



# UNIVERSITÀ DI PISA

**DIPARTIMENTO DI RICERCA TRASLAZIONALE E  
DELLE NUOVE TECNOLOGIE IN MEDICINA E CHIRURGIA**

**Corso di Laurea Specialistica in Medicina e Chirurgia**

**Tesi di Laurea**

**VALUTAZIONE RETROSPETTIVA DELLA ETEROGENEITÀ DI  
ESPRESSIONE DI ER, PgR E HER2 TRA NEOPLASIA PRIMITIVA E  
METASTATICA IN PAZIENTI CON DIAGNOSI DI CARCINOMA  
MAMMARIO IN STADIO AVANZATO: RILEVANZA DEL FENOMENO E  
POSSIBILI IMPLICAZIONI TERAPEUTICHE.**

**Relatore:**

**Chiar.mo Prof. Alfredo Falcone**

**Candidato:**

**Sara Cecconi**

**Anno Accademico 2015-2016**

*Ai miei cari*

## INDICE DEI CONTENUTI

INDICE DEI CONTENUTI.....	2
RIASSUNTO.....	4
1. INTRODUZIONE.....	7
1.1. Epidemiologia.....	7
1.2. Fattori di rischio e screening.....	7
1.3. Classificazione molecolare.....	9
1.4. Valutazione dello stato di HER2.....	10
1.5. Gene HER2/neu/c-erbB-2 e recettore Her-2.....	11
1.6. Farmaci anti Her-2.....	13
2. TRATTAMENTO DELLA MALATTIA METASTATICA E, IN PARTICOLARE, DI QUELLA HER2 POSITIVA.....	14
2.1. Cenni di trattamento della malattia metastatica.....	14
2.2. Terapia della malattia metastatica HER2 positiva.....	15
3. VARIABILITÀ DELL'ASSETTO RECETTORIALE TRA NEOPLASIA PRIMITIVA E LESIONI METASTATICHE: IMPORTANZA CLINICA, VALORE PROGNOSTICO E IMPLICAZIONI TERAPEUTICHE.....	24
3.1. Frequenza di discordanza nell'espressione dei recettori ormonali (ER e PgR) e di HER2.....	25
3.2. Discordanza nell'espressione dei recettori ormonali e di HER2 tra più siti di recidiva.....	30
3.3. Variazione di espressione di ER, PgR e HER2 e prognosi.....	32
3.4. Variazione di espressione di ER, PgR e HER2 e effetti sulla gestione della terapia.....	34
4. RAZIONALE.....	40
5. OBIETTIVI.....	41
6. PAZIENTI E METODI.....	42
6.1. Criteri di inclusione.....	42
6.2. Metodi di ricerca e di valutazione.....	43
7. RISULTATI.....	46

7.1. Caratteristiche dei pazienti.....	46
7.2. Fattibilità della biopsia/chirurgia sulla metastasi.....	47
7.3. Confronto tra lo status recettoriale dei tumori primitivi e corrispondenti recidive.....	48
7.3.1 Variazione di espressione di ER.....	49
7.3.2 Variazione di espressione di PgR.....	51
7.3.3 Variazione di espressione di HER2.....	53
7.4. Risposta a terapie contenenti farmaci anti Her-2.....	55
7.4.1 Prima terapia medica anti Her-2 eseguita dopo la biopsia.....	55
7.4.2 Seconda terapia medica anti Her-2 eseguita dopo la Biopsia.....	58
7.4.3 Terapia con T-DM1 dopo la biopsia.....	60
8. DISCUSSIONE.....	64
9. BIBLIOGRAFIA.....	70

## RIASSUNTO

Il carcinoma della mammella è, in Italia, se si escludono i carcinomi cutanei, la prima neoplasia per incidenza nel sesso femminile, oltre che la prima causa di morte per neoplasia nelle donne, nonostante il tasso di mortalità sia in costante riduzione.

Her-2 è un recettore trans membrana con attività tirosin-chinasica, appartenente a una famiglia di quattro recettori tirosin-chinasici (EGFR/Her-1, Her-2, Her-3, Her-4) coinvolti nella regolazione della crescita, della sopravvivenza e della differenziazione cellulare. Sebbene sia privo di un ligando noto, esso funge da co-recettore universale per gli altri membri della famiglia. La proteina di membrana Her-2 (Human Epidermal growth factor Receptor – 2; erbB2/neu) è iperespressa in circa il 15-20% dei carcinomi mammari, costituendo un marcatore prognostico sfavorevole e di maggiore aggressività della malattia rispetto a tumori che non esprimono tale recettore. I carcinomi con questa caratteristica molecolare hanno un comportamento mediamente più aggressivo, una peggiore prognosi e una peggiore risposta alle terapie ormonali, quando ER +, e alla chemioterapia.

Nel corso del tempo diversi farmaci mirati contro il recettore Her-2 sono stati introdotti sul mercato, rivoluzionando la prognosi del carcinoma mammario HER2 positivo. Nel setting metastatico disponiamo oggi dei seguenti farmaci:

- **Trastuzumab:** si tratta di un anticorpo monoclonale umanizzato ricombinante (mAb) specifico per il dominio extracellulare del recettore Her-2, al quale si lega prevenendo l'attivazione del recettore. [9, 10, 11]. Trastuzumab può essere utilizzato nel setting adiuvante, neoadiuvante e nella malattia metastatica
- **Pertuzumab:** è un anticorpo monoclonale umanizzato che lega il dominio extracellulare di Her-2, in un sito diverso rispetto a trastuzumab, prevenendo la dimerizzazione con altri recettori della famiglia Her.

Pertuzumab può essere impiegato nel trattamento di prima linea del carcinoma mammario HER2 positivo in associazione a Trastuzumab e Taxano o nel setting neoadiuvante in associazione a Trastuzumab e chemioterapia (farmaco approvato, ma non rimborsato dal SSN).

- **Lapatinib:** è un inibitore della tirosin-chinasi, che blocca la via di trasduzione del segnale innescata dal dominio intracellulare del recettore HER2. Lapatinib è attualmente utilizzato esclusivamente nel setting metastatico.
- **T-DM1 o Trastuzumab-emtansine:** è un anticorpo-farmaco coniugato che contiene trastuzumab, legato in modo covalente a DM1, un inibitore della polimerizzazione dei microtubuli; la presenza dell'anticorpo permette di veicolare selettivamente il chemioterapico nelle cellule con iperespressione di Her-2. T-DM1 è attualmente utilizzato nella terapia del carcinoma mammario HER2 positivo metastatico.

Circa il 7% dei carcinomi della mammella presenta metastasi sincrone, ma circa il 30% dei tumori N- e il 70% N+ alla diagnosi presenta una ripresa di malattia entro 10 anni.

Il cardine della terapia medica del tumore mammario HER2 positivo è costituito dai farmaci anti Her-2, per lo più in associazione a chemioterapici.

Alcuni studi hanno riportato la possibilità che l'espressione dei recettori ormonali e di HER2, quando questi vengano rivalutati su un campione istologico di una sede di recidiva, locoregionale o a distanza, risulti diversa rispetto a quella in origine riscontrata sul tumore primitivo. Il recettore che più frequentemente va incontro a variazione di espressione sembra essere PgR, seguito da ER e infine da HER2, il cui status è generalmente piuttosto stabile nell'evoluzione metastatica.

Alcuni studi hanno indagato il peso prognostico del viraggio nell'espressione di uno o più di questi recettori: dalla maggior parte di questi sembra emergere che la variazione di espressione di ER, PgR e HER2 nel corso della progressione di malattia influenzi negativamente la prognosi, specialmente per quanto riguarda la perdita di espressione. Tuttavia le conclusioni di alcuni studi sono in contrasto con questa ipotesi, soprattutto relativamente al ruolo di PgR e i dati ad oggi disponibili non consentono di trarre delle conclusioni definitive.

Alcuni studi hanno cercato di definire le implicazioni terapeutiche della discordanza di espressione di ER, PgR e HER2 tra primitivo e metastasi e, in particolar modo, del guadagno di iperespressione di HER2 a livello metastatico da parte di un carcinoma HER2 negativo all'esordio.

I risultati di questi studi, limitati dalle ristrette dimensioni dei campioni di pazienti inclusi e dal disegno, nella maggior parte dei casi, retrospettivo, sono frequentemente in contrasto tra loro e non conclusivi.

Non esistono, al momento, evidenze certe di una reale efficacia dei classici farmaci anti Her-2 nel trattamento del carcinoma mammario metastatico HER2 positivo con primitivo HER2 negativo.

Lo studio monocentrico che abbiamo condotto aveva come principale obiettivo quello di valutare in maniera retrospettiva il tasso di variazione intra individuale di espressione di ER, PgR e HER2 tra tumore primitivo e metastatico, in un gruppo di pazienti affetti da carcinoma mammario metastatico o localmente. Altri obiettivi erano descrivere le caratteristiche dei pazienti, valutare la fattibilità della biopsia a livello metastatico e, soprattutto, confrontare, retrospettivamente, attività ed efficacia di terapie contenenti farmaci anti Her-2, e in particolare il T-DM1, nei casi di neoplasia HER2 positiva in maniera concorde tra primitivo e metastasi e con conversione positiva dello status di HER2.

Abbiamo identificato una popolazione di 82 pazienti, il 70,7% dei quali aveva subito una biopsia o una procedura chirurgica a livello di una sede di metastasi, mentre il 29,3% aveva avuto la biopsia di una recidiva locale o regionale.

I tassi di discordanza per ER e PgR sono risultati simili a quelli riportati in letteratura, mentre il tasso di discordanza di HER2 è risultato più alto.

Al momento di confrontare attività ed efficacia delle terapie anti Her-2 nei due gruppi di pazienti metastatici HER2 positivi con o senza conversione positiva di HER2 a livello metastatico, abbiamo riscontrato un tasso di risposte obiettive più basso nel primo gruppo rispetto al secondo: 33,3% e 57,1% riguardo alla prima linea di terapia contenente agenti anti Her-2 ricevuta successivamente al momento in cui la biopsia era stata eseguita e 30,0% contro 66,7% riguardo alla seconda linea di terapia anti Her-2 dopo la biopsia. Anche la PFS mediana è stata più bassa nel gruppo con conversione positiva di HER2 rispetto all'altro.

Nel valutare attività ed efficacia di T-DM1 in questo gruppo di pazienti, abbiamo riscontrato un basso tasso di risposte obiettive (10,0%) e una preponderanza di

casi di progressione di malattia. Inoltre la PFS mediana è stata molto ridotta (3,0 mesi). Entrambi i valori erano più bassi rispetto a quelli riscontrati nel gruppo di pazienti con malattia HER2 positiva in modo concorde tra primitivo e metastasi e rispetto a quelli riportati dagli autori degli studi EMILIA e TH3RESA, i due studi cardine su questo farmaco.

Il nostro studio presenta alcuni limiti, derivanti dall'essere stato condotto su una casistica retrospettiva e su un numero non elevato di casi e dall'aver omesso di ritestare tutti i campioni istologici per l'espressione di ER, PgR e HER2.

Nonostante questo riteniamo di aver prodotto dei risultati importanti, anche se non definitivi e abbiamo intenzione di proseguire lo studio ampliando la casistica, grazie anche alla collaborazione di altri centri universitari.

## **1. INTRODUZIONE**

### **1.1. Epidemiologia**

Il carcinoma della mammella è una delle neoplasie più frequenti nei paesi economicamente avanzati. In Italia, se si escludono i carcinomi cutanei, rappresenta la prima neoplasia per incidenza nel sesso femminile (il 29% delle neoplasie maligne), sia nella fascia d'età 0-49 anni (41%), che in quella 50-69 anni (35%), che in quella di settanta anni e oltre (21%). Nonostante il carcinoma mammario costituisca la prima causa di morte per neoplasia nelle donne (il 17%), il tasso di mortalità è in costante riduzione dalla fine degli anni novanta, grazie alla diffusione delle metodiche di screening e al miglioramento delle strategie terapeutiche disponibili. Attualmente il tasso di sopravvivenza a 5 anni è dell'85,5%. [1]

### **1.2. Fattori di rischio e screening**

Il rischio di sviluppare un carcinoma mammario aumenta con l'aumentare dell'età, raggiungendo un picco massimo di incidenza nella fascia 50-69 anni (5,4%). Altri fattori di rischio, oltre all'invecchiamento, sono:

- lunga durata del periodo fertile: menarca precoce e/o menopausa tardiva, per la maggiore esposizione dei lobuli mammari alle cicliche modificazioni ormonali caratteristiche di questa fase della vita femminile;

- nulliparità, prima gravidanza a termine in età superiore a trenta anni e mancato allattamento al seno;
- terapia ormonale sostitutiva nel climaterio e/o pillola contraccettiva estroprogestinica;
- eccessiva assunzione di alcool, dieta ricca in grassi animali e povera in fibre, vitamine e oligoelementi;
- vita sedentaria, obesità e sindrome metabolica;
- precedente radioterapia a livello toracico;
- anamnesi di displasia o neoplasia mammaria;
- familiarità ed ereditarietà: circa il 7% dei carcinomi mammari riconosce una predisposizione ereditaria.

L'utilizzo della mammografia come metodica di screening permette un'identificazione precoce di nuovi casi di carcinoma mammario, con un conseguente impatto positivo sulla prognosi. Nel nostro paese l'indicazione allo screening mammografico è strutturata come segue:

- Rx-mammografia a cadenza biennale raccomandata per tutte le donne tra i 50 e i 69 anni d'età;
- Rx-mammografia con cadenza variabile a seconda dei fattori di rischio individuali per le donne tra i 40 e i 49 anni;

Non ci sono prove di efficacia circa l'utilizzo della mammografia di screening in donne dai 70 anni in poi.

La risonanza magnetica nucleare non è indicata nello screening della popolazione generale, tuttavia essa trova applicazione in situazioni selezionate:

- pazienti ad alto rischio (importante storia familiare di carcinoma mammario, mutazione accertata di BRCA 1-2, lifetime risk di malattia del 20-25% secondo i comuni modelli di calcolo del rischio, sindrome di Cowden, sindrome di Li-Fraumeni, sindrome di Bannayan-Riley-Ruvalcaba, storia di radioterapia sul torace all'età di 10-30 anni)
- pazienti a rischio moderato (lifetime risk del 15-20%, anamnesi personale positiva per carcinoma duttale o lobulare in situ, iperplasia duttale o lobulare atipica, mammelle particolarmente dense)

### 1.3. Classificazione molecolare

[3][4] Il carcinoma della mammella è una malattia eterogenea e tumori apparentemente simili possono presentare un decorso clinico diverso. Nella pratica clinica, la valutazione immunohistochimica dello stato dei recettori ormonali, del Ki67 e di HER2, permette di identificare alcuni sottogruppi fenotipici di carcinoma mammario (luminali A, luminali B/HER2 negativi, luminali B/HER2 positivi, HER2 positivi non luminali, tripli negativi). Tali sottogruppi hanno rilevanza clinica e implicazioni terapeutiche importanti, ad esempio a livello di terapia adiuvante. Dal 2000 con il lavoro di Perou, tuttavia, studi di biologia molecolare basati sull'analisi dell'espressione genica hanno rivelato una maggiore complessità all'interno dei profili tumorali. Si sono così identificati almeno quattro sottotipi molecolari intrinseci:

- “Luminal A”: neoplasie con espressione dei recettori ormonali, a prognosi favorevole;
- “Luminal B”: neoplasie che, pur possedendo l'espressione dei recettori ormonali, hanno un rischio di recidiva elevato, a causa dell'elevato indice proliferativo correlato ad alta espressione dei geni di proliferazione;
- “HER2-enriched (HER2-E)”: presenza di espressione di HER2;
- “Basal like”: neoplasie caratterizzate dalla assenza di espressione dei recettori ormonali e di HER2 e da una aumentata espressione delle citocheratine (mioepiteliali) basali (CK5/6 e CK 17).

A causa della eterogeneità biologica del carcinoma HER2+, nella pratica clinica, il sottotipo *HER2-enriched (HER2-E)* è stato ulteriormente diviso nella categoria “Luminal B/HER2 positivo” (se recettori ormonali positivi) e nella categoria “HER2+” (se recettori ormonali negativi). La corrispondenza fra i sottotipi basati sull'espressione genica e quelli ottenuti nella pratica clinica tramite la valutazione immunohistochimica, tuttavia, non è sempre completa. Ad esempio, dal 30% al 50% dei tumori che risultano HER2-enriched all'analisi del profilo molecolare (ottenuta con lo studio dei microarray PAM50), sono clinicamente HER2 negativi se analizzati solo con IHC, FISH o entrambe.

Anche a causa di questa eterogeneità, non tutti i pazienti beneficiano allo stesso modo della terapia anti-HER2. Dati recenti mostrano che quella percentuale di tumori HER2+ che risulta HER2-enriched presenta una maggiore attivazione del pathway HER2/EGFR, suggerendo quindi che possa beneficiare maggiormente della terapia anti-HER2. Ulteriori studi saranno invece necessari per valutare l'efficacia delle terapie anti-HER2 nella popolazione di tumori HER2-negativi/HER2-E.

#### **1.4. Valutazione dello stato di Her-2**

Her-2 deve essere valutato sul tessuto neoplastico in tutti i pazienti che ricevono una nuova diagnosi di carcinoma e, se possibile, sul tessuto delle eventuali metastasi. Le metodiche utilizzabili sono l'immunoistochimica e le tecniche di ibridizzazione in situ come la FISH (Fluorescent In Situ Hybridization). Secondo le raccomandazioni ASCO-CAP 2013 [5] si definisce:

- Test positivo
  - ✓ immunoistochimica: punteggio di 3+, definito come “colorazione completa, intensa e circonferenziale di una popolazione contigua e omogenea di almeno il 10% delle cellule
  - ✓ ibridizzazione in situ: con sonda singola media di copie di  $HER2 \geq 6$ ; con sonda doppia rapporto  $HER2/CEP17 \geq 2$  e media di copie di  $HER2 \geq 4$  o  $< 4$ , oppure rapporto  $HER2/CEP17 < 2$  e media di copie di  $HER2 \geq 6$
- Test negativo
  - ✓ immunoistochimica: punteggio di 0, definito come “assenza di colorazione o colorazione incompleta di membrana debole/appena percettibile in  $< 10\%$  delle cellule di carcinoma invasivo” o 1+, definito come “colorazione incompleta di membrana, debole/appena percettibile in  $> 10\%$  delle cellule di carcinoma invasivo”
  - ✓ ibridizzazione in situ: con sonda singola media di copie di  $HER2 < 4$ ; con sonda doppia rapporto  $HER2/CEP17 < 2$  e media di copie di  $HER2 < 4$
- Test equivoco
  - ✓ immunoistochimica: punteggio di 2+, definito come “colorazione

circonfrenziale di membrana incompleta e/o debole/moderata e >10% delle cellule, o completa, intensa e circonfrenziale in  $\leq 10\%$  iperespressa delle cellule di carcinoma invasivo”

- ✓ ibridizzazione in situ: con sonda singola media di copie di HER2 $\geq 4$  e <6; con sonda doppia rapporto HER2/CEP17<2 e media di copie di HER2 $\geq 4$  e <6

In caso di risultato equivoco all'immunoistochimica, la presenza di amplificazione del gene HER2 deve essere dimostrata con una tecnica di ibridizzazione in situ.

- Test Indeterminato: categoria assente nelle precedenti raccomandazioni, il cui impiego deve essere riservato a quelle rare situazioni in cui per ragioni tecniche uno o entrambi i test (IHC e ISH), non possono essere classificati come positivo /negativo/equivoco.

### **1.5. Gene HER2/neu/c-erbB-2 e recettore Her-2**

Her-2 è un recettore trans membrana con attività tirosin-chinasica privo di un ligando noto, identificata per la prima volta nel glioblastoma del ratto. Essa appartiene a una famiglia di quattro recettori tirosin-chinasici (EGFR/Her-1, Her-2, Her-3, Her-4) che sono coinvolti nella regolazione della crescita, della sopravvivenza e della differenziazione cellulare grazie a un sistema di trasmissione del segnale interconnesso che prevede l'attivazione della via metabolica PI3K/Akt e di Ras/Raf/MEK/MAPK. Sebbene Her-2 venga considerato un recettore orfano (cioè sia privo di un'attività ligand binding), esso ha una funzione chiave in qualità di co-recettore universale per gli altri membri della famiglia HER (in particolare, anche se viene riconosciuto un possibile ruolo dell'omodimero Her-2, l'unità critica per il segnale oncogenetico sembra essere Her-2/Her-3). Gli studi hanno infatti rivelato che Her-2 si trova sempre in una conformazione attiva pronto ad interagire con gli altri recettori, generando un eterodimero. La dimerizzazione provoca a sua volta l'autofosforilazione del residuo di tirosina nel dominio citoplasmatico dei recettori e dà l'avvio alla trasduzione del segnale. Secondo gli studi, sarebbe l'iperespressione di Her-2 sulla membrana cellulare a stimolare la fosforilazione costitutiva di Her-2 e la conseguente attivazione della catena di trasmissione, che induce la crescita del tumore.

