per escludere quindi la presenza della sindrome di Klinefelter, è stato valutato il tessuto epiteliale normale adiacente alla neoplasia.

Al fine di poter classificare i casi come positivi o negativi per la presenza di aneusomie a carico del cromosoma X e per l'amplificazione del gene per il recettore androgenico (AR) sono stati valutati i seguenti parametri:

Numero totale dei segnali relativi al gene AR, numero totale dei segnali relativi al centromero del cromosoma X (SE X), rapporto tra il numero dei segnali relativi al gene AR e il centromero del cromosoma X, numero medio di segnali relativi al centromero del cromosoma X.

Tali valori sono stati interpretati seguendo i criteri pubblicati da Koivisto et. al. (1997)^[11]

Si definisce un caso amplificato per il gene AR quando il rapporto AR/SE X è maggiore o uguale a 2; si definisce un caso positivo per l'aneusomia del cromosoma X quando il numero medio di segnali SE X è maggiore o uguale a 2 in almeno il 20% dei nuclei neoplastici analizzati.

I casi di carcinoma della mammella maschile sono stati anche analizzati in FISH per l'amplificazione del gene Her2 al fine di valutare il grado di eterogeneità di tale patologia neoplastica.

La metodica utilizzata è la medesima riportata per AR/SE X con l'impiego di sonde specifiche per il gene Her2 ed il centromero del cromosoma 17 (CEP17) (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, The Netherlands)^[10].

L'interpretazione dell'indagine FISH per Her2 è stata effettuata seguendo le linee guida ASCO/CAP 2013^[13].

Indagini immunoistochimiche

La valutazione immunoistochimica (IHC) dell'espressione del recettore per gli androgeni è stata condotta su sistema automatico Benchmark-Ventana-Roche con anticorpo specifico monoclonale di coniglio (clone SP107).

In tal caso la valutazione della positività è stata eseguita utilizzando le stesse regole vevoli per la determinazione di ER e PgR ^[14].

In archivio erano inoltre già presenti i dati relativi all'IHC per ER, PgR e Ki67.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando software disponibili on line (Quick-Cals by GraphPad).

Al fine di valutare eventuali correlazioni tra i dati FISH e le caratteristiche clinico - patologiche è stato applicato il test esatto di Fisher considerando valori di P inferiori allo 0.05 come significativi.

3. Risultati

La casistica analizzata prevedeva 20 caso di carcinoma mammario maschile (MBC) e 10 casi di ginecomastia.

I pazienti affetti da MBC sono caratterizzati da un'età media di 69 anni (range 50-81), mentre i pazienti affetti da ginecomastia da un'età media di 58 anni (range 19-81).

La diagnosi principale di MBC consisteva in 14 casi di carcinoma duttale infiltrante grado II e 6 di carcinoma duttale infiltrante grado III.

Dalle indagini immunoistochimiche presenti in archivio emerge che tutti i casi di carcinoma mammario maschile sono positivi per ER (20/20) e 18/20 sono positivi per PgR, ed il valore del Ki67 medio è di 23% (range 5%-50%).

Per quanto riguarda il dato IHC relativo ad Her2, 10 casi sono risultati negativi (0 e 1+), 5 casi sono stati classificati come equivoci (2+) e 4 casi positivi (3+), di 1 solo caso il dato non era disponibile.

Dal punto di vista istopatologico in 4 casi su 20 è stata osservata la presenza di metastasi linfonodali all'esordio.

L'indagine IHC per l'espressione del recettore androgenico ha mostrato positività in 20 casi su 20 con un valore percentuale medio del 88.5% (range 35-98) (Tabella 14)

id	Metastasi (si= 1, no=2)	ER	PGR	KI67	HER-2 % cellule positive	Grado di positività	AR
1	1	90	90	20	20	2 +	98
2	2	90	70	25	20	2 +	98
3	1	90	<1	20	0	0	98
4	2	90	40	10	20	1 +	98
5	2	90	85	35	50	3 +	98
6	2	80	20	50	30	1 +	90
7	2	90	5	30	50	3 +	90
8	2	90	70	50	0	0	90
9	2	90	90	18	0	0	90
10	2	90	40	12	25	2 +	90
11	1	90	70	25	70	3 +	90
12	2	90	95	12	60	3 +	90
13	2	90	75	20	5	1 +	90
14	2	95	95	20	0	0	90
15	2	80	90	30	NA	NA	90
16	2	95	95	15	40	2 +	95
17	2	100	2	5	0	0	60
18	1	90	0	30	40	2 +	90
19	2	90	90	12	0	0	35
20	2	90	50	30	30	1 +	98

Tabella 14 Dati immunoistochimici dei casi di MBC

Ulteriori parametri che sono stati valutati riguardano la dimensione della lesione, la presenza di carcinoma in situ, l'invasione dei margini di resezione e la presenza di invasione vascolare e/o linfatica. (tabella 15)

id	Dimensioni (asse maggiore) cm	In situ	Margini	V+L
1	4,5	no	no	no
2	2,1	si	no	si
3	1,2	no	no	no
4	1,3	si	no	no
5	2,8	si	no	no
6	2,7	no	no	no
7	1,8	no	si	no
8	0,8	si	si	si
9	2,1	si	no	no
10	1,7	no	no	no
11	2,8	no	no	no
12	2,5	no	no	no
13	2,3	no	si	si
14	0,8	no	no	no
15	2,3	no	no	no
16	2	no	si	no
17	2	no	no	no
18	1,3	si	no	no
19	2,5	si	no	si
20	2,5	si	no	si

Tabella 15 Parametri istopatologici dei casi MBC

Dai dati raccolti emerge che la dimensione media delle lesioni neoplastiche è di cm 2.1 (range 0.8-4.5), la presenza contestuale di carcinoma in situ è stata riscontrata in 8 casi su 20, in 4 casi la neoplasia raggiungeva i margini di resezione ed in 5 caso era presente invasione neoplastica vascolare e/o dei vasi linfatici.

Per quanto riguarda il follow-up dei pazienti, valutato dal punto di vista di eventi chirurgici, solo 1 caso su 20 ha presentato una recidiva a 21 mesi di distanza dal primo intervento.

I casi di ginecomastia sono stati usati come controllo patologico non neoplastico per la valutazione in FISH delle alterazioni a carico di AR/SE X.

Nessun paziente dei 10 selezionati aveva in precedenza o successivamente all'evento "ginecomastia" alcuna manifestazione neoplastica in un follo-up di 10 anni.

Risultati FISH

L'analisi FISH per la valutazione dell'amplificazione del gene Her2 è stata condotta su tutti e 20 i casi di carcinoma mammario, ripetendo eventuali test eseguiti in precedenza.

Per quanto riguarda i casi risultati equivoci in IHC (2+), 3 sono risultati positivi e 2 negativi.

Il singolo caso che non era stato valutato in IHC è risultato negativo in FISH.

Complessivamente sono risultati positivi o amplificati per il gene Her2 7 casi, mentre negativi 13.

Tutti i casi sono risultati negativi per l'eterogeneità dell'amplificazione di Her2 (vedere capito 2) considerando un cut-off del 20% di nuclei neoplastici sparsi o a cluster con differente assetto genico.

id	Ratio	Ampl ratio o media (si= 1, no=2)	Eterogeneità (>20%) (si= 1, no=2)
1	1,8	1	2
2	1,0	2	2
3	0,6	2	2
4	1,2	2	2
5	2,2	2	2
6	1,2	2	2
7	5,8	1	2
8	1,1	2	2
9	1,0	2	2
10	2,3	1	2
11	1,7	1	2
12	2,5	1	2
13	2,5	1	2
14	1,0	2	2
15	1,1	2	2
16	1,0	2	2
17	0,7	2	2
18	1,06	1	2
19	1,06	2	2
20	0,99	2	2

Tabella 16 Dati FISH Her2 MBC

Per quanto riguarda la valutazione dell'assetto genico di AR e del cromosoma X, nessuno dei 20 casi analizzati presentava amplificazione per il gene AR, mentre tutti erano caratterizzati dalla presenza di più del 20% di nuclei neoplastici con almeno 2 copie del cromosoma X con una media del 59% (range 31%-85%)(tabella 17).

Id	Assetto del cromosoma X*	Nuclei XX**
1	25X, 68XX, 7XXX	68
2	52X, 41XX, 3XXX, 4XXXX	41
3	69X, 30XX, 1XXX	30
4	19X, 73XX, 3XXX, 4XXXX, 1VIX	73
5	31X, 58XX, 10XXX, 1 XXXX	58
6	44X, 53XX, 3 XXX	53
7	52X, 48XX	48
8	48X, 49XX, 3XXX	49
9	64X, 36XX	36
10	55X, 44XX, 1XXX	44
11	28X, 66XX, 6XXX	66
12	51X, 46XX, 2XXX, 1 XXXX	46
13	15X, 75XX, 5XXX, 5XXXX	75
14	21X, 22XX, 28XXX, 23XXXX, 5XXXXX, 1 XXXXXX	22
15	24X, 74XX, 2XXX	74
16	50X, 46XX, 4XXX	46
17	53X, 44XX, 1XXX, 1XXXX, 1 XXXXXX	44
18	29X, 69XX, 2XXX	69
19	55X, 44XX, 2XXX	44
20	37X, 60XX, 2XXX, 1 XXXX	60

Tabella 17 Dati FISH SE X negli MBC: * indica l'assetto generale del cromosoma X osservato su 100 nuclei nei MBC in %; ** il valore indica la % di nuclei con 2 copie del cromosoma X.

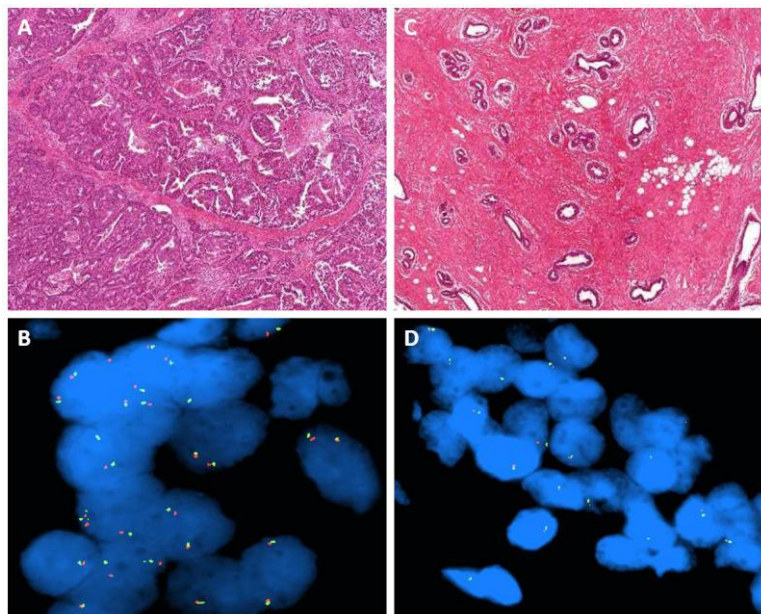


Figura 8 Colorazione Ematossilina-Eosina e FISH AR/SE X rispettivamente su un caso di MBC (A, B) e di ginecomastia (C,D).

Al contrario nessuno dei casi di ginecomastia era positivo per l'aneusomia del cromosoma X media di nuclei con assetto XX pari a 5.5% (range 0%-11%) (tabella 18).

Id	Assetto del cromosoma X*	Nuclei WT**	Nuclei XX**
G1	100X	100	0
G2	90X,10XX	90	10
G3	95X,5XX	95	5
G4	98X,2XX	98	2
G5	95X,5XX	95	5
G6	97X,3XX	97	3
G7	89X,11XX	89	11
G8	94X, 6XX	94	6
G9	93X, 7XX	93	7
G10	94X, 6XX	94	6

Tabella 18 Dati FISH SE X nei casi di ginecomastia: * indica l'assetto generale del cromosoma X osservato su 100 nuclei in %; ** il valore indica la % di nuclei privi di alterazioni a carico di X; *** il valore indica la % di nuclei con 2 copie del cromosoma X.

Nessuno dei nuclei di controllo sano, costituito dai cheratinociti normali del tessuto epiteliale vicino all'area neoplastica, mostrava alterazioni a carico del complesso AR/SE X.

Correlazioni tra FISH e parametri clinico - patologici

Sono stati raffrontati i dati relativi alla FISH per il centromero del cromosoma X con i dati a disposizione per quanto riguarda le caratteristiche immunohistochimiche, molecolari e clinico patologiche.

A tal riguardo non sono state trovate correlazioni statisticamente significative tra il numero di nuclei con assetto XX e:

positività all'IHC ER (p value: 0.61); positività all'IHC PgR (p value: 0.56); valore del Ki67 (p value: 0.67); grado di positività all'IHC Her2 (p value: 0.22); positività all'IHC AR (p value: 1.00) e stato di amplificazione del gene Her2 (p value 0.65).

Parimenti non è stata riscontrata una correlazione statisticamente significativa con la presenza di metastasi linfonodali all'esordio (p value: 0.28), né con la presenza di carcinoma in situ (p value: 1.00), né con la dimensione della lesione (p value: 0.53).

Al contrario sono state riscontrate correlazioni statisticamente significative tra:

- la dimensione della lesione e l'età alla diagnosi (p value: 0.0064) (figura 9);

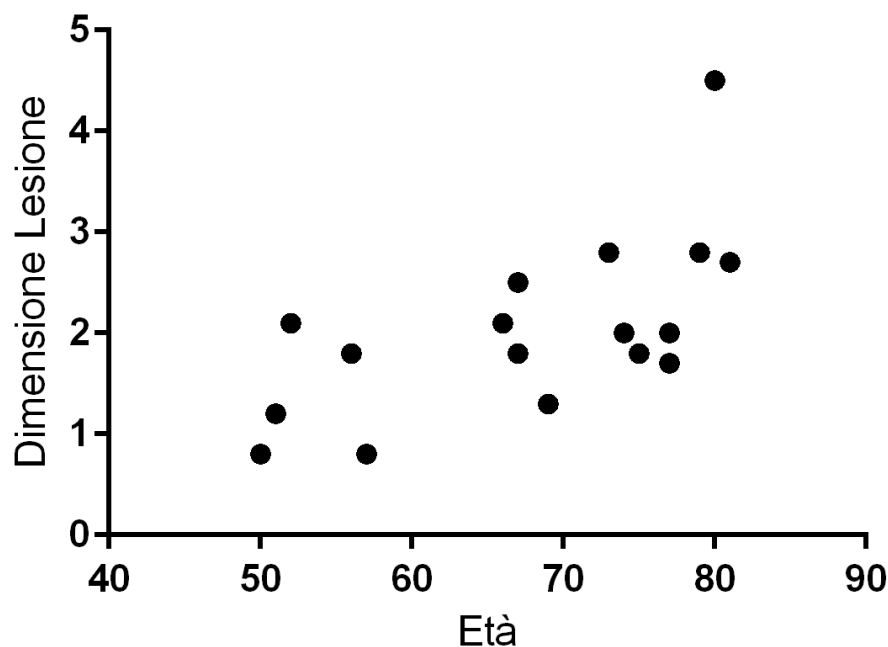


Figura 9 Correlazione tra dimensione della lesione ed età alla diagnosi

- Il numero di nuclei neoplastici con aneusomie a carico di X (47XXY) e l'età alla diagnosi (figura 10);

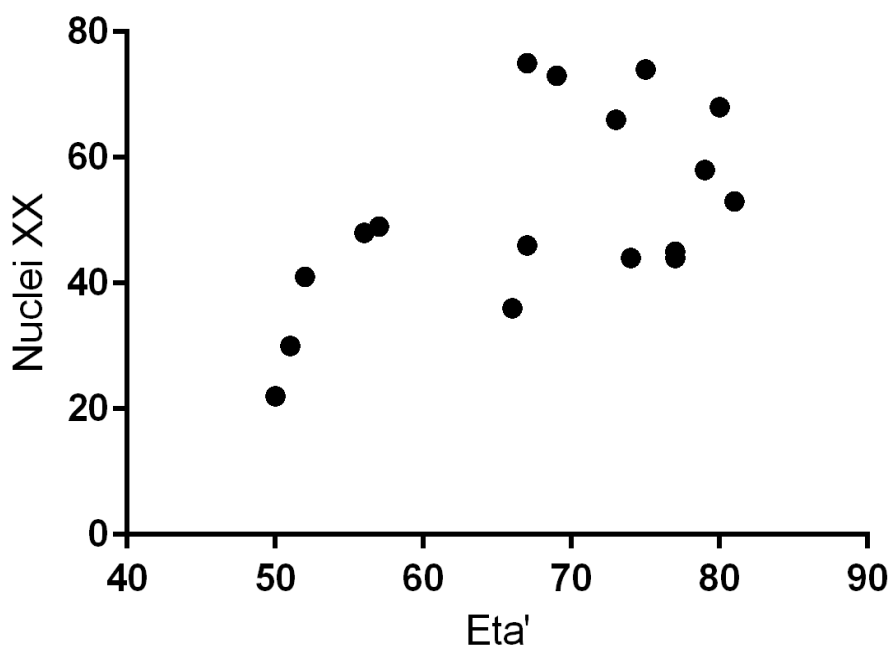


Figura 10 Correlazione tra numero di nuclei con assetto XX ed età alla diagnosi.

