



**UNIVERSITÀ
DI TORINO**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

Dipartimento di **Scienze Chirurgiche**

Dottorato di ricerca in **Scienze Biomediche e Oncologia**

Titolo della tesi: **Caratterizzazione di HER2 Low e HER2 3+ nel tumore mammario e loro correlazione con la risposta alla chemioterapia neoadiuvante**

Tesi presentata da: **Marta D'Alonzo**

Tutor: **Prof.ssa Nicoletta Biglia**

Co-Tutor: **Prof.ssa Annamaria Ferrero**

Coordinatore del Dottorato: **Prof. Emilio Hirsch**

Anno Accademico: **2023-2024**

Settore scientifico disciplinare di afferenza: **MED/40**

Sommario

INTRODUZIONE	3
PARTE GENERALE	5
1-CHEMIOTERAPIA NEOADIUVANTE.....	5
1.1 Obiettivi della terapia sistemica neoadiuvante.....	6
1.2 Selezione delle pazienti	9
2-FATTORI PREDITTIVI DI RISPOSTA ALLA CHEMIOTERAPIA NEOADIUVANTE.....	10
2.1 Fattori predittivi noti	10
2.2 Fattori predittivi in studio.....	16
2.3 HER2 e sottocategorie	17
HER2 Low.....	20
HER2 3+.....	23
3-OPZIONI DI TRATTAMENTO NEOADIUVANTE.....	25
4-VALUTAZIONI PRE-TRATTAMENTO.....	28
5-VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA ALLA CHEMIOTERAPIA NEOADIUVANTE.....	29
5.1 Valutazione radiologica	29
5.2 Valutazione anatomo-patologica	33
PARTE SPERIMENTALE.....	35
1-RAZIONALE E SCOPO DELLO STUDIO.....	35
2-MATERIALI E METODI	37
3-RISULTATI.....	42
3.1- Caratterizzazione dei tumori HER2 Low e HER2 3+.....	42
3.2- HER2 Low e HER2 3+ e risposta al trattamento chemioterapico neoadiuvante.....	47
4-DISCUSSIONI.....	51
4.1- Caratterizzazione dei tumori HER2 Low e HER2 3+.....	51
4.2- HER2 Low e HER2 3+ e risposta al trattamento chemioterapico neoadiuvante.....	53
4.3- Considerazioni generali	55
5-CONCLUSIONI	56
6- RINGRAZIAMENTI.....	57
7- BIBLIOGRAFIA	58

INTRODUZIONE

Il carcinoma della mammella è la neoplasia più diffusa nel sesso femminile ed è sempre stato oggetto di numerose ricerche, prima in ambito chirurgico, poi in ambito medico.

L'adozione della **chemioterapia neoadiuvante** (neoadjuvant chemotherapy [NACT]) è relativamente recente, inizialmente introdotta allo scopo di ridurre l'estensione della lesione mammaria e di consentire a lesioni inoperabili di essere asportate, viene attualmente proposta con indicazioni sempre più diversificate. La terapia sistemica preoperatoria può consentire la riduzione dell'estensione della chirurgia mammaria, aumentando il tasso di interventi conservativi, e di ridurre i tassi di dissezione ascellare. Inoltre, la NACT offre l'opportunità di osservare il tipo di risposta del tumore al trattamento, fornendo importanti informazioni sull'efficacia della terapia stessa e sulla prognosi. Il raggiungimento di una risposta patologica completa (pathologic complete response [pCR]) rappresenta un indice prognostico positivo molto forte. Infine, in base al tipo di risposta ottenuta dopo la NACT, è possibile modulare il trattamento adiuvante post operatorio; nelle pazienti che non hanno ottenuto una pCR, l'aggiunta in regime adiuvante di un trattamento con Capecitabina nei tumori triplo negativi (triple negative breast cancer [TNBC]) o la sostituzione del Trastuzumab con TDM-1 nei tumori HER2 positivi, può migliorare gli outcome di sopravvivenza.

È quindi importante selezionare attentamente le pazienti con maggiore probabilità di risposta, per offrire un trattamento mirato e personalizzato. La possibilità di **predire il tipo di risposta alla NACT** rimane ancora una sfida a causa della natura altamente eterogenea del carcinoma mammario che presenta diversi sottotipi a livello molecolare, istopatologico e clinico. Il più importante fattore predittivo indipendente di pCR sembra essere il sottotipo molecolare, con tassi più alti nella malattia HER2 positiva e triplo negativa. Tuttavia, anche in queste categorie, la risposta è altamente eterogenea e, dal punto di vista clinico, è importante identificare sotto-popolazioni per le quali ci possiamo aspettare un tipo di risposta diverso da quello predetto sulla sola base del sottotipo tumorale. Parallelamente, sarebbe importante individuare pazienti che potrebbero beneficiare dell'introduzione di nuovi trattamenti mirati.

A questo proposito, recentemente, è stata messa in discussione la classica distinzione dicotomica dei tumori mammari in HER2 positivi (ICH 3+, ICH 2+ FISH positivo) ed HER2 negativi (ICH 0+, ICH 1+, ICH 2+ FISH negativo) introducendo, all'interno del gruppo HER2 negativo, una nuova categoria definita **HER2 Low** (HER2 1+, HER2 2+ FISH negativo) che si differenzia dagli HER2 0 come una popolazione cellulare che esprime comunque una certa quantità di recettore di membrana HER2. Allo stesso modo, tra gli HER2 positivi, gli **HER2 3+**, si differenziano dagli HER2 2+ FISH positivo per una più ricca presenza di recettori HER2 sulla membrana cellulare.

Questa ulteriore sottocategorizzazione, ad oggi, ha un risvolto clinico solo nel trattamento in II linea dei tumori metastatici HER2 Low, per i quali recentemente è stato approvato un trattamento con farmaci anti HER2 mirati.

Questa approvazione ha scardinato la tipica distinzione dicotomica di HER2 nei tumori mammari, valutando l'espressione di HER2 come un continuum e rappresentando un importante spunto di riflessione, sia perché per la prima volta è stata riconosciuta una nuova sottocategoria di HER2, sia perché queste acquisizioni in campo metastatico potrebbero essere traslate in ambito neoadiuvante o adiuvante, offrendo un trattamento con farmaci anti HER2 anche alle pazienti HER2 Low, fino ad ora classificate come HER2 negative

Ad oggi abbiamo solo trial clinici che prevedono la somministrazione in regime neoadiuvante di farmaci anti HER2 in pazienti con tumori HER2 Low¹. In questo setting, possiamo solamente estrapolare dati indiretti osservazionali, confrontando le due categorie (HER2 0 / HER2 Low) all'interno del gruppo HER2 negativo, fino ad oggi gestito e trattato in modo omogeneo.

Per quanto riguarda gli HER2 3+, considerati come entità a sé stante tra gli HER2 positivi, abbiamo pochissima letteratura che ne definisca le caratteristiche e ad oggi non abbiamo proposte di trattamento differenziato. Esprimendo una maggior quantità di recettori HER2 sulla membrana cellulare, potrebbero rappresentare una sottocategoria maggiormente sensibile al trattamento neoadiuvante con agenti anti HER2.

Questa Tesi si articola in una **parte generale**, riguardante la chemioterapia neoadiuvante nel trattamento del carcinoma mammario, e in una parte sperimentale.

Nella **parte sperimentale** viene presentata un'analisi retrospettiva multicentrica da noi condotta su pazienti con tumore mammario, sottoposte a NACT e successivamente ad intervento chirurgico. Nello studio sono state caratterizzate le diverse sottocategorie di HER2 in termini di presentazione clinico-patologica del tumore all'esordio, di capacità predittiva di risposta al trattamento neoadiuvante (tassi di pCR) e di esiti a medio/lungo termine (disease free survival [DFS] e overall survival [OS]). Conoscere meglio queste sottocategorie ha lo scopo di valutare se l'introduzione di farmaci anti HER2 per le pazienti HER2 Low possa avere un razionale e di migliorare la selezione delle pazienti a cui proporre un trattamento neoadiuvante con agenti anti HER2 tra le pazienti HER2 positive.

PARTE GENERALE

1- CHEMIOTERAPIA NEOADIUVANTE

La chemioterapia neoadiuvante (NACT) consiste nel trattamento sistemico del carcinoma mammario effettuato prima dell'intervento chirurgico. Tipicamente, il trattamento neoadiuvante corrisponde alla **chemioterapia** (eventualmente associata a farmaci biologici), sebbene vi sia un crescente interesse a espandere il ruolo della terapia endocrina neoadiuvante in alcuni sottogruppi di pazienti con malattia endocrino-sensibile².

Studi clinici randomizzati non hanno riscontrato differenze significative per quanto riguarda gli esiti a lungo termine, indipendentemente dal fatto che la chemioterapia sistemica venga somministrata prima o dopo l'intervento chirurgico. Sebbene fosse stato ipotizzato un miglioramento della sopravvivenza globale (OS) delle pazienti a seguito della chemioterapia neoadiuvante, gli studi randomizzati non hanno dimostrato questo vantaggio. In termini di sopravvivenza globale la strategia pre-operatoria e post-operatoria appaiono equivalenti³. Una metanalisi per singola paziente ha confrontato gli esiti a lungo termine della chemioterapia neoadiuvante vs. adiuvante sulla base dei dati provenienti da 4.756 donne incluse in 10 studi avviati tra il 1983 e il 2002⁴. Dalle analisi non è stata osservata alcuna differenza significativa in termini di sopravvivenza con tassi di mortalità per tumore mammario del 34,4% contro il 33,7%, e di mortalità per tutte le cause del 40,9% vs il 41,2%, anche i tassi di ripresa di malattia a distanza sono sovrapponibili (38,2% vs 38% a 15 anni).

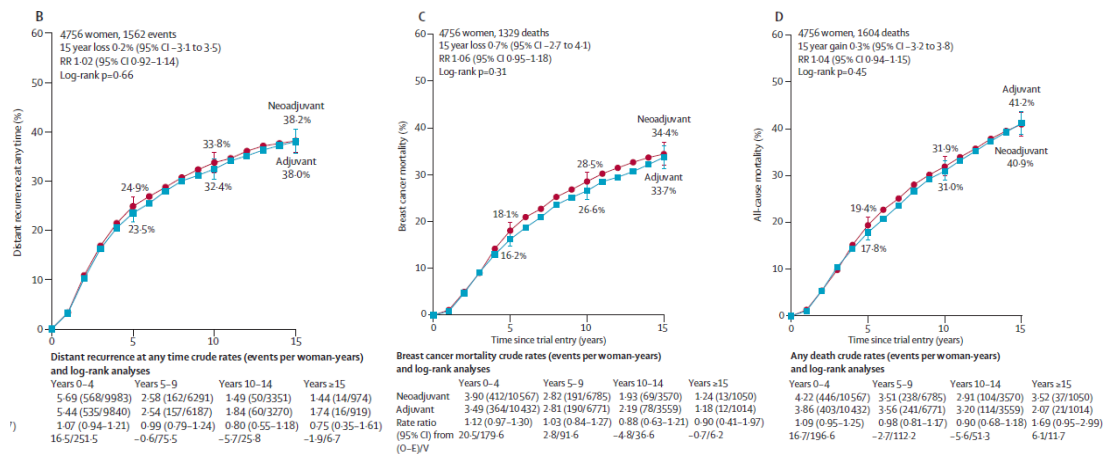


Figura 1: Effetto della chemioterapia neoadiuvante vs adiuvante su recidive e mortalità: recidiva a distanza (B), mortalità per cancro della mammella (C) e morte per qualsiasi causa (D).

1.1 Obiettivi della terapia sistemica neoadiuvante

Storicamente, il vantaggio principale della terapia sistemica preoperatoria è stato quello di **migliorare gli esiti chirurgici**.

La NACT può rendere resecabili lesioni altrimenti inoperabili (tumori localmente avanzati o carcinoma infiammatorio) e aumentare il tasso di interventi conservativi in pazienti con tumore operabile ma inizialmente candidate a mastectomia, che ottengono una buona risposta al trattamento. Fanno eccezione le pazienti con mastite carcinomatosa, nelle quali l'eventuale chirurgia (qualora fattibile) sarà sempre la mastectomia associata a dissezione ascellare (DA)⁵.

Studi clinici e revisioni retrospettive indicano **tassi di chirurgia conservativa** aumentati nelle pazienti sottoposte a NACT⁵. Una recente metanalisi ha confrontato gli esiti chirurgici in pazienti sottoposta a chemioterapia neoadiuvante vs. adiuvante riportando un incremento statisticamente significativo dei tassi di chirurgia conservativa nel gruppo NACT (65% vs. 49%)⁷.

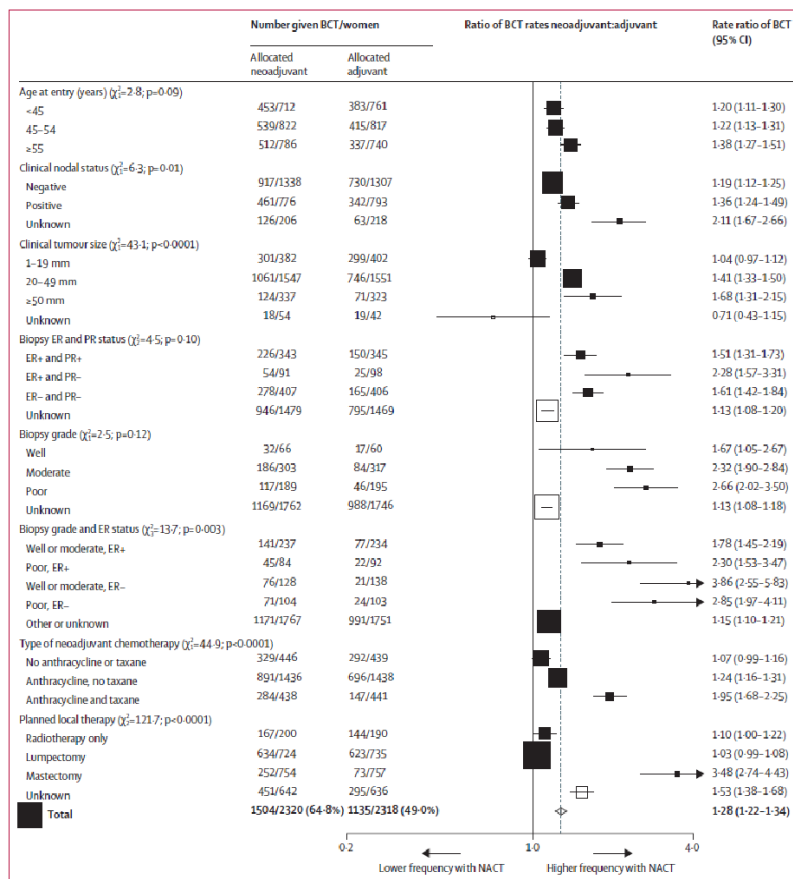


Figure 1: BCT rate ratios
 Numbers with BCT or mastectomy after chemotherapy. Excludes local therapy unknown (67 patients with NACT and 51 with adjuvant chemotherapies).
 BCT=breast-conserving therapy, ER=estrogen receptor, PR=progesterone receptor, NACT=neoadjuvant chemotherapy.