La proteina di membrana Her-2 (Human Epidermal growth factor Receptor – 2; erbB2/neu) è iperespressa in circa il 15-20% dei carcinomi mammari, determinando conseguenti implicazioni prognostiche e terapeutiche. L'iperpressione/amplificazione del gene HER-2 è stata originariamente identificata come un marcatore prognostico sfavorevole e di maggiore aggressività della malattia rispetto a tumori che non esprimono tale recettore, indipendentemente dallo stato linfonodale. Inoltre i carcinomi con questa caratteristica molecolare tendono ad avere un comportamento più aggressivo, una peggiore prognosi e una peggiore risposta alle terapie ormonali, quando ER +, e alla chemioterapia. [6][7]

Uno studio condotto da Dawood S. e altri autori [8] ha paragonato la sopravvivenza di donne affette da carcinoma mammario HER2/neu negativo e HER2/neu positivo e l'influenza del trattamento con trastuzumab. 2091 pazienti con carcinoma mammario metastatico diagnosticato tra il 1991 e il 2007, non trattate con trastuzumab in terapia adiuvante, sono state esaminate e suddivise in tre gruppi sulla base delle caratteristiche di malattia: pazienti con malattia HER2/neu negativa, pazienti con malattia HER2/neu positiva e trattate in prima linea con trastuzumab e pazienti con malattia HER2/neu positiva non sottoposte a trastuzumab. Il tasso di sopravvivenza ad un anno è risultato essere del 75,1% (95% CI 72,9%-77,2%), 86,6% (95% CI 80,8%-90,8%) e 70,2% (95% CI 60,3%-78,1%) rispettivamente, con differenze tra i tre gruppi statisticamente significative ( $P=0,028$ ). Dopo correzione per le caratteristiche clinicamente rilevanti della paziente e della neoplasia, il gruppo con malattia HER2/neu positiva trattata con trastuzumab ha mostrato una riduzione del 44% del rischio di morte a confronto col gruppo HER2/neu negativo. Il gruppo HER2/neu positivo non ricevente trastuzumab è quello a peggiore prognosi. I risultati di questo studio suggeriscono che l'amplificazione/iperpressione di HER2/neu peggiori significativamente la prognosi della paziente, ma che l'adozione di terapie mirate (trastuzumab) compensi questa differenza, riconducendo il tasso di sopravvivenza a valori simili a quelli della malattia HER2/neu negativa o superiori.

## 1.6. Farmaci anti Her-2

Nel corso del tempo sono stati sviluppati diversi farmaci mirati contro il recettore Her-2 e introdotti nella pratica clinica, rivoluzionando la prognosi del carcinoma mammario HER2 positivo. Nel setting metastatico disponiamo oggi dei seguenti farmaci:

- **Trastuzumab:** si tratta di un anticorpo monoclonale umanizzato ricombinante (mAb) specifico per il dominio extracellulare del recettore Her-2, al quale si lega prevenendo l'attivazione del recettore. [9, 10, 11]. Trastuzumab può essere utilizzato nel setting adiuvante, neoadiuvante e nella malattia metastatica. I dosaggi e le schedule attualmente utilizzate per trastuzumab derivano dagli studi di Vogel e collaboratori [12] e Baselga e collaboratori [13]
- **Pertuzumab:** è un anticorpo monoclonale umanizzato che lega il dominio extracellulare di Her-2, in un sito diverso rispetto a trastuzumab, prevenendo la dimerizzazione con altri recettori Her. [14]. Pertuzumab può essere impiegato nel trattamento di prima linea del carcinoma mammario HER2 positivo in associazione a Trastuzumab e Taxano o nel setting neoadiuvante in associazione a Trastuzumab e chemioterapia (farmaco approvato, ma non rimborsato dal SSN). [25, 26, 27] [95]
- **Lapatinib:** è un inibitore della tirosin-chinasi, che blocca il percorso di crescita cellulare promosso dal recettore del recettore HER2. Lapatinib è attualmente utilizzato esclusivamente nel setting metastatico. [15]
- **T-DM1 o Trastuzumab-emtansine:** è un anticorpo-farmaco coniugato che contiene trastuzumab, legato in modo covalente a DM1, un inibitore della polimerizzazione dei microtubuli; la presenza dell'anticorpo permette di veicolare selettivamente il chemioterapico nelle cellule con iperespressione di Her-2. T-DM1 è attualmente utilizzato nella terapia del carcinoma mammario metastatico resistente ad altri farmaci anti Her-2 . [16]

## **2. TRATTAMENTO DELLA MALATTIA METASTATICA E, IN PARTICOLARE, DI QUELLA HER2 POSITIVA**

### **2.1. Cenni di trattamento della malattia metastatica**

Circa il 7% dei carcinomi della mammella presenta metastasi sincrone; nella maggior parte dei casi le metastasi si presentano in pazienti con un carcinoma mammario trattato in fase adiuvante o neoadiuvante (circa il 30% dei tumori N- e il 70% N+ alla diagnosi, presenta una ripresa di malattia entro 10 anni). Il sottotipo biologico correla sia con il rischio che con la sede di recidiva (maggior rischio di metastasi scheletriche nei tumori ormonosensibili, maggior rischio di metastasi encefaliche nei tumori HER2 positive e Basal Like).

Il carcinoma della mammella metastatico è una malattia sostanzialmente inguaribile, il cui trattamento ha lo scopo principale di prolungare la sopravvivenza e migliorare la qualità di vita, ritardando e alleviando la sintomatologia causata dal progredire della malattia e controllando gli effetti tossici dei farmaci impiegati. Solo in alcuni casi selezionati è possibile ottenere la guarigione od ottenere almeno lunghe sopravvivenze.

La scelta del trattamento oncologico deve essere individualizzata sulla base delle caratteristiche della malattia e della paziente: parametri biologici (ER, PgR, Her-2, Ki67), estensione, numero e sede delle lesioni metastatiche, durata dell'intervallo libero da malattia e risposta ai precedenti trattamenti, età, performance status e comorbidità della paziente.

Nei casi di neoplasia ormonosensibile e Her-2 negativa, in assenza di grave e rapida disfunzione d'organo, la terapia ormonale deve essere adottata come prima opzione e proseguita fino a che la malattia possa essere considerata ancora ormonosensibile, anche con linee successive di terapia. La terapia ormonale è in grado di ottenere sopravvivenze paragonabili a quelle date dalla chemioterapia, con una miglior qualità di vita.

Per quanto riguarda i tumori HER2 positivi, i farmaci di prima scelta sono gli agenti anti Her-2 associati a chemioterapia. In situazioni particolari (paziente anziana, controindicazioni assolute alla chemioterapia) può essere considerata una combinazione di farmaco anti Her-2 con inibitore delle aromatasi in tumori con espressione dei recettori ormonali e paziente in post menopausa.

I tumori privi di espressione dei recettori ormonali e di Her-2 hanno come unica opzione di trattamento la chemioterapia classica, eventualmente associata a farmaci anti angiogenetici come Bevacizumab.

## **2.2. Terapia della malattia metastatica HER2 positiva**

Il cardine della terapia della malattia metastatica Her-2 positiva è costituito dai farmaci anti Her-2, prevalentemente in combinazione con chemioterapici.

### **Trattamenti di 1<sup>a</sup> linea con combinazioni contenenti Trastuzumab**

Lo studio randomizzato di fase III di Slamon e coll.[18], ha confrontato una combinazione di chemioterapia e trastuzumab (n=235) rispetto alla sola chemioterapia (n=234), con un significativo aumento del tempo alla progressione (TTP mediano di 7,4 mesi contro 4,6 ottenuto dalla sola chemioterapia;  $P < 0,001$ ), del tasso di risposte obiettive (ORR 50% versus 32%;  $p = 0,008$ ), della durata della risposta (mediana di 9,1 mesi contro 6,1 mesi;  $P < 0,001$ ) e un più basso tasso di morte ad un anno (22% contro il 33%;  $P = 0,008$ ) nelle pazienti trattate con l'anticorpo monoclonale.

I regimi chemioterapici utilizzati, combinati o meno con trastuzumab, erano doxorubicina (60 mg/mq q21) o epirubicina in associazione a ciclofosfamide (epirubicina 75 mg/mq; ciclofosfamide 600 mg/mq q21) nelle pazienti non trattate con antracicline in fase adiuvante o paclitaxel (175 mg/mq q21) nelle pazienti che avevano ricevuto antracicline. Il principale effetto collaterale si dimostrò essere la disfunzione cardiaca, con un'incidenza maggiore nelle pazienti trattate con la combinazione antraciclina – trastuzumab (27%) rispetto a quelle sottoposte a terapia con solo trastuzumab (8%) o la combinazione dell'anticorpo con il taxano (13%), o paclitaxel in monoterapia (1%).

Questo studio rappresenta la pietra miliare del trattamento di prima linea della malattia HER2 positiva e ha determinato l'introduzione dell'anticorpo monoclonale in associazione a paclitaxel nel trattamento del carcinoma mammario HER2 positivo. Lo studio ha fatto inoltre emergere un altro dato importante, ovvero la potenziale pericolosità dell'associazione antracicline-trastuzumab in termini di tossicità cardiaca, che rende questa combinazione di

farmaci clinicamente inappropriata.

Nello studio randomizzato di fase II condotto da Gasparini e collaboratori [19], 118 pazienti sono state randomizzate a ricevere paclitaxel settimanale (80 mg/kg) in associazione a trastuzumab (4 mg/Kg dose di carico, poi 2 mg/Kg, settimanalmente) o paclitaxel settimanale in monoterapia. Il trattamento combinato ha dimostrato un migliore tasso di risposte obiettive e tempo alla progressione rispetto al solo paclitaxel settimanale nel gruppo di pazienti con IHC 3+ (ORR 84,5% vs 47,5%;  $P=0,0005$  e TTP 369 giorni vs 272 giorni;  $P=0,03$ ).

Lo studio randomizzato di fase II di Marty e coll. [20] ha confrontato, in un campione di 186 pazienti con carcinoma mammario metastatico HER2 positivo non precedentemente trattato per la malattia sistemica, l'efficacia di trastuzumab (4 mg/Kg dose di carico, poi 2 mg/Kg, settimanalmente) in associazione a docetaxel (100 mg/Kg ogni 21 giorni) contro il solo docetaxel. La combinazione docetaxel-trastuzumab si è dimostrata superiore sia in termini di tasso di risposte obiettive (ORR 61% vs 34%;  $P=0,0002$ ), che di tempo alla progressione (TTP mediano 11,7 mesi vs 6,1 mesi;  $P=0,0001$ ), tempo al fallimento del trattamento (TTF mediano 9,8 mesi vs 5,3 mesi;  $P=0,0001$ ) e durata della risposta (mediana 11,7 mesi vs 5,7 mesi;  $P=0,009$ ).

Nel 2011 lo studio HERNATA (fase III, randomizzato) [21], ha paragonato la combinazione docetaxel e trastuzumab rispetto a vinorelbina e trastuzumab nel trattamento di prima linea di pazienti affette da carcinoma mammario Her-2 positivo metastatico o localmente avanzato non pretrattate per la malattia metastatica. Lo studio non ha evidenziato differenze in termini di efficacia di uno dei due trattamenti, ma ha evidenziato una maggiore tossicità per docetaxel (maggiore incidenza di neutropenia G3 e G4, leucopenia, infezioni, febbre, neuropatia, onicopatia, edema).

Altri farmaci chemioterapici impiegati in combinazione a trastuzumab sono capecitabina, doxorubicina liposomiale e i derivati del platino (cisplatino e carboplatino).

### **Doppio blocco di Her-2 nel trattamento di I linea**

Lo studio di fase III randomizzato CLEOPATRA ha valutato l'aggiunta di pertuzumab (840 mg dose di carico, 420 mg ogni tre settimane) alla

combinazione docetaxel-trastuzumab (docetaxel 75-100 mg/mq ogni tre settimane, trastuzumab 8 mg/kg dose di carico, poi 6 mg/kg ogni tre settimane) versus docetaxel-trastuzumab da soli, come terapia di prima linea in pazienti affette da carcinoma della mammella metastatico, localmente recidivato o non operabile HER2 positivo. Nello studio sono state arruolate 808 pazienti e il gruppo ricevente l'associazione dei due agenti biologici con docetaxel ha mostrato un significativo vantaggio rispetto al gruppo di controllo in termini di risposte obiettive, progression free survival e overall survival (PFS 18,5 mesi vs 12,4 mesi, HR=0,62; 95% CI 0,51-0,75;  $p < 0,001$ ; OS mediana di 56,5 mesi vs 40,8 mesi, HR= 0,68; 95% CI 0,56-0,84;  $P=0,0002$ ) al prezzo di un modesto aumento di effetti collaterali come diarrea e neutropenia febbrile [25, 26, 27]. Pertuzumab è indicato in combinazione con trastuzumab e docetaxel in pazienti con carcinoma mammario HER2 positivo non operabile, metastatico o recidivato localmente, non trattati in precedenza con farmaci anti Her-2 o chemioterapia per la malattia metastatica.

Uno studio clinico di fase II non randomizzato [28] ha valutato la combinazione Paclitaxel-trastuzumab-pertuzumab (paclitaxel 80 mg/mq settimanalmente, trastuzumab 8 mg/kg dose di carico, poi 6 mg/kg ogni tre settimane, pertuzumab 840 mg/kg dose di carico, poi 420 mg/kg ogni tre settimane); nello studio sono state arruolate 69 pazienti con carcinoma mammario Her-2 positivo metastatico o localmente avanzato inoperabile; 51 pazienti non avevano ricevuto alcun trattamento per la malattia sistemica, 18 pazienti pretrattate. L'86% delle pazienti era libera da progressione a sei mesi dall'inizio del trattamento, con una PFS mediana di 19,5 mesi (95% CI, 14-26 mesi). Ad oggi l'impiego di paclitaxel in associazione al doppio blocco pertuzumab-trastuzumab è indicata in caso di controindicazioni assolute a docetaxel.

### **Trastuzumab e polichemioterapia**

L'utilizzo di una polichemioterapia con taxani in combinazione a trastuzumab è stato valutato in tre diversi studi randomizzati. Lo studio BCIRG 007 ha confrontato la combinazione di docetaxel in associazione a carboplatino, rispetto a un trattamento con solo docetaxel; le pazienti in entrambi i bracci di studio erano candidate a ricevere trastuzumab. [22]

Uno studio randomizzato di fase II ha invece indagato l'aggiunta di

capecitabina a un regime con docetaxel e trastuzumab. [23]

Un terzo studio randomizzato di fase III ha confrontato la combinazione paclitaxel e carboplatino in associazione a trastuzumab rispetto al solo paclitaxel e trastuzumab. [24]

Tutti gli studi hanno dimostrato un vantaggio in termini di risposte obiettive, in assenza di un vantaggio in outcome clinico e una maggiore tossicità legata all'aggiunta di un ulteriore chemioterapico.

Lo studio MA.31 [29] ha confrontato l'efficacia e la tossicità, nell'ambito di una terapia di prima linea per carcinoma mammario HER2 positivo metastatico, di lapatinib e trastuzumab, in associazione con un taxano. Il trattamento con lapatinib si è dimostrato meno efficace (minore progression free survival) e più tossico di quello con trastuzumab.

### **Combinazione di trastuzumab con agenti ormonali**

Circa la metà dei tumori HER2 positivi è ormonosensibile. È noto che questo sottotipo tumorale presenti una resistenza intrinseca al trattamento ormonale, verosimilmente correlabile alla presenza di un cross-talk tra i pathways di Her-2, EGFR e del recettore estrogenico [30, 31]. Il simultaneo blocco di entrambe le vie del segnale per permettere il superamento dell' endocrinoresistenza ha fornito il razionale per studi di combinazione tra ormonoterapia ed agenti anti Her-2 nei tumori Luminal B HER2 positive. [32]

Nello studio randomizzato di fase III TAnDEM [33] la combinazione anastrozolo-trastuzumab (anastrozolo 1 mg/die, trastuzumab 4 mg/kg dose di carico, poi 2 mg/kg settimanalmente) è stata confrontata con il solo anastrozolo, in pazienti in post-menopausa affette da carcinoma mammario metastatico HER-2 positivo e ER positivo, non sottoposte a chemioterapia per la malattia metastatica. Le pazienti nel braccio di combinazione (n=103) hanno mostrato un significativo miglioramento del tempo alla progressione rispetto al braccio solo anastrozolo (n=104) (hazard ratio=0.63; 95% CI, 0.47-0.84; PFS mediana 4.8 v 2.4 mesi; log-rank P=0.0016). Nonostante dallo studio non siano risultate differenze significative in sopravvivenza globale, circa il 70% delle pazienti assegnate al braccio anastrozolo ha ricevuto trastuzumab al momento della progressione,

alterando il risultato.

Un altro studio di fase III, lo studio eLEcTRA [34], ha invece confrontato l'associazione letrozolo-trastuzumab (letrozolo 2,5 mg/die, trastuzumab 4 mg/kg dose di carico, poi 2 mg/kg settimanalmente o 8 mg/kg dose di carico, poi 6 mg/kg ogni tre settimane. n=26) con il solo letrozolo (n=31) come terapia di prima linea nel carcinoma mammario metastatico esprimente sia Her-2, sia ER. Il braccio letrozolo-trastuzumab ha ottenuto un migliore tempo alla progressione rispetto al braccio letrozolo (TTP mediano 14,1 mesi contro 3,3 mesi; hazard ratio=0,6; P=0,23).

Lo studio di Johnston et al. [35] ha valutato l'efficacia della combinazione letrozolo + lapatinib rispetto al solo letrozolo in pazienti con carcinoma della mammella metastatico (n=1286) con espressione dei recettori ormonali. Nel sottogruppo di pazienti con tumore di Her-2 positivo (n=219) gli autori hanno potuto osservare un significativo miglioramento del tasso di risposte obiettive (ORR dal 15% al 28%; OR= 0,4; 95% CI 0,2-0,9; P=0,021) e della sopravvivenza libera da progressione (PFS di 3,0 mesi contro 8,2 mesi; HR=0,71; 95% CI 0.53-0.96; P=0,019) nei soggetti trattati con la combinazione di farmaci. Ad oggi l'associazione lapatinib + letrozolo trova indicazione nelle pazienti in postmenopausa con malattia ormonosensibile e Her-2 positiva per le quali non sia al momento indicata la chemioterapia.

### **Trattamento con farmaci anti Her-2 in pazienti precedentemente trattate con trastuzumab**

Diversi studi indicano che l'impiego di trastuzumab nella malattia HER2 positiva sia efficace anche in pazienti precedentemente sottoposte a un trattamento con l'anticorpo monoclonale nel setting adiuvante/neoadiuvante, suggerendo quanto il blocco della via del segnale di HER2 rappresenti un cardine terapeutico di questo particolare sottotipo di patologia e portando così allo sviluppo di nuovi agenti anti HER2. [37]

Lo studio randomizzato di fase III EMILIA ha confrontato la combinazione lapatinib + capecitabina verso T-DM1 (trastuzumab-emtansine) in pazienti (n=991) con carcinoma della mammella per Her-2 positivo già trattate con trastuzumab e taxani. Lo studio ha arruolato sia pazienti in progressione a un

trattamento di prima linea, che pazienti naïve per la malattia metastatica progredite durante o entro sei mesi dal termine di una terapia adiuvante contenente trastuzumab. [39] T-DM1 si è dimostrato superiore alla combinazione lapatinib-capecitabina in termini di progression free survival mediano (9,6 mesi contro 6,4 mesi; HR per progressione o morte per qualsiasi causa =0,65; 95% CI 0,55-0,77; P<0,001), tasso di risposte obiettive (43,6%, contro 30,8%; P<0,001), sopravvivenza globale mediana (30,9 mesi contro 25,1 mesi; HR=0,68; 95 CI 0,55-0,85; P<0,001) e tossicità (incidenza di effetti collaterali G3 e G4 del 41% contro 57%).