- Il numero di nuclei neoplastici con aneusomie a carico di X ed il grado istologico (p value: 0.04) (tabella 19).

	Grade 2	Grade 3	Total
XX >50	4	5	9
XX <50	10	1	11
Total	14	6	20

Tabella 19 Correlazione tra grado istologico e percentuale di nuclei con assetto XX

Per quanto riguarda le ginecomastie, pur essendo esse stesse negative per la polisomia a carico del cromosoma X mostrano la presenza di alcuni nuclei con alterazioni in una percentuale variabile tra 0% e 11%.

Per questo motivo, e per valutare se vi fosse un bias da accumulo di alterazioni legato all'età del paziente più che alla patologia, è stata confrontato il numero di nuclei con assetto XX e l'età alla diagnosi anche per questi casi, senza trovare una correlazione (figura 11).

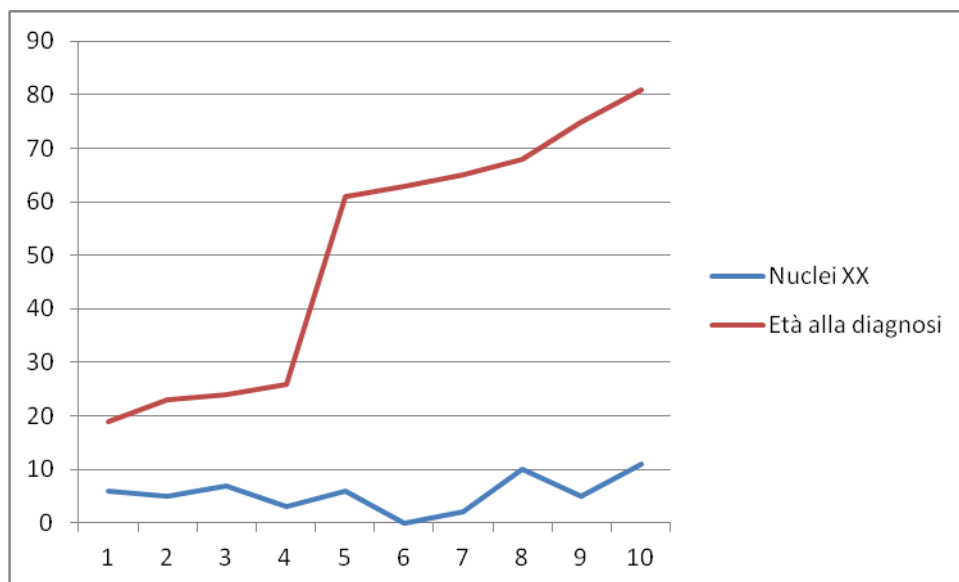


Figura 11 Confronto tra età alla diagnosi e numero di nuclei con assetto XX nelle ginecomastie.

4. Discussione e conclusioni

La sindrome di Klinefelter, caratterizzata dalla presenza di un assetto cromosomico 47 XXY, è la alterazione più comune a carico dei cromosomi sessuali nei pazienti di sesso maschile con un'incidenza di 1/2000 maschi. ^[12].

In alcuni studi ^[4,15] è stato osservato come i pazienti affetti da tale sindrome siano a maggior rischio di sviluppare una neoplasia mammaria, percentualmente analogo a quello nelle pazienti di sesso femminile.

Ciò nonostante il meccanismo alla base di questa maggior suscettibilità non è ancora ben noto anche se sembra esserci un ruolo da parte dell'aumentato numero di copie del cromosoma X nella trasformazione neoplastica dell'epitelio mammario maschile.

Ad oggi i dati più importanti relativi all'aumento di copie del cromosoma X nella patologia neoplastica maschile sono relativi al carcinoma prostatico. la maggior parte dei carcinomi della prostata, infatti, è dipendente dalla via di segnalazione dell'AR, il cui gene, assieme al suo regolatore MAGE-11, è mappato proprio sul cromosoma X(Xq12 e Xq28).

L'aumento di copie del cromosoma X, ma soprattutto un'amplificazione del gene AR sembrano essere correlati con la resistenza della neoplasia al trattamento con anti-androgenici e ad un maggior rischio di recidive ^[16].

L'impatto dell'aumento di numero di copie del cromosoma X è altresì stato studiato nell'ambito del carcinoma mammario femminile dove correla con uno l'aggressività e con il grado istologico della neoplasia ^[1].

Altri studi recenti ^[17,18] riportano un'associazione tra alterazioni a carico del cromosoma X e minor sopravvivenza in pazienti affette da carcinoma mammario.

Queste osservazioni indicano un possibile ruolo del cromosoma X nella trasformazione neoplastica dell'epitelio mammario.

Nei casi valutati è stata osservata la presenza di alterazioni numeriche a carico del cromosoma X in tutti i casi di MBC in più del 20% delle cellule neoplastiche. al contrario nessun caso di ginecomastia superava il valore soglia.

Le correlazioni trovate tra l'età alla diagnosi e le dimensioni della neoplasia, ma soprattutto tra il numero di nuclei con assetto XX con l'età alla diagnosi mostra un ruolo potenziale dell'alterazione nelle prime fasi della trasformazione neoplastica e nel conferimento alle cellule cancerose di un vantaggio proliferativo tale da giustificare un accumulo nel tempo parallelamente all'aumento di dimensione della lesione.

Queste osservazioni, già oggetto di pubblicazione ^[19] verranno approfondite in uno studio successivo con maggiori pazienti arruolati in collaborazione con l'Institute of Surgical Pathology, University Hospital (Zurigo).

Capitolo 4

Valutazione comparativa dell'analisi dell'espressione e dell'assetto genico di Her2 tramite IHC e FISH e la nuova doppia colorazione IHC-SISH.

Indice

Introduzione	60
Materiali e metodi.....	61
Selezione dei pazienti	61
Valutazione dell'espressione proteica e dell'assetto genico di Her2 – scoring system.....	62
Indagine immunohistochimica.....	63
Analisi FISH.....	63
Double Staining IHC/SISH.....	66
Analisi Statistica	68
Risultati.....	68
Risultati IHC e FISH	68
Risultati Double Staining IHC/SISH	69
Confronto tra le metodiche.....	71
Discussione e conclusioni	75

1. Introduzione

Uno dei geni maggiormente alterati nel carcinoma della mammella è Her2 (human epidermal growth factor receptor-2). Esso si trova infatti amplificato in circa il 15-20% dei casi ed associato ad una prognosi sfavorevole ^[1-3].

Solamente dopo l'introduzione del Trastuzumab, un anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro alla porzione extracellulare di Her2, la valutazione di Her2 assume anche un valore di indicazione al trattamento.

Ad oggi la valutazione dello stato di Her2 può essere effettuata con tecniche di immunohistochimica (IHC) e/o con ibridazione in situ (ISH) sia essa fluorescente (FISH) che non (SISH, CISH).

Infatti, mentre l'IHC determina il grado di espressione proteica, l'indagine ISH consente di visualizzare il numero di copie del gene Her2 attraverso l'impiego di sonde a DNA marcate.

Al fine di poter valutare in un'unica sessione sia il grado di espressione proteica che l'assetto genico, Roche-Ventana ha sviluppato una nuova metodica semi-automatizzata frutto della combinazione tra IHC e ISH, denominata Double Staining ISH/SISH.

Tale metodica è stata recentemente validata su una coorte di 589 casi selezionati su tissue macro array (TMA) da Varga et al ^[4].

Il dato è stato confermato ulteriormente da uno studio di Chenard e colleghi ^[5].

Attualmente l'algoritmo diagnostico prevede la valutazione in prima istanza con IHC ed in caso di risultati equivoco (2+) l'utilizzo di un test di secondo livello quale la ISH^[6,9].

Sebbene l'impiego delle due metodiche sia in grado nella maggioranza dei casi di dare un risultato definitivo, talvolta la valutazione dello stato di her2 è resa difficile dall'eterogeneità genica che caratterizza il carcinoma alla mammella.

L'impatto dell'eterogeneità nell'amplificazione genica di Her2, quindi, contribuisce ad un aumentato rischio di errata stratificazione dei pazienti con conseguenze sull'approccio terapeutico.

Oltre a tale caratteristica, alcuni fattori di potenziale in accuratezza diagnostica sono stati riscontrati essere le aneusomie a carico del cromosoma 17 (sia polisomie sia monosomie) e la co-localizzazione dei segnali genici e centromerici.

Per questo motivo, rinvenendo nella metodica double staining una possibile soluzione ai pitfall valutativi dovuti alla complessità biologica del carcinoma della mammella, abbiamo testato in parallelo casi con assetto genico omogeneo e casi cosiddetti “difficili” sia con tecniche IHC e FISH sia con la nuova tecnica presso i laboratori dell’Institute of Surgical Pathology, University Hospital, Zurigo sotto la supervisione della prof.ssa Z. Varga.

2. Materiali e metodi

Selezione dei pazienti

Per lo studio sono stati selezionati dall’archivio dell’Unità Operativa di Anatomia Patologica “M. Malpighi”, Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie 26 casi di carcinoma duttale infiltrante della mammella.

Di questi, 6 erano caratterizzati da un assetto genico omogeneo (2 casi amplificati e 4 casi non amplificati) mentre 20 erano caratterizzati per la presenza di eterogeneità genica (9 casi amplificati ed 11 casi non amplificati) (tabella 20).

id	IHC Her2 (SP3)	FISH Her2		id	IHC Her2 (SP3)	FISH Her2	
		Amplificazione	% di nuclei eterogenei			Amplificazione	% di nuclei eterogenei
1	2+	Y	60%	14	2+	N	32%
2	2+	Y	55%	15	2+	N	45%
3	3+	Y	48%	16	1+	N	N
4	2+	Y	45%	17	2+	N	53%
5	2+	Y	55%	18	2+	N	37%
6	2+	Y	33%	19	3+	N	35%
7	2+	Y	63%	20	2+	N	38%
8	2+	N	58%	21	2+	N	58%
9	2+	Y	52%	22	2+	Y	45%
10	2+	N	15%	23	0	N	N
11	2+	N	35%	24	2+	Y	N
12	2+	Y	N	25	2+	N	N
13	2+	N	22%	26	2+	N	N

Tabella 20 Dati IHC e FISH dei casi selezionati

Valutazione dell'espressione proteica e dell'assetto genico di Her2 – scoring system.

Nel 2013 l' American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologist ha aggiornato le linee guida per la definizione del grado di espressione della proteina Her2 come segue:

- 0 (negativo): colorazione assente ovvero incompleta debole / appena percettibile, di membrana in meno del 10% delle cellule neoplastiche.
- 1+ (negativo): colorazione di membrana debole / appena percettibile in più del 10% di cellule neoplastiche.
- 2+ (equivoco): colorazione di membrana circonferenziale incompleta debole o moderata in più del 10% delle cellule neoplastiche ovvero circonferenziale completa e intensa in meno del 10% delle cellule neoplastiche.

- 3+ (positivo): colorazione circonferenziale completa e intensa in più del 10% delle cellule neoplastiche.^[9]

Nello stesso ambito sono stati rivisti i criteri di definizione dell'amplificazione genica di Her2:

- Positivo per l'amplificazione: il rapporto tra i segnali relativi al gene Her2 e quelli relativi al centromero del cromosoma 17 (CEP17) è maggiore o uguale a due ovvero quando il numero medio dei segnali relativi al gene Her2 è maggiore o uguale a 6.
- Negativo per l'amplificazione: il rapporto tra i segnali relativi al gene Her2 e quelli relativi al centromero del cromosoma 17 (CEP17) è minore di due ovvero quando il numero medio di segnali relativi al gene Her2 è minore di 4
- Equivoco: il rapporto tra i segnali relativi al gene Her2 e quelli relativi al centromero del cromosoma 17 (CEP17) è minore di due e il numero medio di segnali relativi al gene Her2 è compreso tra 4 e 6.^[9]

Indagine immunoistochimica

Per ciascun caso è stata tagliata una sezione istologica in bianco dello spessore di 2 micron e sottoposta a metodica immunoistochimica automatizzata su piattaforma Benchmark (Roche-Ventana, Tucson, AZ, USA) con anticorpo specifico per la proteina Her2 (clone SP3). La metodica consiste in passaggi successivi di paraffinatura, trattamento termico del preparato, incubazione con anticorpo a temperatura controllata, lavaggi e controcolorazioni.

Il controllo negativo interno era costituito dai dotti non neoplastici.

Analisi FISH

L'analisi FISH è stata eseguita seguendo il protocollo di Graziano et al.^[10]:

da ciascun caso è stata ottenuta una sezione istologica in bianco dello spessore di 5 micron posta su vetrino polarizzato.

Dopo una prima incubazione in stufa a secco a 56°C per almeno 2 ore, le sezioni sono state sparaffinate in 3 cambi di Bioclear (Agente chiarificante a base di terpeni naturali, Bio-Optica, Milano (IT)) di 15 minuti ciascuno. In seguito si procede con una rapida asciugatura all'aria e con una reidratazione parziale in due cambi successivi di etanolo assoluto, seguita da una successiva asciugatura all'aria.

I campioni così processati possono essere sottoposti ai successivi trattamenti termico e protesico, rispettivamente in SSC2X (tampone salino sodio citrato a pH 7) a 75°C per 10-12 minuti, ed in una soluzione di Proteinasi K in SSC2x alla concentrazione di 0.25mg/ml a 45°C per 10-12 minuti.

Ne segue un lavaggio in tampone, una successiva disidratazione in scala di alcoli (etanolo 70%-80%-100%) per 1-2 minuti ciascuno e l'asciugatura all'aria.

La fase successiva prevede l'apposizione di un'idonea quantità di sonda molecolare (tra i 5 ed i 10 microlitri) su un'area rappresentativa della lesione selezionata preferibilmente in base alla positività IHC per Her2 ovvero sulla sezione colorata in ematossilina-eosina.

La sonda utilizzata per la valutazione dell'amplificazione di Her2, ON HER2/CEP17 dual colour probe (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, The Netherlands), è caratterizzata dall'assenza di sequenze ripetute e dall'emissione in spectrum orange (segnali genici) e spectrum green (segnali centromerici).

Una volta apposta la sonda il vetrino viene coperto con un coprioggetto, sigillato con una collante vinilico (Rubber Cement) e posto su piastra di ibridazione per essere sottoposto al ciclo di denaturazione (75-80°C per 10-15 minuti) ed ibridazione (37°C o/n).

Il giorno successivo, si procede con la fase post-ibridazione che prevede la rimozione del coprioggetto in un lavaggio di SSC2X a RT, un lavaggio di stringenza in una soluzione di NP40 in SSC2X allo 0.5% a 73°C per 2 minuti per rimuovere la quota eccedente di sonda molecolare e quei filamenti che non si sono appaiati correttamente, una disidratazione in scala di alcoli ed il contrasto dei nuclei con DAPI/Antifade (soluzione di 4',6'-diamidino-2-fenylindole in antifade alla concentrazione di 1 µg/mL, Kreatech Diagnostics, Amsterdam, The Netherlands).

La valutazione dei preparati sottoposti ad indagine FISH è stata effettuata con piattaforma di microscopia a fluorescenza Olympus BX 61 (Olympus, Melville, NY) valutando almeno 60 nuclei neoplastici per ciascun preparato.

Ogni caso è stato caratterizzato riportando il numero medio di segnali genici di Her2, il numero medio di segnali centromerici del cromosoma 17, il rapporto tra Her2/CEP17 e la percentuale di nuclei neoplastici con differente assetto genico rispetto alla popolazione maggiormente rappresentata. L'interpretazione dei dati è stata effettuata seguendo le raccomandazioni ASCO/CAP2013 ^[9].