Figura 2⁷ Tassi chirurgia conservativa dopo chemioterapia neoadiuvante. BCT = terapia conservativa della mammella. ER = recettore per gli estrogeni. PR = recettore del progesterone. NACT = chemioterapia neoadiuvante.

La NACT, inoltre, offre la possibilità di **ridurre considerevolmente il tasso di dissezioni ascellari**. Recentemente, si è valutata la possibilità di evitare l'intervento di dissezione ascellare nelle pazienti con linfonodi positivi all'esordio (cN+) che ottengono una negativizzazione clinica del cavo ascellare dopo NACT (cN-) e con BLNS negativa. Alcuni autori hanno applicato questo principio con l'obiettivo di quantificare la possibile riduzione del tasso di dissezione ascellare in pazienti cN+ all'esordio. *Galimberti et al.*⁶ ha sottoposto 147 pazienti cN+ all'esordio e convertite a cN- al termine del trattamento preoperatorio, a biopsia del linfonodo sentinella omettendo la dissezione ascellare in caso di linfonodo negativo. Seguendo questa procedura, è stata evitata la DA nel 47 % delle pazienti con una sola recidiva ascellare (0,7%) ad un follow-up mediano di 61 mesi.

Come accennato precedentemente, l'uso della terapia sistemica preoperatoria può fornire importanti **informazioni prognostiche** correlate al tipo di risposta. Una **risposta patologica completa (pCR)** documentata alla chirurgia dopo NACT riveste un significato prognostico rilevante: è infatti associata a maggiore sopravvivenza libera da malattia e sopravvivenza globale nei tumori della mammella allo stadio iniziale⁷⁻⁸. In una metanalisi pubblicata nel 2014⁹, sono state analizzate 11.955 pazienti incluse in 12 studi clinici randomizzati di chemioterapia neoadiuvante: l'eradicazione del tumore dalla mammella e dai linfonodi (ypT0 ypN0 o ypT0/is ypN0) è risultata associata ad una migliore sopravvivenza libera da eventi (ypT0ypN0: HR 0,44, 85% CI 0,39-0,51; ypT0/is ypN0: HR 0,48, IC 95% 0,43-0,54) e sopravvivenza globale (HR 0,48, 95% CI 0,33-0,69) rispetto all'eradicazione del tumore invasivo dalla sola mammella. L'associazione tra pCR (ypT0/is ypN0) ed esito a lungo termine si osserva in tutti i sottotipi, ma è risultata più forte nelle pazienti con tumori più aggressivi, tra cui sottotipi tripli negativi (EFS: HR 0,24, 95% CI 0,18-0,33; OS: HR 0,16, 95% CI 0,11-0,25) e HER2 positivi (EFS: HR 0,39, 95%CI 0,31-0,50; OS: HR 0,34, 95% CI 0,24-0,47).

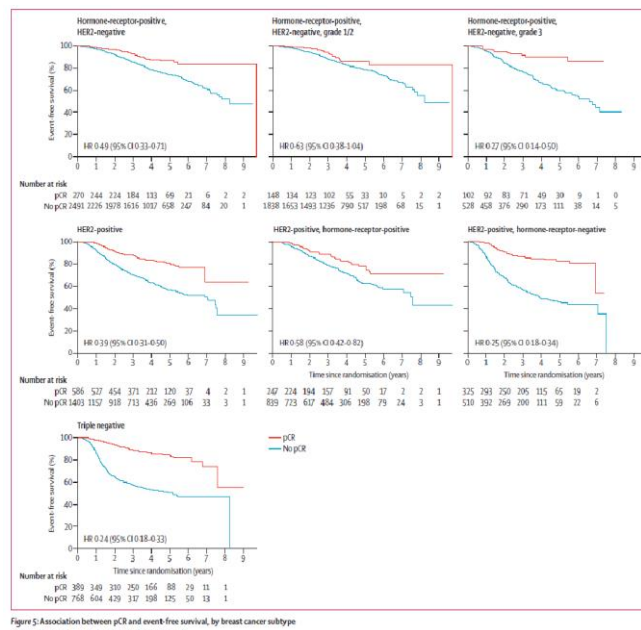


Figure 5: Association between pCR and event-free survival, by breast cancer subtype

Figura 3¹²: Associazione tra pCR e sopravvivenza libera da eventi, in base al sottotipo di carcinoma mammario

Un'ulteriore opportunità della chemioterapia neo-adiuvante è quella di identificare le pazienti che possono beneficiare di un **trattamento adiuvante aggiuntivo** in caso di persistenza di malattia invasiva riscontrata all'esame istologico definitivo. Nelle pazienti con tumore triplo negativo, che non hanno ottenuto una risposta patologica completa, un trattamento adiuvante con capecitabina offre un vantaggio in termini di sopravvivenza libera da malattia e di sopravvivenza globale a 5 anni¹⁰. Analogamente, nelle pazienti con carcinoma mammario HER2 positivi e malattia invasiva residua dopo terapia neoadiuvante contenente un taxano in associazione a Trastuzumab, la sostituzione di quest'ultimo con Trastuzumab Emtansine (T-DM1) in regime adiuvante, riduce il rischio di recidiva rispetto al solo trastuzumab¹¹.

Ulteriori benefici che si possono ottenere con l'utilizzo della terapia sistemica preoperatoria includono la possibilità di posticipare l'intervento chirurgico guadagnando tempo per l'effettuazione di test genetici appropriati o per la pianificazione della ricostruzione mammaria in caso di mastectomia. Inoltre, la terapia sistemica preoperatoria funge da eccellente piattaforma di ricerca per testare nuove terapie e biomarcatori predittivi, fornendo campioni tumorali e di sangue prima, durante e dopo il trattamento sistemico.

PER RIASSUMERE:

Benefici noti della terapia sistemica preoperatoria:

Può rendere operabili tumori inoperabili

Aumenta il tasso di intervento conservativi

Fornisce importanti informazioni prognostiche in base al tipo di risposta alla terapia, in particolare nei pazienti con carcinoma mammario triplo negativo e HER2 positivo

Permette di guadagnare il tempo necessario per eseguire i test genetici

Permette di guadagnare il tempo necessario per pianificare la ricostruzione mammaria in pazienti che scelgono la mastectomia

Opportunità:

Può consentire di effettuare la sola biopsia del linfonodo sentinella (BLNS) in caso di negativizzazione clinica di un cavo ascellare positivo all'esordio

Può fornire l'indicazione all'aggiunta di trattamenti adiuvanti se non viene riscontrata una risposta patologica completa

In caso di risposta patologica completa ascellare, può consentire di eseguire campi radioterapici postoperatori più ristretti

È un'eccellente piattaforma di ricerca per testare nuove terapie e biomarker predittivi

Precauzioni:

Possibile overtreatment se lo stadio clinico è sovrastimato

Possibile undertreatment locoregionale con la radioterapia se lo stadio clinico è sottostimato

Possibilità di progressione della malattia durante la terapia sistemica preoperatoria

Tabella 1¹²: NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Breast Cancer Version 1.2019 — March 14, 2019: benefici, opportunità e precauzioni della NACT

1.2 Selezione delle pazienti

Non tutte le pazienti sono candidabili a terapia sistemica preoperatoria.

Le indicazioni sono^{5- 15}:

- donne con carcinoma mammario localmente avanzato (stadio IIB-IIIc), indipendentemente dal sottotipo, perché nella maggioranza dei casi non suscettibili di chirurgia, e nelle pazienti con carcinoma non operabile (compresi i casi di carcinoma infiammatorio, malattia linfonodale regionale N2 e N3 e tumori T4).
- donne con carcinoma mammario operabile in stadio iniziale (compresi gli stadi I o IIA), ma con particolari caratteristiche clinico-anamnestiche. La terapia sistemica preoperatoria può essere presa in considerazione qualora la *chirurgia conservativa non sia proponibile* a causa di un elevato rapporto tumore-mammella o se l'esito cosmetico atteso è subottimale dovuto ad una particolare localizzazione tumorale. La terapia sistemica preoperatoria può anche essere somministrata in pazienti con tumori operabili se il sottotipo di carcinoma mammario è associato a *un'alta probabilità di risposta*. Nei casi di pazienti affette da carcinoma triplo negativo (TNBC) o HER2+ la NACT è fortemente incoraggiata poiché questi sottotipi tumorali sono particolarmente chemio-sensibili e queste pazienti sono di norma, comunque candidate a un trattamento chemioterapico post-chirurgico. Al contrario, il ruolo della NACT nelle pazienti con carcinoma mammario HR+/HER2- è meno chiaro¹³; in particolare, rimane dibattuto se a queste pazienti debba essere offerta la NACT o la terapia endocrina neoadiuvante (NET).
- Pazienti con cavo ascellare positivo all'esordio con buona probabilità di risposta al trattamento con possibile negativizzazione linfonodale

La **terapia sistemica preoperatoria non è appropriata** in alcuni casi:

- pazienti con estesa malattia in situ quando non è possibile definire l'estensione della malattia invasiva;
- pazienti in cui l'estensione del tumore è scarsamente delineata;

La decisione di utilizzare la terapia preoperatoria dovrebbe essere presa nel contesto di un team multidisciplinare coordinato e collaborativo.

PER RIASSUMERE:

Candidati per la terapia sistemica preoperatoria

Pazienti con carcinoma mammario non operabile: carcinoma infiammatorio, linfonodi ascellari N2, malattia nodale N3, tumori T4

Pazienti con carcinoma mammario operabile ma rapporto tumore-mammella sfavorevole in una paziente desiderosa di chirurgia conservativa;

Pazienti con malattia linfonodale che può diventare ypN0

Non candidati alla terapia sistemica preoperatoria

Pazienti con ampia malattia in situ quando l'estensione del carcinoma invasivo non è ben definita

Pazienti con un'estensione del tumore poco delineata

Tabella 2¹⁵: NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) Breast Cancer Version 1.2019 — March 14, 2019: pazienti candidabili e non candidabili alla NACT

2- FATTORI PREDITTIVI DI RISPOSTA ALLA CHEMIOTERAPIA NEOADIUVANTE

Obiettivo della NACT è quello di ridurre l'estensione locale della malattia, fino ad ottenere, in condizioni ottimali, una risposta patologica completa. È quindi importante selezionare attentamente le pazienti che hanno maggiori possibilità di rispondere al trattamento. Per questo motivo, una crescente attenzione è rivolta verso lo studio di **fattori predittivi di risposta**.

Esistono fattori consolidati che vengono valutati quotidianamente nella pratica clinica a cui si affiancano numerosi marcatori tuttora in studio. Tra i primi abbiamo l'istotipo, il grado della neoplasia, l'espressione dei recettori per estrogeni e progesterone e l'espressione di HER2: tumori con più alta probabilità di risposta sono quelli negativi per il recettore degli estrogeni (ER), iperesprimenti HER2, di alto grado e con scarsa differenziazione¹⁴. I nuovi marcatori in studio sono, invece: l'espressione dei recettori per gli androgeni (AR), di FOXA1, del fosfoistone H3 (PHH3) e l'infiltrato linfocitario tumorale (TILs). Recentemente è stata rivalutata la classica distinzione dicotomica dei tumori mammari in HER2 positivi (ICH 3+, ICH 2+ FISH positivo) ed HER2-negativi (ICH 0+, ICH 1+, ICH 2+ FISH negativo), introducendo, all'interno del gruppo HER2 negativo, una nuova categoria definita **HER2 Low** (HER2 1+, HER2 2+ FISH negativo) che si differenzia dagli HER2 0 come una popolazione cellulare che esprime comunque una certa quantità di recettore di membrana HER2. Allo stesso modo, tra gli HER2 positivi, gli **HER2 3+**, si differenziano dagli HER2 2+ FISH positivo per una più ricca presenza di recettori HER2 sulla membrana cellulare.

Il risvolto clinico in ambito neoadiuvante è l'ipotesi che queste sottocategorie possano presentare una diversa suscettibilità e risposta al trattamento.

2.1 Fattori predittivi noti

Gli indicatori clinici predittivi di risposta includono caratteristiche cliniche e demografiche, anche se è ancora incerto se effettivamente queste caratteristiche possano prevedere in modo affidabile la risposta al NACT.

In uno studio pubblicato nel 2012¹⁵ sono stati valutati fattori predittivi clinici e patologici di risposta alla NACT in 1402 donne con carcinoma mammario localmente avanzato. Un più alto tasso di risposta patologica completa è stato rilevato nelle donne più giovani, nei tumori più piccoli e in quelli negativi per il recettore degli estrogeni o tripli negativi. La presenza di carcinoma duttale in situ (DCIS) e di invasione linfatica e vascolare (LVI) sono stati associati a inferiore pCR.

Un unico studio¹⁶ dimostra che, nei tumori mammari tripli negativi, la presenza di calcificazioni alla mammografia, riscontrate prima della chemioterapia, può predire l'efficacia del trattamento. Gli autori hanno dimostrato che le pazienti con risposta patologica completa avevano meno probabilità di

manifestare calcificazioni nei mammogrammi rispetto alle pazienti non-pCR (17 vs 58%; P:0,034). Anche se sono necessarie ulteriori indagini, si può quindi presumere che i tumori con una ricca componente intraduttale, che spesso si presenta con calcificazioni alla mammografia, siano più probabilmente resistenti alla chemioterapia.

Sembra inoltre che la densità della mammella alla mammografia sia correlata alla probabilità di risposta alla chemioterapia sistemica neoadiuvante: una bassa densità potrebbe predire una maggiore probabilità di remissione patologica completa¹⁷.

Altri fattori che vengono considerati per predire la risposta al trattamento neoadiuvante sono legati alle **caratteristiche patologiche e biomolecolari** della lesione mammaria quali il tipo istologico del tumore, lo stadio TNM, i marcatori di proliferazione delle cellule tumorali (conteggio delle mitosi e indice Ki-67), l'espressione del recettore dell'estrogeno (ER) e del recettore del progesterone (PR) e lo stato di HER2.