Lo studio TH3RESA [41] ha arruolato 602 pazienti con malattia metastatica Her-2 positiva già sottoposte a due o più trattamenti anti-Her-2, incluso lapatinib. Le pazienti sono state randomizzate a ricevere T-DM1 o terapia scelta dallo sperimentatore. T-DM1 si è dimostrato superiore rispetto al braccio di controllo in termini di sopravvivenza libera da progressione (PFS mediana 6,2 mesi contro 3,3 mesi; HR=0,528; 95% CI 0,422–0,661; P<0,0001) e una maggiore sopravvivenza globale mediana (OS HR =0,552; 95% CI 0,369–0,826; P=0,0034), anche se per quest'ultimo parametro non è stato raggiunto il livello di significatività prefissato. T-DM1 è attualmente indicato nel trattamento del carcinoma mammario Her-2 positivo metastatico, in pazienti che abbiano ricevuto taxani e trastuzumab (sia in combinazione, che separatamente) o progrediti entro 6 mesi dal termine o durante un trattamento adiuvante con trastuzumab.

In uno studio di fase III [40] 156 pazienti con carcinoma Her-2 positivo localmente avanzato o metastatico progredite durante terapia adiuvante o di prima linea con trastuzumab, sono state assegnate a due gruppi a ricevere o capecitabina (2500 mg/mq/die gg1-14 q21) più trastuzumab (6 mg/kg q21) (n=78) o capecitabina in monoterapia. Le pazienti trattate con la combinazione ha ottenuto migliori risultati in termini di tempo alla progressione (TTP mediano 8,2 mesi contro 5,6 mesi; HR=0,69; 95% CI 0,48-0,97; two-sided log-rank P =0,0338), sopravvivenza globale (OS mediano 25,5 mesi contro 20,4 mesi; P=0,257), tasso di risposte obiettive (ORR 48,1% contro 27%; odd ratio=2,5; P=0,0115), in assenza di un aumento di tossicità.

Lo studio EGF104900 [36] ha dimostrato come, in pazienti con tumore della

mammella HER2 positivo metastatico fortemente pretrattate e in progressione in corso di terapia con trastuzumab, la combinazione trastuzumab + lapatinib sia superiore rispetto al solo lapatinib. Lo studio, che ha arruolato 291 pazienti, ha dimostrato un vantaggio statisticamente significativo in termini di sopravvivenza libera da progressione (PFS mediano 11,1 settimane contro 8,1 settimane; HR=0,74; 95% CI 0.58-0.94; P=0,011) e sopravvivenza globale (OS mediano 14 mesi contro 9,5 mesi; HR=0,74; 95% CI 0.57-0.97; stratified log-rank P=0,026). Grazie ai risultati di questo studio è attualmente approvata dall'EMA l'associazione dei due farmaci biologici, lapatinib e trastuzumab, per la terapia del carcinoma mammario HER2 positivo, negativo per recettori ormonali, in progressione a seguito di una o più terapie con trastuzumab associato a chemioterapici.

Al momento in Italia lapatinib è approvato in associazione a un inibitore delle aromatasi in donne in postmenopausa con malattia metastatica HER2 positiva, positiva per i recettori ormonali, non candidabili a un trattamento chemioterapico, o in associazione alla capecitabina, nella terapia di pazienti con carcinoma mammario avanzato o metastatico HER2 positivo in progressione dopo un trattamento includente antracicline e taxani ed una terapia con trastuzumab, sulla base del risultato di uno studio randomizzato di fase III [42, 43], condotto su donne affette da carcinoma mammario HER2 positivo metastatico o localmente avanzato inoperabile, in pazienti già trattate con taxani, antracicline e trastuzumab; l'associazione lapatinib-capecitabina (lapatinib 1250 mg/die, capecitabina 2000 mg/mq giorni 1 → 14 q21) si è dimostrata superiore alla sola capecitabina, in termini di tempo alla progressione (TTP mediano 6,2 mesi contro 4,3; average hazard ratio =0.57; 95% CI 0,43-0,77; P<0,001), risposte obiettive (ORR 24% contro 14%; OR=1,9; 95% CI 1,1-3,4; P=0,017) e sopravvivenza globale, (anche se non si è raggiunta la significatività statistica per questo endpoint). Nel gruppo lapatinib - capecitabina si è documentata una riduzione dei casi di prima progressione a livello cerebrale. L'associazione ha determinato una maggiore incidenza di diarrea, rash e dispepsia.

Lapatinib è inoltre utilizzabile in Italia in associazione a un inibitore delle aromatasi in donne in postmenopausa con malattia metastatica Her-2 positiva,

positiva per i recettori ormonali, non candidabili a un trattamento chemioterapico.

**Tabella riassuntiva dei principali regimi di terapia con farmaci biologici anti Her-2 impiegati, in Italia, nel carcinoma mammario metastatico, in 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> linea:**

**Tabella 1**

Regime	Farmaci	Dose e schedula
Docetaxel pertuzumab trastuzumab	docetaxel	75-100 mg/mq q21
	pertuzumab	840 mg/kg dose carico → 420 mg/kg q21
	trastuzumab	8 mg/kg dose carico → 6 mg/kg q21
Docetaxel trastuzumab	docetaxel	75-100 mg/mq q21
	trastuzumab	4mg/kg dose carico → 2 mg/kg settimanale 8 mg/kg dose carico → 6 mg/kg q21
Paclitaxel trastuzumab	paclitaxel	80 mg/mq giorni 1,8,15 q28
	trastuzumab	4mg/kg dose carico → 2 mg/kg q21 8 mg/kg dose carico → 6 mg/kg q21
Paclitaxel pertuzumab trastuzumab	paclitaxel	80 mg/mq giorni 1,8,15 q28
	pertuzumab	840 mg/kg dose carico → 420 mg/kg q21
	trastuzumab	4mg/kg dose carico → 2 mg/kg q21 8 mg/kg dose carico → 6 mg/kg q21
Paclitaxel carboplatino trastuzumab	paclitaxel	175 mg/mq q21
	carboplatino	AUC 6 q21
	trastuzumab	8 mg/kg dose carico → 6 mg/kg q21
Vinorelbina Trastuzumab	vinorelbina	30-35 mg/mq giorni 1,8 q21 25 mg/mq giorni 1,8,15 q28
	trastuzumab	4mg/kg dose carico → 2 mg/kg q21 8 mg/kg dose carico → 6 mg/kg q21
Capecitabina trastuzumab	capecitabina	2500 mg/mq/die giorni 1→ 14
	trastuzumab	8 mg/kg dose carico → 6 mg/kg q21
Capecitabina lapatinib	capecitabina	2000 mg/mq/die giorni 1→ 14 q21
	lapatinib	1250 mg/die
T-DM1	T-DM1	3,6 mg/kg q21
Trastuzumab Lapatinib (N.B. non approvata da AIFA)	trastuzumab	4mg/kg dose carico → 2 mg/kg q21 8 mg/kg dose carico → 6 mg/kg q21
	Lapatinib	1250 mg/die

### **3. VARIABILITÀ DELL'ASSETTO RECETTORIALE TRA NEOPLASIA PRIMITIVA E LESIONI METASTATICHE: IMPORTANZA CLINICA, VALORE PROGNOSTICO E IMPLICAZIONI TERAPEUTICHE**

La valutazione dell'espressione dei recettori per estrogeni (ER), per progesterone (PgR) e del recettore Her-2 o dell'amplificazione del gene HER2 su un campione istologico della neoplasia è diventata di primaria importanza. Conoscere il profilo molecolare della malattia permette di inquadrarne più precisamente l'aggressività e quindi il livello di rischio individuale, ma soprattutto di ottimizzare la terapia e adeguarla al singolo caso. Tuttavia, nonostante l'assetto recettoriale venga puntualmente valutato sul tumore primitivo, esiste la possibilità che l'espressione dei tre recettori risulti differente a livello delle recidive locoregionali o a distanza.

Le ragioni di questo fenomeno possono dipendere da:

- Fattori di tipo tecnico: numerose variabili possono influenzare l'accuratezza dei test [44] come il ritardo nella fissazione e preparazione del campione o il tipo di procedura (ad esempio, la decalcificazione preliminare all'analisi di metastasi ossee può alterare il risultato) [45, 46]. Altri fattori possono essere l'adozione di protocolli diversi, e quindi di diverse soglie di positività, la variazione nei test utilizzati (per esempio IHC piuttosto di FISH), la valutazione da parte di differenti anatomopatologi, la diversa tecnica biotecnica utilizzata. Alcuni studi, basati sulla revisione centralizzata di preparati istologici, hanno chiaramente dimostrato la non completa riproducibilità dei test immunohistochimici e di ibridizzazione in situ impiegati per la valutazione di ER, PgR e Her-2 [47, 48]
- Fattori di tipo biologico: come possibile espressione di eterogeneità intra- ed inter-tumorale [49][Heim S, Teixeira MR]. La variazione dei recettori nel sito di metastasi potrebbe riflettere la nascita di nuovi cloni cellulari come evoluzione naturale della malattia e della sua instabilità genomica, oppure la presenza, a livello del primitivo, di piccoli subcloni cellulari che non vengono rilevati e che diventano manifesti solo a livello metastatico. Inoltre un ruolo potrebbe essere svolto dalle terapie impiegate, che

potrebbero favorire una espansione clonale selettiva [50, 51]

Al momento della recidiva di malattia la decisione terapeutica viene per lo più adottata sulla base dello status di espressione recettoriale del carcinoma primitivo, piuttosto che una nuova rivalutazione tramite prelievo biotico della lesione, con un possibile impatto negativo sulla prognosi delle pazienti.

Diversi studi, principalmente retrospettivi, hanno indagato su quale sia il tasso di discordanza di espressione di ER, PgR e Her-2 tra neoplasia primitiva e metastasi linfonodali, recidive locali e metastasi a distanza, e su quali possano essere le implicazioni cliniche di un'eventuale variazione, in termini di prognosi e possibilità terapeutiche.

Molte domande restano aperte sull'opportunità o meno di sottoporre la paziente ad un nuovo prelievo biotico nella sede di recidiva, tenendo in considerazione il potenziale beneficio clinico da un lato e l'invasività e i costi della procedura dall'altro. Inoltre solo pochi dati sono disponibili, ad oggi, riguardo al reale impatto clinico dell'evidenza di discordanza, ovvero riguardo quali modifiche possano essere apportate alla terapia ricevuta dalla paziente e, soprattutto, se eventuali aggiustamenti, allo scopo di adattare la terapia al più recente profilo di espressione, determinino effettivamente un miglioramento dell'outcome. In particolare, in riferimento ai casi di variazione di espressione di Her-2 nel senso di acquisizione di espressione, non esistono ancora dati certi che confermino che l'aggiunta di farmaci anti Her-2 alla terapia utilizzata fornisca effettivamente un beneficio alla paziente.

### **3.1. Frequenza di discordanza nell'espressione dei recettori ormonali (ER e PgR) e di HER2**

Diversi studi, già a partire dagli anni '70 [52, 53] hanno esaminato il tasso di discordanza fenotipica tra carcinoma mammario primitivo e corrispondenti recidive, sia a livello locoregionale che a distanza, riportando risultati eterogenei e frequentemente contrastanti.

Un'importante meta-analisi condotta da Aurilio et coll., pubblicata nel 2014 [54], ha selezionato 48 articoli relativi alle modifiche dell'assetto recettoriale tra

tumore mammario primitivo e campione di tessuto della corrispondente recidiva; di questi lavori solo sette erano di tipo prospettico [55-61]. Tra gli studi presi in considerazione, 33 di questi erano focalizzati sulle modifiche dell'espressione di ER, 24 su PgR e 31 su HER2. Per quanto riguarda le modifiche di espressione di ER, dalla meta-analisi dei dati raggruppati, relativi a un totale di 4200 pazienti, la percentuale di discordanza complessiva è risultata essere del 20%, con valori del 29% e del 19% calcolati sui dati, rispettivamente, degli studi prospettici e retrospettivi e con risultati simili dall'analisi degli studi confrontanti i tumori primitivi e le loro recidive locoregionali, da un lato, e tumori primitivi e metastasi a distanza dall'altro. La percentuale "pooled" di pazienti andati incontro ad acquisizione e perdita di espressione di ER nel sito di metastasi è stata rispettivamente del 14% e del 24%.

Per quanto riguarda PgR, dalla meta-analisi dei dati raggruppati, relativo a un totale di 2739 pazienti, la percentuale di discordanza complessiva è risultata essere del 33%, con valori del 37% negli studi prospettici e del 33% in quelli retrospettivi e una percentuale più elevata ricavata dagli studi riguardanti il confronto tra primitivo e metastasi a distanza, rispetto agli studi consideranti solo recidive locoregionali (41% contro 26%). Il tasso di conversione positiva è risultata essere del 15%, mentre quello di conversione negativa del 46%.

Per quanto riguarda HER2, dati che si riferiscono alla variazione dello status di questo marker molecolare sono stati ricavati da 31 studi e l'analisi si è svolta su un totale di 2987 pazienti. La percentuale di discordanza è stata dell' 8% sui dati complessivi di tutti gli studi, del 10% tra gli studi prospettici e dell' 8% tra quelli retrospettivi. Il tasso di discordanza rilevato dall'analisi degli studi riguardanti il confronto tra primitivo e metastasi a distanza è stato del 10%, mentre dagli studi consideranti solo recidive locoregionali è emersa una percentuale di discordanza del 6%.

Le percentuali di discordanza sono state inoltre calcolate dopo analisi separate degli studi sulla base delle tecniche utilizzate per la valutazione di HER2: 5% negli studi dove era stata impiegata solo l'IHC e 10 % negli studi dove erano stati utilizzati IHC e FISH.

Il tasso di conversione positiva è stato del 5% (2% negli studi col solo uso di IHC e 7% tra quelli con uso sia di IHC che FISH), mentre quello di conversione

negativa del 13% (8% negli studi dove era usata solo IHC e 15% negli studi con impiego di IHC e FISH).

Più recentemente, nel corso del 2016, è stata pubblicata una review condotta da Yeung e coll [62], nella quale sono stati esaminati gli studi che valutavano lo status di ER, PgR o HER2 in coppie corrispondenti di carcinomi mammari primitivi e metastatici. Complessivamente sono stati analizzati 47 studi, di cui 7 di tipo prospettico, relativi a 3384 coppie di campioni istologici del primitivo e della metastasi. Tra questi studi 11 erano rientrati anche nella meta-analisi del 2014 di Aurilio et al. [55, 58, 60, 63-70] Trentaquattro studi riportavano dati su ER, 25 su PgR e 41 su HER2. Solo 5 studi sono stati considerati a basso rischio di bias. [57] [71] [65] [72] [73]

I tassi di discordanza mediani tra tumori primitivi e metastasi sono stati, rispettivamente, del 14% (range 0–67 %; scarto interquartile IQR 9–25 %), 21 % (range 0–62 %; IQR 15–41 %), e 10 % (range 0–44 %; IQR 4–17 %). Per 1396 coppie corrispondenti di campioni di tessuto gli autori hanno potuto recuperare informazioni anche riguardo alla direzione nel viraggio di espressione recettoriale. Complessivamente in 128 casi su questi 1396 si è evidenziata una perdita di espressione recettoriale (9,17%) e in sessantatré un guadagno di espressione (4,51). Nello specifico 63 (11,15%) e 15 (2,65%) coppie su 565 hanno mostrato perdita e guadagno di espressione di ER, rispettivamente, mentre per PgR si è osservato perdita di espressione in 24 su 267 coppie corrispondenti (8,99%) e acquisizione in 9 su 267 (2,67%). Per quanto riguarda HER2, in 41 casi su 564 (7,27%) si è trovata una perdita di espressione e in 39 su 564 (6,91%) un guadagno.

Gli autori hanno descritto un maggior tasso di variabilità riguardo alle metastasi ossee quando paragonate alle lesioni in tutte le altre sedi (linfonodi, tratto gastrointestinale, polmone, fegato, encefalo), anche se questo dato può essere influenzato dalle peculiari problematiche legate all'analisi di questi campioni.

I dati ad oggi disponibili su questo argomento suggeriscono che il recettore più suscettibile alla variazione di espressione nell'ambito delle recidive sia PgR, seguito da ER e, infine da Her-2.

La variabilità di espressione dei recettori ormonali è più frequentemente legata alla perdita di espressione a livello metastatico, piuttosto che il suo guadagno, mentre per quanto riguarda Her2 i dati sono contrastanti: dalla meta-analisi di

Aurilio et al. [54] emerge come la conversione negativa sia più frequente di quella positiva, mentre la review di Yeung et al. [62] non sembra mostrare una distinta tendenza nell'una o nell'altra direzione. Dalla review di Jabbour et al. [74], che ha analizzato 45 studi, si evince che Her-2 sia soggetto più frequentemente ad un cambiamento in senso positivo, sia a livello delle metastasi linfonodali che delle metastasi a distanza, anche se alcuni studi inclusi nell'analisi riportano una tendenza opposta [75] o l'assenza di una tendenza precisa [72].

Questo dato è stato confermato da Houssami et al. in una meta-analisi pubblicata nel 2011 [76], incentrata sulla variabilità di espressione di HER2 tra tumore primitivo e metastasi a distanza o recidive locoregionali, che ha analizzato 26 studi, per un totale di 2520 soggetti, documentando una maggiore tendenza ( $P=0,074$ ) di cambiamento da primitivo negativo verso metastasi positiva rispetto al contrario; una volta escluso dalla metanalisi lo studio di Lower et al. [75] considerato poco attendibile per la incoerenza tra le metodiche usate per la valutazione di HER2 nel primitivo e nella metastasi.

La review di Rossi et al. [77] ha riportato un'elevata concordanza di Her-2 tra primitivo e recidive e, nei casi di discordi, una maggiore tendenza all'acquisizione di espressione. Anche in questa review PgR si è rivelato il più soggetto a variazione tra i recettori e la perdita di espressione di PgR o di ER è stata la modificazione più frequentemente osservata.

Nello studio di Hoefnagel et al. [72] i tassi di conversione recettoriale sono stati pari a 15,1% e 32,6% per ER $\alpha$  e PgR, rispettivamente, utilizzando una soglia  $\geq 1$  per IHC. Il tasso di conversione di HER2 è stato pari a 5,2%. Anche in questo studio di è osservato più frequentemente il passaggio da primitivo positivo a recidiva negativa per ER e PgR, mentre per HER2 i casi di conversione si sono verificati in uguale misura nei due sensi.

Nello studio di Nishimura et al. [78], condotto su 97 pazienti con carcinoma mammario recidivato a livello locoregionale o a distanza, i tassi di discordanza di ER, PgR e HER2 sono risultati essere del 10,3%, 25,8% e 14,4% rispettivamente. Per ER e PgR la perdita di espressione è stata più osservata più frequentemente rispetto all'acquisizione, mentre per HER2 è stato il contrario: 8 casi sul totale di 97 (8,2%) contro 2 su 97 (2%) per ER, 19 (19,6%) contro 6 (6,2%) su 97 per PgR, 3 su 97 contro 11 su 97 per HER2.

Nello studio di Jensen et al. [79], il tasso di discordanza tra tumore primitivo e corrispondenti metastasi metacrone a distanza è risultato del 12% per ER (14 su 118 pazienti) e del 9% per HER2 (10 su 114 pazienti). In 10 casi si è avuta perdita di espressione di ER (8,5% dei 118 casi totali) e in 4 casi guadagno di espressione (3,4% dei 118 casi). La maggior parte dei casi di discordanza di discordanza di HER2 si è verificata nel senso di acquisizione di espressione (8 casi su 114 coppie primitivo-metastasi totali, cioè il 7%, contro 2 su 114, ovvero il 1,7%)

Lo studio di Liu et al. [80] ha confrontato l'espressione recettoriale ricavata da campioni istologici di tessuto del carcinoma primitivo e di metastasi epatiche sincrone (12 casi) e metacrone (46 casi), ricavando tassi di discordanza di 0% per ER, 33,3% per PgR e 8,3% per HER2 nel primo gruppo e di 30,4% per ER, 50,3% per PgR e 10,9% per HER2 nel secondo gruppo. Nel caso di metastasi sincrone in 3 coppie di campioni si è evidenziata una perdita di espressione di PgR e in 1 coppia il guadagno di espressione, mentre in un solo caso lo status di HER2 si è modificato, con acquisto di espressione (8,3% dei 12 casi totali). Nel gruppo di pazienti con metastasi metacrone, in 7 casi si è verificata la perdita dell'espressione di ER e nello stesso numero di casi l'acquisto di espressione (15,2% dei 46 casi totali), mentre l'espressione di PgR è stata persa in 15 casi (32,6% delle 46 pazienti) e guadagnata in 10 (21,7% di 46). In un caso HER2 è passato da positivo a negativo a livello della lesione epatica (2,2% dei 46 casi) e in 4 casi da negativo a positivo (8,7%).