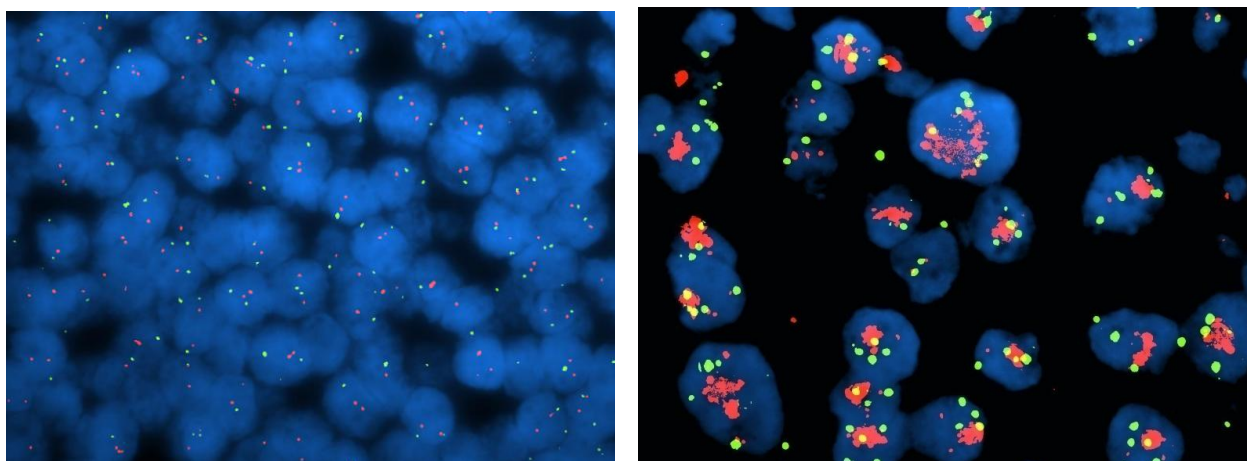


Figura 12 FISH Her2 rispettivamente non amplificata (sx) e amplificata (dx)

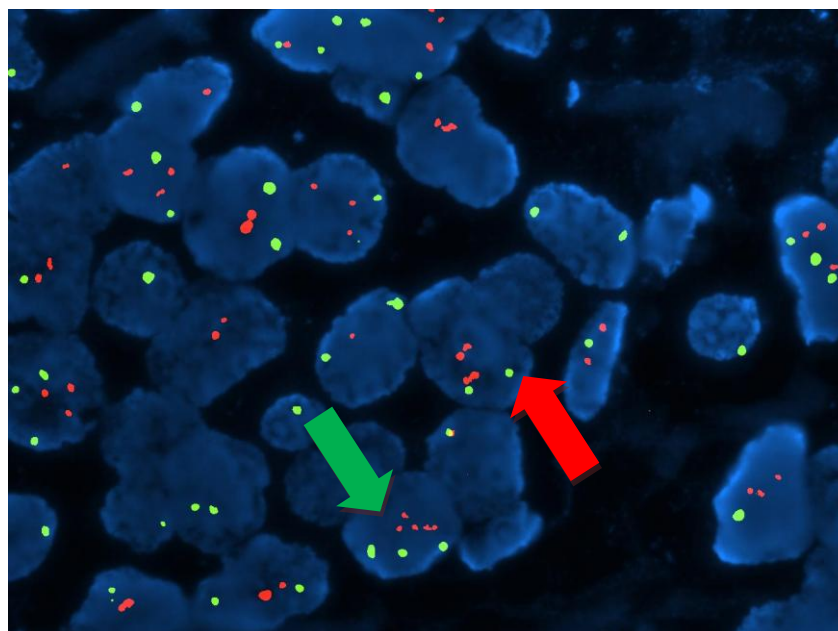


Figura 13 FISH Her2: caso eterogeneo (le frecce indicano i nuclei amplificati in un contesto complessivo di assenza di amplificazione)

Double Staining IHC/SISH

Per quanto riguarda la metodica per la rilevazione simultanea dell'espressione proteica e dell'assetto genico di Her2 è stata condotta presso l'Institute of Surgical Pathology dell'Università di Zurigo seguendo un protocollo da loro ottimizzato.

Anche in questo caso da ciascun campione è stata preparata una sezione di tessuto dello spessore di 5 micrometri e posta su vetrino polarizzato.

Le sezioni dopo una pre incubazione in stufa a secco a 56°C per almeno 2 ore vengono caricate sulle slitte termo riscaldate della piattaforma automatica Benchmark Ultra (Roche-Ventana, Tucson AZ) e sottoposte ad uno specifico protocollo che prevede una fase iniziale di trattamenti termici sia a calore diretto che in soluzione di sparaffinatura.

I passaggi successivi sono caratteristici di una reazione automatizzata di immunohistochimica della durata di circa 200 minuti.

Al termine della reazione IHC, con il preparato già sottoposto a precipitazione della Diamminobenzidina (DAB) per la rivelazione del segnale relativo all'espressione proteica, lo strumento procede con l'esecuzione dell'indagine SISH.

La metodica prevede anch'essa una serie di passaggi utili a rendere il tessuto accessibile alla sonda molecolare seguiti dalle fasi di denaturazione ed ibridazione delle sonde molecolari specifiche per il gene Her2 e per il centromero del cromosoma 17 con il DNA bersaglio ed i passaggi di rivelazione dell'avvenuta ibridazione per un tempo totale di 200 minuti a cui aggiungere 6 ore di ibridazione. Nel suo complesso l'intera metodica, come schematizzata in figura 10, ha una durata complessiva di circa 12 ore.

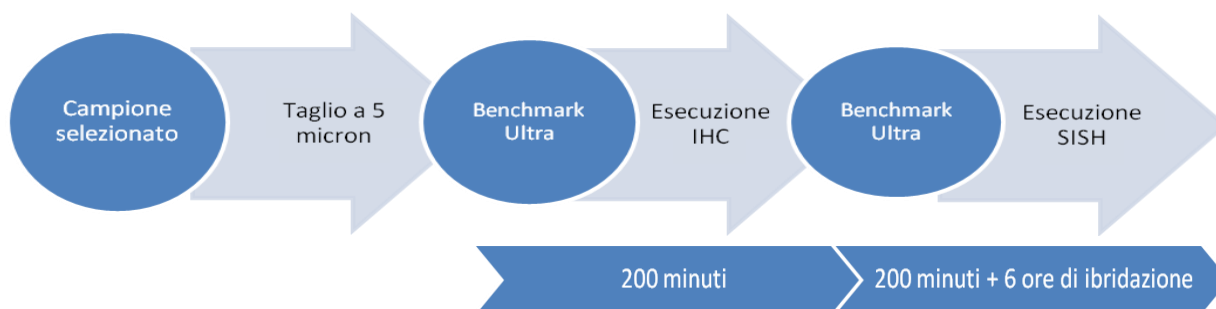


Figura 14 Schema di flusso della doppia colorazione IHC/SISH

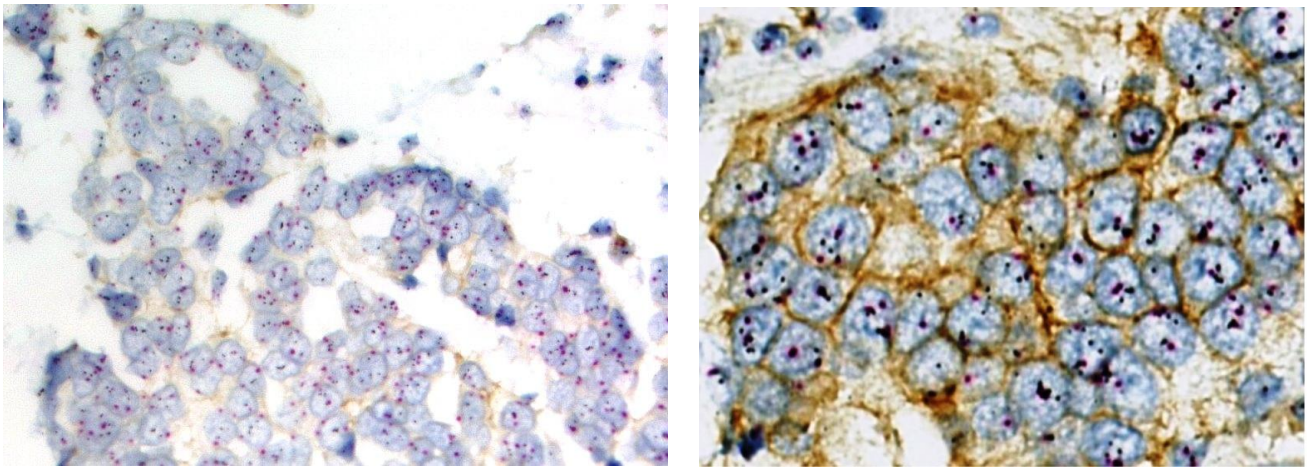


Figura 15 D.S. IHC/ISH Her2 rispettivamente negativa all'IHC e non amplificata (sx) e positiva all'IHC e amplificata (dx)

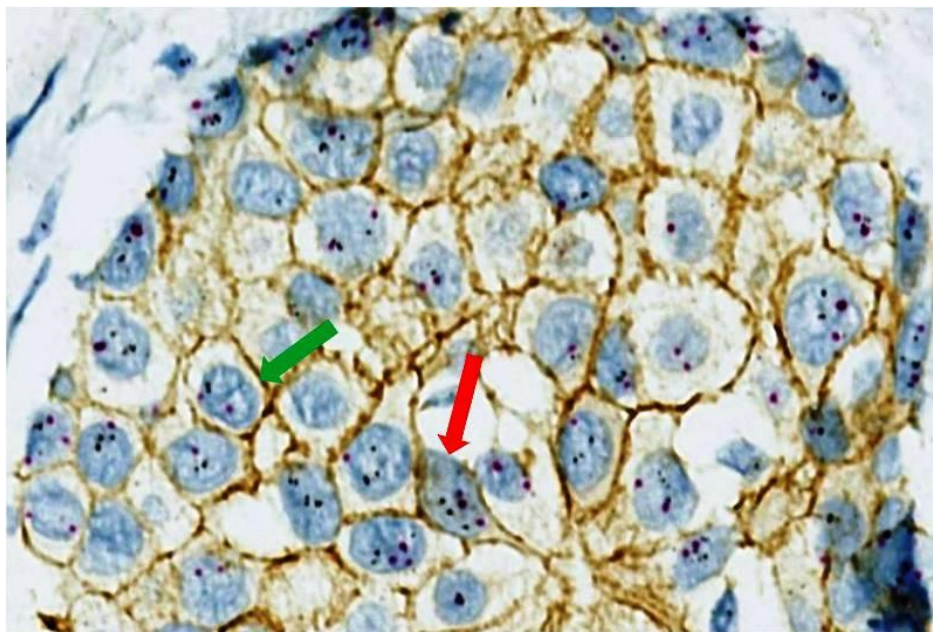


Figura 16 D.S. IHC/SISH Her2: caso eterogeneo (le frecce indicano rispettivamente un nucleo amplificato in rosso ed un nucleo non amplificato in verde)

I vetrini allestiti sono poi stati valutati in doppio da un biologo e da un patologo con microscopio tradizionale a luce trasmessa con obiettivo 20X e 40X seguendo i criteri di valutazione ASCO/CAP2013 ^[9].

Ogni caso è stato caratterizzato riportando la percentuale di nuclei positivi per l'IHC ed il grado di positività, il numero medio di segnali genici di Her2, il numero medio di segnali centromerici del cromosoma 17, il rapporto tra Her2/CEP17 e la percentuale di nuclei neoplastici con differente assetto genico rispetto alla popolazione maggiormente rappresentata.

Successivamente si è proceduto anche con la digitalizzazione dei preparati con piattaforma NanoZoomer-XR Digital slide scanner (Hamamatsu Photonics K.K. Hamamatsu City, Shizuoka Pref., Japan).

Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando software disponibili on line (Quick-Cals by GraphPad).

Al fine di valutare eventuali differenze tra le metodiche sono stati utilizzati il T test di Student, Il test esatto di Fisher ed il test del Chi quadrato.

3. Risultati

Risultati IHC e FISH

Tutti i 26 casi selezionati sono risultati valutabili sia in immunoistochimica che in FISH.

Il risultato prevalente per l'IHC è stato il 2+ (22 casi pari all'84.6%), seguito dal 3+ (2 casi pari al 7.6%) e da 1+ e 0, (rispettivamente 1 caso pari al 3.8%).

All'interno dei casi classificati come 2+ l'analisi FISH ha mostrato una assenza di amplificazione (rapporto Her2/CEP17 minore di 2) in 12 casi, mentre l'amplificazione genica (rapporto Her2/CEP17 maggiore o uguale a 2) era presente nei restanti 10.

Analizzando in maniera più dettagliata i casi FISH non amplificati è stata osservata la presenza di una sottopopolazione con amplificazione genica in 10/12 con una percentuale media di nuclei neoplastici con differente assetto genico rispetto al dato globale pari al 40% (range 22%-58%).

Un quadro analogo ma opposto è stato osservato anche in 8 casi su 10 risultati amplificati in FISH. Nello specifico era presente una popolazione di nuclei neoplastici privi di amplificazione genica quantificabile in un valore medio percentuale del 47% (range 37%-67%).

Anche tra i casi classificati come IHC 3+ è stata riscontrata la presenza di eterogeneità sia in quello positivo in FISH (48% di nuclei con assetto genico differente) sia in quello negativo in FISH (35% di nuclei con amplificazione genica).

Al contrario nessuno dei casi negativi all'IHC (0 e 1+) è risultato positivo in FISH né ha mostrato la presenza di una sottopopolazione eterogenea (tabella 21).

IHC Her-2 (SP3)	Numero di casi	FISH	
		Amplificazione genica (di cui eterogenei)	Assenza di amplificazione genica (di cui eterogenei)
0	1	0	1
1+	1	0	1
2+	22	10 (8)	12 (10)
3+	2	1 (1)	1 (1)
Tot	26	11 (9)	15 (11)

Tabella 21 Caratterizzazione IHC e FISH

Risultati Double Staining IHC/SISH

Tutti i casi sono risultati valutabili dopo essere sottoposti alla nuova metodica, tuttavia in 4 di essi la componente IHC della reazione non ha dato risultati ottimali a causa dell'iperdigestione del tessuto.

Pertanto, tra i 22 casi valutabili per l'espressione proteica il risultato prevalente per l'IHC è stato il 2+ (16 casi pari al 72.7 %), seguito dall' 1+ (3 casi pari al 13.6%), 0 (2 casi pari al 9.09%) e 3+, (1 caso pari al 4.54%).

4 casi (pari al 15.3%) non sono risultati valutabili in IHC ma solo in SISH.

All' interno dei casi classificati come 2+ l'analisi della componente SISH ha mostrato una assenza di amplificazione (rapporto Her2/CEP17 minore di 2) in 6 casi, mentre l'amplificazione genica (rapporto Her2/CEP17 maggiore o uguale a 2) era presente nei restanti 10.

Analizzando in maniera più dettagliata i casi SISH non amplificati è stata osservata la presenza di una sottopopolazione con amplificazione genica in 9/10 con una percentuale media di nuclei neoplastici con differente assetto genico rispetto al dato globale pari al 43% (range 28%-58%).

Un quadro analogo ma opposto è stato osservato anche in 9 casi su 10 risultati amplificati in FISH.

Nello specifico era presente una popolazione di nuclei neoplastici privi di amplificazione genica quantificabile in un valore medio percentuale del 29% (range 20%-37%).

Il caso classificato come IHC 3+ è risultato positivo in FISH con una sottopopolazione eterogenea pari al 67% dei nuclei neoplastici; mentre tra i casi negativi in IHC (0 e 1+) nessuno è risultato positivo per l'amplificazione genica ma rispettivamente 1 e 2 casi erano caratterizzati da eterogeneità.

Tra i casi non valutabili per la componente immunoistochimica 1 caso è risultato positivo in SISH ed eterogeneo (presenza di una sottopopolazione non amplificata pari al 22% dei nuclei neoplastici), i restati 3 casi sono risultati negativi sia per la SISH che per l'eterogeneità (tabella 22).

Componente IHC Her-2 (SP3)	Numero di casi	Componente SISH	
		Amplificazione genica (di cui eterogenei)	Assenza di amplificazione genica (di cui eterogenei)
0	2	0	2 (1)
1+	3	0	3 (2)
2+	16	10 (9)	6 (5)
3+	1	1 (1)	0
NE	4	1 (1)	3
Tot	26	12 (11)	14 (8)

Tabella 22 Simultanea caratterizzazione IHC e SISH

Confronto tra le metodiche

Per confrontare le due metodiche di valutazione dell'Her2 sono stati raffrontati i parametri a disposizione sia qualitativi (inteso come “positivo” e “negativo” che quantitativi.

Per la componente immunoistochimica è stata riscontrata una concordanza significativa tra le due metodiche sia dal punto di vista qualitativo (Test esatto di Fisher a due code P: 0.477) che quantitativo (Chi quadro: 0.95 LD19 P:1.00) (tabella 23 e figura 17).