Per quanto **riguarda l'istotipo tumorale**, studi suggeriscono che i pazienti con carcinoma lobulare invasivo (ILC) rispondono peggio alla NACT rispetto ai pazienti con carcinoma duttale invasivo (IDC)¹⁸. Un'analisi retrospettiva di pazienti che hanno ricevuto NACT a base di antracicline ha dimostrato un tasso di pCR del 3% nelle pazienti con ILC rispetto al 15% nelle pazienti con IDC. È stato riscontrato che più pazienti con ILC erano ER positive (92 vs 62% in IDC) e avevano un grado tumorale inferiore. La differenza di pCR è comunque rimasta significativa dopo l'aggiustamento per lo stato di ER, suggerendo il carcinoma lobulare invasivo (ILC) come un fattore predittivo indipendente¹⁹. Un altro studio di confronto sugli outcome in funzione dell'istotipo tumorale, ha concluso che una minoranza di pazienti con ILC (17%) ha raggiunto una risposta patologica completa, e che la maggior parte dei pazienti (84%) è stata sottoposta a mastectomia.²⁰

Diversi articoli in letteratura riportano che alcune caratteristiche patologiche, come le **dimensioni** del tumore più piccole, la **negatività dei linfonodi ascellari** e un **grado elevato**, hanno maggiori probabilità di raggiungere una pCR²¹.

Anche il **conteggio delle mitosi** e l'**indice Ki-67**, marcatori di proliferazione delle cellule tumorali, si sono dimostrati validi fattori prognostici e predittivi. Recentemente, è stata eseguita una meta-analisi su 36 studi con un totale di 6793 pazienti per valutare il tasso di pCR e gli esiti clinici in funzione del valore di *ki-67*. Come mostrato nella figura 4, i risultati hanno rivelato che le pazienti con alto Ki-67 mostravano tassi di risposta patologica completa significativamente più alti (OR = 3,94, intervallo di confidenza al 95% [CI]: 3,33-4,67, P <0,001) rispetto a quelli con basso Ki-67²².

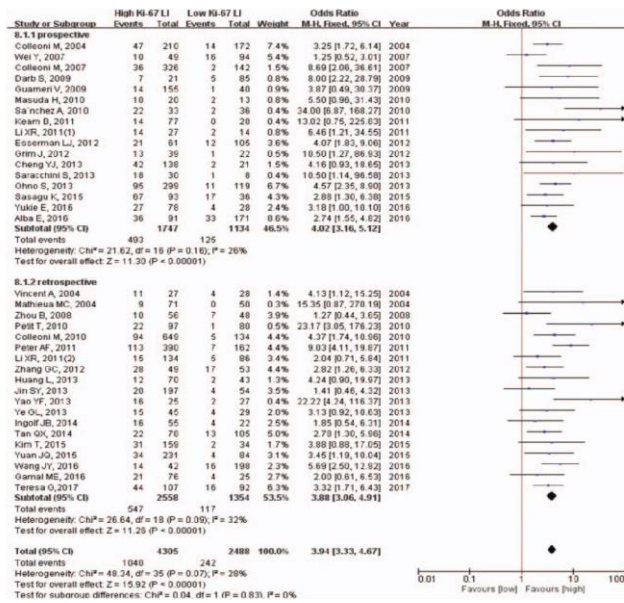


Figura 4²⁵: analisi cumulativa di Ki-67 e pCR.

Un'ulteriore meta-analisi pubblicata di recente ha confermato questo dato. L'analisi ha coinvolto 53 studi con un totale di 10.848 pazienti: l'alto valore di Ki-67 è stato associato a un alto tasso di risposta patologica completa (odds ratio: 3.10; 95% CI: 2.52-3.81), indipendentemente dalla tipologia di tumore (HR +, HER2 + e tripli-negativi)²³.

Dai numerosi studi di correlazione tra fattori biomolecolari e risposta al trattamento emerge che il **sottotipo molecolare** del tumore è il fattore predittivo più importante. La tabella 3 mostra la suddivisione del tumore mammario in sottotipi molecolari in base all'espressione di ER, PR, all'indice di proliferazione Ki-67 e alla presenza di amplificazione di HER2/neu.

Sottotipo intrinseco	Surrogato clinico-patologico
Luminali A	- ER+*, PgR+* - HER2- - Ki67 < 20%
Luminali B	Luminal B (HER2 negativi) - ER+, PgR+ - HER2- - Ki67 > 20% Luminal B (HER2 positivi) - ER+, PgR+ - HER2 + - qualsiasi Ki67
HER2 positivi	- ER -, PgR - - HER2 +
Tripla negativi	- ER-, PgR- - HER2-

Tabella 3⁵: Surrogati clinico-patologici dei sottotipi intrinseci del carcinoma della mammella; * la positività recettoriale è definita tale se ≥ 1%

In una meta-analisi che ha coinvolto 11695 pazienti provenienti da 30 studi è stata valutata l'associazione tra il sottotipo molecolare e la risposta alla chemioterapia neoadiuvante²⁴. Sono stati utilizzati due modelli, definendo tre categorie per il modello 1:

1. recettore ormonale positivo (HR + / HER2-)
2. HER2 positivo (HER2 +),
3. triplo negativo (ER- / PR- / HER2-)

e 4 categorie per il modello 2 in cui i tumori HER2 + sono stati ulteriormente classificati in:

- a. HER2 + / HR +
- b. HER2 + / HR-

In entrambi i modelli, è stata dimostrata un'associazione indipendente tra sottotipo molecolare e la risposta patologica completa ($P < 0,0001$), come mostrato in Figura 5.

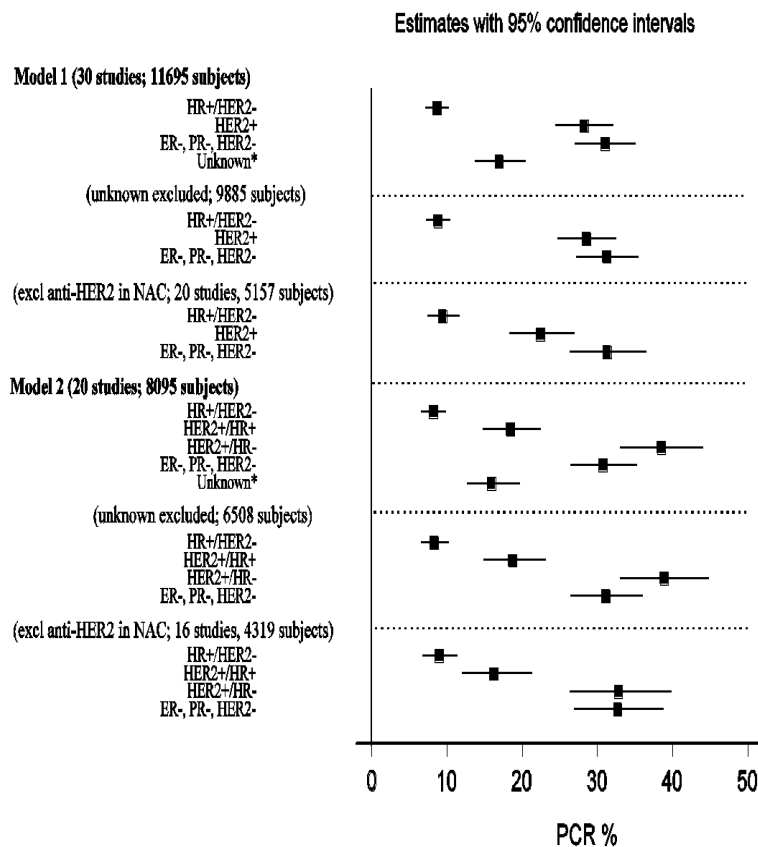


Figura 5²⁷: Stime aggregate specifiche di % di pCR in base al sottotipo di carcinoma mammario, per ciascuno dei modelli 1 e 2.

Le probabilità di ottenere una pCR sono più alte per i sottotipi triplo negativo e HER2+/HR-. Inoltre, nel sottotipo HER2+/HR-, è emersa l'importanza dell'associazione della terapia diretta contro HER2 in corso di NACT, per ottenere la pCR.

	Adjusted odds ratio (OR)		P value ^a
	OR	95% CI	
Model 1 (30 studies, 9869 subjects)			
<i>Adjusted for midpoint of timeframe (years) of study recruitment</i>			
Hormone receptor positive ^b : IIR+/IIIR2	Referent		$P < 0.0001$
HER2 positive: HER2+	4.12	3.58 4.75	
Triple negative: ER-/PR-/IIIR2	4.75	4.12 5.47	
<i>Adjusted for pCR definition (breast or breast/axilla)^c</i>			
Hormone receptor positive ^b : HR1/HER2-	Referent		$P < 0.0001$
HER2 positive: HER2+	4.15	3.61 4.78	
Triple negative: ER-/PR-/IIIR2	4.74	4.12 5.44	
<i>Adjusted for time from start of NAC to surgery</i>			
Hormone receptor positive ^b : HR+/HER2-	Referent		$P < 0.0001$
IIIR2 positive: IIIR2+	4.17	3.63 4.80	
Triple negative: ER-/PR-/HER2-	4.75	4.14 5.46	
<i>Adjusted for number of NAC cycles</i>			
Hormone receptor positive ^b : HR+/HER2	Referent		$P < 0.0001$
HER2 positive: HER2+	4.18	3.63 4.80	
Triple negative: ER-/PR-/HER2	4.74	4.13 5.45	
<i>Adjusted for sequencing of anthracycline/taxane regimen (based on studies where this was given to all or some subjects)</i>			
Hormone receptor positive ^b : HR+/HER2-	Referent		$P < 0.0001$
IIIR2 positive: IIIR2+	4.61	3.89 5.47	
Triple negative: ER-/PR-/HER2-	5.51	4.64 6.54	
Model 2 (20 studies, 6508 subjects)			
<i>Adjusted for midpoint of timeframe (years) of study recruitment</i>			
Hormone receptor positive ^b : IIR+/IIIR2	Referent		$P < 0.0001$
HER2 positive/HR1: HER2+/HR1	2.56	2.05 3.20	
IIIR2 positive/IIR: IIR2+/IIR	6.98	5.66 8.62	
Triple negative: ER-/PR-/HER2-	5.03	4.22 6.00	
<i>Adjusted for time from start of NAC to surgery</i>			
Hormone receptor positive ^b : HR+/HER2	Referent		$P < 0.0001$
HER2 positive/HR1: HER2+/HR1	2.58	2.08 3.21	
HER2 positive/HR: HER2+/HR	7.08	5.78 8.68	
Triple negative: ER-/PR-/IIIR2	5.03	4.24 5.97	
<i>Adjusted for number of NAC cycles</i>			
Hormone receptor positive ^b : HR1/HER2-	Referent		$P < 0.0001$
IIIR2 positive/IIR+: IIR2+/IIR+	2.57	2.07 3.20	
HER2 positive/HR-: HER2+/HR-	7.12	5.81 8.72	
Triple negative: ER-/PR-/IIIR2	5.02	4.23 5.96	
<i>Adjusted for sequencing of anthracycline/taxane regimen (based on studies where this was given to all or some subjects)</i>			
Hormone receptor positive ^b : IIR+/IIIR2	Referent		$P < 0.0001$
HER2 positive/HR1: HER2+/HR1	2.67	2.13 3.34	
HER2 positive/HR: HER2+/HR	7.51	6.04 9.35	
Triple negative: ER-/PR-/HER2	5.33	4.42 6.41	

^a P value for association of breast cancer subtype and pCR% in each adjusted model.

^b Hormone receptor positive: HR+ (ER+ and/or PR+)/HER2.

^c Definition of pCR (whether applied to breast or breast/axilla) was adjusted for in model (this adjustment was not performed for model 2 because the variable was not associated with pCR% in model 2 – see Section 3, Table 3).

Tabella 4²⁷: Odds ratios corretti per l'associazione del sottotipo di carcinoma mammario con la risposta patologica completa (pCR) alla chemioterapia neoadiuvante (NAC).

Nel 2018 è stato pubblicato uno studio che ha incluso un totale di 13.939 donne statunitensi con carcinoma mammario cT1-4, N1-3, M0 sottoposte a NACT, realizzato con l'obiettivo di caratterizzare la relazione tra sottotipo molecolare e risposta al trattamento²⁵. I tumori sono stati suddivisi in quattro sottotipi così rappresentati: 322 (2%) luminali A, 5941 (43%) luminali B, 2274 (16%) Her2+ e 5402 (39%) TN. Il sottotipo molecolare si è dimostrato fortemente influente per quanto riguarda il tipo di risposta: stabilità o progressione di malattia sono più frequenti nei tumori Luminal A e B (Her2-), al contrario, esiti più favorevoli si registrano nei tumori HER2+ e TN. Complessivamente, il 19% di tutte

le pazienti ha raggiunto una risposta patologica completa mammaria ed ascellare, con percentuale più bassa in caso di malattia Luminale A (0,3%) e il più alta nella malattia Her2+ (38,7%). La figura 6 indica il tipo di risposta (6a) e i tassi di risposta patologica completa (6b) per sottotipo molecolare.

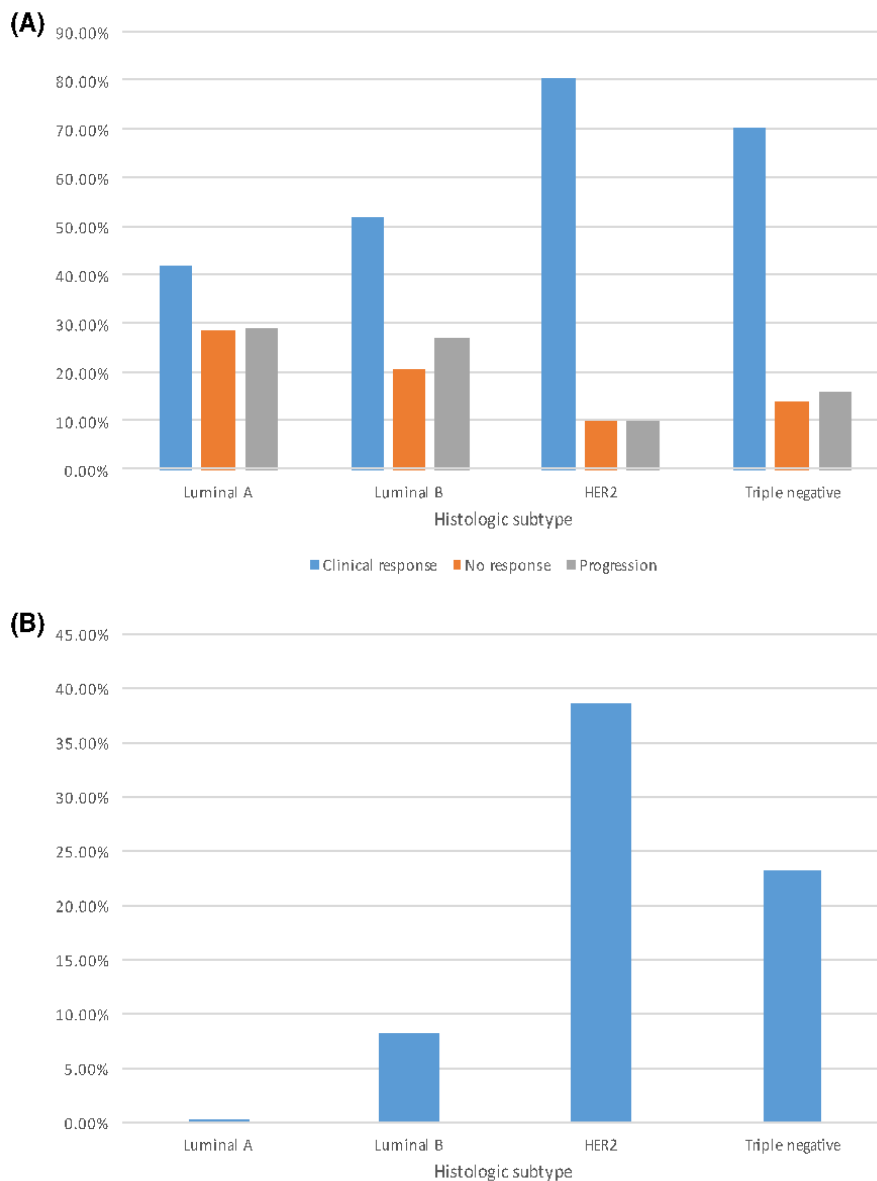


Figura 6a: tipo di risposta alla chemioterapia neoadiuvante per sottotipo molecolare.