Nello studio di Dieci et al.[81] i tassi di discordanza tra primitivo e recidive, calcolati su 119 coppie di campioni tissutali, sono risultati pari a 13,4%, 39% e 11,8% per ER, PgR e HER2. In particolare, 4 pazienti tra le 21 con primitivi HER2 positivi hanno virato verso la negatività a livello della recidiva (19%) e 10 su 98 hanno acquisito espressione di HER2 a livello della recidiva (10,2%). Relativamente ai recettori ormonali, invece, 13 pazienti su 94 (13,8%) e 36 su 72 (50%) hanno mostrato perdita di espressione di ER e PgR, rispettivamente, mentre 3 su 25 (12%) e 10 su 46 (21,7%) hanno mostrato guadagno di espressione.

Amir e altri autori [82] hanno condotto una meta-analisi di due significativi studi prospettici sulla variazione dello status recettoriale tra primitivo e recidive, ovvero gli studi BRITS [59] e DESTINY [61]. Le percentuali di variazione di ER,

PgR e HER2 sono state calcolate su un totale di 231 pazienti, ottenendo come risultati valori di 12,6%, 31,2% e 5,5% rispettivamente. Mentre per PgR la perdita di espressione è stata più frequente del contrario (42,7% versus 16,0%;  $P < 0,001$ ), per ER e HER2 non è stata individuata una differenza significativa tra le due situazioni.

Nello studio di Yang et al. [83], l'analisi condotta su 133 donne ha mostrato un tasso di discordanza tra primitivo e recidive del 18,8% per ER, 33,8% per PgR e 6,8% per HER2 (20,0%, 38,1% e 6,7% per i pazienti con metastasi a distanza e 14,3%, 17,9% e 7,1% per quelli con recidive locoregionali). Il 23,9% delle pazienti con tumore primitivo ER positivo aveva perso la positività nel sito di recidiva (21 di 88 casi), mentre il contrario si era verificato in 4 donne su 45 (8,9%). Riguardo PgR, in 37 casi su 91 si era verificato un cambiamento da primitivo positivo a recidiva negativa (40,7%) e in 8 pazienti su 42 (19,0%) 42 si era verificato l'opposto. Di 25 pazienti con neoplasia primitiva HER2, 4 avevano sviluppato recidive HER2 negative (16%) e di 108 donne con primitivo HER2 negativo, 5 (4,9%) avevano avuto recidive HER2 positive.

### **3.2. Discordanza nell'espressione dei recettori ormonali e di HER2 tra più siti di recidiva**

Alcuni studi hanno investigato l'eventuale presenza di discordanza nello status recettoriale tra più sedi di metastasi nello stesso paziente. Nello studio di Gancberg et al.[84] lo status di HER2 è stato valutato su tessuto del carcinoma primitivo e delle metastasi a distanza di 107 pazienti, in 17 delle quali erano disponibili almeno due campioni diversi di tessuto metastatico, per un totale di 129 campioni metastatici. L'analisi è stata condotta sia con immunistochimica (considerando vero positivo un punteggio di 3+) che con FISH. Su 100 coppie corrispondenti di tessuto valutabili con IHC, 6 (6%) hanno mostrato discordanza, in tutti i casi nel senso di un cambiamento, statisticamente significativo ( $P=0,03$ ), dalla negatività alla positività. La FISH è stata applicata solo in 68 coppie di tessuto, rivelando un risultato discorde in 5 casi (7%): 2 con gene amplificato nel primitivo ma non nella metastasi e 3 con la situazione opposta. Dei 17 casi con siti metastatici multipli, di cui 12 con due sedi di metastasi e 5 con tre, 3 hanno mostrato discordanza nell'espressione di HER2

alla IHC (18%; 95% CI 0%-26%), che non è stata però confermata dalla FISH. In 16 di questi 17 casi è stata applicata la FISH, evidenziando differenze nell'amplificazione di HER2 in 3 casi (19%; 95% CI 0%-38%), diversi da quelli risultati discordi alla IHC.

In uno studio condotto da Lindström et al. [85] lo status di ER, PgR e HER2 nel tumore primitivo e in una o più recidive è stato valutato su 459, 430 e 104 pazienti rispettivamente, utilizzando, per ER e PgR, IHC/ICC con una soglia  $\geq 10\%$  e, per HER2, IHC/ICC e FISH nella maggior parte dei casi con score 2+ o 3+. Un'alterazione dello status recettoriale è emersa nel 32,4% dei casi per ER ( $P < 0,001$ ), nel 40,7% dei casi per PgR ( $P < 0,001$ ) e nel 14,5% dei casi per HER2 ( $P = 0,44$ ). Un viraggio da primitivo positivo verso recidiva negativa è stato osservato nel 24,6% delle pazienti per ER e nel 33,0% delle pazienti per PR, mentre il contrario si è verificato nel 7,8% per ER e nel 7,7% per PgR. In 15 pazienti su 104 (14,5%) si è verificato un cambiamento nello status di HER2. Lo status di ER, PgR e HER2 è stato valutato, per 119, 116 e 32 pazienti, rispettivamente, anche a livello di multipli siti di recidiva. L'espressione di tutti e tre i markers si è dimostrata instabile a livello delle recidive: il 33,6% di pazienti aveva una variazione dello status di ER tra le diverse sedi di recidiva e lo stesso era evidente nel 32,0% dei casi per PgR e nel 15,7% per HER2.

Hoefnagel et al. [86] hanno valutato l'espressione di ER $\alpha$ , PgR e HER2 in diverse metastasi a distanza di 55 pazienti. Utilizzando come soglia per IHC 1%, è emerso un tasso di discordanza tra sedi metastatiche pari al 10,9% (6 di 55) per ER $\alpha$  e 30,9% per PgR. In 2 casi su 49 lo stato di ER $\alpha$  differiva tra primitivo e corrispondenti metastasi, ma non tra di esse e lo stesso si poteva osservare per PgR in 5 casi su 38. Per quanto riguarda HER2, in 2 casi su 55 (3,6%) è stata evidenziata discordanza tra metastasi tramite IHC e in 2 casi su 53 (3,8%) discordanza tra primitivo e metastasi, tra di loro concordi. Nessun risultato ottenuto con IHC è stato confermato dalla SISH. Mentre per ER $\alpha$  e PgR la variazione nell'espressione tra diverse metastasi si è verificata in un significativo numero di casi, per HER2 la percentuale di discordanza tra metastasi è stata minima con IHC e nulla con la SISH.

### **3.3. Variazione di espressione di ER, PgR e HER2 e prognosi**

Diversi studi hanno indagato l'impatto della conversione dell'assetto recettoriale sulla prognosi. Liedtke et al. [87] hanno calcolato i tassi di discordanza di ER, PgR e HER2 in 789 pazienti affette da carcinoma mammario recidivato, che sono risultati del 18,4%, 40,3%, e 13,6% rispettivamente. I pazienti con tumore positivo per almeno un recettore (RPBC, receptor positive breast cancer) in maniera concorde tra primitivo e recidiva avevano la migliore sopravvivenza dopo la recidiva (PRS/post relapse survival 45,1 mesi; 95% CI 37,1–53,9 mesi). I gruppi con malattia concorde triplo negativa (TNBC, triple negative breast cancer) e con status recettoriale discorde avevano prognosi significativamente peggiore in modo simile tra loro: PRS 25,8 mesi (95% CI 17,6-59,6) per i TNBC/TNBC, PRS 16,7 mesi (95% CI 10,9-31,6) per i TNBC/non TNBC e PRS 19,6 mesi (95% CI 8,0-33,6) per i non TNBC/TNBC.

Nello studio di Lindström et al. [85] la perdita di espressione di ER è risultata associata a una riduzione di sopravvivenza globale rispetto ai casi stabilmente ER+ (HR=1,48; 95% CI 1,08-2,05 considerando sia recidive locoregionali che a distanza e HR=1,62; 95% CI 1,12-2,34 considerando solo le metastasi a distanza).

Nello studio di Niikura et al. [88] campioni tissutali ricavati da metastasi di carcinoma mammario di 182 donne con tumori primitivi HER2 positivi (IHC 3+ e/o amplificazione alla FISH) sono stati testati per evidenziare la frequenza di discordanza nell'espressione di HER2, che si è rivelata essere del 24% (43 casi di metastasi HER2 negative su 182 casi di tumori primitivi HER2 positivi). Nel gruppo delle pazienti con metastasi a distanza (n=168), quelle con status di HER2 concorde hanno avuto una sopravvivenza globale significativamente superiore rispetto a quelle con perdita di espressione di HER2 (HR=0,47; P=0,003) all'analisi univariata. Il risultato si è mantenuto statisticamente significativo anche dopo aggiustamento per stadio di malattia, età, stato menopausale.

Amir et al. [61], nello studio DESTINY, hanno valutato prospetticamente l'impatto prognostico del cambiamento dello status di ER, PgR e HER2 tra primitivo e recidiva in 94 donne. Dopo un follow-up mediano di 12 mesi, la discordanza nell'espressione recettoriale non è risultata associata a differenze

statisticamente significative né in termini di tempo al fallimento della terapia (TTF, time to treatment failure mediano 6,3 mesi e 6,5 mesi per il gruppo concorde e quello discorde rispettivamente; HR=0,88; P=0,59 ), né in termini di OS (OS mediano 27,6 mesi e 30,2 per il gruppo concorde e quello discorde; HR=0,94; P=0,85).

Nello studio di Dieci e coll. [81] la perdita di espressione recettoriale è risultata associata ad un significativo peggioramento della prognosi, sia in caso di negativizzazione di un singolo recettore, che nel caso di viraggio verso il fenotipo triplo negativo. La discordanza nello status di HER2 non è risultata, nel complesso, associata a modificazioni nella prognosi, ma la perdita di espressione di HER2 a livello della recidiva si è accompagnata a una sopravvivenza dopo la recidiva e una sopravvivenza globale significativamente ridotte rispetto ai casi HER2 positivi concordi (PRS mediano 16 mesi versus 88 mesi; P=0,008; OS mediano 40 mesi versus 108 mesi; P=0,06). In nessuno di questi pazienti era stato abbandonato il trastuzumab dopo la recidiva. Per quanto riguarda ER, la prognosi dei casi discordi è stata significativamente peggiore dei casi concordi (PRS mediano 27 mesi versus 50 mesi; P=0,01 e OS mediano 59 mesi versus 112 mesi; P=0,0005) e, sebbene non sia stata osservata una differenza significativa in PRS, nei pazienti con cambiamento da primitivo ER positivo a recidiva ER negativa si è ottenuta una sopravvivenza globale significativamente minore rispetto al gruppo ER positivo concorde (OS 59 mesi versus 10 mesi; P=0,001). Non è stata descritta nessuna correlazione tra discordanza nello status di PgR e perdita di espressione di PgR e sopravvivenza, sia in termini di PRS che OS. In generale, i pazienti andati incontro al cambiamento nel fenotipo di espressione recettoriale (HR+/HER2-, HR+/HER2+, HR-/HER2+; triplo negativo) durante la progressione della malattia hanno mostrato una prognosi peggiore e, in particolar modo, l'acquisizione del profilo triplo negativo è stata associata alla peggiore prognosi, quando paragonata a quella dei casi concordi (PRS mediano 27 mesi versus 51 mesi; HR=4,35; 95% CI 2,07–9,15; P<0,0001; OS mediano 59,3 mesi versus 119,2 mesi; HR=2,70; 95% CI 1,31–5,55; P=0,007).

Nello studio di Yang et al. [83] la discordanza nell'espressione di ER e HER2, e nello specifico la conversione negativa, è stata associata a un peggioramento di OS e PRS, mentre la variazione nello status di PgR non ha mostrato avere

implicazioni prognostiche.

Complessivamente dalla maggior parte degli studi sembra emergere che la variazione di espressione di ER, PgR e HER2 nel corso della progressione di malattia influenzi negativamente la prognosi, specialmente per quanto riguarda la perdita dell'espressione di questi recettori. Tuttavia le conclusioni di alcuni studi sono in contrasto con questa ipotesi, soprattutto relativamente al ruolo di PgR. I dati ad oggi disponibili non consentono di trarre delle conclusioni definitive e ulteriori studi sono necessari, soprattutto con disegno prospettico.

### **3.4. Variazione di espressione di ER, PgR e HER2 e effetti sulla gestione della terapia**

Un aspetto particolarmente importante, circa la possibilità che si realizzi un cambiamento nell'espressione dei recettori ormonali e di HER2 a livello delle recidive di malattia rispetto al fenotipo identificato al momento della prima diagnosi, riguarda le possibili implicazioni terapeutiche. Se da un lato l'acquisizione di espressione di un recettore può rendere la paziente candidata ad una terapia mirata, ormonale o anti-Her-2, il viraggio verso un fenotipo ER negativo o HER2 negativo potrebbe implicare sviluppo di resistenza alle terapie ormonali o ai farmaci anti-Her-2. In questo caso continuare a proporre quei trattamenti alla paziente potrebbe non fornire un reale beneficio clinico, ma, piuttosto, generare effetti collaterali evitabili, oltre a ritardare l'uso di un approccio più aggressivo, come la chemioterapia. D'altro canto, data la notevole eterogeneità della malattia, l'espressione dei marker tumorali rilevata a livello della recidiva sottoposta a biopsia, potrebbe non riflettere quella di tutte le sedi affette e quindi, sospendendo una terapia ormonale o l'antiHer-2, si potrebbe correre il rischio di privare la paziente di una preziosa arma terapeutica, ancora dotata di una parziale efficacia a livello di alcune localizzazioni della neoplasia. Inoltre a oggi non esistono dati attendibili che confermino che, con particolare riferimento al viraggio da una condizione di neoplasia primitiva HER2 negativa verso almeno una sede di recidiva HER2 positiva, l'adozione di farmaci mirati, come trastuzumab, pertuzumab o T-DM1, si riveli davvero una strategia vincente, o non comporti solo un carico ulteriore di tossicità senza un effetto sulla sopravvivenza migliore rispetto a quello che si

sarebbe ottenuto anche con una strategia farmacologica diversa.

Gli studi che hanno indagato il reale impatto clinico della discordanza nell'espressione recettoriale, riportando in quanti di questi casi la terapia fosse stata effettivamente modificata e se il cambiamento avesse prodotto dei risultati positivi sull'outcome delle pazienti, sono attualmente pochi e le loro conclusioni ben lontane dall'essere definitive.

Nello studio prospettico di Simmons et al. [89] sono state arruolate 40 pazienti affette da carcinoma mammario con sospetto clinico o radiologico di recidiva di malattia, da sottoporre a biopsia nella sede di metastasi. Sono stati esclusi i casi di recidiva locoregionale operabile e quelli in cui un trattamento per malattia metastatica era già stato avviato prima dell'arruolamento nello studio. Sono state eseguite 35 biopsie, ottenendo 29 campioni istologici analizzabili. La presenza di una lesione metastatica è stata confermata in 25 casi: 11 casi di lesioni ossee, 10 casi di lesione non operabile a carico dei tessuti molli, 3 casi di lesioni epatiche, 1 caso di lesione del SNC, 1 caso di lesione polmonare, 3 casi di prelievo di liquido pleurico e in 1 caso di liquido cerebro-spinale. In 2 pazienti (8%) è stato osservato un guadagno di HER2, in 3 (12%) una perdita di ER e in 7 (28%) una perdita di PgR.

In 6 casi (20% delle 29 donne sottoposte a biopsia con esito valutabile) i medici coinvolti nello studio hanno deciso di adeguare la terapia al risultato dell'esame istologico: nei due casi di guadagno di iperespressione di HER2 è stato proposto trastuzumab o la partecipazione ad uno studio clinico, mentre nei 4 casi dove la biopsia aveva evidenziato una lesione benigna o un secondo tumore maligno, l'approccio è stato deciso di conseguenza. I risultati dello studio indicano che sottoporre una paziente a nuova biopsia a livello di una sospetta recidiva è importante sia per confermare la reale natura metastatica della lesione, sia per guidare le scelte terapeutiche, ma non forniscono informazioni circa il reale impatto delle scelte terapeutiche sulla sopravvivenza delle pazienti.

Nello studio prospettico DESTINY [61] il tasso di discordanza di espressione dei recettori ormonali e di HER2 tra neoplasia primitiva e sede di metastasi è stato del 16%, 40%, e 10% per ER, PgR e HER2 rispettivamente. Per 17 donne la terapia è stata modificata rispetto a quella pianificata prima dell'esecuzione della biopsia: in tutte le 6 donne con acquisizione di iperespressione di HER2 è

stato aggiunto trastuzumab, in 5 pazienti su 11 con perdita di espressione di ER è stata offerta chemioterapia al posto della terapia ormonale, nei 4 casi in cui la biopsia aveva portato alla luce un secondo tumore maligno o una lesione benigna è stata proseguita la terapia in atto prima del sospetto di recidiva o progressione e in 2 pazienti di 4 con guadagno di espressione di ER è stata impiegata ormonoterapia anziché chemioterapia. In dieci pazienti la terapia pianificata prima della biopsia non è stata modificata, nonostante la discordanza di ER o HER2 rilevata, ma le ragioni di questa decisione non sono riportate dagli autori.

Altro importante studio prospettico è lo studio BRITS, condotto da Thompson et al. [59] su 205 pazienti affette da carcinoma della mammella e arruolate per essere sottoposte a biopsia di lesioni sospette per recidiva locoregionale o metastasi a distanza. In definitiva 137 coppie di tessuto di tumore primitivo e corrispondente recidiva sono state valutate, rivelando tassi di discordanza recettoriale del 10% per ER (11 casi di perdita e 3 di guadagno di positività), 25% per PgR e 3% per HER2 (in un caso da HER2 positivo a HER2 negativo e in tre casi il contrario). Il cambiamento nello status recettoriale ha portato al cambiamento della terapia, rispetto a quella pianificata prima del risultato della biopsia, in 24 pazienti (17.5%).

Per quanto riguarda l'effetto della discordanza recettoriale sull'efficacia delle terapie mirate, i dati disponibili sono limitati e spesso contraddittori, oltre che provenienti principalmente da studi retrospettivi e condotti su numeri di pazienti molto contenuti. Una questione ancora aperta di particolare interesse è l'efficacia del trastuzumab e delle altre terapie her-2 mirate nei casi di discordanza di espressione di HER2.

Nello studio DESTINY [61], a un follow-up mediano di dodici mesi, non è emersa nessuna differenza in termini di tempo al fallimento della terapia o di sopravvivenza globale tra le pazienti con tumore con o senza discordanza di HER2 e/o di recettori ormonali, includendo anche i 6 pazienti con acquisizione di HER2 che avevano ricevuto trastuzumab e i 2 pazienti tra i 4 con guadagno di ER che avevano ricevuto terapia ormonale. Questo risultato, per quanto limitato a causa del piccolo numero di pazienti e dell'assenza di randomizzazione, potrebbe suggerire un reale effetto determinato dall'adeguamento della terapia.

Zidan e altri autori [90] hanno confrontato retrospettivamente coppie di campioni biotici di carcinomi mammari primitivi e metastasi di 58 pazienti, rilevando un tasso di discordanza di HER2 del 14% (perdita di iperespressione di HER2 in un caso e guadagno in 7 casi). Delle 7 pazienti con viraggio da HER2 negativo a positivo, tre sono decedute senza poter ricevere trastuzumab, mentre 4 hanno ricevuto una terapia a base di trastuzumab. In un caso (trastuzumab e vinorelbina) si è ottenuta una risposta completa, in un caso (trastuzumab in monoterapia) una risposta parziale, in un caso (trastuzumab in monoterapia) una risposta minima e in un caso (regime terapeutico non specificato) una progressione di malattia.