Score	2+	0 - 1+ - 3+	Totale
IHC	22	4	26
IHC/SISH	16	6	22

Tabella 23 Confronto tra le due metodiche per la componente IHC

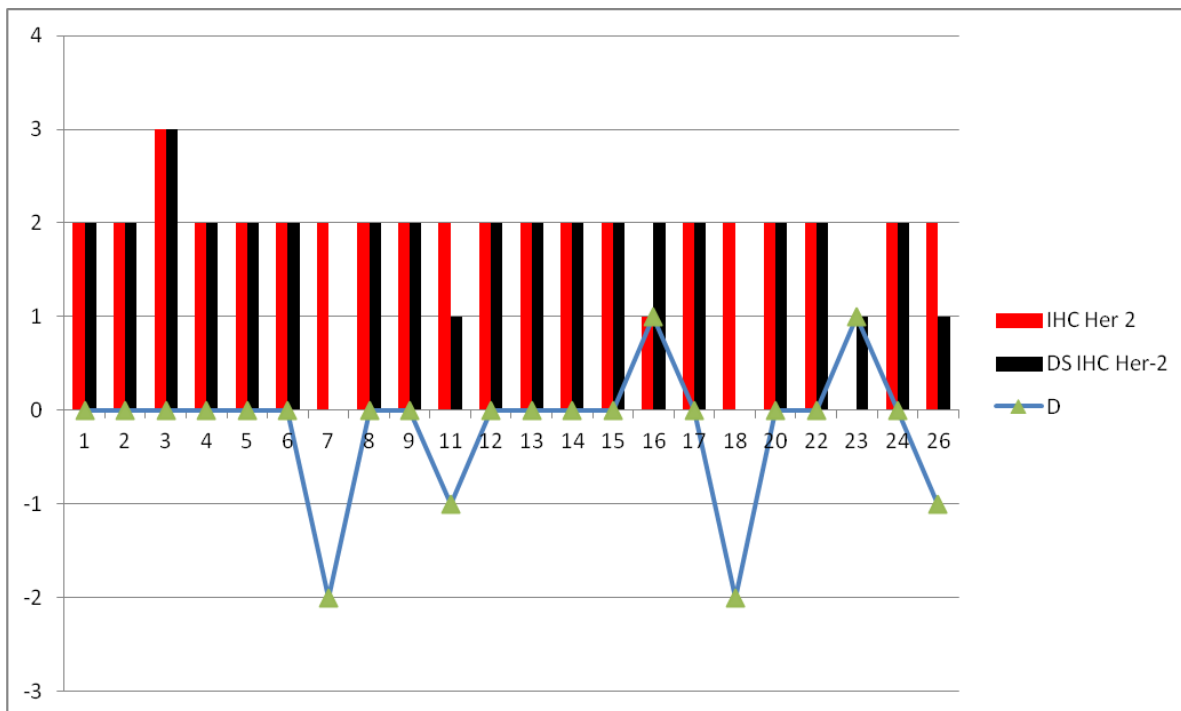


Figura 17 Confronto grafico dei risultati per la componente IHC: le barre rosse rappresentano i dati IHC ottenuti con metodica stand-alone, le barre nere rappresentano i dati della componente IHC della doppia colorazione (DS IHC), la linea bli indica le differenze tra le due metodiche (valori negativi: sottostima da parte della DS IHC; valori positivi: sovrastima da parte della DS IHC).

Il confronto tra la valutazione dell'amplificazione genica in FISH ed in SISH è stata effettuata considerando i dati sia qualitativi (amplificato o non amplificato) sia quantitativi (numero medio di segnali genici, numero medio di segnali centromerici e rapporto Her2/CEP17).

Anche in questo caso è stata osservata una concordanza statisticamente significativa tra i dati qualitativi ottenuti con le due metodiche (Test esatto di Fisher a due code P: 1.00). (tabella 24).

	Amplificazione	Assenza di amplificazione	Totale
FISH	11	15	26
IHC/SISH	12	14	26
Totale	13	29	56

Tabella 24 Confronto tra le due metodiche per la componente ISH

id	FISH	DS SISH	id	FISH	DS SISH
	Amplificazione (si-no)	Amplificazione (si-no)		Amplificazione (si-no)	Amplificazione (si-no)
1	s	s	14	n	n
2	s	s	15	n	n
3	s	s	16	n	n
4	s	s	17*	n	s
5	s	s	18	n	n
6	s	s	19	n	n
7*	s	n	20	n	n
8	n	n	21*	n	s
9	s	s	22	s	s
10	n	n	23	n	n
11	n	n	24	s	s
12	s	s	25	n	n
13	n	n	26	n	n

Tabella 25 Confronto qualitativo tra la metodica FISH e la DS SISH: * indica i casi discordanti.

Come emerge dalla tabella 25, solo 3 casi (7,17 e 21) hanno mostrato una discordanza minore, dovuta a livelli di amplificazione cosiddetti “borderline”.

Analizzando ulteriormente i casi discordanti emerge quanto segue:

Caso 7: risulta amplificato in FISH ma non amplificato in DS SISH. In questo caso anche il dato immunocistochemico è discordante (2+ vs 0) facendo ipotizzare un problema nella preanalitica del campione tale da alterare i dati ottenuti con un protocollo “standard” non personalizzato.

Casi 17 e 21: risultano non amplificati in FISH ma amplificati in DS SISH. Mentre nel caso 17 la DS SISH differisce con la FISH solo per un minor numero di segnali centromerici rilevati, il caso 21 rientra tra i non valutabili in IHC ipotizzando una situazione analoga a quanto descritto per il caso 7 (tabella 26).

id	IHC Her-2	FISH Results			Double IHC-SISH Results			
		Segnali Her-2	Segnali CEP17	Ratio	IHC Her-2	Segnali Her-2	Segnali CEP17	Ratio
7	2+	6,8	2,7	2,43	0*	3,73*	2,13	1,75
17	2+	4,83	4,23	1,25	2+	4,75	2,16*	2,19
21	2+	4,2	2,5	1,63	nv*	6,15*	2,51	2,44

Tabella 26 Analisi dei casi con discordanza minore tra FISH e DS SISH; * indica i valori discordanti.

La valutazione statistica per quanto riguarda i parametri quantitativi dell'indagine molecolare (FISH e DS SISH) è stata eseguita con il test T di Student.

Non sono state osservate differenze significative nè per il numero medio di segnali relativi al gene Her2 (p value:0.8858) nè per il rapporto tra Her2/CEP17 (p value: 0.3914). Le due metodiche sono sovrapponibili anche per la definizione dell'eterogeneità genica (tabella 27).

	Eterogeneità	Assenza di eterogeneità	Totale
FISH	20	6	26
IHC/SISH	20	6	26
Totale	40	16	55

Tabella 27 Confronto tra l'eterogeneità riscontrata con le due metodiche FISH e DS SISH

Complessivamente è stata osservata una concordanza significativa tra le due metodiche in relazione ai casi completamente valutabili (figura 18).

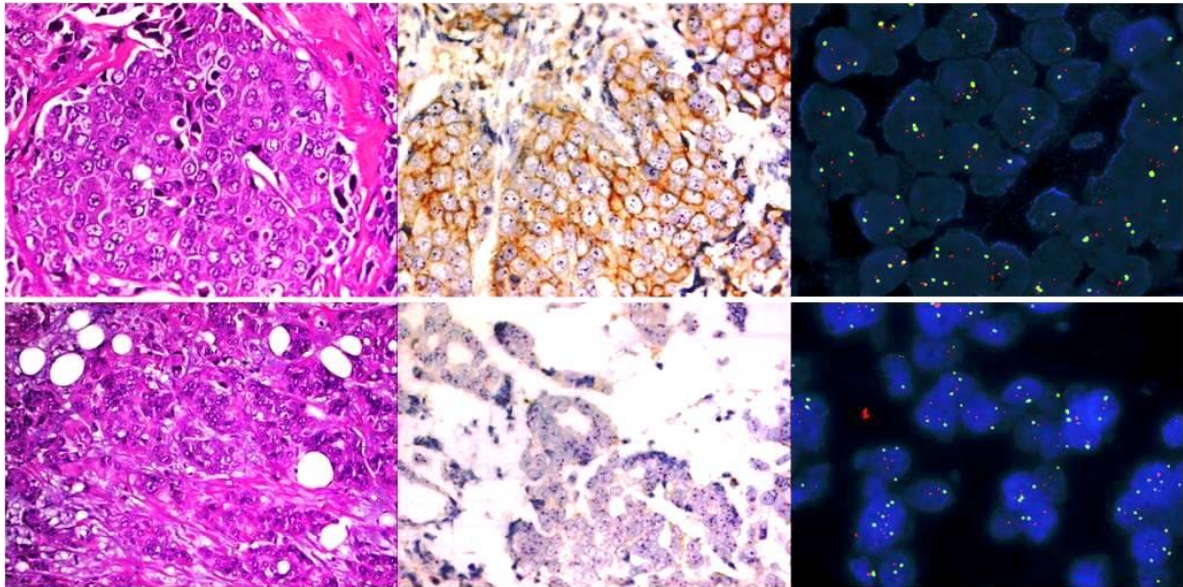


Figura 18 Confronto tra le due metodiche: in alto un caso 3+ e amplificato; in basso un caso negativo e non amplificato

4. Discussione e conclusioni

L'assetto di Her2 è stato valutato in una coorte di 26 carcinomi mammari utilizzando una nuova metodica, Double Staining IHC/SISH, in grado di rilevare simultaneamente e sulla stessa sezione l'espressione proteica e la presenza di alterazioni numeriche a carico del gene.

Sebbene tale metodo fosse già stato validato in altri lavori ^[4,5] i casi selezionati costituiscono un cosiddetto "stress test" poiché caratterizzati da un elevato livello di difficoltà interpretativa riguardo allo stato di Her2 per l'intrinseca eterogeneità genica di cui erano caratterizzati.

Per questo motivo 20 casi rientrano nella categoria dei casi difficili.

La casistica oggetto dello studio era stata in precedenza testata separatamente con le metodiche standard IHC e FISH, la quale è oggi considerata il gold standard nella determinazione dell'assetto genico di Her2 nella patologia neoplastica mammaria e di molteplici alterazioni geniche e cromosomiche in ambito oncologico ^[9,11].

Accanto alla FISH è stata sviluppata una metodica di ibridazione in situ in campo chiaro a precipitazione di Sali d'argento (SISH) che si propone come valida

alternativa, specialmente per la possibilità di essere conservata nel tempo e visualizzata in campo chiaro, nonché per il maggior livello di automazione.

La nuova metodica DS IHC/SISH presenta comunque alcuni vantaggi rispetto alla FISH, come ad esempio la possibilità di essere visualizzata in campo chiaro e, non ultima, la possibilità per l'operatore di selezionare immediatamente ed in tempo reale le singole cellule sulla base della positività immunohistochimica per Her2.

Inoltre può ridurre il tempo diagnostico per quei casi (IHC 2+) che altrimenti richiederebbero un reflex test..

In questo studio è stata posta l'attenzione sulle capacità della metodica di rilevare la presenza di sottopopolazioni eterogenee e sulla capacità di risolvere casi difficili.

Nella serie di casi analizzata la comparazione tra i dati ottenuti con la metodica FISH e la componente SISH della DS IHC/SISH hanno mostrato una concordanza significativa nella determinazione dell'amplificazione genica e nella identificazione di sottopopolazioni eterogenee.

Un dato analogo è stato ottenuto comparando la valutazione dell'espressione proteica con la metodica IHC "stand-alone" e con la componente IHC della DS IHC/SISH.

Pertanto possiamo affermare, nonostante la casistica limitata dalla natura dei casi stessi, che le due metodiche sono sovrapponibili anche in campioni cosiddetti "difficili".

L'utilizzo della selezione "cellula per cellula" resa possibile dalla compresenza sullo stesso vetrino dell'indagine IHC e ISH non riduce il grado di eterogeneità riscontrato in precedenza con la FISH.

Ciò porta a supporre l'esistenza di un fenomeno alternativo per spiegare l'iperespressione proteica. Tale supposizione era già stata sollevata da Varga et al ^[4] nei casi FISH negativi ma IHC positivi.

I dati a disposizione arricchiti da quelli presentati in questo capitolo confermano la buona sovrapponibilità tra la metodica DS IHC/SISH e la IHC e la FISH, rendendola una valida alternativa alle tecniche ad oggi utilizzate.

Capitolo 5

Messa a punto e validazione di una metodica rapida per la diagnosi FISH

Indice

Introduzione	78
Materiali e metodi.....	79
Selezione dei reagenti per le miscele	79
Selezione della casistica.....	79
Indagine immunocistochimica.....	80
Analisi FISH.....	80
Metodica rapida	82
Ritrattamento di casi non ottimali.....	83
Valutazione FISH.....	83
Analisi Statistica	83
Risultati.....	84
Risultati FISH	84
Risultati metodica Rapida	87
Confronto tra le metodiche.....	90
Discussione e conclusioni.....	91

1. Introduzione

Il carcinoma mammario è la neoplasia più frequente nelle pazienti di sesso femminile e la prima causa di morte per cancro. Una delle caratteristiche più comuni nei carcinomi della mammella è l'amplificazione genica di Her2, riscontrata in circa il 20% dei casi ^[1-3].

Il gene Her2 codifica per un recettore tirosinchinasico della famiglia Erb coinvolto nella trasduzione di segnali di proliferazione e sopravvivenza cellulare facendone un importante bersaglio per nuovi farmaci oncologici.

Infatti ad oggi sono stati sviluppati diversi anticorpi monoclonali umanizzati specificatamente diretti contro la proteina Her2; in particolare il Trastuzumab rappresenta il trattamento d'elezione per le pazienti con carcinoma mammario Her2 positivo sia in neoadiuvante che in adiuvante in combinazione con la chemioterapia tradizionale e non. ^[4]

Al fine di poter assegnare il farmaco è necessario che la paziente sia positiva per l'espressione della proteina recettoriale (IHC 3+) ovvero per l'amplificazione del gene Her2 come definito dalle recenti linee guida ASCO/CAP ^[5].

L'algoritmo diagnostico, quindi, prevede un test di primo livello comunemente rappresentato dall'IHC seguito, in caso di un risultato equivoco (2+), dall'indagine molecolare con tecniche di ibridazione in situ come la FISH con un allungamento dei tempi diagnostici. ^[6]

Ad oggi il tempo tecnico di esecuzione della metodica FISH non richiede meno di 2-3 giorni lavorativi; lo stesso vale per la CISH ^[7] e per la SISH ^[8]

Al fine di ridurre il tempo tecnico Matthiesen and Hansen ^[9] per primi hanno descritto una metodica rapida alternativa alla FISH cosiddetta "standard" caratterizzata da un tempo tecnico minimo di 210 minuti da cui è stato sviluppato un kit commerciale.

Al fine di superare alcuni limiti insiti nel kit commerciale disponibile, quali la necessità di cambiare radicalmente i protocolli in uso, la necessità di cambiare sonda molecolare e di investire risorse nell'aggiornamento della piattaforma di microscopia a fluorescenza acquistando nuovi filtri e nuove componenti e la

limitatezza alla sola diagnosi Her2, abbiamo sviluppato e validato tre miscele chimiche in grado di ridurre il tempo tecnico della FISH a poche ore senza alcun vincolo tecnologico da parte del laboratorio.

Essendo le tre miscele e la metodica oggetto di tutela brevettuale all'interno dei 18 mesi di segretezza, nel presente capitolo verranno riportati solo i dati essenziali non sensibili.

2. Materiali e metodi

Selezione dei reagenti per le miscele

La composizione delle tre miscele sviluppate è costituita da sostanze la cui natura e concentrazione non verrà divulgata per motivi di segretezza brevettuale.

La composizione finale delle miscele è stata ottenuta in seguito a prove con concentrazioni variabili in differenti condizioni di denaturazione e ibridazione.

Selezione della casistica

Al fine di metter a punto e validare le tre miscele sviluppate sono stati selezionati dall'archivio dell'Unità Operativa di Anatomia Patologica "M. Malpighi", Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie 50 casi di carcinoma duttale infiltrante della mammella, 20 casi di neoplasie cerebrali e 20 casi di adenocarcinomi del polmone.

Tutti i tessuti erano precedentemente fissati in formalina ed inclusi in paraffina.

Di tutti i casi di carcinoma alla mammella era già disponibile la reazione immunohistochimica per la valutazione dell'espressione di Her2, poi utilizzata come guida per le metodiche di ibridazione in situ.

La valutazione degli altri campioni della casistica è stata effettuata su sezione istologica colorata in ematossilina-eosina al momento dell'indagine FISH.