Figura 6b: tassi di risposta patologica completa per sottotipo molecolare.

2.2 Fattori predittivi in studio

Il sottotipo molecolare è quindi il fattore predittivo indipendente di pCR più importante, eppure, anche all'interno delle categorie molecolari, il tasso di risposta è altamente eterogeneo. Per esempio, nelle pazienti con tumore Luminale HER2 negativo nelle quali generalmente ci si attende un effetto chemioterapico inferiore rispetto a quello degli altri sottotipi, si possono incontrare pazienti che rispondono bene al trattamento, ottenendo in alcuni casi addirittura una risposta patologica completa. Al contrario, in alcune pazienti con tumore HER2 positivo, nelle quali ci aspettiamo un'ottima risposta al trattamento neoadiuvante, i risultati sono ben distanti dall'atteso. Dal punto di vista clinico, sarebbe importante identificare, all'interno delle categorie molecolari, sotto-popolazioni, per le quali ci possiamo aspettare un tipo di risposta diverso da quello predetto sulla sola base del sottotipo tumorale²⁶.

Una priorità emergente è quella di studiare **nuovi fattori predittivi clinici e biomolecolari di pCR** come mezzo per predire la risposta alla chemioterapia. Diversi studi hanno esaminato retrospettivamente pazienti affette da carcinoma mammario e sottoposte a NACT, per studiare meglio la relazione tra l'espressione di alcuni marcatori biomolecolari e gli effetti del trattamento. La terapia neoadiuvante rappresenta un ottimo modello per la ricerca clinica, grazie alla disponibilità di campioni tissutali pre e post terapia. È così possibile analizzare l'espressione di marcatori biomolecolari sui campioni tissutali prima del trattamento e valutare il loro valore predittivo di risposta analizzando l'efficacia del trattamento sul pezzo operatorio.

Studi recenti hanno focalizzato l'attenzione su nuovi biomarcatori come il recettore per gli androgeni (AR), il FOXA1, il fosfoistone H3 (PHH3) e l'infiltrato linfocitario tumorale (TILs).

L'alta espressione di **FOXA1**, un membro della classe forkhead delle proteine leganti il DNA, cruciale per il legame estrogeno indotto del recettore steroideo al DNA e la successiva trascrizione, sembra essere associata a una peggiore risposta alla NACT, essendo la sua espressione caratteristica dei tumori di tipo Luminale. Analogamente, sembra che la positività per i **recettori per gli androgeni** conferisca una maggiore resistenza alla terapia neoadiuvante²⁷⁻²⁸. Per quanto riguarda il **fosfoistone H3**, sembra che la sua espressione sia correlata con una migliore risposta alla NACT²⁹. L'utilizzo del PHH3 in ambito mammario è attualmente limitato, si tratta di un marcatore di proliferazione cellulare che può offrire vantaggi in termini di riproducibilità ed accuratezza rispetto alla conta in ematossilina eosina delle mitosi e alla valutazione del Ki67 poiché la valutazione del PHH3 avviene in immunistochemica facilitano l'interpretazione per i patologi e lo stato fosforilato dell'istone H3 può essere identificato solo durante la mitosi (transizione da G2 tardiva a fase M) ma non in interfase o in apoptosi. Tuttavia, la relazione tra l'espressione di questi biomarcatori e la risposta alla chemioterapia non è ancora chiara. Le valutazioni esistenti sono limitate a piccole serie e mancano in una analisi integrata dei diversi biomarcatori.

2.3 HER2 e sottocategorie

Il carcinoma della mammella è una malattia estremamente eterogenea, anche all'interno di categorie definite permane un'elevata variabilità.

Con l'acronimo **HER2** viene identificato il recettore 2 per il fattore di crescita epidermico umano; appartiene alla famiglia delle proteine ErbB e viene codificato dall'oncogene ErbB2 situato nel braccio lungo del cromosoma 17. HER2 è una proteina a funzione di recettore di membrana del tipo tirosin-chinasico, posizionata esternamente alla cellula e coinvolta nelle vie di traduzione del segnale che portano alla crescita e al differenziamento cellulare. Le cellule epiteliali mammarie normali hanno una copia del gene ErbB2 su ciascun cromosoma 17 ed esprimono circa 20.000 recettori HER2 per cellula. Quando il gene ErbB2 è sovraespresso/amplificato, i recettori HER2 sulla superficie delle cellule tumorali sono significativamente aumentate (si stima che possano superare i 2.000.000). La sovraespressione di HER2 stimolerà la sua attività chinasica intrinseca, con conseguente attivazione di cascate di segnali intracellulari che coinvolgono la proliferazione cellulare, la sopravvivenza, l'angiogenesi, l'invasione e la metastatizzazione; tutti fattori che contribuiscono direttamente a una biologia aggressiva del tumore.

Per quanto riguarda la **valutazione dell'espressione di HER2**, i metodi impiegati sono l'immunoistochimica (IHC) e, in seconda battuta, l'ibridazione in situ (in situ hybridization, ISH, tipicamente in fluorescenza, nota come FISH). L'**immunoistochimica** consente la quantificazione da parte del patologo dell'espressione di membrana del recettore HER2 attraverso una valutazione della quantità di cellule colorate (cut off 10%), dell'intensità di colorazione e della distribuzione della colorazione (completa o moderata). L'analisi restituisce uno score di 0, 1+, 2+ e 3+ corrispondente ad una sempre maggiore espressione del recettore. La figura 7 mostra i dettagli di attribuzione dello score secondo IHC.

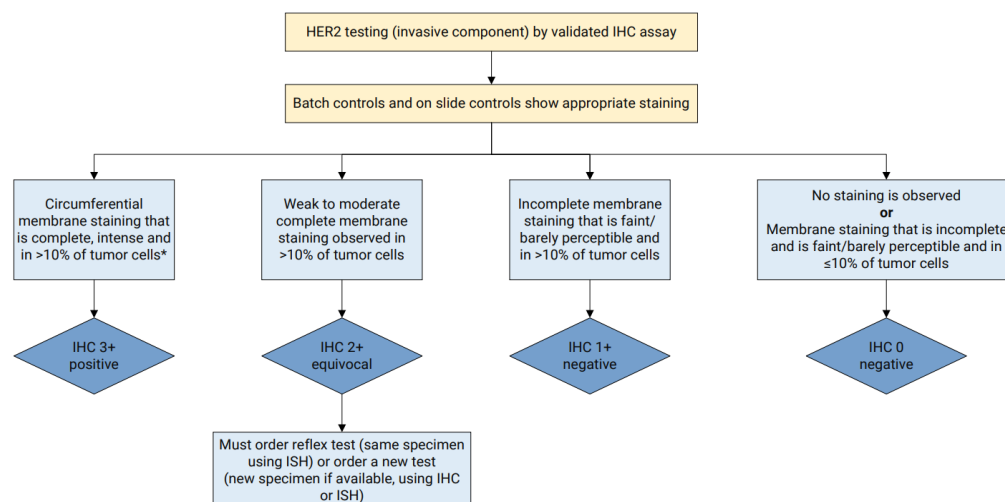


Figura 7³⁰: algoritmo per la valutazione di HER2 in IHC

Secondo uno studio, gli score 0, 1+, 2+ e 3+ corrispondono a un numero di recettori HER2 sulla membrana cellulare di circa 20.000, 100.000, 500.000 e 2.300.000 per cellula³¹.

L'**ibridazione in situ**, viene effettuata nei casi di score 2+ all'IHC e valuta l'amplificazione del gene (positiva o negativa).

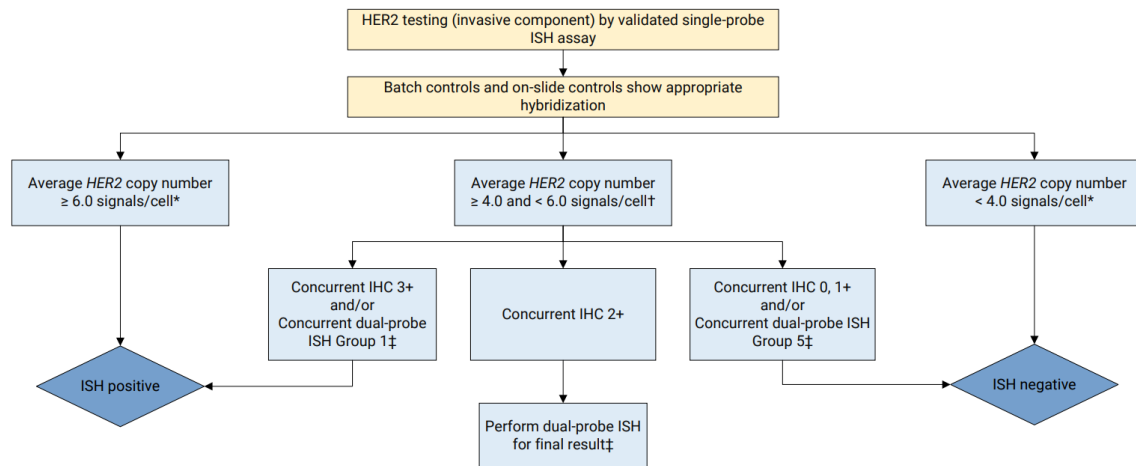


Figura 8³²: algoritmo per la valutazione di HER2 con FISH test

Nonostante l'espressione cellulare di HER2 abbia un **andamento continuo**, l'espressione di HER2 è stata resa **dicotomica** definendo le cellule tumorali HER2 positive o negative.

Il tumore viene definito **HER2 positivo** se la metodica IHC definisce una notevole presenza recettoriale sulla membrana cellulare con score 3+ (HER2 3+) o intermedia con score 2+ ma con successiva positività all'amplificazione genica con metodica FISH (HER2 2+ FISH positivo). Il tumore viene invece definito **HER2 negativo** se la metodica IHC definisce l'assenza di recettore sulla membrana con score 0 (HER2 0), una scarsa presenza recettoriale con score 1+ (HER2 1+) o intermedia con score 2+ e successiva negatività all'amplificazione genica con metodica FISH (HER2 2+ FISH negativo).

I tumori **HER2 positivi** rappresentano circa il 15% (10-20%, alcuni studi 25%)³³ dei tumori mammari e sono caratterizzati da una aggressività maggiore, un decorso clinico più rapido e una prognosi peggiore³¹. Tuttavia, con lo sviluppo di agenti ad azione mirata contro HER2, a partire dall'anticorpo monoclonale Trastuzumab, seguito dai diversi anticorpi monoclonali umanizzati Pertuzumab, dagli inibitori tirosin-chinasici (TKI) Lapatinib, Neratinib e Tucatinib, fino agli anticorpi coniugati con agenti chemioterapici (ADC) T-emtansina o T-deruxtecan, la storia naturale e la prognosi dei tumori mammari HER2 positivi sono cambiati drasticamente, diventando HER2 un fattore predittivo e prognostico positivo.

Questi farmaci sono sempre stati approvati esclusivamente per pazienti con tumori HER2 positivi, avvalorando la distinzione dicotomica in due categorie HER2 ben definite. Tuttavia, recenti studi hanno dimostrato significativi benefici clinici dall'utilizzo di farmaci anti HER2, in particolare gli anticorpi

coniugati con agenti chemioterapici (ADC), in un sottogruppo di pazienti con carcinoma mammario avanzato, HER2 negativo ma che esprimano anche se a bassi livelli HER2 (bassa espressione di HER2). Questa categoria viene definita **HER2 Low** e comprende tumori HER2 1+ e HER2 2 + FISH negativo. Recentemente, l'AIFA, sulla scorta di studio di fase III DESTINY-Breast04³⁴ e del parere favorevole di FDA ed EMA, ha approvato l'utilizzo di T-deruxtecan in pazienti con tumore mammario metastatico HER2 Low che abbiano già ricevuto una o due linee precedenti di chemioterapia. Questa decisione ha scardinato la tipica distinzione dicotomica di HER2 nei tumori mammari, valutando l'espressione di HER2 come un continuum e aprendo alla possibilità di considerare concretamente sottocategorie anche all'interno degli HER2 negativi.

Attualmente gli HER2 Low sono argomento di studio e discussione con numerose pubblicazioni e trial clinici che ne valutino il potere prognostico e predittivo in previsione di trattamenti non solo in ambito metastatico ma anche adiuvante e neoadiuvante.

Altra sottocategoria interessante, all'interno degli HER2 positivi, è quella degli **HER2 3+**, definita con una sovraespressione di HER2 già evidente all'IHC con score 3+. Ad oggi questa categoria non trova un riscontro clinico specifico in quanto viene trattata al pari degli HER2 2+ FISH positivo con farmaci anti HER2, ma viene descritta una sua particolare suscettibilità ai trattamenti con ottimi tassi di pCR in ambito neoadiuvante e conseguenti buoni outcomes di sopravvivenza, nonostante la natura intrinsecamente più aggressiva del tumore all'esordio.

HER2 Low

Come detto, i tumori **HER2 Low** sono caratterizzati da una bassa espressione di HER2 definita con score IHC score 1+ o score 2+ con FISH test negativo. Si differenziano all'interno degli HER2 negativi dai tumori HER2 0 (score 0 all'IHC) come una categoria che esprime comunque HER2, seppur in minor quantità rispetto agli HER2 positivi.