Nello studio retrospettivo di Guarneri et al. [91], condotto su 75 pazienti con biopsia del carcinoma primitivo e della corrispondente metastasi, in 7 su 10 pazienti con guadagno di HER2 era stata impiegato trastuzumab (in due casi trastuzumab seguito da lapatinib), con una durata mediana di trattamento di 26 settimane (range 2-108 settimane). Tre di sette pazienti con conversione da ER negativo a ER positivo avevano ricevuto una terapia ormonale, con una durata mediana del trattamento di 104 settimane (range 48-128 settimane). La lunga durata dei trattamenti mirati anti-Her-2 e della terapia ormonale nelle pazienti con guadagno di HER2 e ER a livello della recidiva, paragonabile alla durata di queste terapie nei casi di pazienti con neoplasie HER2 positive e ER positive, ha fatto ipotizzare agli autori che queste pazienti avessero ricavato un beneficio clinico dall'adozione di un trattamento mirato.

Nello studio retrospettivo di Botteri et al. [92] diciotto pazienti su 101 affette da carcinoma mammario metastatico e sottoposte a biopsia epatica avevano mostrato, a livello della lesione metastatica, una conversione dello status di ER e/o HER2 che aveva giustificato un adeguamento della terapia (iperespressione di HER2 in 12 pazienti, acquisizione di ER in 5 pazienti e entrambe le condizioni in un caso). Quattordici di queste pazienti avevano ricevuto trastuzumab e 3 una terapia ormonale. Per queste 18 pazienti si è constatato una sopravvivenza significativamente maggiore rispetto alle restanti 82 (HR=0,55; 95% CI 0,28-1,10) e, soprattutto, rispetto alle 13 pazienti nelle quali la biopsia epatica aveva mostrato perdita di espressione di ER o di iperespressione di HER2, fattori predittivi di risposta alle terapie ormonali e anti-Her-2 (HR=0,19; 95% CI 0,06-0,62). Questo miglioramento di sopravvivenza potrebbe essere in parte

attribuibile all'impiego di farmaci mirati in pazienti con guadagno di ER e HER2, che in precedenza non vi sarebbero state candidate, confermando la loro efficacia in questo scenario.

Negli studi di Dieci et al. [81] e Niikura et al. [88] la perdita di positività per HER2 a livello della recidiva è stata associata ad un peggioramento dell'outcome, nonostante la prosecuzione, in alcuni casi, del trastuzumab (in 4 casi nello studio di Dieci e in 7 in quello di Niikura). Questo dato suggerisce che il trastuzumab perda efficacia nei pazienti con perdita di HER2 nel corso della progressione tumorale, nonostante la presenza di iperespressione/amplificazione a livello del primitivo.

Nello studio di Lower et al. [75] l'espressione di HER2 a livello di una recidiva di carcinoma mammario è stata valutata retrospettivamente in 382 pazienti e confrontata con quella a livello del primitivo: 37 pazienti avevano avuto un guadagno di HER2 e 90 una sua perdita. Gli autori hanno poi confrontato i dati relativi alla sopravvivenza dei 4 gruppi di pazienti (HER2-/HER2-, HER2+/HER2+, HER2-/HER2+, HER2+/HER2-), riscontrando come la migliore sopravvivenza si fosse avuta nelle pazienti con primitivo HER2 negativo e metastasi HER2 positiva e come questo vantaggio di sopravvivenza si annullasse escludendo dall'analisi tutte le pazienti che avevano ricevuto trastuzumab come terapia per la malattia metastatica, indipendentemente dallo status del primitivo e della recidiva. Questo risultato sembrerebbe indicare un ruolo preminente del trastuzumab nella terapia delle pazienti con metastasi HER2 positiva ma neoplasia primitiva HER2 negativa.

Nello studio di Chang et al. [93] cinquantasei pazienti sono state incluse: il 21,4% (12 pazienti) aveva neoplasie positive per i recettori ormonali a livello del primitivo e negative a livello metastatico e il 3,6% (2 pazienti) soffriva di una malattia negativa per i recettori ormonali a livello del tumore primitivo convertitasi a HR positiva a livello della recidiva. Una conversione da HER2 negativo a HER2 positivo è stata osservata in 5 pazienti, mentre in 2 casi il cambiamento si era verificato nel senso opposto. Tutte le pazienti con conversione positiva di HER2 avevano ricevuto una terapia contenente trastuzumab, conducendo a risposta parziale in due casi, stabilità di malattia in un caso e progressione di malattia in due casi (ORR 40%; 95% CI 11,8%-76,9%). Nel gruppo di pazienti con malattia concorde HER2+/HER2+ (13 casi)

si erano invece verificati 2 casi di risposta completa, 7 casi di risposta parziale e 2 casi di stabilità di malattia (ORR 69,2%; 95% CI 42,4–87,3%). La differenza di ORRs tra i due gruppi non è stata statisticamente significativa ( $P=0,169$ ). La sopravvivenza globale mediana nel gruppo HER2+/HER2+ è stata di 60,9 mesi, mentre quella del gruppo HER2-/HER2+ di 51,6 mesi, differenza non statisticamente significativa ( $P=0,434$ ). Per le pazienti trattate con trastuzumab, invece, la sopravvivenza globale mediana del gruppo HER2+/HER2+ è risultata essere significativamente superiore rispetto a quella del gruppo HER2-/HER2+ (31,8 mesi contro 11 mesi;  $P=0,023$ ) e un andamento simile si è avuto anche per la sopravvivenza libera da progressione (PFS mediana 16,9 mesi nel gruppo HER2+/HER2+ contro 7,6 mesi nelle pazienti HER2-/HER2+;  $P=0,004$ ). Questi risultati potrebbero essere la conseguenza di una ridotta risposta al trastuzumab nei casi di neoplasia positiva per HER2 solo a livello sistemico, ma inizialmente negativa.

Nello studio di Fabi et al.[94] lo status di HER2 è stato studiato in 137 carcinomi mammari primitivi e nelle loro corrispondenti metastasi metacrone, rivelando una discordanza in 14 casi (il 10%): 12 con conversione positiva e 2 con conversione negativa. Diciotto pazienti tra quelle con metastasi HER2 positive, tra cui 6 delle 12 con guadagno di HER2, erano state sottoposte a terapia con trastuzumab al momento della progressione. Nelle 12 pazienti con malattia HER2+/HER2+ il tempo alla progressione mediano è risultato maggiore rispetto alle 6 pazienti del gruppo HER2-/HER2+, anche se non in maniera statisticamente significativa (11 mesi contro 8 mesi).

#### **4. RAZIONALE**

I farmaci anti Her-2 (pertuzumab, trastuzumab, lapatinib, T-DM1) costituiscono il cardine della terapia sistemica della neoplasia mammaria metastatica HER2 positiva.

Non sono disponibili, tuttavia, ad oggi, dati scientificamente validi che rispondano alla domanda se questi farmaci siano o meno efficaci nel tumore mammario metastatico HER2 positivo ma HER2 negativo alla diagnosi.

Sono stati condotti alcuni studi che hanno cercato di chiarirne il loro ruolo in questo particolare sottogruppo di pazienti, tuttavia si tratta per la maggior parte di analisi retrospettive o comunque condotte su piccoli campioni e con risultati qualitativamente e quantitativamente scarsi e spesso contrastanti tra loro.

Rimane, però, ad oggi, la necessità di dare una risposta a tale domanda, per le possibili implicazioni che ne deriverebbero.

Qualora, infatti, i farmaci anti Her-2 dovessero dimostrarsi per niente o poco efficaci nel trattamento di quei casi di carcinoma mammario inizialmente HER2 negativo convertitosi solo in un secondo momento, a livello metastatico, a HER2 positivo, si potrebbe evitare di proporre al paziente terapie inappropriate, che non darebbero alcun beneficio sul piano clinico e comporterebbero, piuttosto, un rischio ingiustificato di insorgenza di effetti collaterali.

Ciò, inoltre, avrebbe anche ripercussioni di tipo economico, poiché si potrebbe ottenere un'importante riduzione della spesa per il Servizio Sanitario Nazionale, dati i costi elevati di queste terapie.

Solo studi più vasti, prospettici, di fase III, multicentrici, potrebbero, probabilmente, aiutarci a risolvere definitivamente la questione, ma ciò presenta numerose difficoltà organizzative e importanti implicazioni etiche, dal momento che non sarebbe corretto randomizzare pazienti con neoplasia mammaria metastatica HER2 positiva, anche se HER2 negativa all'esordio, a ricevere o meno una terapia anti Her-2, sulla base delle conoscenze attuali.

La conduzioni di ulteriori studi di tipo retrospettivo, condotti su una casistica più ampia di pazienti, potrebbe, magari, contribuire a creare una base di conoscenze più solida per orientare, in futuro, la decisione terapeutica, oltre che fornire delle evidenze fondate che giustificino lo sviluppo di studi prospettici di fase III eticamente corretti.

## 5. OBIETTIVI

Gli obiettivi dello studio presentato in questa tesi sono:

- Obiettivo primario: valutare in maniera retrospettiva il tasso di variazione intra individuale di espressione di ER, PgR e HER2 tra tumore primitivo e metastatico, in un gruppo di pazienti affetti da carcinoma mammario metastatico o localmente avanzato che siano stati sottoposti ad almeno una biopsia o chirurgia a livello della metastasi.
- Obiettivi secondari:
  - Descrivere le caratteristiche dei pazienti
  - Valutare la fattibilità della biopsia a livello metastatico.
  - Confrontare, retrospettivamente, l'efficacia di terapie contenenti farmaci anti Her-2 nei casi di neoplasia HER2 positiva in maniera concorde tra primitivo e metastasi e nei casi con conversione positiva dello status di HER2, in termini di risposta ottenuta e sopravvivenza libera da progressione.
  - Confrontare, in questi due gruppi di pazienti, l'efficacia del T-DM1, un anticorpo-farmaco coniugato che contiene trastuzumab, in termini di risposta ottenuta e sopravvivenza libera da progressione.

## **6. PAZIENTI E METODI**

### **6.1. Criteri di inclusione**

Nel nostro studio sono stati inclusi pazienti di entrambi i sessi, con diagnosi di carcinoma della mammella in stadio avanzato, sottoposti, in qualsiasi momento della loro storia clinica, a biopsia a carico di una o più sedi di sospetta recidiva di malattia, sia locale, regionale o a metastasi a distanza, e pazienti sottoposti ad asportazione chirurgica della stessa lesione, con conferma istologica di recidiva di carcinoma mammario. Abbiamo incluso nella nostra analisi pazienti seguiti presso le U.O. Oncologia Medica e Senologia della Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana "S. Chiara", durante qualsiasi intervallo di tempo e per i quali fossero disponibili, in cartella clinica, i dettagli degli esami istopatologici, compresi i profili di espressione di ER, PgR e HER2, sia del carcinoma primitivo che della recidiva- metastasi.

## **6.2. Metodi di ricerca e di valutazione**

Abbiamo individuato i nostri pazienti principalmente attraverso lo svolgimento della normale attività ambulatoriale di follow-up del carcinoma mammario e di day hospital per terapie oncologiche.

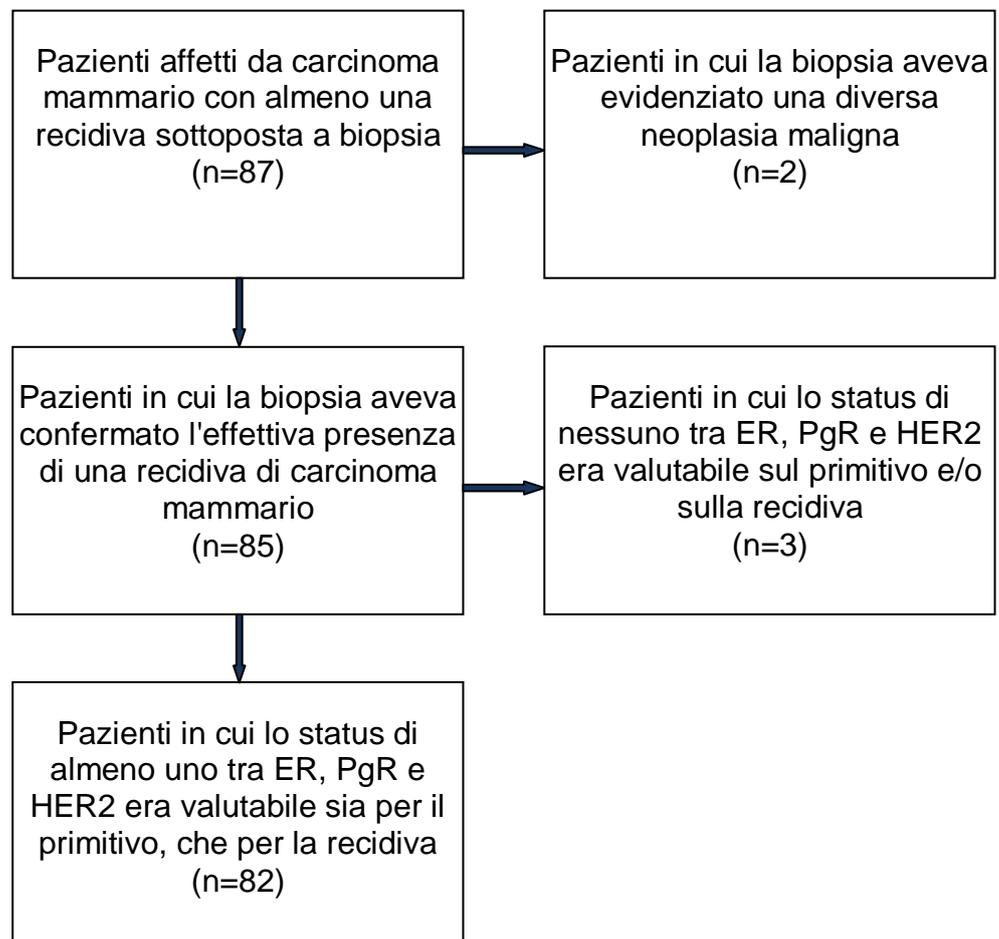
Altri casi ancora sono stati individuati generando, tramite il software Prescrivo.web, elenchi di pazienti che fossero stati sottoposti a terapie secondo protocolli usati per carcinoma mammario metastatico o localmente avanzato HER-2 positivo, nel periodo 01/01/2010-26/05/2016 e poi inserendo i nominativi ottenuti nella striscia di ricerca del software Winsap, per ricercare eventuali referti istologici prodotti dalla U.O. Anatomia Patologica della Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana e riferibili a recidive di malattia.

Abbiamo individuato 87 pazienti con diagnosi di carcinoma della mammella sottoposte a biopsia per sospetta recidiva/metastasi.

Due (2,3%) pazienti sono state escluse poiché la biopsia della sospetta recidiva si è rivelata essere una seconda neoplasia maligna primitiva: un colangiocarcinoma in un caso di biopsia epatica (1,15%) e un angiosarcoma in un caso di sospetta recidiva locale (1,15%).

Altre tre pazienti (3,4%) sono state escluse dalla nostra indagine poiché il referto istologico non conteneva informazioni sullo status di ER, di PgR e di HER2, in due casi (2,3%) e sul tumore primitivo nel restante caso (1,15%).

Figura 1



Degli 82 casi individuati abbiamo raccolto i seguenti dati:

- dati anagrafici;
- stadio clinico iniziale (quando disponibile);
- istotipo, grado di differenziazione, indice proliferativo e status recettoriale (ER, PgR, Her-2) del tumore primitivo, valutati sia su biopsie eseguite prima della chirurgia, se disponibili in cartella clinica, sia sul pezzo operatorio (esclusi i casi in cui l'intervento chirurgico di asportazione del carcinoma non fosse stato eseguito);
- data dell'intervento chirurgico, tipo di intervento e stadio patologico;
- terapie neoadiuvanti e/o adiuvanti, schema terapeutico e durata;
- data di prima progressione e sopravvivenza libera da malattia;

- data di esecuzione e sede della biopsia;
- caratteristiche istologiche, status di ER, PgR, Her-2, grado istologico e indice proliferativo delle biopsie;
- evidenza o meno di discordanza nell'espressione dei recettori ormonali o di HER2 tra tumore primitivo e recidiva e direzione dell'eventuale viraggio (da positivo a negativo o viceversa);
- eventuale trattamento con farmaci anti HER2;
- tipo di trattamento ricevuto dopo la biopsia, schema terapeutico, date di inizio e fine del trattamento, migliore risposta ottenuta (tra RC, RP, RM, SD, PD), data di prima progressione e sopravvivenza libera da progressione;
- eventuale trattamento con T-DM1 dopo la biopsia: data di inizio e fine, migliore risposta ottenuta (tra RC, RP, RM, SD, PD), data di prima progressione e sopravvivenza libera da progressione;
- cenni di altre terapie mediche somministrate;
- data dell'ultima visita di follow-up;
- data del decesso, nella sua eventualità, se reperibile;

Le informazioni così raccolte sono state riunite in un database per il lavoro successivo.

Lo status di ER, PgR e HER2 è stato ottenuto retrospettivamente dai referti istopatologici disponibili per i pazienti. ER e PgR erano stati valutati mediante immunistochimica, mentre HER2 tramite immunistochimica e metodiche di ibridizzazione in situ. Per l'espressione dei recettori ormonali abbiamo utilizzato una soglia di positività del 1%, intesa come percentuale di cellule colorate alla IHC. I campioni istologici sono stati considerati HER2 positivi nel caso di uno score 3+ alla IHC o di evidenza di amplificazione genica alla FISH o altre tecniche di ibridizzazione in situ utilizzate.

## 7. RISULTATI

### 7.1. Caratteristiche dei pazienti

Tabella 2

<b>Numero di pazienti</b>		82
<b>Sesso</b>		
M		1 (1,2%)
F		81 (98,8%)
<b>Età alla prima diagnosi (anni)</b>		
Media/mediana		50,2/49,5
range		30-76
<b>Disease-Free Survival (mesi)</b>		
Medio/mediano		56/36
Range		0-300
<b>Stadio iniziale</b>		
I-II		54 (65,9%)
III		22 (26,8%)
IV		5 (6,1%)
Non noto		1 (1,2%)
<b>Chemioterapia neoadiuvante</b>		
Sì		17 (20,7%)
No		65 (79,3%)
<b>Chirurgia del primitivo</b>		
Sì		80 (97,6%)
No		2 (2,4%)
<b>Terapie adiuvanti</b>		
<b>Chemioterapia</b>		47 (57,3%)
<i>Con antracicline</i>		36 (43,9%)
<i>Con taxani</i>		22 (26,8%)
Trastuzumab		14 (17,1%)
Pertuzumab		1 (1,2%)
<b>Ormonoterapia</b>		53 (64,7%)

**Tabella 3**

<b>Sede della biopsia/escissione chirurgica</b>	
<b>Ripetizioni locoregionali</b>	24 (29,3%)
<b>Metastasi a distanza</b>	58 (70,7%)
<i>Fegato</i>	29 (35,4%)
<i>Ossa</i>	12 (14,6%)
<i>Polmone</i>	4 (4,9%)
<i>Pleura</i>	3 (3,7%)
<i>Encefalo</i>	2 (2,4%)
<i>Cute cranio</i>	1 (1,2%)
<i>Tiroide</i>	1 (1,2%)
<i>Parete pelvica</i>	1 (1,2%)
<i>Ovaio</i>	1 (1,2%)
<i>Linfonodi extraregionali</i>	4 (4,9%)

## **7.2. Fattibilità della biopsia/chirurgia sulla metastasi**

La maggior parte delle biopsie, relativamente alle metastasi a distanza, era stata eseguita, in ordine di frequenza, a carico di fegato, ossa e polmone, riflettendo da un lato le principali sedi di metastatizzazione del carcinoma mammario e, dall'altro, la diversa accessibilità delle varie strutture anatomiche alla esecuzione di una biopsia.

In nessun caso sono state riportate complicanze successivamente a questa procedura.