Indagine immunohistochimica

Le indagini immunohistochimiche (IHC) per la valutazione dell'espressione di Her2 sono state effettuate al momento della diagnosi iniziale dei casi su piattaforma automatizzata Benchmark (Roche-Ventana, Tucson, Az) con anticorpo specifico per il dominio interno della proteina recettoriale (clone SP3).

La valutazione del grado di positività per l'IHC HER2 è stata rivista per tutti i 50 casi selezionati per attualizzarla alle linee guida ASCO/CAP 2013 ^[5].

Tutti i casi selezionati sono risultati 2+, i casi con IHC negativa (0 o 1+) e positiva (3+) non sono stati presi in considerazione in questo studio.

Analisi FISH

L'analisi FISH è stata eseguita seguendo il protocollo di Graziano et al. ^[6]:

da ciascun caso è stata ottenuta una sezione istologica in bianco dello spessore di 5 micron posta su vetrino polarizzato.

Dopo una prima incubazione in stufa a secco a 56°C per almeno 2 ore, le sezioni sono state sparaffinate in 3 cambi di Bioclear (Agente chiarificante a base di terpeni naturali, Bio-Optica, Milano (IT)) di 15 minuti ciascuno.

In seguito si procede con una rapida asciugatura all'aria e con una reidratazione parziale in due cambi successivi di etanolo assoluto, seguita da una successiva asciugatura all'aria.

I campioni così processati possono essere sottoposti ai successivi trattamenti termico e protesico, rispettivamente in SSC2X (tampone salino sodio citrato a pH 7) a 75°C per 10-12 minuti, ed in una soluzione di Proteinasi K in SSC2x alla concentrazione di 0.25mg/ml a 45°C per 10-12 minuti.

Ne segue un lavaggio in tampone, una successiva disidratazione in scala di alcoli (etanolo 70%-80%-100%) per 1-2 minuti ciascuno e l'asciugatura all'aria.

La fase successiva prevede l'apposizione di un'adeguata quantità di sonda molecolare (tra i 5 ed i 10 microlitri) su un'area rappresentativa della lesione selezionata preferibilmente in base alla positività IHC per Her2 ovvero sulla sezione colorata in ematossilina-eosina.

La sonda utilizzata per la valutazione dell'amplificazione di Her2, ON HER2/CEP17 dual colour probe (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, The Netherlands), è caratterizzata dall'assenza di sequenze ripetute e dall'emissione in spectrum orange (segnali genici) e spectrum green (segnali centromerici).

Una volta apposta la sonda il vetrino viene coperto con un coprioggetto, sigillato con una collante vinilico (Rubber Cement) e posto su piastra di ibridazione per essere sottoposto al ciclo di denaturazione (75-80°C per 10-15 minuti) ed ibridazione (37°C o/n).

Il giorno successivo, si procede con la fase post-ibridazione che prevede la rimozione del coprioggetto in un lavaggio di SSC2X a RT, un lavaggio di stringenza in una soluzione di NP40 in SSC2X allo 0.5% a 73°C per 2 minuti per rimuovere la quota eccedente di sonda molecolare e quei filamenti che non si sono appaiati correttamente, una disidratazione in scala di alcoli ed il contrasto dei nuclei con DAPI/Antifade (soluzione di 4',6'-diamidino-2-phenylindole in antifade alla concentrazione di 1 µg/mL, Kreatech Diagnostics, Amsterdam, The Netherlands).

La valutazione dei preparati sottoposti ad indagine FISH è stata effettuata con piattaforma di microscopia a fluorescenza Olympus BX 61 (Olympus, Melville, NY) valutando almeno 60 nuclei neoplastici per ciascun preparato.

Ogni caso è stato caratterizzato riportando il numero medio di segnali genici di Her2, il numero medio di segnali centromerici del cromosoma 17, il rapporto tra Her2/CEP17. L'interpretazione dei dati è stata effettuata seguendo le raccomandazioni ASCO/CAP2013^[5] definendo come positivo per l'amplificazione del gene Her2 un caso in cui il valore del rapporto Her2/CEP17 sia maggiore o uguale a 2; altrimenti il caso viene considerato negativo.

Per quanto riguarda i casi di neoplasia gliale, essi sono stati testati per la valutazione delle delezioni a carico del braccio corto del cromosoma 1 (1p36) e del braccio lungo del cromosoma 19 (19q13) utilizzando il medesimo protocollo modificato solamente nella durata del trattamento termico e protesico (16 minuti cad.).

In questo caso sono state utilizzate sonde specifiche Vysis 1p36/1q25 and 19q13/19p13 FISH Probe Kit (Abbott Molecular, Abbott Park, Illinois).

La valutazione della positività per la delezione a carico di 1p36 e 19q13 è stata effettuata secondo Smith et al. ^[10]

Per la valutazione del riarrangiamento del gene ALK su adenocarcinomi del polmone è stata utilizzata sempre la metodica descritta con le sonde specifiche Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (Abbott Molecular, Abbott Park, Illinois).

La valutazione della positività per il riarrangiamento del gene ALK è stata effettuata secondo Camidge et al. ^[11]

Il tempo minimo complessivo per ottenere un preparato idoneo alla lettura, come precedentemente riportato, è di 2 giorni lavorativi.

Metodica Rapida

Dagli stessi blocchetti testati con la metodica FISH standard sono state ottenute sezioni istologiche in bianco dello spessore di 5 micron e sottoposte ad indagine FISH rapida.

La metodica utilizzata è sovrapponibile a quella standard sino alla fase di denaturazione e ibridazione con alcune modifiche tali da ridurre il tempo. Anche i reagenti ed i tamponi utilizzati sono gli stessi.

Prima della fase di denaturazione, al momento dell'apposizione della sonda, è stata dispensata sull'area selezionata per l'ibridazione un'idonea quantità di una delle miscele sviluppate in relazione al tipo di tessuto da valutare: miscela 1 (denominata brevettualmente DO) per i casi di carcinoma mammario; miscela 2 (denominata brevettualmente MO) per i casi di neoplasia cerebrale ed adenocarcinoma del polmone.

Le fasi successive, una volta sigillato il vetrino coprioggetto, prevedono un ciclo di denaturazione e ibridazione ridotto e successive fasi di lavaggio, disidratazione e contrasto nucleare come per la metodica standard.

Le sonde utilizzate sono le stesse descritte in precedenza.

Il tempo minimo complessivo per ottenere un preparato idoneo alla lettura è, in questo caso, di poco più di 2-3 ore.

Ritrattamento dei casi non ottimali

Talvolta, per motivi indipendenti dalla metodica utilizzata, accade che alcuni test debbano essere ripetuti per la presenza di un segnale non valutabile dopo l'esecuzione della metodica standard.

In tal caso, qualora lo stato del preparato lo consenta, è possibile ripetere la metodica da qualsiasi punto (in genere si predilige riprendere con la sparaffinatura per eliminare eventuali residui) con l'allungamento dei tempi diagnostici.

Per tale ragione è stata sviluppata una miscela (miscela 3, brevettualmente denominata DOMO) che, utilizzata come le precedenti, riduce i tempi del ritrattamento consentendo la ripetizione del test in giornata.

Valutazione FISH

La valutazione delle indagini FISH, sia standard che rapida, è stata eseguita a cieco da due operatori conteggiando almeno 60 nuclei neoplastici non sovrapposti per Her2 ed ALK ed almeno 100 nuclei neoplastici non sovrapposti per 1p36 e 19q13.

Oltre alla registrazione dei parametri numerici quali: media dei segnali genici di Her2, media dei segnali centromerici (CEP17), rapporto Her2/CEP17, percentuale di nuclei neoplastici con almeno 1 segnale di positività per il riarrangiamento del gene ALK, numero medio di segnali della regione cromosomica 1p e 19q, numero medio di segnali per la regione di controllo 1q e 1p e rapporto 1p/1q e 19q/19p; sono stati registrati anche parametri qualitativi come il grado e la variabilità dell'intensità dei segnali, il grado di digestione dei nuclei ed il segnale di contrasto con il DAPI.

Tutti questi parametri sono stati analizzati con sistema di microscopia a fluorescenza Olympus BX61 (Olympus, Melville, NY).

Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando software disponibili on line (Quick-Cals by GraphPad). Al fine di valutare eventuali differenze tra le metodiche sono stati utilizzati il T test di Student, Il test esatto di Fisher ed il test del Chi quadrato.

Inoltre, per la valutazione qualitativa delle ibridazioni è stato utilizzato un software per analisi d'immagine GIMP 2,8 (GNU Image Manipulation Program – www.gimp.org)

3. Risultati

Risultati FISH

I 50 casi di carcinoma mammario selezionati sono risultati valutabili in FISH (tabella 28).

ID	HER2/CEP17 ratio	Interpretazione	ID	HER2/CEP17 ratio	Interpretazione	ID	HER2/CEP17 ratio	Interpretazione
1	1.02	N	18	1.01	N	34	2.29	A
2	1.11	N	19	1.49	N	35	1.07	N
3	1.22	N	20	1.08	N	36	1.67	N
4	2.67	A	21	1.23	N	37	1.26	N
5	2.05	A	22	1.05	N	38	1.03	N
6	1.02	N	23	2.48	A	39	3.67	N
7	0.90	N	24	1.87	N	40	1.06	N
8	1.12	N	25	1.14	N	41	1.53	N
9	1.05	N	26	0.97	N	42	1.06	N
10	1.14	N	27	1.10	N	43	1.2	N
11	1.14	N	28	1.09	N	44	1.82	N
12	2.67	A	29	1.90	N	45	2.02	N
13	1.61	N	30	1.06	N	46	1.03	N
14	1.14	N	31	2.48	A	47	1.01	N
15	1.16	N	32	0.98	N	48	1.25	N
16	1.13	N	33	2.36	A	49	2.66	N
17	1.23	N				50	1.51	N

Tabella 28 Risultati FISH Her2 con metodo standard: N: Non Amplificati, A: Amplificato

Dei 50 casi 7 sono risultati amplificati pari ad un percentuale del 14%, analoga alla media attesa dalla letteratura per i casi classificati come 2+ (figura 19)

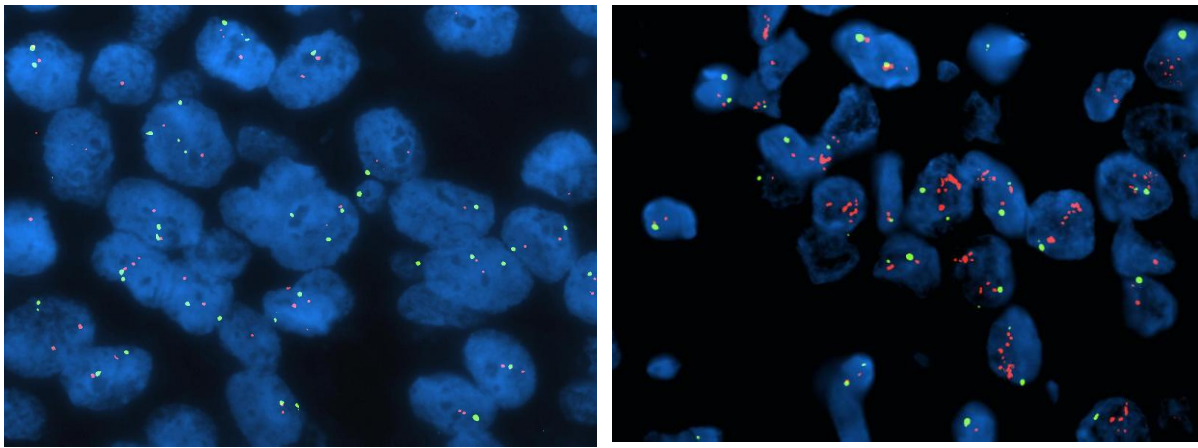


Figura 19 Her2 non amplificato dopo FISH standard (sx) ed Her2 amplificato dopo FISH standard (dx)

Tutti i 20 casi testati per la delezione di 1p e 19q sono risultati valutabili (tabella 29).

ID	1p36/1q	Interpretazione	ID	19q13/19p	Interpretazione
1	0,96	N	1	0,95	N
2	0,95	N	2	0,7	D
3	0,83	D	3	0,8	D
4	0,89	N	4	0,95	N
5	0,96	N	5	0,89	N
6	0,9	N	6	0,92	N
7	0,92	N	7	0,93	N
8	1,03	N	8	0,91	N
9	0,98	N	9	0,96	N
10	0,96	N	10	0,99	N
11	0,95	N	11	0,91	N
12	0,7	D	12	0,63	D
13	0,66	D	13	0,73	D
14	0,88	N	14	0,9	N
15	0,96	N	15	0,95	N
16	0,99	N	16	0,97	N
17	0,98	N	17	0,97	N
18	0,98	N	18	0,96	N
19	0,99	N	19	0,96	N
20	0,96	N	20	0,99	N

Tabella 29 Risultati FISH 1p e 19q con metodo standard: N: Non Deleto, D: Deleto

1 caso è risultato deletp per il solo cromosoma 19, 3 casi hanno mostrato doppia delezione (1p e 19q) mentre i restanti 16 casi sono risultati negative per la delezione di 1p36 e 19q13 (figura 120).

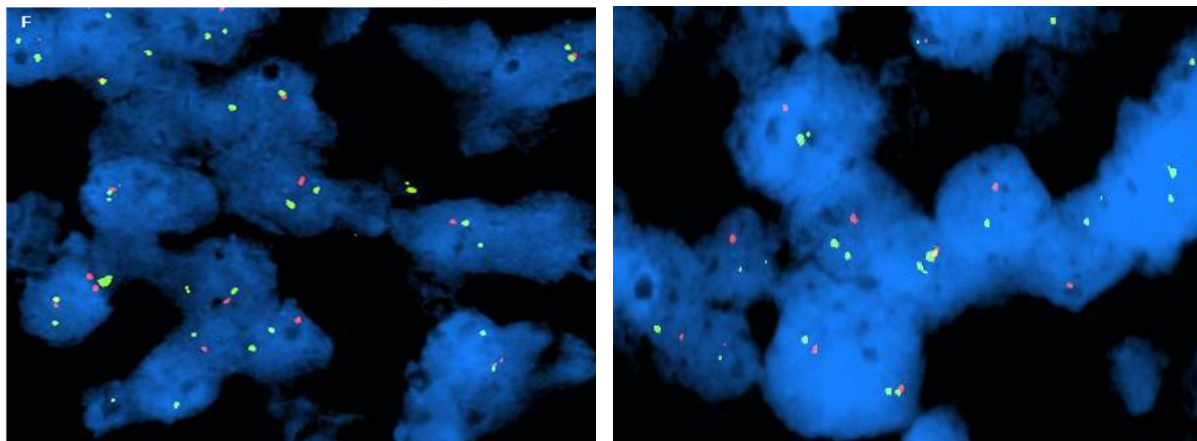


Figura 20 1p36 delecto dopo FISH standard (sx) ed 19q13 delecto dopo FISH standard (dx)

Tutti i 20 casi testati per la presenza del riarrangiamento del gene ALK sono risultati valutabili (tabella 30).

ID	% nuclei ALK R+	Interpretazione	ID	% nuclei ALK R+	Interpretazione
1	1,6	N	11	1,6	N
2	23	R	12	1,6	N
3	1,6	N	13	3,3	N
4	6,6	N	14	3,3	N
5	8,3	N	15	1,6	N
6	1,6	N	16	6,6	N
7	3,3	N	17	11	N
8	1,6	N	18	3,3	N
9	5	N	19	1,6	N
10	6,6	N	20	18	R

Tabella 30 Risultati FISH ALK con metodo standard: N: Non Riarrangiato, R: Riarrangiato

2 casi sono risultati positivi per il riarrangiamento del gene ALK mentre i restanti 18 sono risultati negativi. (figura 21).