La proteina del recettore HER2 è espressa ad un livello rilevabile dall'IHC (score 1+ e superiore) nel 60-70% dei tumori mammari³⁵. Poiché i tumori HER2 positivi rappresentano circa il 15% complessivo, circa il **45-55 %** dei tumori mammari rientra nella categoria HER2 Low. Schettini et al³⁶ definisce che tra gli HER2 Low, circa il 67% ha score 1+.

Sembra che gli HER2 Low siano caratterizzati da **mutazioni differenti** rispetto agli HER2 0 che generalmente hanno mutazioni a livello dei regolatori dei checkpoint, della via di p53, del pathway del ciclo cellulare e mutazioni caratteristiche dell'anemia di Fanconi. I tumori HER2 Low hanno più mutazioni a carico di PI3K-Akt, sia rispetto ad HER0 che ad HER+³⁷. Oltre alla mutazione su PIK3CA (31%), sono molto rappresentate GATA3 (18%), TP53 (17%), and ERBB2 (8%)³⁸. Sono state riscontrate differenze genetiche anche tra tumori HER2 Low ed HER2 positivi. Gli HER2 Low ha maggiore rischio di essere positivo per EGFR e negativo per ER/HER3/HER4, il che si traduce in un grado istologico superiore.

In merito alle **caratteristiche clinico patologiche** di presentazione all'esordio della malattia, i tumori HER2 positivi sono sempre stati associati a caratteristiche più aggressive con linfonodi positivi, stadio avanzato, tasso di proliferazione più elevato e mancanza di espressione dei recettori ormonali. Conseguentemente, se non trattati con agenti mirati anti HER2, sono caratterizzati da prognosi peggiore con minor disease free survival (DFS) e overall survival (OS). Queste caratteristiche non sono così marcatamente osservabili nei tumori HER2 Low quando confrontati con gli HER2 0. I dati in letteratura sono fortemente contrastanti e gran parte della variabilità dipende da come sono stati classificati i tumori HER2 Low. I lavori più datati includevano in questa categoria solo i tumori con IHC score 2+ FISH negativo, contrapponendoli ai tumori HER2 0 e 1+. Considerando che all'interno dell'attuale classificazione circa il 67% degli HER2 Low ha score 1+, si capisce come sia difficile confrontare studi che utilizzano classificazioni differenti.

Per esempio, Rossi et al³⁹ ha concluso che lo stato HER2 Low rappresenta un fattore prognostico negativo determinando un peggiore DFS e OS, ma mettendo a confronto pazienti con carcinoma mammario HER2 2+/FISH-negativo (considerate HER2 Low) Vs HER2 0 o 1+. Analogamente, Eggemann et al⁴⁰ ha studiato 5.907 casi di carcinoma mammario, concludendo che rispetto ai tumori HER2 0 o 1+, i tumori HER2 2+/FISH-negativi sono più grandi, più frequentemente con linfonodi

positivi, con grado tumorale più elevato, e maggiore Ki-67, presentando quindi una prognosi peggiore. Arrivando a studi più recenti che utilizzano l'attuale classificazione, nella maggior parte delle analisi, i tumori HER2 Low rispetto a quelli HER2 0 non sembrano presentare significative differenze. De Moura Leite et al⁴¹ in un'interessante analisi retrospettiva su una casistica di 855 pazienti con tumore HER2 negativo, non ha riscontrato differenze significative in termini di dimensioni del tumore, interessamento linfonodale, stadio di malattia, grado tumorale o Ki67. L'analisi è stata effettuata confrontando HER2 Low vs HER2 0 nell'intera popolazione e all'interno dei due sottotipi molecolari Luminale e TNBC, ottenendo risultati sovrapponibili. Unico dato statisticamente significativo è la prevalenza di sottotipo molecolare Luminale tra gli HER2 Low (82%), mentre la distribuzione tra gli HER2 0 è meno sbilanciata con il 53% di Luminali e 47% di TNBC.

Per quanto riguarda **HER2 Low come fattore prognostico e predittivo**, ci si aspetterebbe una prognosi peggiore per questa categoria, che viene trattata al pari degli HER2 0, senza quindi l'utilizzo di agenti HER2 specifici, tuttavia, anche in questo caso, i dati in letteratura sono contrastanti. Interessanti risultati provengono dalle analisi di correlazione tra lo stato di HER2 Low e la **risposta a trattamenti neoadiuvanti (NACT)**. L'outcome valutato è la risposta patologica completa (pCR), ottimo indice in vivo di efficacia del trattamento. Al momento non sono approvati agenti anti HER2 in pazienti HER2 Low in regine neoadiuvanti, possiamo solamente estrapolare dati indiretti osservazionali, confrontando le due categorie (HER2 0 / HER2 Low) all'interno del gruppo HER2-negativo, fino ad oggi gestito e trattato in modo omogeneo senza la somministrazione di agenti anti HER2, analizzando il tasso di pCR e i successivi outcome di sopravvivenza. Altra possibilità è l'analisi degli outcome di sopravvivenza dopo trattamento adiuvante standard.

Di Cosimo and co⁴² ha valutato la risposta alla NACT, riscontrando una risposta alla terapia inferiore nei tumori HER2 Low. In assenza di risposta completa alla terapia, i tumori HER2 Low hanno una prognosi negativa, soprattutto tra i TNBC. Simili risultati sono stati ottenuti nel 2022 da Zhang and co⁴³, i tumori HER2 Low, rispetto agli HER2 0, presentavano una risposta patologica completa inferiore dopo la terapia neoadiuvante standard. Sempre nel 2022, Guven et al. hanno pubblicato i risultati di uno studio randomizzato controllato che delinea un aumentato rischio di metastasi cerebrali in pazienti con tumore mammario HER2 Low. Nel 2007 Glicrease end co⁴⁴ ha condotto uno studio su 91 pazienti con carcinoma mammario invasivo e linfonodi positivi, trattate con mastectomia e chemioterapia adiuvante a base di doxorubicina (senza trastuzumab). L'espressione di HER2 $\geq 1+$ era significativamente associata a una ridotta sopravvivenza libera da recidiva locoregionale, ridotta sopravvivenza specifica per malattia e ridotta sopravvivenza globale.

Tuttavia, non tutti gli studi sono concordi nell'attribuire una prognosi migliore ai tumori HER2 0 rispetto agli HER2 Low. Yakup end co⁴⁵ ha pubblicato una metanalisi nel 2023, in cui viene condotto un confronto tra neoplasie a basso stadio HER2 0 ed HER2 Low, concludendo che i tumori HER2 Low

sono associati ad un migliore DFS e OS rispetto agli HER2 0, a prescindere da quale sia l'espressione recettoriale. Al medesimo risultato sono arrivati Wei e colleghi, che hanno pubblicato anch'essi una metanalisi sul tema nel 2023⁴⁶. Sempre a sostegno di queste evidenze troviamo lo studio di Almstedt e colleghi. Dei 351 pazienti presi in analisi, 198 (56.4%) presentavano un tumore HER2 Low e 153 (43.6%) presentavano una neoplasia HER2 0. Lo studio evidenzia come i pazienti HER2 Low abbiano una DFS significativamente più lunga; nell'ambito del sottogruppo esprimente i recettori ormonali è stata riscontrata anche una differenza in termini di OS, che non è invece emersa nel gruppo HR negativo⁴⁷.

Infine, altri studi non hanno riscontrato differenze in termini di pCR alla NACT e prognosi tra HER2 Low ed HER0. De Moura Leite et al, non riscontra un impatto significativo dello stato di HER2 Low vs HER2 0 in termini di pCR sia nel gruppo Luminale che TNBC dopo trattamento standard con antracicline⁴¹. Parallelamente, anche gli outcomes di sopravvivenza non presentano differenze significative in termini di disease free survival (DFS) e overall survival (OS), come mostrato nella figura 9, sotto riportata.

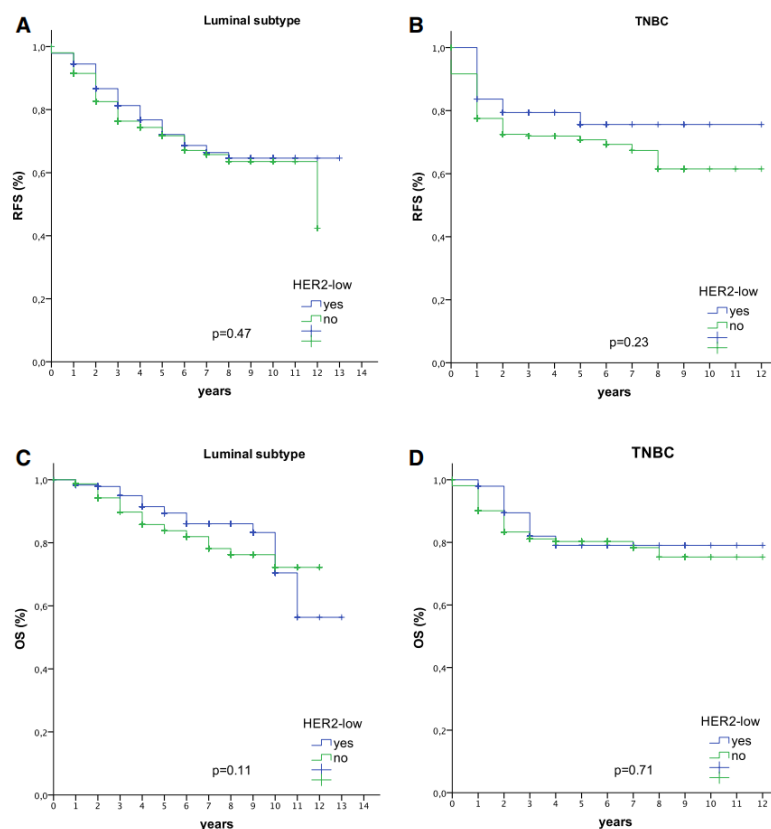


Fig.2 Relapse-free and overall survival curves according to the HER2-low classification among molecular subtypes. **A** and **B** show relapse-free survival curves according to the molecular subtype (luminal/TNBC) stratified by HER2-low status. **C** and **D** show overall

survival curves according to the molecular subtype (luminal/TNBC) stratified by HER2-low status. Survival curves were estimated with the Kaplan-Meier method and compared with log-rank test

Figura 9: outcomes di sopravvivenza in termini di progression free survival (PFS) e overall survival (OS).

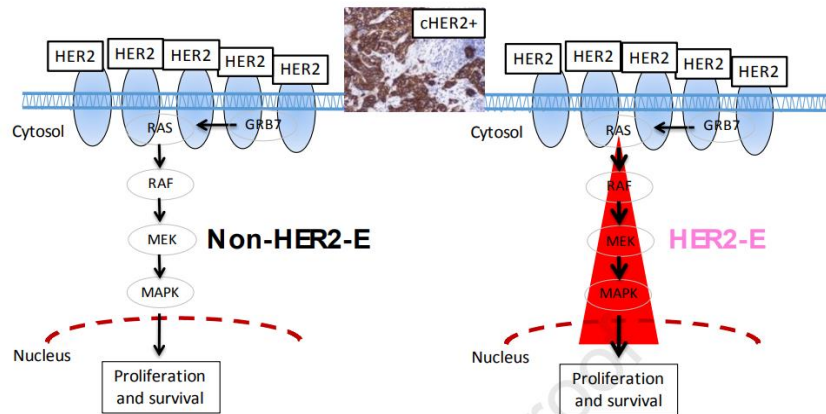
La discordanza tra i risultati dei diversi trial potrebbe essere dovuta ad eventuali fattori confondenti. In primi, come detto precedentemente, da come sono stati classificati i tumori HER2 Low (se includono o meno la categoria HER2 1+). In secondo luogo, poichè fino ad oggi la distinzione HER2 0 e HER2 1+ non comportava alcuna conseguenza clinica, la precisione con cui i patologi hanno valutato i bassi score potrebbe essere non ottimale. Un lavoro, addirittura, riporta un tasso di concordanza tra patologi differenti per lo score HER2 0 del 15% con una riclassificazione a HER2 1+ del 75%⁴⁸.

HER2 3+

Anche l'attuale definizione di HER2 positivo non rispecchia la reale eterogeneità di questa categoria, l'espressione dei recettori HER2 è variabile con quantità nettamente superiori per gli score IHC 3+ (HER2 3+). Come detto, gli HER2 3+, si differenziano all'interno degli HER2 positivi come una categoria che esprime alti livelli di HER2 e sembra essere altamente sensibile agli agenti anti HER2 mostrando più alti tassi di risposta patologica completa.

In letteratura esistono numerosi studi che correlano il sottotipo molecolare con i tassi di risposta patologica completa: stabilità o progressione di malattia sono più frequenti nei tumori Luminal A e B (HER2 negativi), al contrario, esiti più favorevoli si registrano nei tumori HER2+ e TN. Nel 2018 è stato pubblicato uno studio che ha incluso un totale di 13.939 donne statunitensi con carcinoma mammario cT1-4, N1-3, M0 sottoposte a NACT, realizzato con l'obiettivo di caratterizzare la relazione tra sottotipo molecolare e risposta al trattamento⁴⁹. Complessivamente, il 19% di tutte le pazienti ha raggiunto una risposta patologica completa mammaria ed ascellare, con percentuale più bassa in caso di malattia Luminale A (0,3%) e il più alta nella malattia HER2 positiva (38,7%). Analogamente, una meta-analisi che ha coinvolto 11695 pazienti provenienti da 30 studi⁵⁰ ed uno studio su ampia casistica condotto da Haque et al.⁵¹, le probabilità di ottenere una pCR sono in assoluto più alte per il sottotipo HER2+ non luminale con tassi rispettivamente del 38,9% e del 38,7%. Anche il sottotipo Luminale HER2+ ha ottenuto alti tassi di risposta con un 18,7% segnalato nella metanalisi sopra citata.

Se è noto il dato di una risposta migliore tra gli HER2 positivi non luminali rispetto agli HER2 positivi luminali, allo stato attuale delle nostre conoscenze, non esistono dati sulla differente chemiosensibilità tra i tumori HER2 3+ ed i tumori HER2 2+ FISH positivo, che esprimono sempre il recettore HER2, ma in minor quantità. Relativamente a questo discorso, possiamo estrapolare alcune informazioni a partire dai dati relativi ai tumori HER2 Enriched (HER2 E) che rappresentano un sottotipo molecolare identificato attraverso l'analisi dell'espressione genica, caratterizzato da un'alta espressione di geni ErbB2 e conseguentemente una massiva espressione dei recettori HER2. Non vi è una corrispondenza diretta e univoca tra tumori HER2 Enriched ed HER2 score 3+ in IHC, ma alcune informazioni preliminari sugli HER2 3+ possono essere estrapolate dagli studi sugli HER2 Enriched.