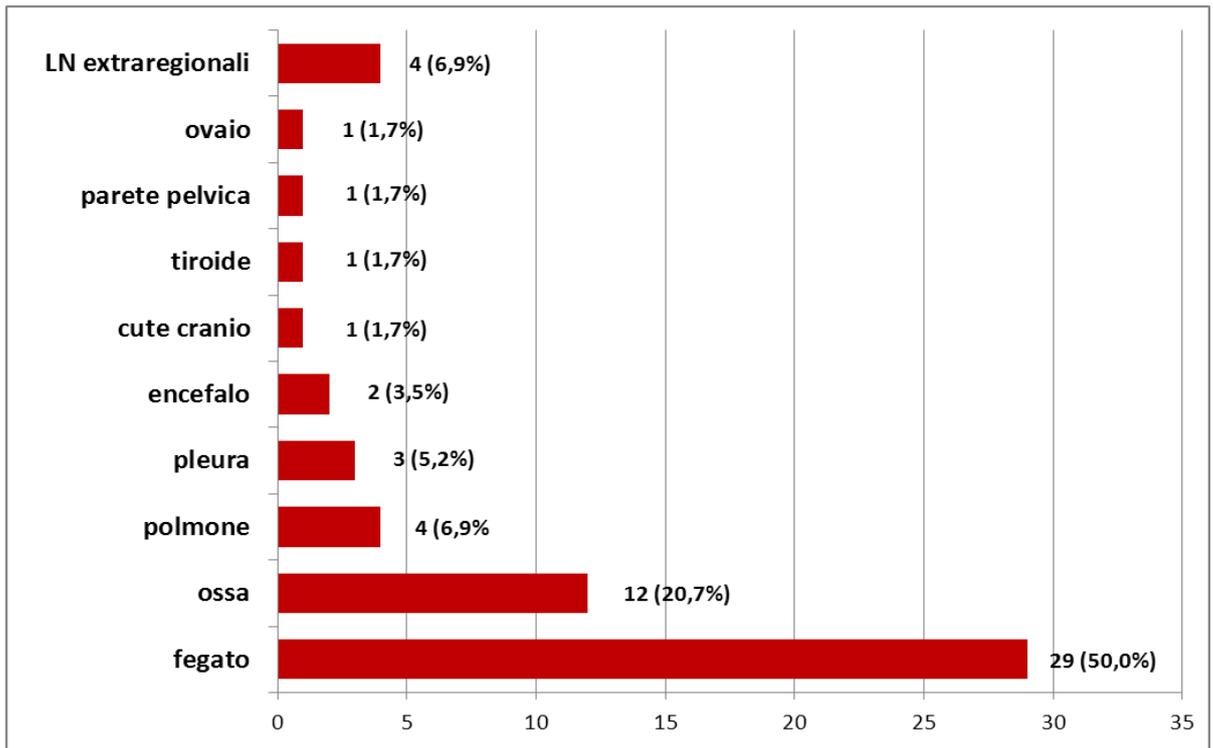
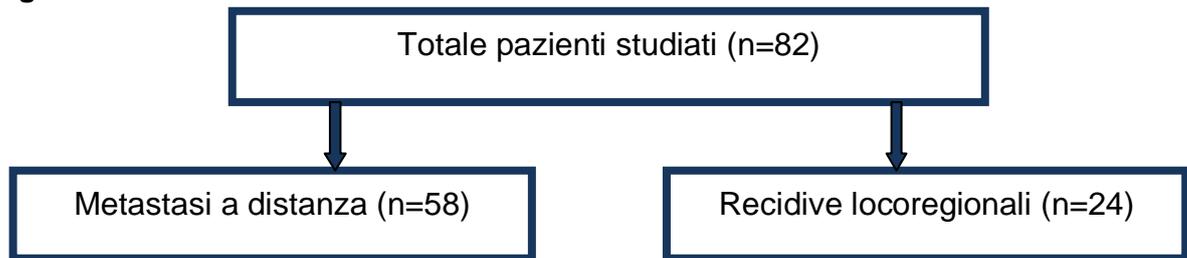


Grafico 1: sedi di biopsia sulla metastasi a distanza (tot=58)

### 7.3. Confronto tra lo status recettoriale dei tumori primitivi e corrispondenti recidive

Per la valutazione della variabilità dell'espressione recettoriale tra primitivo e recidiva di malattia abbiamo considerato sia i casi di biopsia di una metastasi a distanza che i casi di recidiva locoregionale, mentre per le valutazioni successive ci siamo invece concentrati sul primo gruppo.

**Figura 2**



- |   |   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Casi valutabili per la variabilità di espressione di ER = 56</li><li>• Casi valutabili per la variabilità di espressione di PgR = 56</li><li>• Casi valutabili per la variabilità di espressione di HER2 = 49</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Casi valutabili per la variabilità di espressione di ER = 24</li><li>• Casi valutabili per la variabilità di espressione di PgR = 23</li><li>• Casi valutabili per la variabilità di espressione di HER2 = 16</li></ul> |
|---|---|

### **7.3.1. Variazione di espressione di ER**

In due dei 58 pazienti con biopsia di una metastasi a distanza, la presenza o meno di discordanza nell'espressione di ER tra questa e il corrispondente primitivo non era valutabile. Dei 56 pazienti rimasti, 47 avevano un carcinoma primitivo ER positivo (83,9%), mentre 9 (16,1%) un primitivo ER negativo. Le metastasi erano invece ER positive in 45 casi (80,4%) e ER negative in 11 casi (19,6%). Una variazione dello status di ER si era verificato in 8 dei 56 casi (14,3%): da ER positivo verso ER negativo in 5 casi (8,9%) e nel senso contrario in 3 casi (5,4%). Complessivamente 10,6% dei tumori primitivi ER positivi aveva virato verso la perdita di espressione di ER a livello metastatico, mentre il 33,3% dei tumori primitivi ER negativi aveva guadagnato espressione di ER.

**Tabella 4**

Carcinomi primitivi totali	56
ER+	47 (83,9%)
ER-	9 (16,1%)
Metastasi totali	56
ER+	45 (80,4%)
ER-	11 (19,6%)

**Tabella 5**

	Discordanza di ER	
	Metastasi ER+	Metastasi ER-
Primitivo ER+	42 (75,0%)	5 (8,9%)
Primitivo ER-	3 (5,4%)	6 (10,7%)
Totale casi discordi (tasso totale di discordanza)		8 (14,3%)
Totale casi concordi (tasso totale di concordanza)		48 (85,7%)

Relativamente, invece, alle recidive locoregionali, 13 pazienti (54,2%) avevano primitivi ER positivi e 11 pazienti (45,8%) primitivi ER negativi. In 3 casi (12,5%) si era verificato un cambiamento di espressione di ER, con perdita e guadagno rispettivamente in 1 e in 2 casi. Il 7,7% dei casi con primitivo ER positivo aveva virato verso ER negativo a livello della recidiva e il contrario era accaduto nel 18,2% dei pazienti con primitivo ER negativo.

**Tabella 6**

Carcinomi primitivi totali	24
ER+	13 (54,2%)
ER-	11 (45,8%)
Recidive totali	24
ER+	14 (58,3%)
ER-	10 (41,7%)

**Tabella 7**

	Discordanza di ER	
	Recidive ER+	Recidive ER-
Primitivo ER+	12 (50,0%)	1 (4,2%)
Primitivo ER-	2 (8,3%)	9 (37,5%)
Totale casi discordi (tasso totale di discordanza)		3 (12,5%)
Totale casi concordi (tasso totale di concordanza)		21 (87,5%)

### **7.3.2. Variazione di espressione di PgR**

In due dei 58 pazienti con biopsia di una metastasi a distanza, la variazione di espressione di PgR non era valutabile.

Dei 56 pazienti analizzati per l'espressione di PgR, 45 avevano un tumore primitivo PgR positivo (80,4%) e 11 un primitivo PgR negativo (19,6%). Trentuno pazienti avevano metastasi PgR positiva (55,3%) e 25 (44,7%) metastasi PgR negative. In 20 casi (35,7%) si era verificata una variazione di espressione del recettore, con una perdita in 17 di questi (30,4%) e un guadagno nei restanti 3 (5,3%). Dei 45 pazienti con primitivo PgR positivo il 37,8% era passato a PgR negativo a livello della metastasi e degli 11 pazienti con primitivo PgR negativo la conversione positiva si era verificata nel 27,3% casi.

**Tabella 8**

Carcinomi primitivi totali	56
PgR+	45 (80,4%)
PgR-	11 (19,6%)
Metastasi totali	56
PgR+	31 (55,3%)
PgR-	25 (44,7%)

**Tabella 9**

	Discordanza di PgR	
	Metastasi PgR+	Metastasi PgR-
Primitivo PgR+	28 (50,0%)	17 (30,4%)
Primitivo PgR-	3 (5,3%)	8 (14,3%)
Totale casi discordi (tasso totale di discordanza)		20 (35,7%)
Totale casi concordi (tasso totale di concordanza)		36 (64,3%)

Considerando le recidive locoregionali, su 24 casi uno non era valutabile per la variazione di espressione di PgR. Delle rimanenti 23 pazienti, 10 (43,5%) avevano primitivo PgR positivo e 13 (56,5%) primitivo PgR negativo. Il 40,0% dei casi di carcinoma primitivo PgR positivo aveva perso l'espressione del recettore a livello della recidiva e il 23,1% dei casi di primitivo PgR negativo ne aveva guadagnato l'espressione a livello della recidiva. Complessivamente una variazione di espressione di PgR si era verificata in 7 pazienti (30,4%), in 4 casi verso la perdita (17,4%) e in 3 casi verso un guadagno (13,0%)

**Tabella 10**

Carcinomi primitivi totali	23
PgR+	10 (43,5%)
PgR-	13 (56,5%)
Recidive totali	23
PgR+	9 (39,1%)
PgR-	14 (60,9%)

**Tabella 11**

	Discordanza di PgR	
	Recidive PgR+	Recidive PgR-
Primitivo PgR+	6 (26,1%)	4 (17,4%)
Primitivo PgR-	3 (13,0%)	10 (43,5%)
Totale casi discordi (tasso totale di discordanza)		7 (30,4%)
Totale casi concordi (tasso totale di concordanza)		16 (69,6%)

### 7.3.3. Variazione di espressione di HER2

Per quanto riguarda HER2, il suo status non era valutabile relativamente al tumore primitivo e/o alla metastasi in 9 casi di metastasi a distanza, che abbiamo dovuto escludere. In definitiva la variazione di espressione di HER2 è stata analizzata su 49 pazienti, di cui 11 con tumore primitivo HER2 positivo (22,4%) e 38 (77,6%) con primitivo HER2 negativo. Ventisei casi (53,1%) avevano metastasi HER2 positive e 23 (46,9%) metastasi HER2 negative. In 17 casi (34,7%) si era avuta un' inversione di espressione di HER2, con una sua negativizzazione in un caso (2,0%) e un guadagno di positività in 16 casi (32,7%). Il 9,1% dei pazienti con primitivo HER2 positivo aveva avuto un viraggio verso HER2 negativo a livello metastatico e il 42,1% dei primitivi HER2 negativi aveva acquisito positività per HER2 a questo livello.

**Tabella 12**

Carcinomi primitivi totali	49
HER2+	11 (22,4%)
HER2-	38 (77,6%)
Metastasi totali	49
HER2+	26 (53,1%)
HER2-	23 (46,9%)

**Tabella 13**

	Discordanza di HER2	
	Metastasi HER2+	Metastasi HER2-
Primitivo HER2+	10 (20,4%)	1 (2,0%)
Primitivo HER2-	16 (32,7%)	22 (44,9%)
Totale casi discordi (tasso totale di discordanza)		17 (34,7%)
Totale casi concordi (tasso totale di concordanza)		32 (65,3%)

Prendendo in considerazione le recidive locoregionali, solo in 16 casi su 24 abbiamo potuto valutare l'entità della variazione di espressione di HER2, mentre in 8 casi lo status di HER2 a livello del primitivo e/o della recidiva locale

o regionale non era disponibile.

Su 16 pazienti analizzate, 9 (56,3%) avevano primitivo HER2 positivo e le restanti 7 (43,7%) avevano tumore primitivo HER2 negativo. All'interno del primo gruppo, nessuna aveva perso l'espressione di HER2 a livello della recidiva, mentre un guadagno di espressione si era verificato per 4 donne appartenenti al secondo gruppo (57,1%). Complessivamente si erano verificati 4 casi di viraggio nell'espressione di HER2 (25,0%), tutti da negativo a positivo.

**Tabella 14**

Carcinomi primitivi totali	16
HER2+	9 (56,2%)
HER2-	7 (43,8%)
Recidive totali	16
HER2+	13 (81,2%)
HER2-	3 (18,8%)

**Tabella 15**

	Discordanza di HER2	
	Recidive HER2+	Recidive HER2-
Primitivo HER2+	9 (56,2%)	0 (0,0%)
Primitivo HER2-	4 (25,0%)	3 (18,8%)
Totale casi discordi (tasso totale di discordanza)		4 (25,0%)
Totale casi concordi (tasso totale di concordanza)		12 (75,0%)

#### **7.4. Risposta a terapie contenenti farmaci anti Her-2**

Tra i pazienti inclusi nello studio e sottoposti a biopsia/asportazione di una metastasi a distanza (n=58) sono stati selezionati quelli che, successivamente a questa procedura, fossero stati sottoposti ad almeno un trattamento contenente farmaci anti Her-2. Abbiamo in questo modo individuato un gruppo di 27 pazienti. Due casi sono stati esclusi dalla valutazione, poiché non era possibile stabilire con certezza se vi fosse stata o meno una variazione nell'espressione di HER2, mancandone la valutazione a livello del primitivo e/o della metastasi.

Le 25 pazienti rimaste sono state suddivise in due gruppi: quello dei casi in cui era stata osservata una variazione nello status di HER2, con guadagno di iperespressione a livello della recidiva (16 pazienti, età media alla diagnosi 51,7 anni, range 38-72) e quello dei casi con malattia HER2 positiva in maniera concorde tra carcinoma primitivo e recidiva (9 pazienti, età media alla diagnosi 55,1 anni, range 42-76). Per entrambi i gruppi abbiamo valutato la miglior risposta obiettiva ottenuta, come indicata nella cartella clinica e la sopravvivenza libera da progressione (PFS Progression Free Survival, calcolata come intervallo di tempo tra l'inizio della terapia e la prima evidenza strumentale certa di progressione) relativi alla prima e alla seconda, se effettuata e valutabile, linea di terapia anti Her-2 cui le pazienti fossero state sottoposte in un momento successivo al prelievo biotico. Per i casi di pazienti ancora non progredite al momento della stesura di questa tesi, abbiamo calcolato la PFS al momento della valutazione. Abbiamo poi eseguito la stessa operazione rispetto alla sola terapia con T-DM1, effettuata in qualunque momento dopo la biopsia/asportazione chirurgica della recidiva.

##### **7.4.1. Prima terapia medica anti Her-2 eseguita dopo la biopsia**

Nel gruppo con acquisizione di iperespressione di HER2, il tipo di risposta al trattamento era valutabile in 15 casi, tra i quali abbiamo osservato 2 risposte complete (13,3%), 3 risposte parziali (20,0%), stabilità di malattia in 7 pazienti (46,7%) e progressione di malattia in 3 casi (20,0%). In un caso di risposta completa era stato somministrato paclitaxel-pertuzumab-trastuzumab, mentre nell'altro docetaxel-pertuzumab-trastuzumab, così come nei tre casi di risposta parziale. Le sette donne la cui malattia si era mantenuta stabile erano state

sottoposte a vinorelbina-trastuzumab in 3 casi, docetaxel-pertuzumab-trastuzumab in 1 caso, paclitaxel-pertuzumab-trastuzumab in 1 caso e paclitaxel-trastuzumab e anastrozolo-trastuzumab nei restanti 2 casi. Due delle donne andate incontro a progressione durante la terapia avevano ricevuto paclitaxel-pertuzumab-trastuzumab, mentre l'altra vinorelbina-trastuzumab.

Nel gruppo di pazienti non andate incontro a cambiamento dell'espressione di HER2, in un caso la risposta alla terapia non era valutabile per mancanza di informazioni in cartella clinica, mentre in un altro tutte le recidive di malattia erano state asportate chirurgicamente e, al momento dell'inizio della terapia, non vi erano lesioni valutabili rispetto alle quali giudicarne l'efficacia. Delle restanti 7 pazienti, una (14,3%) aveva avuto una risposta completa, ricevendo T-DM1. In 3 pazienti (42,9%) abbiamo riscontrato una risposta parziale, dopo terapia con paclitaxel-pertuzumab-trastuzumab in 2 di esse e con docetaxel-pertuzumab-trastuzumab nel rimanente caso. In un caso la malattia si è mantenuta stabile (14,3%) dopo terapia con fulvestrant-trastuzumab e in due donne, sottoposte a trattamento con vinorelbina-trastuzumab e capecitabina-lapatinib, si era verificata progressione di malattia (28,6%).

**Tabella 16**

<b>Prima terapia con anti Her-2 eseguita dopo la biopsia.</b>			
<b>Pazienti con variazione di HER2 (n=16)</b>		<b>Pazienti senza variazione di HER2 (n=9)</b>	
Risposta non valutabile	1	Risposta non valutabile	1
Chirurgia radicale su metastasi	0	Chirurgia radicale su metastasi	1
Risposta valutabile	15	Risposta valutabile	7
RC	2 (13,3%)	RC	1 (14,3%)
RP	3 (20,0%)	RP	3 (42,9%)
RM	0 (0,0%)	RM	0 (0,0%)
SD	7 (46,7%)	SD	1 (14,3%)
PD	3 (20,0%)	PD	2 (28,6%)
<b>Tasso di risposta</b>	<b>33,3%</b>	<b>Tasso di risposta</b>	<b>57,1%</b>

Tabella 17

Regimi terapeutici utilizzati e tipo di risposta					
Pazienti con variazione di HER2 (n=15)			Pazienti senza variazione di HER2 (n=7)		
<b>RC</b>	Paclitaxel-trastuzumab-pertuzumab	1	<b>RC</b>	T-DM1	1
	Docetaxel-trastuzumab-pertuzumab	1	<b>RP</b>	Paclitaxel-trastuzumab-pertuzumab	2
<b>RP</b>	Docetaxel-trastuzumab-pertuzumab	3		Docetaxel-trastuzumab-pertuzumab	1
<b>SD</b>	Vinorelbina-trastuzumab	3	<b>SD</b>	Fulvestrant-trastuzumab	1
	Docetaxel-trastuzumab-pertuzumab	1	<b>PD</b>	Vinorelbina-trastuzumab	1
	Paclitaxel-trastuzumab-pertuzumab	1		Capecitabina-lapatinib	1
	Anastrozolo-trastuzumab	1			
	Paclitaxel-trastuzumab	1			
<b>PD</b>	Paclitaxel-trastuzumab-pertuzumab	2			
	Vinorelbina-trastuzumab	1			

Per quanto riguarda la sopravvivenza libera da progressione, questa non era valutabile in un caso nel gruppo con conversione positiva di HER2 e in un caso nel gruppo senza conversione di HER2, per assenza di dati in cartella clinica. Una paziente del gruppo con conversione positiva di HER2 e 4 pazienti con malattia HER2 positiva in maniera concorde tra il primitivo e la metastasi non avevano ancora sperimentato progressione di malattia al momento dello studio. Nel gruppo con conversione positiva di HER2 abbiamo, in definitiva, potuto valutare la PFS per 15 donne, sottoposte a terapia con vinorelbina-trastuzumab in 5 casi, a docetaxel-pertuzumab-trastuzumab in 4 casi, paclitaxel-pertuzumab-trastuzumab in 4 casi, paclitaxel-trastuzumab in un caso e anastrozolo-trastuzumab in un caso. Abbiamo calcolato una PFS media di 10,2 mesi e una PFS mediana di 9,3 mesi (range 2,8-20,7 mesi).

Nel gruppo con malattia HER2 positiva sia a livello del primitivo che della recidiva, abbiamo valutato la PFS di 8 donne, delle quali una aveva ricevuto vinorelbina-trastuzumab, due paclitaxel-trastuzumab-pertuzumab, una docetaxel-trastuzumab-pertuzumab, una fulvestrant-trastuzumab, una

capecitabina-lapatinib, una T-DM1 e una trastuzumab. La PFS media è risultata di 13,9 mesi, mentre quella mediana di 9,0 mesi (range 2,9-43,8 mesi).