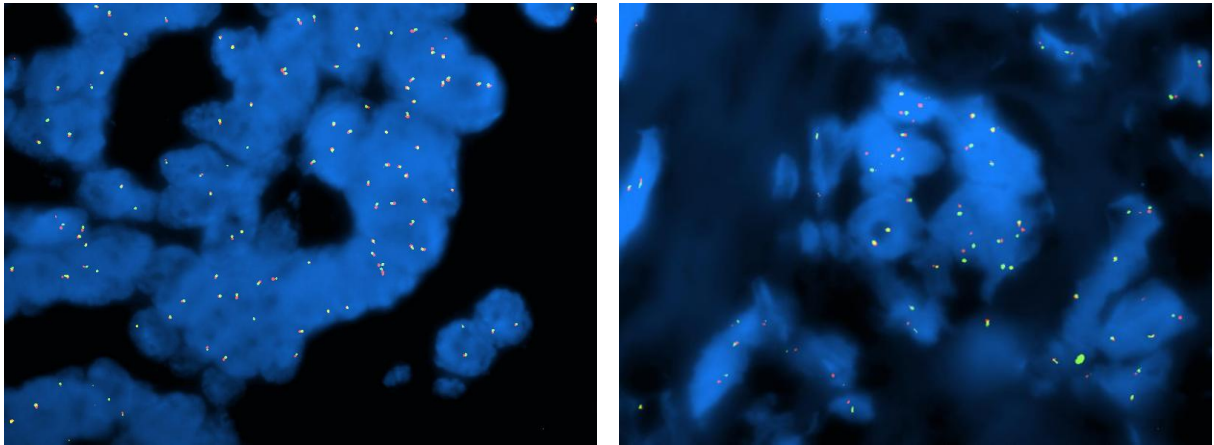


Figura 21 ALK non riarrangiato dopo FISH standard (sx) ed ALK riarrangiato dopo FISH standard (dx)

Risultati metodica rapida

Tutti i 50 casi testati con la metodica rapida sono risultati valutabili ed hanno mostrato amplificazione genica in 6 casi (figura 22)

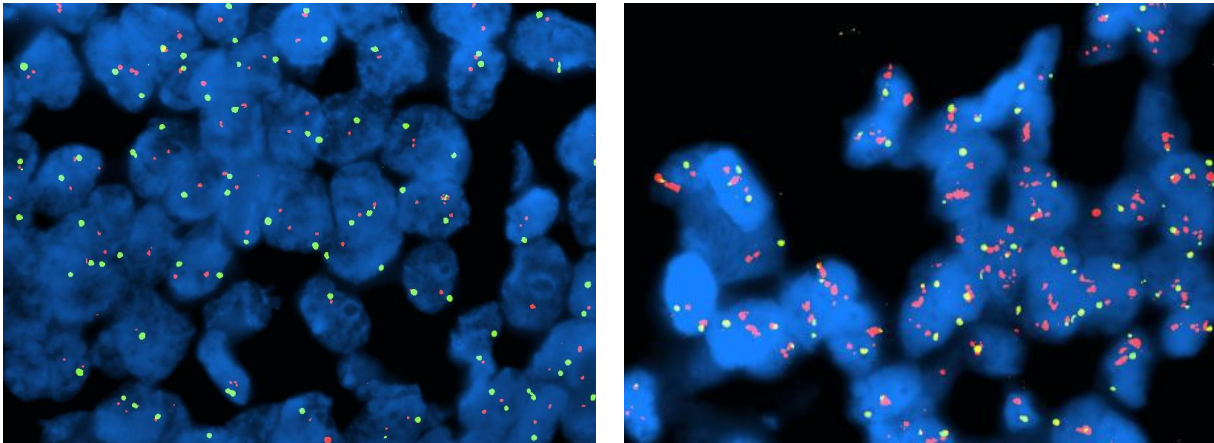


Figura 22 Her2 non amplificato dopo FISH rapida con miscela 1 (sx) ed Her2 amplificato dopo FISH rapida con miscela 1 (dx)

Per quanto riguarda i casi di neoplasia cerebrale testati per la delezione di 1p36/19q13 e per il riarrangiamento del gene ALK sono tutti risultati valutabili. 1 caso è risultato delecto per il solo cromosoma 19, 3 casi hanno mostrato doppia delezione (1p e 19q) mentre i restanti 16 casi sono risultati negative per la delezione di 1p36 e 19q13 (figura 23).

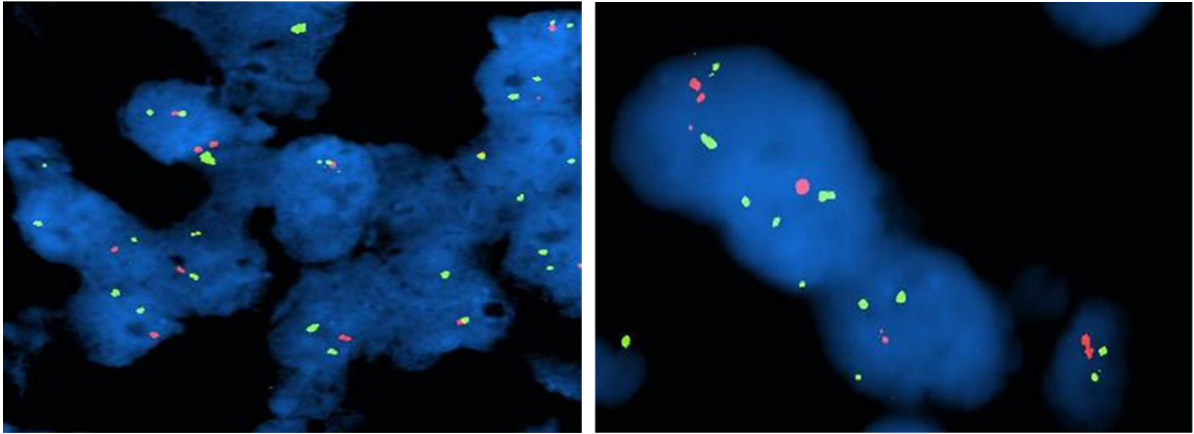


Figura 23 1p deleto dopo metodica FISH rapida con miscela 2 (sx) e 19q deleto dopo metodica FISH rapida (dx)

Anche in questo caso 2 casi sono risultati positivi per il riarrangiamento del gene ALK mentre i restanti 18 sono risultati negativi. (figura 24).

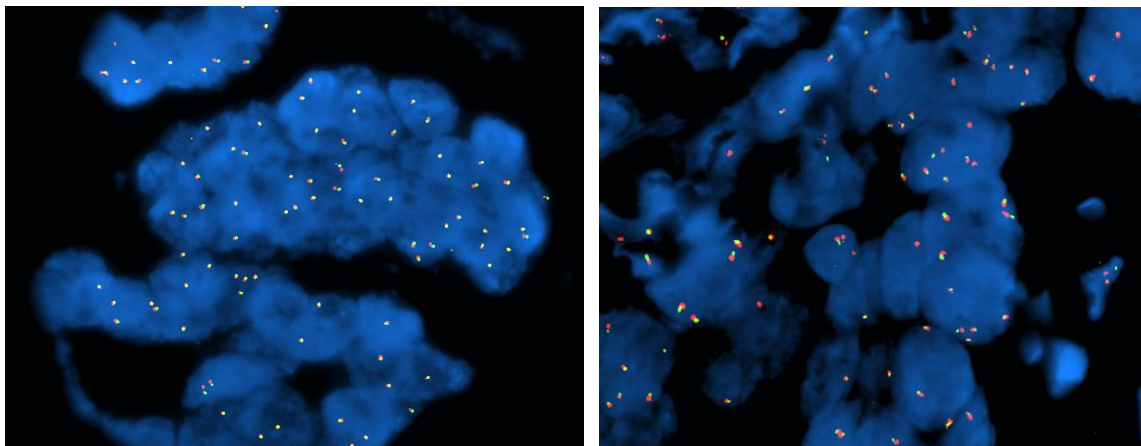


Figura 24 ALK non riarrangiato dopo metodica FISH rapida con miscela 2 (sx) e ALK riarrangiato dopo metodica FISH rapida (dx)

Al fine di testare la potenzialità della miscela 3 nell'ottenimento di un risultato valutabile su casi non ottimali dopo l'esecuzione della metodica standard sono stati ripetuti alcuni casi per testare ciascuna delle sonde a disposizione. Tutte le ripetizioni hanno dato esito positivo (figura 25 e 26)

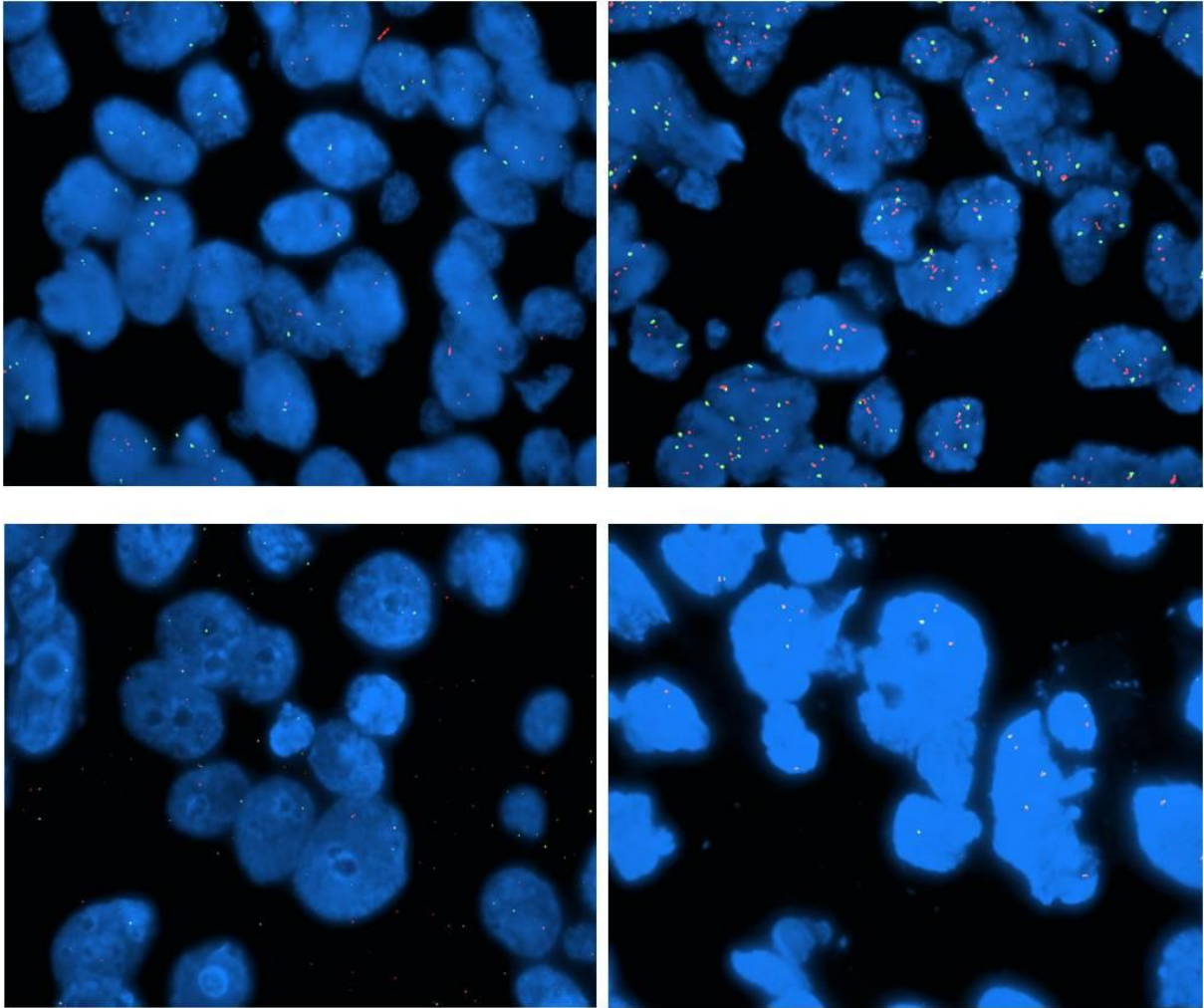


Figura 25 Le immagini a sinistra mostrano rispettivamente 1 caso precedentemente testato per Her2 (in alto) ed uno per ALK (in basso) risultati non valutabili. Le immagini a destra mostrano lo stesso vetrino ritestato con la metodica rapida (miscela 3) rispettivamente per Her2 e ALK

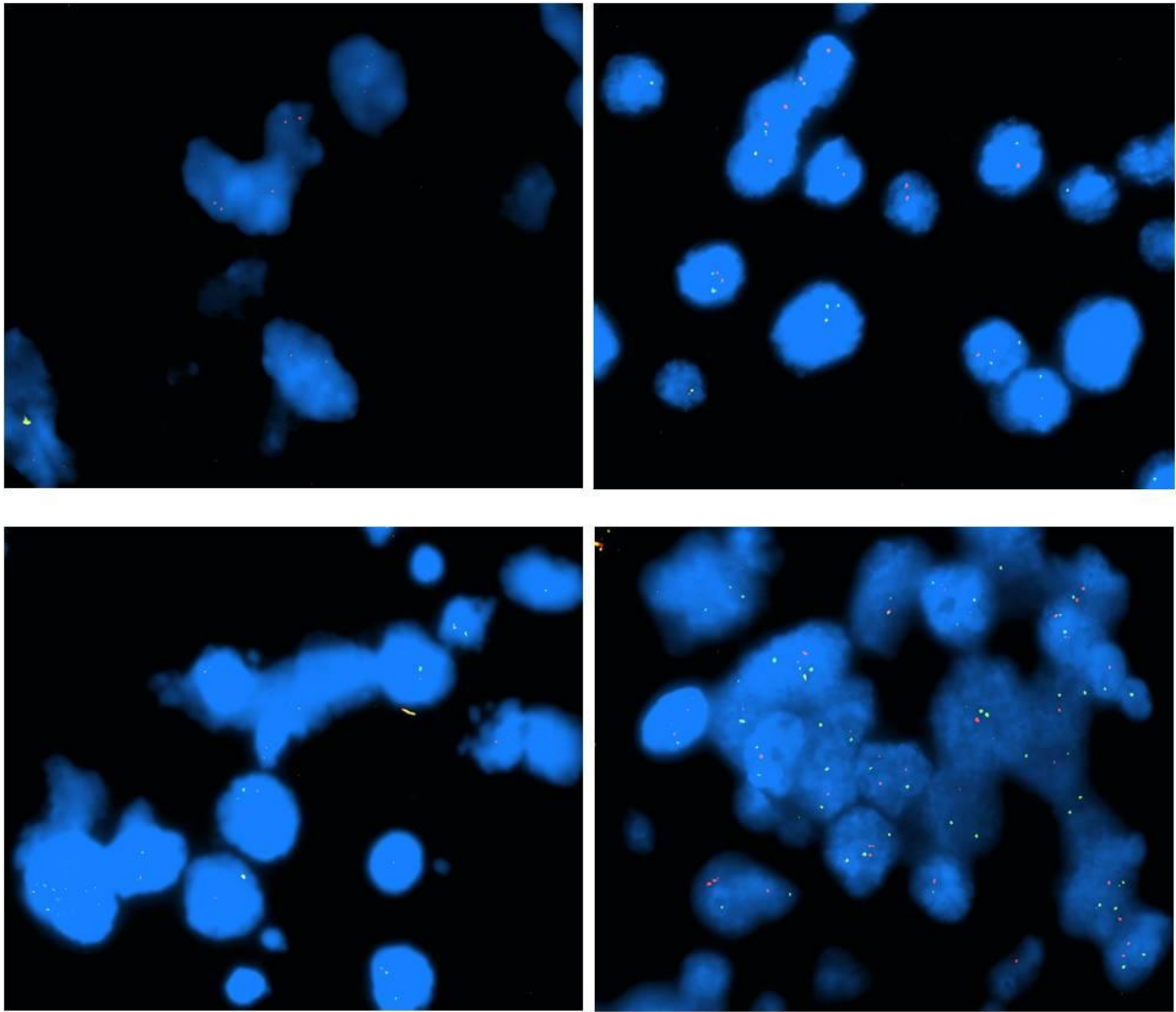


Figura 26 Le immagini a sinistra mostrano rispettivamente 1 caso precedentemente testato per 1p (in alto) ed uno per 19q (in basso) risultati non valutabili. Le immagini a destra mostrano lo stesso vetrino ritestato con la metodica rapida (miscela 3) rispettivamente per 1p e 19q.

Confronto tra le metodiche

Per confrontare le due metodiche FISH sono stati raffrontati i parametri a disposizione sia qualitativi (inteso come “positivo” e “negativo”) che quantitativi, oltre ai dati sulla qualità dell’ibridazione.

Per quanto riguarda la valutazione del gene Her2 non sono state riscontrate differenze significative tra le due metodiche per ciascun parametro analizzato: numero medio dei segnali del gene Her2 $p < 0.01$ ($p = 0.775$; 98LD), numero medio disegni relativi al centromero del cromosoma 17 $p < 0.01$ ($p = 0.673$; 98LD) e rapporto Her2/CEP17 $p < 0.01$ ($p = 0.890$; 98LD)

Inoltre anche la comparazione dei singoli valori del rapporto Her2/CEP17 non ha mostrato differenze significative ($\chi^2 = 2.91$; 49 LD).

Per quanto riguarda la valutazione comparativa per la determinazione della delezione a carico di 1p36 e 19q13, e per il riarrangiamento del gene ALK non ha mostrato differenze significative.