Legend. cHER2+: clinically HER2-positive; HER2-E: HER2-Enriched. The red cone visually suggests a higher activation of the HER2-related pathway in cHER2+/HER2-E tumors, compared to cHER2+/non-HER2-E.

Figura 10: maggiore attivazione delle vie di trasmissione del segnale nelle cellule HER2-E rispetto alle cellule non HER2-E

I dati in letteratura sono pochi, sembra che i tumori HER2 E siano associati ad un tasso maggiore di pCR a seguito di regimi a base di farmaci anti HER2. Una recente metanalisi condotta da Schettini et al⁵² ha incluso sedici studi ed in tutti i lavori il sottotipo HER2 E è risultato significativamente associata a pCR (odds ratio [OR] = 3,50, $p < 0,001$), nel sottotipo Luminale (OR = 3,61, $p < 0,001$), nei tumori HR-negativi (OR = 2,28, $p = 0,01$). Gli autori concludono affermando che i tumori HER2 E hanno una maggiore probabilità di ottenere una pCR dopo una terapia neoadiuvante a base di anti-HER2, indipendentemente dello stato HR e dell'uso della TC.

Risultati simili vengono raggiunti da uno studio ben condotto su 451 pazienti HER2 positive sottoposte a NACT in cui il sottotipo HER2 E è significativamente associato ad un maggior tasso di pCR⁵³.

3- OPZIONI DI TRATTAMENTO NEOADIUVANTE

I regimi chemioterapici comunemente utilizzati nel contesto adiuvante sono efficaci anche come trattamenti neoadiuvanti.

I regimi usati per le pazienti con malattia HER2-negativa prevedono la somministrazione di antraciclina (A) e ciclofosfamide (C) seguiti da un taxano (docetaxel o paclitaxel). Vengono proposti 4 cicli con antraciclina e ciclofosfamide, eventualmente secondo schema a “dose-dense” (EC o AC ogni due settimane), seguiti dai taxani nello schema che considera paclitaxel settimanale per 12 cicli. In alternativa si possono utilizzare regimi senza antracicline, per esempio docetaxel e ciclofosfamide (TC), proposti nei casi in cui le antracicline siano controindicate, in particolare nei casi di malattia cardiaca, età avanzata, fattori di rischio cardiaco (es. ipertensione e diabete mellito).

Nelle donne con carcinoma mammario triplo negativo l’aggiunta del carboplatino ad uno schema standard con antracicline e taxani può essere una valida opzione. L’aggiunta del platino è stata valutata

in diversi studi. Una recente revisione sistematica e metanalisi ha incluso 9 studi randomizzati (n=2109) che ha confrontato regimi chemioterapici neoadiuvanti contenenti platino vs regimi privi di platino per pazienti con carcinoma mammario triplo negativo⁵⁴. L'analisi ha mostrato come l'aggiunta di platino si associa ad un' aumentata probabilità di ottenere una risposta patologica completa (54.2% vs 37.1% OR 2.04; 95% CI 1.39-3.00). Tuttavia, l'utilizzo del platino non è risultato associato significativamente ad una migliore sopravvivenza in termini di event-free survival o overall survival. Sempre nel **tumore triplo negativo**, in casi selezionati è possibile considerare l'associazione con inibitori dei checkpoint immunitari (pembrolizumab) in base alle evidenze dello studio Keynote522⁵⁵⁻⁵⁶. Lo studio ha dimostrato un aumento significativo dei tassi di pCR con pembrolizumab rispetto a placebo (64.8% versus 51.2%, p<0.0001). In considerazione del vantaggio osservato in termini di pCR e EFS, pur in assenza di un vantaggio in OS (dati immaturi), a oggi l'aggiunta di pembrolizumab al trattamento chemioterapico neoadiuvante standard in pazienti con carcinoma mammario triplo-negativo stadio II-III è da approvato e rappresenta il nuovo standard di trattamento.

Nelle pazienti con carcinoma mammario **HER2 positivi** candidate a terapia sistemica primaria, la chemioterapia dovrebbe essere sempre associata a farmaci anti HER2 (Trastuzumab). Sebbene non sia emerso un rischio clinicamente significativo di cardiotossicità con i regimi che prevedevano trastuzumab concomitante ad antracicline nel trattamento neoadiuvante del carcinoma HER2+⁵⁷, lo schema più diffuso rimane la sequenza di antracicline e taxani con il trastuzumab somministrato in concomitanza con i taxani. Nelle pazienti con tumori operabili HER2 positivi (stadio II-IIIa), uno studio randomizzato di fase II⁵⁸⁻⁵⁹ ha valutato l'aggiunta di trastuzumab a una chemioterapia con paclitaxel e FEC riscontrando un'elevata percentuale di pCR, l'assenza di ripresa di malattia e l'assenza di tossicità significative. Nelle pazienti con tumori HER2+ localmente avanzati o infiammatori uno studio randomizzato (studio NOAH)⁶⁰ ha confrontato la sola chemioterapia neoadiuvante con la stessa chemioterapia in combinazione con il trastuzumab. L'aggiunta del trastuzumab ha aumentato significativamente la percentuale di pCR sia nella popolazione complessiva che nel sottogruppo di pazienti con la mastite carcinomatosa (38% verso 20%)⁶¹. Da una metanalisi di 5 studi, l'aggiunta di trastuzumab alla chemioterapia neoadiuvante è risultata associata ad una maggiore probabilità di ottenere una pCR (38% vs 21%, RR 1.85, 95% CI 1.39-2.46, p<0.001)⁶².

Studi recenti hanno valutato il ruolo di altri farmaci anti HER2 (lapatinib e pertuzumab) nel trattamento neoadiuvante del carcinoma HER2 positivo, evidenziando come la combinazione di chemioterapia con due agenti anti-HER2 (doppio blocco) determini tassi di pCR più elevati, mai finora osservati (sino al 65%)⁶³⁻⁶⁴. In Italia l'uso di lapatinib in associazione trastuzumab e chemioterapia in fase neoadiuvante non è autorizzato. Ad oggi, l'impiego di pertuzumab, in associazione a trastuzumab e chemioterapia, in fase neoadiuvante nei casi di carcinoma HER2+ localmente avanzato, infiammatorio o allo stadio iniziale ad alto rischio di recidiva è approvato e rimborsato dall'AIFA.

Per quanto riguarda la **terapia post-chirurgica**, se è stata completata una precedente chemioterapia per 6-8 cicli, non c'è la necessità di un ulteriore trattamento chemioterapico adiuvante ad eccezione di alcune situazioni specifiche

Nelle pazienti con tumore **triplo negativo** che non abbiano ottenuto una pCR alla NACT è indicato offrire un trattamento adiuvante con capecitabina, approvata sulla scorta dei risultati dello studio CreateX4⁶⁵. L'analisi ha mostrato che la sopravvivenza libera da malattia è superiore nel gruppo capecitabina rispetto al gruppo di controllo con placebo (74,1% vs 67,6% a 5 anni; P = 0,01), lo stesso si è visto per la sopravvivenza globale a 5 anni (89,2% vs 83,6%, P = 0,01).

Nelle pazienti con tumore triplo negativo trattate precedentemente con Pembrolizumab (+ chemioterapia), anche se hanno ottenuto una pCR, può essere considerato completare il trattamento pembrolizumab in monoterapia (q3w) per 6 mesi complessivi.

Nelle pazienti con carcinoma mammario **HER2 positivi** che hanno effettuato terapia adiuvante con un taxano associato a Trastuzumab, in caso di pCR l'indicazione è quella di completare il trattamento con Trastuzumab per un totale di 12 mesi. Nel caso presentino malattia invasiva residua dopo chirurgia, è, invece, possibile sostituire il Trastuzumab di mantenimento con il **Trastuzumab emtansine (T-DM1)**: un coniugato farmaco-anticorpo di trastuzumab e dell'agente citotossico emtastina (DM1). Uno studio di fase 3 in cui le pazienti sono state randomizzate a proseguire il trattamento adiuvante con Trastuzumab o a sostituire il farmaco con T-DM1, ha riportato un rischio di recidiva e di morte inferiore del 50% nel braccio T-DM1 rispetto al solo trastuzumab¹⁴.

In pazienti con carcinoma mammario **HR-positivo/HER2negativo** ad alto rischio di recidiva, oltre al trattamento endocrino, in caso di malattia residua dopo trattamento sistemico neoadiuvante vi è l'indicazione al trattamento con inibitori di cicline (CDK 4/6i), per le pazienti ad alto rischio. Tre studi randomizzati di fase III hanno valutato l'aggiunta CDK4/6i alla terapia endocrina adiuvante nelle pazienti candidate a ormonoterapia adiuvante ad alto rischio di recidiva. Di questi, due studi (PALLAS e PENELOPE-B) hanno valutato l'associazione di palbociclib alla terapia endocrina⁶⁶⁻⁶⁷ e uno (MonarchE) l'aggiunta di abemaciclib⁶⁸. Di questi tre studi, solamente il MonarchE ha dimostrato un beneficio statisticamente significativo in termini di iDFS (invasive disease-free survival) e DDFS (distant disease-free survival) dall'aggiunta di abemaciclib per 2 anni in associazione ad ormonoterapia rispetto al trattamento con sola ormonoterapia. Per questo motivo, in pazienti con carcinoma mammario HR+/HER2- N+ ad alto rischio (positività ≥ 4 linfonodi ascellari o da 1 a 3 linfonodi ascellari con almeno una delle seguenti condizioni: dimensioni della neoplasia ≥ 5 cm e/o grado istologico) un trattamento adiuvante con abemaciclib più terapia endocrina può essere considerato rispetto a terapia endocrina.

Infine, in pazienti con neoplasia HER2-negativo e con **mutazioni germinali nei geni BRCA1/2**, che presentino caratteristiche istopatologiche ad alto rischio (≥ 4 linfonodi ascellari e/o residuo di malattia

e CPS/EG score >3 dopo NACT) e che abbiano completato il trattamento loco-regionale e la chemioterapia (neo/adiuvante), si potrebbe proporre un trattamento adiuvante con olaparib (+ terapia ormonale se HR+) sulla base dello studio OlympiA⁶⁹ che ha dimostrato un vantaggio significativo in termini di iDFS, DDFS, OS, secondi tumori a favore di olaparib versus nessun trattamento in queste pazienti.

Infine, recentemente l'AIFA ha approvato l'utilizzo di Trastuzumab-deruxtecan in pazienti con **tumore mammario metastatico HER2 Low** che abbiano già ricevuto una o due linee precedenti di chemioterapia. Lo studio di fase III DESTINY-Breast04³⁴ ha valutato l'impiego di trastuzumab deruxtecan rispetto alla chemioterapia a scelta dell'investigatore (capecitabina, eribulina, gemcitabina, paclitaxel o nab-paclitaxel) in pazienti pretrattati con una o due linee di chemioterapia per malattia avanzata e almeno una linea di terapia endocrina, che presentino bassa espressione di HER2 (HER2 Low). Lo studio è globalmente positivo sia in termini di incremento delle risposte obiettive, che di prolungamento della PFS e della OS. È stato infatti osservato un incremento numerico della mediana di PFS (8,5 mesi rispetto a 2,9 mesi; HR 0,46; IC95% 0,24- 0,89) e della mediana di OS (18,2 mesi rispetto a 8,3 mesi; HR 0,48; IC95% 0,24-0,95). Inoltre, anche il tasso di risposte obiettive è risultato superiore (50,0% vs 16,7%).

L'approvazione di un trattamento specifico per pazienti HER2 Low rappresenta un aspetto molto importante, sia perché per la prima volta viene proposto un trattamento con farmaci anti HER2 a pazienti fino ad ora classificate come HER2 negative, sia perché queste acquisizioni in campo metastatico potrebbero essere traslate in ambito neoadiuvante offrendo un trattamento con farmaci anti HER2 anche a pazienti HER2 Low.

4- VALUTAZIONI PRE-TRATTAMENTO

Nel percorso decisionale, oltre a valutare le indicazioni al trattamento e i fattori predittivi di risposta alla terapia mediante biopsia (con la determinazione dello stato recettoriale ormonale, di HER2, del grado e del Ki67), è importante effettuare una valutazione completa e approfondita dell'estensione della lesione tumorale mammaria, dello stato del cavo ascellare ed escludere la presenza di eventuali metastasi a distanza⁵.

Imaging mammaria

Nella maggior parte dei casi per documentare l'estensione della malattia prima della terapia neoadiuvante vengono utilizzate la mammografia e l'ecografia mammaria. È stato però dimostrato come la **risonanza magnetica (RMN) mammaria** rappresenti lo strumento più accurato per la valutazione dell'estensione della malattia prima dell'inizio del trattamento e della risposta in corso e al termine della terapia neoadiuvante⁵. Una recente revisione di letteraturasottolinea come sia essenziale, prima di iniziare la terapia neoadiuvante, eseguire l'imaging diagnostica per entrambe le mammelle, associando,

a seconda dello stadio della malattia, l'imaging *total body*. L'imaging in questa fase dovrebbe essere mirata a definire l'estensione radiologica della malattia e la stadiazione loco-regionale, per una pianificazione terapeutica ottimale⁷⁰. Per la valutazione radiologica della risposta, dovrebbero essere utilizzata la stessa modalità di imaging e il medesimo protocollo impiegato prima dell'inizio del trattamento. Tra i metodi attualmente stabili, la RMN mammaria offre la massima accuratezza diagnostica nella valutazione della risposta alla terapia primaria per una corretta pianificazione dell'intervento chirurgico. Inoltre, può fornire informazioni rilevanti circa l'estensione tumorale in caso di sospetta malattia multicentrica, in caso di mammella densa alla mammografia, in caso di adenopatie mammarie interne e/o profonde o ancora in caso di sospetta invasione dei muscoli e della parete toracica⁵.

Valutazione dei linfonodi

L'esame obiettivo del cavo ascellare è raccomandato in tutti i casi di nuova diagnosi di carcinoma mammario e nel caso in cui si siano identificate adenopatie ascellari è suggerito l'agospirato o l'agobiopsia per la conferma cito-istologica⁵. In pazienti con cavo clinicamente negativo (cNO) all'esame obiettivo, le linee guida dell'NCCN¹⁵ raccomandano l'imaging ascellare prima dell'inizio della terapia sistemica preoperatoria, utilizzando ecografia ascellare o risonanza magnetica.

Stadiazione della malattia

La stadiazione è suggerita nei casi di malattia clinica in stadio II - III o nei casi di carcinoma infiammatorio o ancora in pazienti con sintomi sospetti (compresi anormali valori di laboratorio) che potrebbero essere riferiti a metastasi occulte⁵.

5- VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA ALLA CHEMIO-TERAPIA NEOADIUVANTE

Le pazienti che ricevono un trattamento neoadiuvante devono essere sottoposte a **periodiche valutazioni cliniche** durante il periodo di terapia, per valutare la risposta e per assicurarsi che il tumore non progredisca.

Per le **pazienti in progressione** durante il trattamento neoadiuvante è suggerito l'anticipo dell'intervento chirurgico. Se la paziente viene ritenuta inoperabile dovrebbe essere proposta una nuova linea di chemioterapia, con farmaci non cross-resistenti, con l'obiettivo di raggiungere l'operabilità o la possibilità di trattamento radioterapico.

Per le pazienti che ottengono un **buon risultato alla chemioterapia** andando incontro ad una risposta parziale o completa, è importante valutare radiologicamente la risposta per poter programmare l'intervento più adeguato. Successivamente, un'attenta valutazione anatomopatologica sul pezzo operatorio consentirà di definire con precisione il tipo di risposta patologica al trattamento⁵.

Per **risposta clinica completa** si intende l'assenza di lesioni a livello mammario e ascellare rilevabili alla visita clinica e all'imaging al termine del trattamento neoadiuvante; mentre la **risposta patologica completa** è definita come l'assenza di cellule tumorali nel campione chirurgico, sia nel sito del tumore primario che nei linfonodi regionali.

5.1 Valutazione radiologica

Nel corso degli studi sulla terapia neoadiuvante sono stati utilizzati numerosi metodi per valutare la risposta del tumore. Al momento, non esistono linee guida consolidate che diano indicazioni su quale sia il modo migliore per valutare la risposta del tumore alla NACT. I metodi attualmente utilizzati consistono nell'esame fisico e nell'imaging convenzionale con mammografia, ecografia e RMN mammaria⁶².

L'accuratezza **dell'esame clinico** del seno per la determinazione della pCR in pazienti con carcinoma mammario localmente avanzato dopo ormonoterapia o chemioterapia neoadiuvante è del 57%, risulta quindi inferiore alla mammografia (74%) e all'ecografia (79%)⁷¹. Le difficoltà nell'esecuzione dell'esame clinico comprendono la presenza di tessuto fibro-ghiandolare solido e di fibrosi post-terapia, che può far sovrastimare la quantità di malattia residua. Allo stesso modo, la non palpabilità della lesione dopo il trattamento non esclude la presenza di tumore residuo.

I dati riguardanti l'accuratezza diagnostica della mammografia e dell'ecografia per valutare la risposta alla terapia neoadiuvante sono variabili. In un'analisi di sei studi, l'accuratezza della mammografia e dell'ecografia è risultata del 74% e 79%, rispettivamente⁷⁷.

La **mammografia** ha dimostrato di essere più sensibile rispetto all'esame fisico per la rilevazione della presenza di tumore residuo, ma è meno specifica e può sottostimare il grado di risposta al trattamento. Il tipo di lesione mammografica, come la distorsione architettonica, e i margini influiscono sulla precisione della misurazione delle dimensioni. La precisione è ridotta quando i margini sono indistinti o spiculati e nel caso in cui avvenga mascheramento da parte del tessuto normale adiacente⁷². Ulteriori difficoltà sono rappresentate dalla presenza di microcalcificazioni, che non sono necessariamente correlate alla presenza di tumore⁷³.

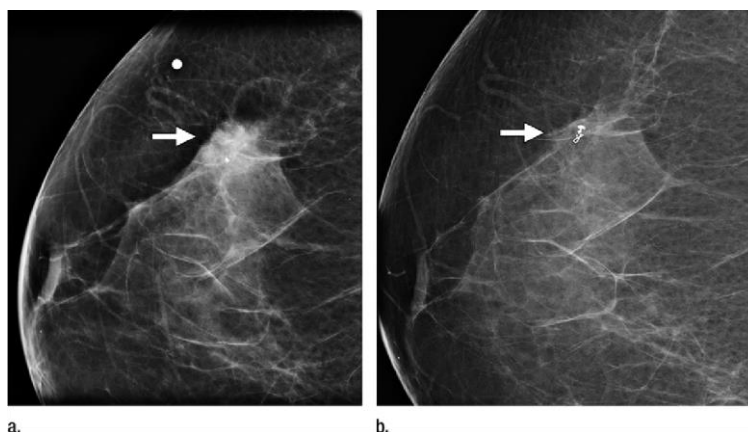
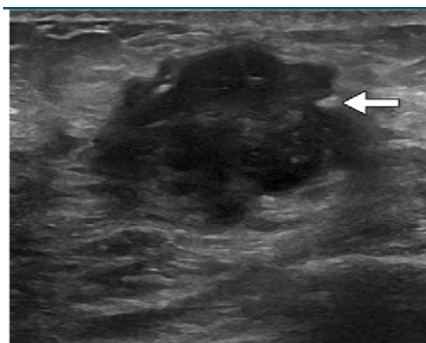


Figura 11⁶²: donna di 65 anni con una massa palpabile mammella destra. (a) mammografia diagnostica con massa irregolare ad alta densità di 1,8 cm con margini indistinti e microcalcificazioni associate (freccia). (b) La mammografia dopo la terapia neoadiuvante mostra la risoluzione della massa e una clip bioptica (freccia) adiacente a una calcificazione distrofica grossolana. La risposta patologica completa è stata confermata con tumorectomia.

L'ecografia è in grado di predire con maggiore accuratezza le dimensioni patologiche del tumore rispetto alla mammografia dopo il trattamento neoadiuvante⁷⁷. Inoltre, l'ecografia è la metodica più accurata nel predire la risposta dei linfonodi ascellari rispetto alla mammografia e all'esame obiettivo⁷⁴.

Un metodo efficace per predire la risposta patologica completa sembra essere la combinazione di mammografia ed ecografia (probabilità dell'80% quando i risultati di entrambe le modalità sono negativi)⁷⁵.



a.

Figura 12⁶²: donna di 65 anni con una massa palpabile a livello della mammella sinistra. (a) La scansione ecografica dopo la mammografia diagnostica mostra una massa corrispondente ipoecogena di 3,1 cm con margini angolari (freccia).

L'imaging con **RMN mammaria** è, ad oggi, la modalità di imaging più accurata per la valutazione della risposta del tumore alla terapia neoadiuvante⁷⁶ presentando una migliore accuratezza rispetto alla mammografia, all'ecografia o al semplice controllo clinico. In un'analisi combinata di sei studi, il valore predittivo positivo della RMN è risultato del 93% con un'accuratezza complessiva dell'84%⁷⁷.

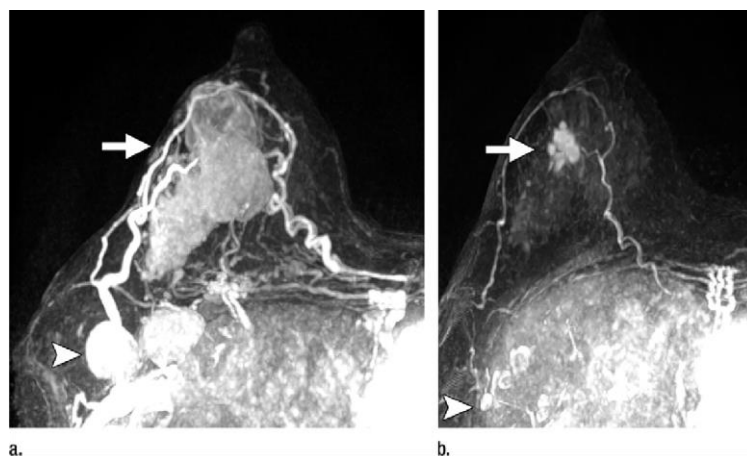


Figura 13⁶²: donna di 37 anni con carcinoma mammario destro di stadio clinico IIIA (T3N1M0) e linfadenopatia ascellare metastatica. (a) La proiezione a massima intensità alla RM con mezzo di contrasto eseguita prima della chemioterapia neoadiuvante dimostra l'aumento della massa del seno destro (freccia) e della linfadenopatia ascellare (punta della freccia) di 6,4 cm. (b) L'immagine RM del seno dopo chemioterapia neoadiuvante mostra una risposta parziale del carcinoma mammario primario (freccia) e una diminuzione della linfadenopatia ascellare destra (punta di freccia).

Nonostante questi dati promettenti, la RMN non è attualmente abbastanza affidabile da consentire alle pazienti di evitare la resezione chirurgica in caso di risposta radiologica completa. Uno studio pubblicato di recente ha confrontato la risposta mammaria ed ascellare radiologica al trattamento con la valutazione anatomopatologica del pezzo operatorio in 129 pazienti⁷⁷. La risonanza magnetica ha dimostrato avere un valore predittivo positivo per la risposta patologica completa a livello mammario del 63,4% (26 su 41) e un valore predittivo negativo nell'84,1% (74 su 88). Delle 32 pazienti con metastasi linfonodali accertate e linfonodi ancora sospetti alla RMN post-NAC, in 11 è stata documentata una pCR ascellare, mentre in 33 pazienti con linfonodi negativizzati alla RMN post-NAC, 6 avevano metastasi al referto patologico finale (tabella 5 e 6). Questo lavoro ha concluso che la risposta radiologica completa mediante risonanza magnetica non è in grado di predire la pCR con un'adeguata precisione da sostituire la valutazione patologica.

Variable	pCR in breast		No pCR in breast		Total, n
	n	%	n	%	
rCR in breast	26*	63.4	15	36.6	41
No rCR in breast	14	15.9	74 [†]	84.1	88
Total	40	—	89	—	129

*Positive predictive value.

[†]Negative predictive value.

pCR, pathologic complete response; rCR, radiologic complete response.

Tabella 5⁸³: correlazione tra risposta radiologica completa mammaria alla risonanza magnetica post-NACT e risposta patologica completa.

Axillary nodal status on MRI*	Final pathology of axillary nodes			
	Nodal pCR [†] (n = 33)		No nodal pCR [†] (n = 32)	
	n	%	n	%
Abnormal pre-NAC, normal post-NAC (n = 33)	22 [‡]	66.7	11	33.3
Abnormal pre- and post-NAC (n = 32)	11	34.4	21 [§]	65.6

*Patients with pre-NAC biopsy-proven malignancy, but who had normal nodes on MRI pre- and post-NAC were not included in the tables.
[†]pCR defined as no residual disease in the axillary nodes.
[‡]Post-neoadjuvant chemotherapy MRI negative predictive value.
[§]Post-neoadjuvant chemotherapy MRI positive predictive value.
NAC, neoadjuvant chemotherapy; pCR, pathologic complete response.

Tabella 6⁸³: correlazione tra risposta radiologica completa linfonodale alla risonanza magnetica post-NACT e risposta patologica completa.

Diversi fattori possono influenzare l'accuratezza diagnostica della RM nella valutazione della risposta alla terapia: il sottotipo molecolare del tumore è un fattore chiave. La precisione della RM nel determinare la dimensione del tumore residuo dopo la terapia neoadiuvante è maggiore nei tumori ER-negativi / HER2 positivi e tripli-negativi ed è meno accurata nei tumori luminali⁷⁸. Anche il tipo di regime chemioterapico può influenzare l'accuratezza diagnostica della RM, che può sottostimare la malattia residua in pazienti trattati con taxani e farmaci antiangiogenici⁷⁹. Un ulteriore fattore che può influire sulla precisione dell'imaging con RM è il pattern di risposta del tumore, la RM può sottostimare la malattia residua quando si verifica la frammentazione e i piccoli focolai di cellule tumorali sono disseminati su una vasta area, al contrario può sovrastimare la malattia residua se c'è una risposta infiammatoria e una fibrosi reattiva a livello del letto tumorale trattato⁸⁰.

Il potenziale impatto clinico della sovrastima della dimensione del tumore residuo è che vengano eseguite resezioni di una maggiore quantità di tessuto durante la chirurgia mammaria conservativa, questo può influenzare negativamente l'esito estetico o determinare la scelta di effettuare una mastectomia. La sottostima delle dimensioni del tumore residuo aumenta il rischio di eseguire una resezione incompleta con margini positivi e necessità di re-intervento.

Nonostante i limiti sopra indicati, l'utilizzo della RM mammaria per la valutazione della risposta alla terapia neoadiuvante è raccomandato dall'American College of Radiology e dalla European Society of Breast Imaging⁸¹⁻⁸² ed è incluso nelle linee guida NCCN come uno strumento opzionale¹⁵.

5.2 Valutazione anatomo-patologica

La risposta patologica completa osservabile dopo terapia neoadiuvante, è definita come l'assenza di cellule tumorali nel campione chirurgico, sia nel sito del tumore primario che nei linfonodi regionali (ypT0 ypN0). Il carcinoma in situ duttale residuo è generalmente incluso nella pCR, perché la sua eventuale persistenza non influisce sul rischio di recidiva a distanza⁵.

È importante sottolineare che i campioni chirurgici di pazienti che hanno ricevuto la NACT possono essere problematici da valutare da parte del patologo, in particolare se c'è stata una risposta completa al trattamento il sito tumorale può essere difficile da identificare sia macroscopicamente che microscopicamente.

Valutazione del grado di risposta alla chemioterapia

La classificazione della risposta clinica alla terapia neoadiuvante è incluso nei sistemi dell'International Union Against Cancer (UICC) e del TNM. Tuttavia, questi non includono la valutazione istologica del grado di risposta e, soprattutto, non forniscono un confronto con lo stato di malattia prima del trattamento.

Il sistema TNM valuta la risposta alla NACT mediante l'uso delle categorie yTNM (clinico) e ypTNM (patologico), dove ypT0 denota una risposta patologica completa del tumore primario e ypN0 denota uno stato negativo dei linfonodi dopo il trattamento neoadiuvante. È importante notare come una valutazione ypN0 non consente di discriminare tra i casi in cui il cavo ascellare era negativo all'esordio e lo è ancora dopo il trattamento o era positivo all'esordio e si è negativizzato il corso di NACT.

Sono stati suggeriti diversi metodi per quantificare istologicamente la risposta post-operatoria del tumore, sebbene non siano stati validati in grandi studi clinici e non vi sia un consenso unanime su quale abbia il miglior impatto prognostico.

I due metodi più comunemente utilizzati per definire il grado di risposta alla NACT sono la classificazione secondo *Pinder et al.*⁸³ e secondo *Smith et al.*⁸⁴, entrambe incorporano la valutazione istologica del grado di risposta e dettagliano il tipo di risposta sia a livello mammario che ascellare.