Tabella 18

<b>Prima terapia con anti Her-2 eseguita dopo la biopsia</b>			
<b>Pazienti con variazione di HER2 (n=16)</b>		<b>Pazienti senza variazione di HER2 (n=9)</b>	
PFS non valutabile	1	PFS non valutabile	1
Paziente non in progressione al momento della valutazione	1	Paziente non in progressione al momento della valutazione	4
<b>PFS media/mediana (mesi)</b>	<b>10,2/9,3</b>	<b>PFS media/mediana (mesi)</b>	<b>13,9/9,0</b>
Range	2,8-20,7	Range	2,9-43,8

#### **7.4.2. Seconda terapia medica anti Her-2 eseguita dopo la biopsia**

Relativamente alla seconda terapia medica eseguita dopo la biopsia, nel gruppo con guadagno di positività per HER2 dodici donne vi erano state sottoposte e tra queste la risposta era valutabile in 10 casi, una volta esclusi quelli senza informazioni sufficienti in cartella clinica (un caso) e quelli dove la risposta non era ancora valutabile, per il poco tempo intercorso dall'inizio della terapia (un caso). In questo insieme di pazienti tre (30,0%) avevano ottenuto una risposta parziale, dopo aver ricevuto T-DM1, vinorelbina-trastuzumab e doxorubicina liposomiale Myocet®-trastuzumab, mentre per 2 pazienti (20,0%), sottoposte a T-DM1 e vinorelbina-trastuzumab, la malattia era rimasta stabile e per 5 pazienti (50,0%) la malattia era progredita nel corso del trattamento con fulvestrant-triptorelina-trastuzumab, in un caso, T-DM1 in 3 casi e T-DM1-sandostatina in un caso (quest'ultimo un caso di carcinoma mammario con differenziazione neuroendocrina).

Nel gruppo senza cambiamento di espressione di HER2, cinque pazienti avevano ricevuto una seconda terapia anti Her-2 dopo la biopsia, ma in un caso la risposta doveva ancora essere valutata al momento dell'esecuzione di questo studio e in un altro caso non vi erano dati disponibili. Tra i tre casi per i quali abbiamo potuto reperire il tipo di risposta ottenuta, abbiamo riscontrato una

risposta completa in una paziente (33,3%), trattata con lapatinib-capecitabina, una risposta parziale in una paziente (33,3 %), dove il trattamento adottato era stato paclitaxel-trastuzumab e una progressione di malattia nell'ultimo caso (33,3%), in seguito a terapia con capecitabina-trastuzumab.

Tabella 19

<b>Seconda terapia con anti Her-2 eseguita dopo la biopsia</b>			
<b>Pazienti con variazione di HER2 (n=12)</b>		<b>Pazienti senza variazione di HER2 (n=5)</b>	
Risposta non valutabile	2	Risposta non valutabile	2
Risposta valutabile	10	Risposta valutabile	3
RC	0 (0,0%)	RC	1 (33,3%)
RP	3 (30,0%)	RP	1 (33,3%)
RM	0 (0,0%)	RM	0 (0,0%)
SD	2 (20,0%)	SD	0 (0,0%)
PD	5 (50,0%)	PD	1 (33,3%)
<b>Tasso di risposta</b>	<b>30,0%</b>	<b>Tasso di risposta</b>	<b>66,7%</b>

Tabella 20

<b>Regimi terapeutici utilizzati e tipo di risposta</b>					
<b>Pazienti con variazione di HER2 (n=10)</b>			<b>Pazienti senza variazione di HER2 (n=3)</b>		
<b>RP</b>	T-DM1	1	<b>RP</b>	Capecitabina-lapatinib	1
	Vinorelbina-trastuzumab	1	<b>SD</b>	Paclitaxel-trastuzumab	1
	Doxorubicina liposomiale-trastuzumab	1	<b>PD</b>	Capecitabina-trastuzumab	1
<b>SD</b>	Vinorelbina-trastuzumab	1			
	T-DM1	1			
<b>PD</b>	Fulvestrant-triptorelina-trastuzumab	1			
	T-DM1	3			
	T-DM1-sandostatina	1			

Tra le pazienti con conversione positiva di HER2 per le quali abbiamo potuto

valutare la PFS (11 soggetti in tutto escludendo un caso senza dati sufficienti in cartella clinica) la PFS media è risultata essere di 4,8 mesi e la PFS mediana di 4,4 mesi (range 2,4-12,1 mesi). Le terapie utilizzate erano state T-DM1 in 5 casi, vinorelbina-trastuzumab in 2 casi, T-DM1-sandostatina in un caso, doxorubicina liposomiale-trastuzumab in un caso, lapatinib-capecitabina in un caso e fulvestrant-triptorelina-trastuzumab in un altro caso.

Tra le pazienti con status di HER2 concorde abbiamo, invece, potuto valutare la PFS in 4 casi, riscontrando un valore di PFS media di 5,9 mesi e uno di PFS mediana di 6,1 mesi (range 1,9-9,6 mesi). I trattamenti impiegati erano stati capecitabina-trastuzumab in una donna, capecitabina-lapatinib in due donne e paclitaxel-trastuzumab in un altro caso. In un caso la cartella clinica non riportava dati sufficienti e in uno la paziente non era ancora andata incontro a progressione, nel momento in cui abbiamo condotto la ricerca.

**Tabella 21**

<b>Seconda terapia con anti Her-2 eseguita dopo la biopsia</b>			
<b>Pazienti con variazione di HER2 (n=12)</b>		<b>Pazienti senza variazione di HER2 (n=5)</b>	
PFS non valutabile	1	PFS non valutabile	1
Paziente non in progressione al momento della valutazione	1	Paziente non in progressione al momento della valutazione	1
<b>PFS media/mediana (mesi)</b>	<b>4,8/4,4</b>	<b>PFS media/mediana (mesi)</b>	<b>5,9/6,1</b>
Range	2,4-12,1	Range	1,9-9,6

### **7.4.3. Terapia con T-DM1 dopo la biopsia della metastasi**

Successivamente ci siamo focalizzati sullo studio dell'efficacia del T-DM1 in questi due diversi gruppi di pazienti. Abbiamo raccolto tutti i casi di pazienti che, in un momento successivo a quello in cui il prelievo bioptico a carico della recidiva di malattia era stato effettuato, avevano ricevuto una terapia con T-DM1 e abbiamo confrontato la migliore risposta ottenuta e la sopravvivenza libera da malattia osservata con questo farmaco nell'insieme di pazienti con malattia inizialmente HER2 negativa a livello del tumore primitivo e divenuta HER2 positiva a livello della metastasi sottoposta a biopsia con quelle osservate nel

gruppo di pazienti senza cambiamento di espressione di HER2 a livello metastatico.

Nel primo gruppo il T-DM1 era stato somministrato in 11 pazienti, 7 delle quali lo avevano ricevuto come seconda linea di terapia anti Her-2 per malattia metastatica, mentre le altre 4 pazienti lo avevano ricevuto come linea anti Her-2 successiva alla seconda. In un caso la risposta ottenuta non poteva essere valutata. Tra i rimanenti 10 casi abbiamo osservato una risposta parziale (10,0%), una stabilità di malattia (10,0%) e 8 casi di progressione di malattia (80,0%). Inoltre la PFS, valutabile su 10 pazienti, è risultata compresa in un range tra 1,3 mesi e 5,4 mesi, con una PFS media di 3,4 mesi e una PFS mediana di 3,0 mesi. Tutte queste pazienti erano andate incontro a progressione al momento dell'analisi.

**Tabella 22**

<b>Pazienti con variazione di HER2 sottoposte a T-DM1 dopo biopsia della metastasi (n=11)</b>	
Come seconda linea di terapia anti Her-2	7
Come linea di terapia anti Her-2 oltre la seconda	4
Risposta non valutabile	1
Ancora da valutare	0
Risposta valutabile	10
RC	0 (0,0%)
RP	1 (10,0%)
RM	0 (0,0%)
SD	1 (10,0%)
PD	8 (80,0%)
<b>Tasso di risposta</b>	<b>10,0%</b>

**Tabella 23**

<b>Pazienti con variazione di HER2 sottoposte a T-DM1 dopo biopsia della metastasi (n=11)</b>	
PFS non valutabile	1
Pazienti non in progressione al momento della valutazione	0
<b>PFS media/mediana (mesi)</b>	<b>3,4/3,0</b>
Range	1,3-5,4

Nel secondo gruppo, quello delle pazienti con malattia HER2 positiva sia a livello del tumore primitivo che metastatico, il T-DM1 era stato somministrato in 5 casi: in 2 come seconda linea di terapia anti Her-2 somministrata per malattia metastatica e in 3 casi come linea di terapia anti Her-2 successiva alla seconda. In un caso la risposta non era ricavabile dalla cartella clinica e in un caso doveva ancora essere valutata al momento della stesura della tesi. Tra i rimanenti 3 casi abbiamo riscontrato una risposta completa (33,3%), una stabilità di malattia (33,3%) e una progressione di malattia (33,3%). Delle cinque pazienti di questo gruppo sottoposte a TDM1 in un caso la PFS non era valutabile e in 2 casi la progressione di malattia non si era ancora verificata al momento dello studio. La PFS media è risultata di 9,7 mesi e quella mediana di 7,0 mesi (range 0,3-24,5 mesi).

**Tabella 24**

<b>Pazienti senza variazione di HER2 sottoposte a T-DM1 dopo biopsia della metastasi (n=5)</b>	
Come seconda linea di terapia anti Her-2	2
Come linea di terapia anti Her-2 oltre la seconda	3
Risposta non valutabile	1
Ancora da valutare	1
Risposta valutabile	3
RC	1 (33,3%)
RP	0 (0,0%)
RM	0 (0,0%)
SD	1 (33,3%)
PD	1 (33,3%)
<b>Tasso di risposta</b>	<b>33,3%</b>

**Tabella 25**

<b>Pazienti senza variazione di HER2 sottoposte a T-DM1 dopo biopsia della metastasi (n=5)</b>	
PFS non valutabile	1
Pazienti non in progressione al momento della valutazione	2
<b>PFS media/mediana (mesi)</b>	<b>9,7/7,0</b>
Range	0,3-24,5

## 8. DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo inizialmente identificato un gruppo di 87 pazienti affetti da carcinoma mammario con sospetta recidiva locoregionale o a distanza sottoposta a biopsia. In un caso il risultato dell'esame istopatologico condotto su una lesione epatica aveva identificato una seconda neoplasia maligna (colangiocarcinoma), mentre in un altro caso l'esame istopatologico su una sospetta recidiva locale aveva rivelato un angiosarcoma.

Degli 82 pazienti analizzati, in linea con i dati epidemiologici, il 99% era di sesso femminile, l'età mediana alla diagnosi era di 49,5 anni (range 30-76 anni). Il 65,9% dei casi aveva alla diagnosi una malattia in stadio I-II, il 26,8% in stadio III e il 6,1% in stadio IV. Il 97,6% è stato sottoposto ad intervento chirurgico sul primitivo, a scopo curativo o palliativo. Il 20,0% dei pazienti aveva ricevuto una chemioterapia neoadiuvante; il 57,3% aveva ricevuto una chemioterapia adiuvante, nel 17,1% dei casi contenente trastuzumab.

Degli 82 pazienti, 24 erano stati sottoposti a biopsia escissionale della recidiva locoregionale e 58 a biopsia o asportazione chirurgica della recidiva a distanza. Di queste ultime il 50% era stato sottoposto a biopsia epatica, il 20,7% a biopsia ossea e il 6,9% a biopsia polmonare.

Nelle 82 pazienti l'esame istopatologico ha confermato la presenza di recidiva loco regionale o a distanza e ha fornito la nuova caratterizzazione biologica della malattia.

Dati di letteratura sostengono come l'espressione dei recettori ormonali (Er, PgR) e di HER2 non rimanga stabile ma si modifichi nel corso dell'evoluzione della malattia e sotto l'azione delle diverse terapie come dimostrato nella meta-analisi di Aurilio et al.[54] nella quale si evince che il tasso di conversione complessivo sia del 33% per PgR, 20% per ER e 8% per HER2.

Mentre alcuni studi riportano un tasso di discordanza nell'espressione recettoriale minore per le recidive loco-regionali e maggiore per le recidive a distanza, altri studi dimostrano esattamente il contrario.

Nello studio di Yang et al.[83], ad esempio, le percentuali sono risultate per ER, PgR e HER2, del 20,0%, 38,1% e 6,7% per le recidive a distanza e del 14,3%, 17,9% e 7,1% per quelle loco regionali rispettivamente. Lo studio BRITS di

Thompson et al. [59], invece, sostiene che la percentuale di casi che vanno incontro a variazione non sia significativamente diversa tra metastasi a distanza e recidive locoregionali. La metanalisi di Aurilio et al. riporta per ER, un tasso di variazione simile nel gruppo di confronto tra primitivo-metastasi a distanza e primitivo-recidiva locoregionale mentre per PgR e HER2 il tasso di variazione riportato è più alto nel gruppo primitivo-metastasi a distanza rispetto al gruppo primitivo-recidiva loco regionale (PgR:41% e 26; HER2: 10% e 6%). E' stato dimostrato un tasso di discordanza per HER2 maggiore nel gruppo primitivo-metastasi a distanza rispetto al gruppo primitivo-recidiva loco-regionale anche nella meta-analisi di Houssami et al.[76]

La maggior parte degli studi riporta più frequentemente la perdita piuttosto che il guadagno di espressione dei recettori ormonali mentre per HER2 gli studi sono discordanti.

Nel nostro studio abbiamo calcolato il tasso di variazione di espressione di ER, PgR e HER2 suddividendo i pazienti in due gruppi: quelli con biopsia sulla metastasi a distanza (n=58) e quelli biopsia sulla recidiva locoregionale (n=24). Nel primo gruppo, su 58 casi la presenza di una modificazione nello status recettoriale era valutabile in 56 casi per ER, 56 per PgR e 49 per HER2. Nel secondo gruppo, su 24 casi analizzati, tutti erano valutabili per la variazione di status di ER, 23 per PgR e 16 per HER2.

**Gruppo metastasi a distanza:** in questo sottogruppo i tassi di discordanza sono stati del 14,3% per ER, 35,7% per PgR e 34,7% per HER2. Per quanto riguarda i recettori ormonali questi risultati sono in linea con i dati disponibili in letteratura, mentre se ne discostano per quanto riguarda HER2. Se nella maggior parte degli studi pubblicati lo status di HER2 sembra stabile nel passaggio primitivo-recidiva loco regionale/a distanza, nel nostro campione di pazienti non si mantiene tale stabilità e c'è un tasso di discordanza, addirittura, più alta di quella di calcolata per ER e simile per PgR. Anche lo studio di Lower et al. [75] ha evidenziato un elevato tasso di discordanza per HER2 (33,2%). Tale dato, in linea con i risultati del nostro studio, risulta tuttavia poco affidabile per la presenza di alcuni bias, come la mancanza di revisione dei parametri biologici dei campioni biotici, analizzati quindi di volta in volta secondo linee guida diverse da quelle oggi disponibili e in laboratori diversi. Tali bias sono condivisi anche dal nostro studio.

Coerentemente con la letteratura per ER e PgR la perdita di espressione recettoriale è stata più frequente del guadagno (ER: 8,9% contro 5,4%; PgR: 30,3% contro 5,4%). Abbiamo riscontrato, invece, per HER2 un maggior numero di casi di guadagno piuttosto che di perdita di espressione recettoriale (32,7% e 2,0%). Questo dato potrebbe essere poco attendibile a causa del bias di selezione.

**Gruppo recidive locoregionali:** in questo gruppo abbiamo calcolato tassi di discordanza per ER, PgR e HER2 rispettivamente del 12,5%, 30,4% e 25,0%. Anche in questo gruppo PgR, come da letteratura, è stato il recettore più suscettibile al cambiamento di espressione. Il tasso di discordanza di HER2 è in questo gruppo più vicino a quello riportato dalla maggior parte degli altri studi, sebbene ancora più alto di quello calcolato per ER.

In questo caso la perdita di espressione recettoriale è stata osservata con minor frequenza rispetto al contrario, relativamente a ER (4,17% contro 8,3%), mentre per PgR la perdita di espressione è rimasta la modificazione più frequente (17,4% contro 13,0%). Rispetto a HER2 tutti i casi di conversione erano da negativo verso positivo.

I numeri molto ristretti di pazienti inclusi nella valutazione limitano fortemente l'attendibilità di questi risultati.

In definitiva, i nostri risultati indicano che l'esecuzione di una nuova biopsia al momento della progressione sia una procedura sicura e utile, poiché capace di chiarire l'esatta natura di una lesione sospetta per recidiva di malattia rilevata radiologicamente o clinicamente e di ridefinire il fenotipo biologico della neoplasia, dal momento che l'espressione di ER e soprattutto PgR, ma anche HER2, può variare rispetto a quella inizialmente riscontrata sul tumore primitivo, influenzando l'outcome della paziente e le scelte terapeutiche del medico.

### **Risposta alle terapie contenenti agenti anti-HER2 nelle pz con malattia HER2-/HER2+ e HER2+/HER2+**

Pochi studi hanno cercato di chiarire il ruolo del trastuzumab e degli altri agenti anti Her-2 nella terapia del carcinoma mammario metastatico HER2 positivo con primitivo HER2 negativo. Le conclusioni cui sono giunti i rispettivi autori sono spesso in contrasto e la natura retrospettiva della maggior parte di questi

studi e le dimensioni ristrette dei campioni di pazienti ne limitano l'attendibilità. Delineare con maggior chiarezza attività ed efficacia dei trattamenti anti Her-2 in questo particolare gruppo di pazienti permetterebbe di ottimizzare le scelte terapeutiche, sia in termini di rapporto beneficio clinico-tossicità della terapia, sia, eventualmente, in termini di vantaggio economico per il Servizio Sanitario Nazionale.

Nel nostro studio abbiamo analizzato migliore risposta, tasso di risposte obiettive (OR) e sopravvivenza libera da progressione (mPFS) alla terapia con agenti anti Her-2 iniziata successivamente alla re-biopsia nel gruppo di pazienti con diagnosi di tumore mammario metastatico HER2 positivo ma HER2 negativo alla diagnosi (n=16) con quelle del gruppo di pazienti con neoplasia mammaria HER2 positiva sia sul primitivo che sulla metastasi (n=9) e li abbiamo messi a confronto.

La risposta alla prima terapia anti Her-2 era valutabile in 15 casi su 16 nel primo gruppo e in 7 casi su 9 nel secondo gruppo; i tassi di risposta obiettiva sono stati rispettivamente del 33,3% e 57,1%.

La PSF mediana è risultata di 9,3 mesi nel primo gruppo ("HER2 virati"), simile a quella del secondo gruppo ("HER2 stabili") che aveva una sopravvivenza libera da progressione mediana di 9,0 mesi. Si deve considerare, però, che al momento dell'analisi 4 pazienti "HER2 stabili" rispetto a 1 solo paziente "HER2 virati" (tra quelli per cui la PFS era valutabile) erano ancora in trattamento.

Una seconda terapia anti Her-2, successiva al momento della biopsia, era stata somministrata a 12 pazienti nel gruppo "HER2 virati" e a 5 del gruppo "HER2 non virati". La risposta era valutabile in 10 casi su 12 nel primo gruppo e in 3 casi su 5 nel secondo gruppo; i tassi di risposta obiettiva sono stati rispettivamente del 30,0%, e 66,7%. La PFS mediana è risultata di 4,4 mesi nel primo gruppo ("HER2 virati") e di 6,1 mesi a quella del secondo gruppo ("HER2 stabili").

Nei limiti di uno studio dal disegno retrospettivo e di una casistica molto ristretta, specie per quanto riguarda il gruppo di pazienti con malattia HER2 positiva in modo concorde tra primitivo e metastasi, abbiamo riscontrato tassi di risposta più alti in questo insieme rispetto a quello dei casi di conversione positiva di HER2 a livello metastatico. Il nostro risultato sembra indicare che gli

agenti biologici anti Her-2 abbiano un'attività più ridotta nei pazienti affetti da carcinoma mammario metastatico "HER2 virati".

Nel nostro studio abbiamo anche cercato di definire il ruolo del farmaco T-DM1 nei pazienti con carcinoma mammario metastatico "HER2 virato". Il T-DM1 (Ado-trastuzumab-emtansine) è un farmaco di recente sviluppo attualmente utilizzato nel carcinoma mammario metastatico HER2 positivo resistente ad un precedente trattamenti anti Her-2. Si tratta di un immunoconiugato, composto da una componente anticorpale, il trastuzumab, coniugato ad una molecola di emtansine (DM1), inibitore della polimerizzazione dei microtubuli. Grazie alla particolare struttura del farmaco l'effetto citotossico del chemioterapico si esercita selettivamente sulle cellule tumorali iperesprimenti HER2. Quando la parte anticorpale del T-DM1 si lega al dominio extracellulare del recettore Her-2, l'intero complesso T-DM1-recettore viene internalizzato e quindi degradato a livello lisosomiale; l'emtansine (DM1) viene così rilasciata all'interno della cellula dove esercita la propria azione citotossica.