Passando alla valutazione qualitativa sono stati confrontati, tra le due metodiche, i diametri dei segnali relativi al gene Her2, al CEP17, alle regioni cromosomiche 1p36,1q,19q13,1p ed al gene ALK tramite misurazione con software GIMP2.8.

Anche in questo caso non sono state osservate differenze significative tra le due metodiche per $p < 0.01$ (figura 27).

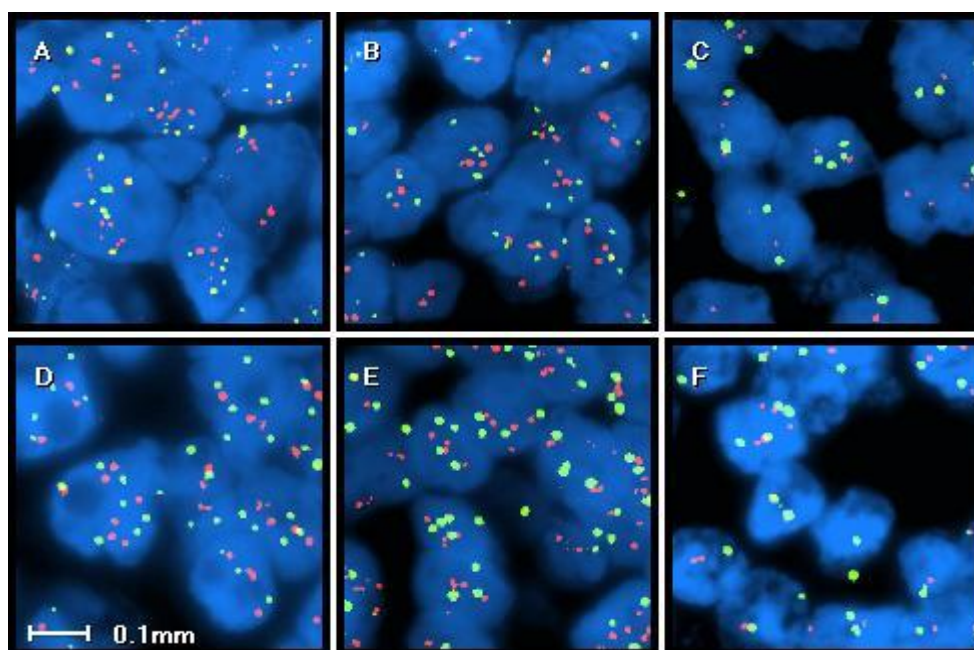


Figura 27 Pannello di comparazione tra la metodica rapida (figure A,B,C) e la metodica standard (figure D,E,F) per la valutazione di Her2.

La valutazione complessiva di corrispondenza dei risultati tra le due metodiche riporta una concordanza del 98% (CI95%: 96.8%-99.1%).

4. Discussione e conclusioni

Con lo sviluppo delle nuove terapie mirate in oncologia riveste sempre maggior importanza il dato molecolare con tecnica FISH.

Ad oggi, infatti, l'accurata selezione dei pazienti in base allo stato di amplificazione del gene Her2 assume un valore fondamentale per l'assegnazione del corretto schema di trattamento.

Lo stesso dicasi per la determinazione della presenza del riarrangiamento del gene ALK nelle neoplasie polmonari in stadio avanzato, e per la determinazione della delezione di 1p36 e 19q13 come valore prognostico e diagnostico nei tumori cerebrali.

Nonostante l'avanzamento tecnologico, la tecnica FISH è rimasta pressoché immutata sin dalla sua introduzione se non sotto forma di varianti il cui uso è limitato o da tempistiche non migliorative e/o da costi molto elevati.

Con il progetto qui discusso abbiamo voluto sviluppare un sistema rapido ed economico per portare anche la FISH verso la cosiddetta “intra-day diagnosis”.

Abbiamo quindi studiato e validato su una casistica interna 3 miscele la cui aggiunta al protocollo tradizionale ne consente la riduzione del tempo tecnico dai 2-3 giorni standard a poco più di 2 ore.

I dati di elevata concordanza, anche maggiore rispetto a quella riportata da Matthiesen ^[9], unita alla possibilità di applicazione a sonde molecolari di differente marca, bersaglio e tessuto rendono quanto da noi sviluppato una valida e praticabile alternativa alla metodica standard ed alle altre metodiche cosiddette “veloci”.

Le performance riportate, quindi, consentono di ipotizzare l'impiego della metodica rapida nella routine quotidiana diventando essa stessa uno standard di lavoro.

Bibliografia

Indice

Capitolo 1	94
Capitolo 2	100
Capitolo 3	110
Capitolo 4	113
Capitolo 5	115

Capitolo 1: La neoplasia mammaria, aspetti generali

[1] Damiani S & Eusebi V: Gross and microscopic pathology. In: Donegan WL, Spratt JS eds. Cancer of the breast. Philadelphia: Saunders, 2002: 347-375.

[2] Tavassoli F.A. and Devilee P. WHO. Tumours of the breast and female genital organs. 3rd (5th). 2003. IARC Press, Lyon. WHO classification of tumours.

[3] Lakhani SR, Gusterson BA et al. The pathology of familial breast cancer: histological features of cancers in families not attributable to mutations in BRCA1 or BRCA2. Clin Cancer Res. 2000 Mar; 6(3):782-9.

[4] Tot T, Tabar L, Dean PB. The pressing need for better histologic–mammographic correlation of the many variations in normal breast anatomy. Virchows Arch. 2000; 437: 338-344.

[5] Hellquist BN, Duffy SW, Abdsaleh S, et al. Effectiveness of population-based service screening with mammography for women ages 40 to 49 years. Cancer 2011;117:414-722.

[6] Bernard JR Jr, Vallow LA, McNeil RB, et al. In newly diagnosed breast cancer, is a contralateral prophylactic mastectomy necessary following a negative MRI? J Clin Oncol 2009;27 (15S):abstract 627.

[7] Camps J, Sentis M, Ricart V, et al. How to deal with additional findings seen in pre-therapeutic breast MRI and their impact on therapeutic approach. A prospective longitudinal single-institutional study in 465 patients. Cancer Res 2009;69 (24 Suppl);abstract 4023.

[8]Lehman CD, Silbergeld J, De Martini WB, et al. MRI detection of otherwise occult malignancies in women recently diagnosed with breast cancer. *Cancer Res* 2009;69 (24 Suppl);abstract 4017.

[9]Mann RM, Kuhl CK, Kinkel K, et al. Breast MRI: guidelines from the European Society of Breast Imaging. *Eur Radiol.* 2008;18:1307-1318.

[10]Schnall M, Orel S. Breast MR imaging in the diagnostic setting. *Magn Reson Imaging Clin N Am.* 2006;14:329-337.

[11]Lakhani S, Ellis IO, Schnitt SJ et al, editors. WHO classification of tumour of the breast, 4th edition. IARC: Lyon 2012.

[12]Edge SB, Byr DR, Compton CC, et al, editors. American Joint Committee on cancer (AJCC). *Cancer Staging manual.* Seventh edition. New York, Springer 2009.

[13]Fisher B, Costantino JB, Wickerham DL, et al. Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1652-1662.

[14]Vogel Vg, Costantino JP, Wickerham DL, et al. Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes. The NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 Trial. *JAMA* 2006;295:32:2727-2741.

[15]Monhollen L. Morrisen C, Ademuyiwa FO, et al. Pleomorphic lobular carcinoma: a distinctive clinical and molecular breast cancer type. *Histopathology* 2012;61:365-377.

[16]Murray L, Reintgen M, Akman K, et al. Pleomorphic lobular carcinoma in situ:

treatment options for a new pathologic entity. *Clin Breast Cancer* 2012;12:76-79.

[17]Sneige N, Wang J, Baker BA, et al. Clinical, histopathologic, and biologic features of pleomorphic lobular (ductal-lobular) carcinoma in situ of the breast: a report of 24 cases. *Mod Pathol* 2002; 15:1044-1050.

[18]Bentz JS, Yassa N, Clayton F. Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: clinicopathologic features of 12 cases. *Mod Pathol* 1998;11:814-822.

[19]Anderson BO, Calhoun KE, Rosen EL. Evolving concepts in the management of lobular neoplasia. *J Natl Compr Canc Netw* 2006;4:511-522.

[20]Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A and, al. et; Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer *Science* 12 May 1989: Vol. 244 no. 4905 pp. 707-712 DOI: 10.1126/science.2470152

[21]Olayioye MA, Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members, in *Breast Cancer Res*, vol. 3, n° 6, 2001, pp. 385–389, DOI:10.1186/bcr327, PMC 138705, PMID 11737890.

[22]De Placido S, De Laurentiis M, Carlomagno C, et al. Twenty-year results of the Naples GUN randomized trial: predictive factors of adjuvant tamoxifen efficacy in early breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9:1039-1046.

[23]Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists.

Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013 Nov 1;31(31):3997-4013. doi: 10.1200/JCO.2013.50.9984.

[24]Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer *J Clin Oncol* 2010;28:2784-2795.

[25]Van de Vijver MJ., He YD., van 't Veer LJ., et al. A Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1999-2009.

[26] Carey LA. Directed Therapy of Subtypes of Triple-Negative Breast Cancer. *Oncologist* 2010;15:49-56.

[27]Prat A, Parker JS, Karginova O, Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer.*Breast Cancer Res*. 2010;12R68.

[28] Gnant M, Harbeck N, Thomssen C. St. Gallen 2011: Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care*. 2011;6(2):136-141..

[29] Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of Oncology*. 2013;24(9):2206-2223.

[30] Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *Clin Oncol* 2010;28:3271-3277.

- [31]Sparano JA, Paik S. Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol* 2008; 26: 721-728.
- [32]Cardoso F, Van't Veer L, Rutgers E et al. Clinical application of the 70 gene-profile: the MINDACT trial. *J Clin Oncol* 2008; 26:729-735.
- [33]Nakopoulou L, Panayotopoulou EG, Giannopoulou I, et al. Extra copies of chromosomes 16 and X in invasive breast carcinomas are related to aggressive phenotype and poor prognosis. *Journal of Clinical Pathology*. 2007;60(7):808-815.
- [34]Harlan LC, Zujewski JA, Goodman MT, Stevens JL. Breast Cancer in Men in the US: A population-based study of diagnosis, treatment and survival. *Cancer*. 2010;116(15):3558-3568.
- [35]Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(11):3155-3163.
- [36]Schottenfeld D, Lilienfeld AM, Diamond H. Some Observations on the Epidemiology of Breast Cancer Among Males. *American Journal of Public Health and the Nations Health*. 1963;53(6):890-897.
- [37]Poortmans Ph. Evidence based radiation oncology: Breast Cancer. *Radiotherapy and Oncology* 2007; 84: 84-101.
- [38]Fisher B, Anderson S, Bryant J et al: Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347(16): 1233-41.
- [39]Morrow M, White J, Moughan J et al: Factors predicting the use of breast conserving therapy in stage I and II breast carcinoma. *J Clin Oncol* 2001; 19(8):

2254-62.

[40] Whelan T, Mackenzie et al: Randomized trial of breast irradiation schedules after lumpectomy for women with lymphonode negative breast cancer. J of National cancer Instiute, Vol.94 N° 15, 1143-1150, August 7, 2002.

[41]Veronesi U, Cascinelli N et al.: Twenty follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. N Engj J Med. 2002; 347(16): 1227-32.

Capitolo 2: Eterogeneità Genetica di Her2 e suo impatto sull'andamento della malattia neoplastica mammaria

- [1] Polyak K: Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest* 2007,117:3155-3163.
- [2] Van de Vijver MJ., He YD., van 't Veer LJ., et al. A Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1999-2009.
- [3] Rosen PP: The pathological classification of human mammary carcinoma: past, present and future. *Ann Clin Lab Sci* 1979, 9: 144-156.
- [4] van Bogaert LJ: Recent progress in the histological typing of human breast tumours. *Diagn Histopathol* 1981, 4:349-353.
- [5] Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012, 490:61-70.
- [6] Ellis MJ, Perou CM: The genomic landscape of breast cancer as a therapeutic roadmap. *Cancer Discov* 2013, 3:27-34.
- [7] Prat A, Ellis MJ, Perou CM: Practical implications of geneexpression-based assays for breast oncologists. *Nat Rev Clin Oncol* 2012, 9:48-57.
- [8] Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000, 406:747-752.

- [9] Mukai H: Treatment strategy for HER2-positive breast cancer. *Int J Clin Oncol* 2010, 15:335-340.
- [10] Prat A, Parker JS, Fan C, Cheang MC, Miller LD, Bergh J, Chia SK, Bernard PS, Nielsen TO, Ellis MJ, Carey LA, Perou CM: Concordance among gene expression-based predictors for ER-positive breast cancer treated with adjuvant tamoxifen. *Ann Oncol* 2012, 23: 2866-2873.
- [11] Real FX, Rettig WJ, Chesa PG, Melamed MR, Old LJ, Mendelsohn J. Expression of epidermal growth factor receptor in human cultured cells and tissues: relationship to cell lineage and stage of differentiation. *Cancer Res* 1986;46:4726–4731.
- [12] Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. Expression of the HER-2/neu protooncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 1990;5:953–962.
- [13] Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z, et al. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 1995;337:341.
- [14] Lee KF, Simon H, Chen H, Bates B, Hung MC, Hauser C. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 1995;378:394–398.
- [15] Sibilina M, Steinbach JP, Stingl L, Aguzzi A, Wagner EF. A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *EMBO J* 1998;17:719–731.

- [16] Andrechek ER, Hardy WR, Siegel PM, Rudnicki MA, Cardiff RD, Muller WJ. Amplification of the neu/erbB-2 oncogene in a mouse model of mammary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3444–3449.
- [17] Shih C, Padhy LC, Murray M, Weinberg RA. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature*. 1981 Mar 19;290(5803):261-4.
- [18] Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*. 1985 Dec 6;230(4730):1132-9.
- [19] Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177–182.
- [20] McKenzie, S. J., Marks, P. J., Lam. T., Morgan, J., Paniccoli, D. L., Trimpe, K. L., and Carney, W. P. Generation and characterization of monoclonal antibodies specific for the human neu oncogene product, p185. *Oncogene*, 4: 543-548, 1989.
- [21] Hudziak, R. M., Lewis. G. D., Winget. M., Fendly, B. M., Shepard, H. M., and Ullrich, A. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro, and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol. Cell. Biol.*, 9: 1165-1172, 1989.
- [22] Hancock, M. C., Langton, B. C., Chan. T., Toy, P., Monahan, J. J., Mischak, R. P., and Shawver, L. K. A monoclonal antibody against the c-erbB-2

- protein enhances the cytotoxicity of ds-diamminedichloroplatinum against human breast and ovarian tumor cell lines. *Cancer Res.* 51: 4575-4580, 1991.
- [23] Stancovski. L, Hurwitz. E., Leitner. D., Ullrich. A., Yarden. Y., and Sela. M. Mechanistic aspects of the opposing effects of monoclonal antibodies to the erbB-2 receptor on tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 8691-8695, 1991.
- [24] Lewis, G. D., Figari, I., Fendly, B., Wong, W. L., Carter, P., Gorman, C., and Shepard, H. M. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunol. Immunother.*, 37: 255-263, 1993.
- [25] Carter, P., Presta, L., Gorman, C. M., Ridgway, J. B., Henner, D., Wong, W. L., Rowland, A. M., Kotts, C., Carver, M. E., and Shepard, H. M. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285-4289, 1992.
- [26] Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res.* 1998 Jul 1;58(13):2825-31.
- [27] Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001 Mar 15;344(11):783-92.

- [28] Press MF, Pike MC, Chazin VR, et al. Her-2/neu expression in node-negative breast cancer: direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Res* 1993;53:4960–4970.
- [29] Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, et al. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol* 1989;7:1120–1128.
- [30] Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1673–1684.
- [31] Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:719–726.
- [32] Madarnas Y, Trudeau M, Franek JA, et al. Adjuvant/ neoadjuvant trastuzumab therapy in women with HER-2/neu-overexpressing breast cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev* 2008;34:539–557.
- [33] Gong Y, Booser DJ, Sneige N. Comparison of HER-2 status determined by fluorescence in situ hybridization in primary and metastatic breast carcinoma. *Cancer* 2005;103:1763–1769.
- [34] Tanner M, Jarvinen P, Isola J. Amplification of HER-2/ neu and topoisomerase II alpha in primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res* 2001;61: 5345–5348.
- [35] Gancberg D, Di Leo A, Cardoso F, et al. Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Ann Oncol* 2002;13:1036–1043.