Valutando attività ed efficacia di T-DM1 su pazienti con malattia mammaria metastatica HER2 positiva non virata, abbiamo riscontrato un tasso di risposta obiettiva del 33,3% e una PFS mediana di 7,0 mesi.

La stessa valutazione è stata fatta nel gruppo di pazienti con malattia metastatica HER2 positiva virata dove si è rilevato un tasso di risposta del 10% (nell'80% dei casi abbiamo piuttosto evidenziato progressione malattia e nel 10% stabilità di malattia) e una PFS mediana di 3,0 mesi.

I risultati del gruppo "HER2 virati" sono inferiori a quelli del gruppo "HER2 stabili". Tali risultati sono inferiori anche ai dati ottenuti dai due principali studi condotti sul T-DM1: studio EMILIA (ORR 43,6%; PFS mediana 9,6 mesi)[39] e studio TH3RESA (PFS mediana 6,2mesi)[41].

I nostri risultati, con i limiti di uno studio retrospettivo e di una casistica molto limitata, suggeriscono che il T-DM1 sia meno efficace nel trattamento del carcinoma mammario HER2 negativo sul primitivo e con iperespressione di HER2 a livello metastatico.

Le ragioni per le quali il T-DM1 risulta inefficace in questo setting di pazienti non è noto. Sono state avanzate diverse ipotesi: la possibilità di un'aumentata

capacità della cellula di espellere il farmaco, tramite iperespressione di P-glicoproteina e fattori simili difetti nella internalizzazione e/o degradazione intracellulare del complesso T-DM1-recettore Her-2, una ridotta espressione di Her-2 a livello della membrana plasmatica indotta dalla precedente esposizione a agenti anti Her-2. Un'altra possibilità dell'inefficacia del T-DM1 in questo setting di pazienti è che le cellule tumorali, e in particolare quelle del carcinoma mammario metastatico HER2 positivo, ma con primitivo HER2 negativo, esprimano una proteina Her-2 tronca o comunque strutturalmente aberrante a cui né trastuzumab , né T-DM1 si legano. In ultimo, vi è la possibilità seppure minima che il riscontro di HER2 positività a livello del della metastasi costituisca in realtà un falso positivo. Altri studi preclinici su cellule sarebbero auspicabili per capirne i meccanismi d'azione.

#### **Limiti dello studio e progetti futuri:**

Lo studio presentato presenta diversi limiti poiché trattasi di un'analisi retrospettiva condotta su un campione ristretto di pazienti. Le caratteristiche cliniche, istologiche e biologiche della malattia sono state reperite esclusivamente tramite consultazione della cartella clinica. Non c'è stata revisione dell'espressione dei recettori ormonali (ER, PgR) né di HER2 sui campioni istologici ma tali dati sono stati acquisiti solo consultando il referto.

Per validare ulteriormente i risultati abbiamo in progetto di proseguire questo studio, ampliandone la casistica e coinvolgendo altri istituti.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. *I numeri del cancro in Italia 2016. AIOM-AIRTUM.*
2. Independent, U.K.P.o.B.C.S., *The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review.* Lancet, 2012. **380**(9855): p. 1778-86.
3. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
4. van de Vijver, M.J., et al., *A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer.* N Engl J Med, 2002. **347**(25): p. 1999-2009.
5. Wolff, A.C., et al., *Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update.* J Clin Oncol, 2013. **31**(31): p. 3997-4013.
6. Ross, J.S., et al., *Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein.* Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(4): p. 379-98.
7. Kurebayashi, J., *Biological and clinical significance of HER2 overexpression in breast cancer.* Breast Cancer, 2001. **8**(1): p. 45-51.
8. Dawood, S., et al., *Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: an institutional-based review.* J Clin Oncol, 2010. **28**(1): p. 92-8.
9. Baselga, J., et al., *Mechanism of action of trastuzumab and scientific update.* Semin Oncol, 2001. **28**(5 Suppl 16): p. 4-11.
10. Sliwkowski, M.X., et al., *Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin).* Semin Oncol, 1999. **26**(4 Suppl 12): p. 60-70.
11. Hudis, C.A., *Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice.* N Engl J Med, 2007. **357**(1): p. 39-51.
12. Vogel, C.L., 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**(3): p. 719-26.
13. Baselga, J., et al., *Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule.* J Clin Oncol, 2005. **23**(10): p. 2162-71.
14. Lynce, F. and S.M. Swain, *Pertuzumab for the treatment of breast cancer.* Cancer Invest, 2014. **32**(8): p. 430-8.
15. Medina, P.J. and S. Goodin, *Lapatinib: a dual inhibitor of human epidermal growth factor receptor tyrosine kinases.* Clin Ther, 2008. **30**(8): p. 1426-47.

16. Baron, J.M., B.L. Boster, and C.M. Barnett, *Ado-trastuzumab emtansine (T-DM1): a novel antibody-drug conjugate for the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer*. J Oncol Pharm Pract, 2015. **21**(2): p. 132-42.
17. Aebi, S., et al., *Chemotherapy for isolated locoregional recurrence of breast cancer (CALOR): a randomised trial*. Lancet Oncol, 2014. **15**(2): p. 156-63.
18. Slamon, D.J., et al., *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*. N Engl J Med, 2001. **344**(11): p. 783-92.
19. Gasparini, G., et al., *Randomized Phase II Trial of weekly paclitaxel alone versus trastuzumab plus weekly paclitaxel as first-line therapy of patients with Her-2 positive advanced breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2007. **101**(3): p. 355-65.
20. Marty, M., et al., *Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group*. J Clin Oncol, 2005. **23**(19): p. 4265-74.
21. Andersson, M., et al., *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. **29**(3): p. 264-71.
22. Valero, V., et al., *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. **29**(2): p. 149-56.
23. Wardley, A.M., et al., *Randomized phase II trial of first-line trastuzumab plus docetaxel and capecitabine compared with trastuzumab plus docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(6): p. 976-83.
24. Robert, N., et al., *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. **24**(18): p. 2786-92.
25. Baselga, J., et al., *Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer*. N Engl J Med, 2012. **366**(2): p. 109-19.
26. Swain, S.M., et al., *Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study*. The Lancet

- Oncology, 2013. **14**(6): p. 461-471.
27. Swain, S.M., et al., *Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer*. N Engl J Med, 2015. **372**(8): p. 724-34.
  28. Dang, C., et al., *Phase II study of paclitaxel given once per week along with trastuzumab and pertuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2015. **33**(5): p. 442-7.
  29. Gelmon, K.A., et al., *Lapatinib or Trastuzumab Plus Taxane Therapy for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Advanced Breast Cancer: Final Results of NCIC CTG MA.31*. J Clin Oncol, 2015. **33**(14): p. 1574-83.
  30. Benz, C.C., et al., *Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu*. Breast Cancer Res Treat, 1992. **24**(2): p. 85-95.
  31. Pietras, R.J., et al., *HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells*. Oncogene, 1995. **10**(12): p. 2435-46.
  32. Prat, A. and J. Baselga, *The role of hormonal therapy in the management of hormonal-receptor-positive breast cancer with co-expression of HER2*. Nat Clin Pract Oncol, 2008. **5**(9): p. 531-42.
  33. Kaufman, B., et al., *Trastuzumab plus anastrozole versus anastrozole alone for the treatment of postmenopausal women with human epidermal growth factor receptor 2-positive, hormone receptor-positive metastatic breast cancer: results from the randomized phase III TAnDEM study*. J Clin Oncol, 2009. **27**(33): p. 5529-37.
  34. Huober, J., et al., *Higher efficacy of letrozole in combination with trastuzumab compared to letrozole monotherapy as first-line treatment in patients with HER2-positive, hormone-receptor-positive metastatic breast cancer – Results of the eLEcTRA trial*. The Breast, 2012. **21**(1): p. 27-33.
  35. Johnston, S., et al., *Lapatinib Combined With Letrozole Versus Letrozole and Placebo As First-Line Therapy for Postmenopausal Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(33): p. 5538-5546.
  36. Blackwell, K.L., et al., *Overall survival benefit with lapatinib in combination with trastuzumab for patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer: final results from the EGF104900 Study*. J Clin Oncol, 2012. **30**(21): p. 2585-92.
  37. Gruschkus, S.K., et al., *First-line patterns of care and outcomes of HER2-*

- positive breast cancer patients who progressed after receiving adjuvant trastuzumab in the outpatient community setting.* Journal of Clinical Oncology, 2010. **28**(15).
38. Negri, E., et al., *Effectiveness of trastuzumab in first-line HER2+ metastatic breast cancer after failure in adjuvant setting: a controlled cohort study.* Oncologist, 2014. **19**(12): p. 1209-15.
  39. Verma, S., et al., *Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer.* N Engl J Med, 2012. **367**(19): p. 1783-91.
  40. von Minckwitz, G., et al., *Trastuzumab Beyond Progression in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Advanced Breast Cancer: A German Breast Group 26/Breast International Group 03-05 Study.* Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(12): p. 1999-2006.
  41. Krop, I.E., et al., *Trastuzumab emtansine versus treatment of physician's choice for pretreated HER2-positive advanced breast cancer (TH3RESA): a randomised, open-label, phase 3 trial.* The Lancet Oncology, 2014. **15**(7): p. 689-699.
  42. Geyer, C.E., et al., *Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer.* N Engl J Med, 2006. **355**(26): p. 2733-43.
  43. Cameron, D., et al., *A phase III randomized comparison of lapatinib plus capecitabine versus capecitabine alone in women with advanced breast cancer that has progressed on trastuzumab: updated efficacy and biomarker analyses.* Breast Cancer Res Treat, 2008. **112**(3): p. 533-43.
  44. Engel, K.B. and H.M. Moore, *Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue.* Arch Pathol Lab Med, 2011. **135**(5): p. 537-43.
  45. Darvishian, F., et al., *Impact of decalcification on receptor status in breast cancer.* Breast J, 2011. **17**(6): p. 689-91.
  46. Alers, J.C., et al., *Effect of bone decalcification procedures on DNA in situ hybridization and comparative genomic hybridization. EDTA is highly preferable to a routinely used acid decalcifier.* J Histochem Cytochem, 1999. **47**(5): p. 703-10.
  47. Viale, G., et al., *Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98.* J Clin Oncol, 2007. **25**(25): p. 3846-52.
  48. Perez, E.A., et al., *HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 intergroup*

- adjuvant trial*. J Clin Oncol, 2006. **24**(19): p. 3032-8.
49. Heim, S., et al., *Cytogenetic polyclonality in tumors of the breast*. Cancer Genet Cytogenet, 1997. **95**(1): p. 16-9.
  50. Kuukasjarvi, T., et al., *Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer*. Cancer Res, 1997. **57**(8): p. 1597-604.
  51. Rasbridge, S.A., et al., *The effects of chemotherapy on morphology, cellular proliferation, apoptosis and oncoprotein expression in primary breast carcinoma*. Br J Cancer, 1994. **70**(2): p. 335-41.
  52. Rosen, P.P., et al., *Estrogen receptor protein (ERP) in multiple tumor specimens from individual patients with breast cancer*. Cancer, 1977. **39**(5): p. 2194-200.
  53. Webster, D.J.T., D.G. Bronn, and J.P. Minton, *Estrogen-Receptor Levels in Multiple Biopsies from Patients with Breast-Cancer*. American Journal of Surgery, 1978. **136**(3): p. 337-338.
  54. Aurilio, G., et al., *A meta-analysis of oestrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 discordance between primary breast cancer and metastases*. Eur J Cancer, 2014. **50**(2): p. 277-89.
  55. Kamby, C., B.B. Rasmussen, and B. Kristensen, *Estrogen-Receptor Status of Primary Breast Carcinomas and Their Metastases - Relation to Pattern of Spread and Survival after Recurrence*. British Journal of Cancer, 1989. **60**(2): p. 252-257.
  56. Pectasides, D., et al., *HER-2/neu status of primary breast cancer and corresponding metastatic sites in patients with advanced breast cancer treated with trastuzumab-based therapy*. Anticancer Research, 2006. **26**(1B): p. 647-653.
  57. Santinelli, A., et al., *HER-2 status discrepancy between primary breast cancer and metastatic sites. Impact on target therapy*. Int J Cancer, 2008. **122**(5): p. 999-1004.
  58. Amir, E., et al., *Discordance between receptor status in primary and metastatic breast cancer: an exploratory study of bone and bone marrow biopsies*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2008. **20**(10): p. 763-8.
  59. Thompson, A.M., et al., *Prospective comparison of switches in biomarker status between primary and recurrent breast cancer: the Breast Recurrence In Tissues Study (BRITS)*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(6): p. R92.
  60. Hilton, J.F., et al., *Acquisition of metastatic tissue from patients with bone metastases from breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **129**(3): p. 761-

- 5.
61. Amir, E., et al., *Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer*. J Clin Oncol, 2012. **30**(6): p. 587-92.
  62. Yeung, C., et al., *Estrogen, progesterone, and HER2/neu receptor discordance between primary and metastatic breast tumours-a review*. Cancer Metastasis Rev, 2016. **35**(3): p. 427-37.
  63. Andersen, J. and H.S. Poulsen, *Relationship between estrogen receptor status in the primary tumor and its regional and distant metastases. An immunohistochemical study in human breast cancer*. Acta Oncol, 1988. **27**(6A): p. 761-5.
  64. Nedergaard, L., T. Haerslev, and G.K. Jacobsen, *Immunohistochemical study of estrogen receptors in primary breast carcinomas and their lymph node metastases including comparison of two monoclonal antibodies*. APMIS, 1995. **103**(1): p. 20-4.
  65. van Agthoven, T., et al., *Expression of estrogen, progesterone and epidermal growth factor receptors in primary and metastatic breast cancer*. Int J Cancer, 1995. **63**(6): p. 790-3.
  66. Zheng, W.Q., et al., *Variation of ER status between primary and metastatic breast cancer and relationship to p53 expression\**. Steroids, 2001. **66**(12): p. 905-10.
  67. Gong, Y., D.J. Booser, and N. Sneige, *Comparison of HER-2 status determined by fluorescence in situ hybridization in primary and metastatic breast carcinoma*. Cancer, 2005. **103**(9): p. 1763-9.
  68. Aitken, S.J., et al., *Quantitative analysis of changes in ER, PR and HER2 expression in primary breast cancer and paired nodal metastases*. Ann Oncol, 2010. **21**(6): p. 1254-61.
  69. Sari, E., et al., *Comparative study of the immunohistochemical detection of hormone receptor status and HER-2 expression in primary and paired recurrent/metastatic lesions of patients with breast cancer*. Med Oncol, 2011. **28**(1): p. 57-63.
  70. Curigliano, G., et al., *Should liver metastases of breast cancer be biopsied to improve treatment choice?* Ann Oncol, 2011. **22**(10): p. 2227-33.
  71. Cardoso, F., et al., *Evaluation of HER2, p53, bcl-2, topoisomerase II-alpha, heat shock proteins 27 and 70 in primary breast cancer and metastatic ipsilateral axillary lymph nodes*. Ann Oncol, 2001. **12**(5): p. 615-20.
  72. Hoefnagel, L.D., et al., *Receptor conversion in distant breast cancer*

- metastases*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(5): p. R75.
73. Tapia, C., et al., *HER2 gene status in primary breast cancers and matched distant metastases*. Breast Cancer Res, 2007. **9**(3): p. R31.
  74. Jabbour, M.N., C.Y. Massad, and F.I. Boulos, *Variability in hormone and growth factor receptor expression in primary versus recurrent, metastatic, and post-neoadjuvant breast carcinoma*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **135**(1): p. 29-37.
  75. Lower, E.E., et al., *HER-2/neu expression in primary and metastatic breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2009. **113**(2): p. 301-6.
  76. Houssami, N., et al., *HER2 discordance between primary breast cancer and its paired metastasis: tumor biology or test artefact? Insights through meta-analysis*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **129**(3): p. 659-74.
  77. Rossi, S., et al., *Hormone Receptor Status and HER2 Expression in Primary Breast Cancer Compared With Synchronous Axillary Metastases or Recurrent Metastatic Disease*. Clin Breast Cancer, 2015. **15**(5): p. 307-12.
  78. Nishimura, R., et al., *Changes in the ER, PgR, HER2, p53 and Ki-67 biological markers between primary and recurrent breast cancer: discordance rates and prognosis*. World J Surg Oncol, 2011. **9**: p. 131.
  79. Jensen, J.D., et al., *ER, HER2, and TOP2A expression in primary tumor, synchronous axillary nodes, and asynchronous metastases in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **132**(2): p. 511-21.
  80. Liu, J., et al., *Comparison of ER/PR and HER2 statuses in primary and paired liver metastatic sites of breast carcinoma in patients with or without treatment*. J Cancer Res Clin Oncol, 2012. **138**(5): p. 837-42.
  81. Dieci, M.V., et al., *Discordance in receptor status between primary and recurrent breast cancer has a prognostic impact: a single-institution analysis*. Ann Oncol, 2013. **24**(1): p. 101-8.
  82. Amir, E., et al., *Tissue confirmation of disease recurrence in breast cancer patients: pooled analysis of multi-centre, multi-disciplinary prospective studies*. Cancer Treat Rev, 2012. **38**(6): p. 708-14.
  83. Yang, Y.-F., et al., *Discordances in ER, PR and HER2 receptors between primary and recurrent/metastatic lesions and their impact on survival in breast cancer patients*. Medical Oncology, 2014. **31**(10).
  84. Gancberg, D., et al., *Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites*. Annals of Oncology, 2002. **13**(7): p. 1036-1043.
  85. Lindstrom, L.S., et al., *Clinically used breast cancer markers such as estrogen*

- receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 are unstable throughout tumor progression. J Clin Oncol, 2012. 30(21): p. 2601-8.*
86. Hoefnagel, L.D., et al., *Discordance in ERalpha, PR and HER2 receptor status across different distant breast cancer metastases within the same patient. Ann Oncol, 2013. 24(12): p. 3017-23.*
87. Liedtke, C., et al., *Prognostic impact of discordance between triple-receptor measurements in primary and recurrent breast cancer. Ann Oncol, 2009. 20(12): p. 1953-8.*
88. Niikura, N., et al., *Loss of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression in metastatic sites of HER2-overexpressing primary breast tumors. J Clin Oncol, 2012. 30(6): p. 593-9.*
89. Simmons, C., et al., *Does confirmatory tumor biopsy alter the management of breast cancer patients with distant metastases? Ann Oncol, 2009. 20(9): p. 1499-504.*
90. Zidan, J., et al., *Comparison of HER-2 overexpression in primary breast cancer and metastatic sites and its effect on biological targeting therapy of metastatic disease. Br J Cancer, 2005. 93(5): p. 552-6.*
91. Guarneri, V., et al., *Comparison of HER-2 and hormone receptor expression in primary breast cancers and asynchronous paired metastases: impact on patient management. Oncologist, 2008. 13(8): p. 838-44.*
92. Botteri, E., et al., *Biopsy of liver metastasis for women with breast cancer: impact on survival. Breast, 2012. 21(3): p. 284-8.*
93. Chang, H.J., et al., *Discordant human epidermal growth factor receptor 2 and hormone receptor status in primary and metastatic breast cancer and response to trastuzumab. Jpn J Clin Oncol, 2011. 41(5): p. 593-9.*
94. Fabi, A., et al., *HER2 protein and gene variation between primary and metastatic breast cancer: significance and impact on patient care. Clin Cancer Res, 2011. 17(7): p. 2055-64.*
95. Gianni, L., et al., *5-year analysis of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in patients with locally advanced, inflammatory, or early-stage HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a multicentre, open-label, phase 2 randomised trial. Lancet Oncol., 2016. 17(6): p. 791-800*

Ringraziamenti:

Ringrazio il professor Alfredo Falcone per avermi dato la possibilità di lavorare a questa tesi.

Ringrazio il dottor Andrea Fontana per avermi affidato questo progetto ed avermi assistito nella sua realizzazione.

Ringrazio le dottoresse Ilaria Bertolini e Claudia De Angelis per avermi aiutata e sostenuta in diverse fasi della realizzazione di questa tesi.

Ringrazio la dottoressa Ilaria Ferrarini e le specializzande del “gruppo mammella” per avermi dato supporto e aver chiarito i miei dubbi.

Ringrazio la mia famiglia e i miei amici per il sostegno che mi hanno dato.