- [36] Fabi A, Di Benedetto A, Metro G, et al. HER2 protein and gene variation between primary and metastatic breast cancer: significance and impact on patient care. *Clin Cancer Res* 2011;17:2055–2064.
- [37] Meng S, Tripathy D, Shete S, et al. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:9393–9398.
- [38] Regitnig P, Schippinger W, Lindbauer M, et al. Change of HER-2/neu status in a subset of distant metastases from breast carcinomas. *J Pathol* 2004;203:918–926.
- [39] Lower EE, Glass E, Blau R, et al. HER-2/neu expression in primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009;113:301–306.
- [40] Hanna W, Nofech-Mozes S, Kahn HJ. Intratumoral heterogeneity of HER2/neu in breast cancer—a rare event. *Breast J* 2007;13:122–129.
- [41] Andersson J, Linderholm B, Bergh J, et al. HER-2/neu (c-erbB-2) evaluation in primary breast carcinoma by fluorescent in situ hybridization and immunohistochemistry with special focus on intratumor heterogeneity and comparison of invasive and in situ components. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004;12:14–20.
- [42] Glockner S, Buurman H, Kleeberger W, et al. Marked intratumoral heterogeneity of c-myc and cyclin D1 but not of c-erbB2 amplification in breast cancer. *Lab Invest* 2002;82:1419–1426.

- [43] Brunelli M, Manfrin E, Martignoni G, et al. Genotypic intratumoral heterogeneity in breast carcinoma with HER2/neu amplification: evaluation according to ASCO/CAP criteria. *Am J Clin Pathol* 2009;131: 678–682.
- [44] Shin SJ, Hyjek E, Early E, et al. Intratumoral heterogeneity of her-2/neu in invasive mammary carcinomas using fluorescence in-situ hybridization and tissue microarray. *Int J Surg Pathol* 2006;14:279–284.
- [45] Baselga J, Cortés J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, Roman L, Pedrini JL, Pienkowski T, Knott A, Clark E, Benyunes MC, Ross G, Swain SM; CLEOPATRA Study Group. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2012 Jan 12;366(2):109-19.
- [46] Blackwell KL, Burstein HJ, Storniolo AM, Rugo H, Sledge G, Koehler M, Ellis C, Casey M, Vukelja S, Bischoff J, Baselga J, O'Shaughnessy J. Randomized study of Lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer *J Clin Oncol*. 2010 Mar 1;28(7):1124-30.
- [47] Andersson M, Lidbrink E, Bjerre K, Wist E, Enevoldsen K, Jensen AB, Karlsson P, Tange UB, Sørensen PG, Møller S, Bergh J, Langkjer ST. Phase III randomized study comparing docetaxel plus trastuzumab with vinorelbine plus trastuzumab as first-line therapy of metastatic or locally advanced human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: the HERNATA study. *J Clin Oncol*. 2011 Jan 20;29(3):264-71.
- [48] Valero V, Forbes J, Pegram MD, Pienkowski T, Eiermann W, von Minckwitz G, Roche H, Martin M, Crown J, Mackey JR, Fumoleau P, Rolski J, Mrcic-Krmpotic Z, Jagiello-Gruszfeld A, Riva A, Buyse M, Taupin H,

- Sauter G, Press MF, Slamon DJ. Multicenter phase III randomized trial comparing docetaxel and trastuzumab with docetaxel, carboplatin, and trastuzumab as first-line chemotherapy for patients with HER2-gene-amplified metastatic breast cancer (BCIRG 007 study): two highly active therapeutic regimens. *J Clin Oncol*. 2011 Jan 10;29(2):149-56.
- [49] Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001 Mar 15;344(11):783-92.
- [50] Robert N, Leyland-Jones B, Asmar L, Belt R, Ilegbodu D, Loesch D, Raju R, Valentine E, Sayre R, Cobleigh M, Albain K, McCullough C, Fuchs L, Slamon D. Randomized phase III study of trastuzumab, paclitaxel, and carboplatin compared with trastuzumab and paclitaxel in women with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Jun 20;24(18):2786-92.
- [51] Tripathy D, Slamon DJ, Cobleigh M, Arnold A, Saleh M, Mortimer JE, Murphy M, Stewart SJ. Safety of treatment of metastatic breast cancer with trastuzumab beyond disease progression. *J Clin Oncol*. 2004 Mar 15;22(6):1063-70.
- [52] Seidman AD, Berry D, Cirrincione C, Harris L, Muss H, Marcom PK, Gipson G, Burstein H, Lake D, Shapiro CL, Ungaro P, Norton L, Winer E, Hudis C. Randomized phase III trial of weekly compared with every-3-weeks paclitaxel for metastatic breast cancer, with trastuzumab for all HER-2 overexpressors and random assignment to trastuzumab or not in HER-2

- nonoverexpressors: final results of Cancer and Leukemia Group B protocol 9840. *J Clin Oncol*. 2008 Apr 1;26(10):1642-9.
- [53] Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:118–145.
- [54] Vance GH, Barry TS, Bloom KJ, et al. Genetic heterogeneity in HER2 testing in breast cancer: panel summary and guidelines. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133:611–612.
- [55] Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013 Nov 1;31(31):3997-4013. doi: 10.1200/JCO.2013.50.9984.
- [56] Bernasconi B, Chiaravalli AM, Finzi G, et al. Genetic heterogeneity in HER2 testing may influence therapy eligibility. *Breast Cancer Res Treat* 2012;133:161–168.
- [57] Lakhani S, Ellis IO, Schnitt SJ et al, editors. WHO classification of tumour of the breast, 4th edition. IARC: Lyon 2012.
- [58] Graziano F, Galluccio N, Lorenzini P, Ruzzo A, Canestrari E, D'Emidio S,

Catalano V, Sisti V, Ligorio C, Andreoni F, Rulli E, Di Oto E, Fiorentini G, Zingaretti C, De Nictolis M, Cappuzzo F, Magnani M, Genetic activation of the MET pathway and prognosis of patients with high-risk, radically resected gastric cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29,(36), 4789-95,

- [59] Jackson AL, Loeb LA. The mutation rate and cancer. *Genetics* 1998;148:1483–1490.
- [60] Hanna WM, Rüschoff J, Bilous M, Coudry RA, Dowsett M, Osamura RY, Penault-Llorca F, van de Vijver M, Viale G. HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. *Mod Pathol.* 2014 Jan;27(1):4-18.
- [61] Seol H, Lee HJ, Choi Y, Lee HE, Kim YJ, Kim JH, Kang E, Kim SW, Park SY. Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance. *Mod Pathol.* 2012 Jul;25(7):938-48.
- [62] Lee HJ, Kim JY, Park SY, Park IA, Song IH, Yu JH, Ahn JH, Gong G. Clinicopathologic Significance of the Intratumoral Heterogeneity of HER2 Gene Amplification in HER2-Positive Breast Cancer Patients Treated With Adjuvant Trastuzumab. *Am J Clin Pathol* October 2015;144:570-578.
- [63] Shafi H, Astvatsaturyan K, Chung F, et al. J Clinicopathological significance of HER2/neu genetic heterogeneity in HER2/neu non-amplified invasive breast carcinomas and its concurrent axillary metastasis. *Clin Pathol* 2013;66:649–654.

Capitolo 3: Carcinoma della mammella maschile: valutazione delle aneusomie a carico del cromosoma X.

[1]Nakopoulou L, Panayotopoulou EG, Giannopoulou I, et al. Extra copies of chromosomes 16 and X in invasive breast carcinomas are related to aggressive phenotype and poor prognosis. *Journal of Clinical Pathology*. 2007;60(7):808-815.

[2]Harlan LC, Zujewski JA, Goodman MT, Stevens JL. Breast Cancer in Men in the US: A population-based study of diagnosis, treatment and survival. *Cancer*. 2010;116(15):3558-3568.

[3]Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(11):3155-3163.

[4]Schottenfeld D, Lilienfeld AM, Diamond H. Some Observations on the Epidemiology of Breast Cancer Among Males. *American Journal of Public Health and the Nations Health*. 1963;53(6):890-897.

[5]Jackson AW, Muldal S, Ockey CH, O'connor PJ; Carcinoma of Male Breast in Association with the Klinefelter Syndrome, *Brit. med. J.*, 1965; 1: 223-225.

[6]Röpke, A, Erbersdobler, A, Hammerer, P, Palisaar, J, John, K, Stumm, M and Wieacker, P, Gain of androgen receptor gene copies in primary prostate cancer due to X chromosome polysomy. *Prostate*, 2004; 59: 59–68.

[7]Lakhani SR et al. WHO classification of tumours of the breast , World Health Organization classification of tumours (4th ed.) IARC press: Lyon 2012 ISBN 9789283224334.

[8]Tavassoli, F, Eusebi V. AFIP Atlas of Tumor Pathology Series 4, Fascicle 10:

Tumors of the Mammary Gland. ARP Press, Silver Spring, Maryland, 2009. ISBN: 9781933477053.

[9]Eslton CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;(5), 403-10.

[10]Graziano F, Galluccio N, Lorenzini P, Ruzzo A, Canestrari E, D'Emidio S, Catalano V, Sisti V, Ligorio C, Andreoni F, Rulli E, Di Oto E, Fiorentini G, Zingaretti C, De Nictolis M, Cappuzzo F, Magnani M, Genetic activation of the MET pathway and prognosis of patients with high-risk, radically resected gastric cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29,(36), 4789-95,

[11]Koivisto P, Kononen J, Palmberg J, Tammela T, Hyytinen E, Isola J, Trapman J, Cleutjens K, Noordzij A, Visakorpi T, and. Kallioniemi OP, Androgen Receptor Gene Amplification: A Possible Molecular Mechanism for Androgen Deprivation Therapy Failure in Prostate Cancer, *Cancer Research* 1997; 57, 314-319.

[12]Nieschlag E. Klinefelter Syndrome The Commonest Form of Hypogonadism, but Often Overlooked or Untreated. *Dtsch Arztebl Int*. 2013; 110(20): 347–53.

[13] Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013 Nov 1;31(31):3997-4013. doi: 10.1200/JCO.2013.50.9984. Epub 2013 Oct 7.

[14] Safarpour D, Pakneshan S, Tavassoli F, Androgen receptor (AR) expression in 400 breast carcinomas: is routine AR assessment justified? *Am J Cancer Res.* 2014; 4(4): 353–368.

[15] Ottesen AM, Garn ID, Aksglaede L, et al. A simple screening method for detection of Klinefelter syndrome and other X-chromosome aneuploidies based on copy number of the androgen receptor gene. *Mol Hum Reprod.* 2007; (10):745-50.

[16] Wilson EM. Androgen receptor molecular biology and potential targets in prostate cancer. *Ther Adv Urol* 2010; 2: 105-117.

[17] Lin IH, Chen DT, Chang YF, Lee YL, Su CH, Cheng C, Tsai YC, Ng SC, Chen HT, Lee MC, Chen HW, Suen SH, Chen YC, Liu TT, Chang CH, Hsu MT. Hierarchical Clustering of Breast Cancer Methylomes Revealed Differentially Methylated and Expressed Breast Cancer Genes. *PLoS One.* 2015; 10(2): e0118453.

[18] Muñoz-Rodríguez JL, Vrba L, Futscher BW, et al. Differentially Expressed MicroRNAs in Postpartum Breast Cancer in Hispanic Women. *PLoS ONE* 2015; 10(4): e0124340.

[19] Di Oto E, Monti V, Cucchi MC, Masetti R, Varga Z, Foschini MP. X Chromosome Gain In Male Breast Cancer. *Hum Pathol.* 2015 Dec;46(12):1908-12. doi: 10.1016/j.humpath.2015.08.008. Epub 2015 Sep 3. (IF 2.769)

Capitolo 4: Valutazione comparativa dell'analisi dell'espressione e dell'assetto genico di Her2 tramite IHC e FISH e la nuova doppia colorazione IHC-SISH.

[1] Key TJ, Verkasalo PK . Epidemiology of breast cancer, *Lancet Oncol* 2001; (2):133-140.

[2] Jemal A, Murray T, Ward E. et Al. Cancer Statistics 2005 . *CA Cancer J Clin* 2005; (55) :10-30.

[3] Hyesil S, Hyun Ju L, Yoomi C et Al., Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance, *Modern Pathology* 2012; (25): 938–948.

[4] Varga Z, Tubb RR, Moch H, Concomitant Detection of HER2 Protein and Gene Alterations by Immunohistochemistry (IHC) and Silver Enhanced In Situ Hybridization (SISH) Identifies HER2 Positive Breast Cancer with and without Gene Amplification, *Plos One* 2014; 9 (8): e105961. doi: 10.1371/journal.pone.0105961.

[5] Chenard MP, Wissler MP, Weingertner N, Mathelin C, Bellocq JP. HER2 gene and protein expression status of breast carcinoma can be reliably tested on a single slide. *Virchows Arch* 2015,(467):169–175.

[6] Wolff A, Hammond EH, Schwartz J, et Al. American Society of Clinical Oncology-College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer, *JCO* 2008; (25): 118-145.

[7]Hee Jin L, An Na S, Eun Joo K, et Al. HER2 Heterogeneity Affects Trastuzumab Responses and Survival in Patients With HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Am J Clin Pathol* December 2014; (142):755-766.

[8]Hanna WM, Ruschoff J, Bilous M, et Al. HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity, *Modern Pathology* 2014; (27): 4–18.

[9] Wolff A, Hammond EH, Hicks DG, et Al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *JCO* 2013; (31): 3997-4013.

[10]Graziano F, Galluccio N, Lorenzini P, Ruzzo A, Canestrari E, D'Emidio S, Catalano V, Sisti V, Ligorio C, Andreoni F, Rulli E, Di Oto E, Fiorentini G, Zingaretti C, De Nictolis M, Cappuzzo F, Magnani M, Genetic activation of the MET pathway and prognosis of patients with high-risk, radically resected gastric cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29,(36), 4789-95.

[11] Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S et Al, Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 2001; 344 (15): 783-92

[12] Dietel M, Ellis IO, Höfler H et Al. Comparison of automated Silver enhanced in situ hybridization (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologist (ASCO/CAP). *Virchows Arch* 2007;451(1):19-25.

Capitolo 5: Messa a punto e validazione di una metodica rapida per la diagnosi FISH

[1]Chen H., Pimienta G., Gu. Y., Sun X, Hu J., Kim M-S.,Chaerkady R., Gucek M., Cole R.N., Sukumnar S. and Pandey A., “Proteomic characterization of Her2/neu – overexpressing breast cancer cells”. *Proteomics* Vol 10 pp.3800-3810.

[2]Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL, “Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene”. *Science*, vol. 235, no. 9, pp. 177-82, 1987.

[3]Sapino A, Margherita Goia, Daniele Recupero and Caterina Marchiò, “Current challenges for HER2 testing in diagnostic pathology: state of the art and controversial issues”. *Frontiers in oncology*, vol. 21,no.3, pp. 1-9, 2013.

[4]Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L, “Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2”. *N Engl J Med*, vol. 344, no.15, pp. 783-92, 2001.

[5]Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF, “American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update”. *J Clin Oncol*. vol.31, no.31, pp. 3997-4013, 2013.

[6]Hanna WM, Rüschoff J, Bilous M, Coudry RA, Dowsett M, Osamura RY, Penault-Llorca F, van de Vijver M, Viale G, “HER2 in situ hybridization in breast

cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity”. *Mod Pathol*, vol. 27, no.1, pp.4-18, 2014.

[7]Rosa F.E., Santos R.M., Rogatto S.R. and Domingues M.A.C. ”Chromogenic in situ hybridization compared with other approaches to evaluate HER2/neu status in breast carcinomas”. *Brazilian Journal of Medical and Biomedical Research* no 46, pp 207-216, 2013.

[8] Lim S-J, Cantillep A, Carpenter P.M., “Validation and workflow optimization of human epidermal growth factor receptor 2 testing using INFORM HER2 dual-color in situ hybridization”. *Human Pathology* no 44 pp. 2590-2596, 2013.

[9]Matthiesen Steen H, Charles M. Hansen, “Fast and Non-Toxic In Situ Hybridization without Blocking of Repetitive Sequences”. *Plos One*, vol.7, no.7, 2012.

[10]Smith JS, Perry A, Borell TJ, Lee HK, O'Fallon J, Hosek SM, Kimmel D, Yates A, Burger PC, Scheithauer BW, Jenkins RB. Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *J Clin Oncol*. 2000 Feb;18(3):636-45.

[11]Camidge DR, Kono SA, Flacco A, et al. Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. *Clin Cancer Res*. 2010;16(22):5581-5590.

Ringraziamenti

Questa tesi è il frutto non solo del mio lavoro ma anche di chi a casa mi supporta (e sopporta) quotidianamente, in particolare la mia compagna Patrizia e la nostra bambina Elettra.

“Ogni uomo può scegliere. Io scelgo l'impossibile”

Andrew Ryan.