- **Classificazione secondo *Pinder et al.***

Tumore - classe 1: risposta patologica completa

- (i): assenza di malattia residua
- (ii): assenza di carcinoma invasivo ma presenza di CDIS

Tumore - classe 2: risposta parziale alla terapia:

- (i): minima malattia residua/ near total effect (<10% di tumore residuo)
- (ii): evidenza di risposta alla terapia ma 10-50% di tumore residuo
- (iii): >50% di cellularità tumorale residua rispetto alla core-biopsy, sebbene alcune caratteristiche della risposta alla terapia siano presenti

Tumore-classe 3: non evidenza di risposta alla terapia

Linfonodi-classe 1: non evidenza di malattia metastatica e assenza di alterazioni linfonodali

Linfonodi-classe 2: assenza di metastasi con evidenza patologica di risposta terapeutica (es. fibrosi)

Linfonodi-classe 3: presenza di metastasi con evidenza patologica di risposta terapeutica (fibrosi)

Linfonodi-classe 4: presenza di metastasi senza evidenza patologica di risposta terapeutica (fibrosi)

- Classificazione secondo *Smith et al.*

Le caratteristiche del **tumore primario** devono essere valutate da G1 a G5:

1. nessuna riduzione del numero complessivo di cellule tumorali rispetto alla *core biopsy* pretrattamento;
2. lieve diminuzione di cellule tumorali, ma la cellularità complessiva rimane alta;
3. riduzione fino al 90% delle cellule tumorali;
4. marcata scomparsa con solo piccoli cluster rimasti;
5. nessun tumore invasivo, carcinoma in situ o reazione stromale residua.

Allo stesso modo i **linfonodi** sono classificati come:

- A. vero negativo, nessuna metastasi e nessuna alterazione;
- B. metastasi senza alterazioni istologiche;
- C. metastasi con alterazioni;
- D. nessuna metastasi con alterazioni.

Tutti questi sistemi di valutazione della risposta istologica alla chemioterapia neoadiuvante si basano su un accurato campionamento del sito precedente del tumore e dei linfonodi.

PARTE SPERIMENTALE

1- RAZIONALE E SCOPO DELLO STUDIO

Il vantaggio principale della **chemioterapia neoadiuvante** (neoadjuvant chemotherapy [NACT]) è il miglioramento degli esiti chirurgici: la NACT può rendere resecabili tumori altrimenti non operabili, può permettere il *downstaging* della neoplasia in pazienti con carcinoma mammario operabile che desiderano una chirurgia mammaria conservativa e può consentire, in situazioni particolari, l'omissione della dissezione ascellare. Inoltre, l'uso della terapia sistemica preoperatoria offre l'opportunità di osservare il tipo di risposta del tumore al trattamento, fornendo importanti informazioni sull'efficacia della terapia stessa e sulla prognosi. Il raggiungimento di una risposta patologica completa (pathologic complete response [pCR]) è associato a migliori outcome di sopravvivenza. Questa correlazione è più forte per le pazienti con carcinoma mammario triplo negativo, meno per la malattia positiva ai recettori ormonali. Infine, studi recenti hanno dimostrato che, in pazienti che non abbiano ottenuto una pCR al termine del trattamento neoadiuvante, l'aggiunta in regime adiuvante di un trattamento con Capecitabina nei tumori triplo negativi (TN) o la sostituzione del Trastuzumab con TDM-1 nei tumori Her2 positivi, può migliorare gli outcome di sopravvivenza.

La possibilità di **predire il tipo di risposta alla NACT** rimane ancora una sfida a causa della natura altamente eterogenea del carcinoma mammario che presenta diversi sottotipi a livello molecolare, istopatologico e clinico. La risposta del NACT dipende da numerosi fattori, tra i quali l'estensione della malattia, la biologia del tumore, il tipo e dalla durata della chemioterapia. Dimensioni del tumore piccole, l'assenza di linfonodi ascellari interessati, il grado elevato e l'alta espressione di Ki67 indicano maggiore probabilità di raggiungere una risposta patologica completa, anche se il più importante fattore predittivo indipendente di pCR sembra essere il sottotipo molecolare. Le donne con malattia Luminale A sono le meno inclini a raggiungere una risposta completa, con tassi invece più alti nella malattia HER2 positiva e triplo negativa. Tuttavia, anche in queste categorie, il tasso di risposta è altamente eterogeneo e dal punto di vista clinico, è importante identificare, sotto-popolazioni per le quali ci possiamo aspettare un tipo di risposta diverso da quello predetto sulla sola base del sottotipo tumorale. Parallelamente sarebbe importante individuare pazienti che potrebbero beneficiare dell'introduzione di trattamenti mirati.

A questo proposito recentemente è stata messa in discussione la classica distinzione dicotomica dei tumori mammari in HER2 positivi (ICH 3+, ICH 2+ FISH positivo) ed HER2 negativi (ICH 0+, ICH 1+, ICH 2+ FISH negativo); introducendo, all'interno del gruppo HER2 negativo, una nuova categoria definita **HER2 Low** (HER2 1+, HER2 2+ FISH negativo) che si differenzia dagli HER2 0 come una popolazione cellulare che esprime comunque una certa quantità di recettore di membrana. Allo stesso

modo, tra gli HER2 positivi, gli **HER2 3+**, si differenziano degli HER2 2+ FISH positivo per una più ricca presenza di recettori HER2 sulla membrana cellulare.

Tra le pazienti con tumore HER2 negativo, la recente approvazione di un trattamento con agenti anti HER2 mirati in ambito metastatico nella sottocategoria HER2 Low rappresenta un aspetto molto importante, sia perché per la prima volta è stata riconosciuta una nuova sottocategoria di HER2, sia perché queste acquisizioni in campo metastatico potrebbero essere traslate in ambito neoadiuvante, offrendo un trattamento con farmaci anti HER2 anche alle pazienti HER2 Low, fino ad ora classificate come HER2 negative

Ad oggi abbiamo solo trial clinici che prevedono la somministrazione in regime neoadiuvante di farmaci anti HER in pazienti con tumori HER2 Low¹. In questo setting, possiamo solamente estrapolare dati indiretti osservazionali, confrontando le due categorie (HER2 0 / HER2 Low) all'interno del gruppo HER2 negativo, fino ad oggi gestito e trattato in modo omogeneo.

Per quanto riguarda gli HER2 3+, considerati come entità a sé stante tra gli HER2 positivi, ad oggi non abbiamo proposte di trattamento differenziato. Esprimendo una maggior quantità di recettori HER2 sulla membrana cellulare, potrebbero rappresentare una sottocategoria maggiormente sensibile al trattamento neoadiuvante con agenti anti HER2.

Questa Tesi, presenta un'analisi retrospettiva multicentrica da noi condotta su pazienti con tumore mammario, sottoposte a NACT e successivamente a intervento chirurgico. Nello studio sono state caratterizzate le diverse sottocategorie di HER2 in termini di presentazione clinico-patologica del tumore all'esordio, di capacità predittiva di risposta al trattamento neoadiuvante (tassi di pCR) e di esiti a medio/lungo termine (disease free survival [DFS] e overall survival [OS]). Lo scopo è stato quello di conoscere meglio queste sottocategorie per valutare se l'introduzione di farmaci anti HER2 per le pazienti HER2 Low possa avere un razionale e per migliorare la selezione delle pazienti a cui proporre un trattamento neoadiuvante con agenti anti HER2 tra le pazienti HER2 positive.

2- MATERIALI E METODI

2.1- Popolazione in studio

Lo studio è stato condotto retrospettivamente su una casistica multicentrica di 508 pazienti affette da carcinoma mammario e sottoposte a chemioterapia neoadiuvante tra il 2010 ed il 2023 presso le "Breast Unit" di "A.O.U. Città della Salute e della Scienza" (374 pazienti) e "A.O. Ordine Mauriziano" (134 pazienti) di Torino. Tutte le pazienti sono state successivamente sottoposte ad intervento chirurgico mammario ed ascellare.

La **selezione delle pazienti** è stata effettuata mediante la ricerca in *database* dedicati e prospetticamente compilati presso le rispettive *Breast Unit*. I criteri utilizzati per reclutare le pazienti all'interno dello

studio sono stati gli stessi per entrambe le strutture ospedaliere, sono state escluse le pazienti sottoposte a ormonoterapia neoadiuvante e pazienti metastatiche non sottoposte ad intervento chirurgico dopo il trattamento. Non sono state escluse le pazienti con tumore infiammatorio, le pazienti con infiltrazione o ulcerazione cutanea, né quelle con estensione diretta alla parete toracica. Entrambe le strutture ospedaliere hanno applicato le medesime linee guida nazionali ed internazionali per la scelta del tipo di trattamento neoadiuvante e per la gestione chirurgica delle pazientigarantendo uniformità nella gestione dei casi⁵⁻¹⁵. Nello specifico, paziente HER2 negative (compresa la categoria HER2 Low) non hai mai ricevuto trattamento con Trastuzumab o agenti simili e tutte le pazienti HER2 positive sono tate trattate con farmaci anti HER2.

Tutte le pazienti trattate presso i due Istituti firmano routinariamente, al momento della presa in carico, un consenso informato all'utilizzo anonimo dei dati clinici e strumentali per scopi scientifici.

Per ogni paziente sottoposta a chemioterapia neoadiuvante e successivo intervento:

- Le informazioni **anagrafiche** e **anamnestiche** riguardanti la neoplasia e i trattamenti effettuati sono state ottenute attraverso la consultazione del *database* prospetticamente compilato delle rispettive *breast Unit* e confermate dalla lettura dei referti delle visite cliniche, degli esami strumentali e degli istologici effettuati in ospedale.
- Le informazioni riguardanti i dati **anatomopatologici** ed **immunoistochimici** della lesione prima dell'inizio della chemioterapia neoadiuvante sono state ricavate dalla lettura dei referti della biopsia mammaria effettuata prima di iniziare il trattamento.
- Le informazioni relative al **pezzo operatorio** sono state ricavate dalla lettura del referto istologico definitivo con specifica attenzione sul tipo di risposta al trattamento.
- Le informazioni relative al **DFS e OS** sono state ottenute mediante aggiornamento del follow-up tramite revisione degli ultimi referti, presenti sul servizio informatico di reparto, relativi a visite della paziente press la nostra divisione o, dove non reperibili, tramite contatto telefonico alla paziente stessa.

2.2- Valutazione delle core biopsy pre-NACT

Il materiale proveniente dalle *core biopsy* delle lesioni mammarie effettuate prima dell'inizio del trattamento neoadiuvante è stato trattato seguendo i protocolli standard che prevedono fissazione in formalina tamponata, inclusione in paraffina, taglio di sezioni dello spessore di 2 micron e successiva colorazione con ematossilina eosina. Sullo stesso materiale vengono eseguite le colorazioni immunoistochimiche.

Nella valutazione della biopsia, in tutte le pazienti vengono routinariamente analizzati l'istotipo e il grado della lesione, l'espressione del recettore per gli estrogeni (ER) e per il progesterone (PgR),

l'espressione di Her2. Per lo studio in questione, queste valutazioni non sono state ripetute; i dati sono stati ricavati dalla lettura dei referti risalenti al momento della diagnosi.

Le **reazioni immunoistochimiche** sono state eseguite utilizzando il sistema automatizzato Ventana BenchMark XT (VentanaMedical System Inc., Tucson, AZ. Gli anticorpi impiegati e le condizioni delle reazioni che sono state utilizzate presso il reparto di Anatomia Patologica “Città della Salute e della Scienza” sono elencati in Tabella 7. Gli anticorpi utilizzati dal reparto di Anatomia Patologia “A.O. Ordine Mauriziano” sono stati i medesimi, con le eccezioni mostrate in tabella per PgR e Ki-67.

Marcatore	Clone anticorpo	Specie	Ditta	Smascheramento	Diluizione	Localizzaz.
ER	SP1	Rabbit	Ventana /Roche	52' CC1	Prediluito	Nucleo
PgR	1A6	Mouse	Novocastra	52' CC1	1:40	Nucleo
A.O Mauriziano	1E2	Mouse	HD/Leica ^[11] _[SEP] Ventana/Roche	36 CC1	Prediluito	
Ki 67	MIB-1	Mouse	Dako ^[11] _[SEP]	36' CC1	1:80	Nucleo
A.O Mauriziano	(30-9)	Mouse	Ventana/Roche	36' CC1	Prediluito	
HER2	4B5	Rabbit	Ventana/Roche	36' CC1	Prediluito	Membrana citoplasm.

Tabella 7: Marcatori e anticorpi utilizzati per le reazioni di immunoistochimica con le relative caratteristiche

Il *cut-off* utilizzato per definire **ER** e **PgR** espressi (positivi) è stato fissato a 1%, come riportato dal Consensus di St. Gallen 2011 e riconfermato dallo stesso Consensus del 2023.

Per suddividere i tumori ad alto o basso indice replicativo è stato utilizzato il *cut-off* del 18% per **Ki-67**.

Lo stato di **HER2** è stato definito in immunoistochimica come positivo (3+) o negativo (0, 1+); nelle pazienti in cui il valore è risultato 2+, è stato richiesto l'esame FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) come raccomandato anche dalle linee guida del 2023 ASCO (“American Society of Clinical Oncology”)/CAP (“College of American Pathologists”).

Il **grado nucleare** è stato utilizzato come variabili continua categorica con valori da 1 a 3, 1) basso, 2) intermedio, 3) alto.

Sulla base dell'espressione dei recettori per estrogeni e progesterone, del valore di Ki67 e dello stato di HER2, i tumori sono stati divisi in **sottotipi molecolari**. La nostra casistica è stata divisa in 4 categorie di seguito riportate:

- Luminali HER2 negativo (HR + / HER2-),

- Luminali Her2 positivi (HR + / HER2+),
- HER2 positivo (HR-/HER2 +),
- Triplo negativi (ER- / PR- / HER2-).

2.3- Valutazione della risposta alla chemioterapia neoadiuvante

La risposta patologica al trattamento è stata valutata su pezzo operatorio. In entrambi i centri i campioni vengono routinariamente analizzati da un patologo dedicato alla senologia. I campioni pervengono al laboratorio di Anatomia Patologica a fresco in sacchetti sottovuoto; qui vengono sottoposti a processo di fissazione in formalina tamponata al 10% per circa 20 ore a temperatura ambiente. Il patologo provvede quindi al prelievo del tessuto significativo. Il materiale viene incluso in paraffina e tagliato in sezioni da 5 micron. Infine, vengono effettuate le colorazioni in ematossilina eosina e le colorazioni immunohistochimiche.

La **risposta patologica** al trattamento è stata valutata utilizzando il sistema di classificazione proposto da Pinder⁸⁹, che stratifica il residuo tumorale secondo i seguenti criteri:

Tumore - classe 1: risposta patologica completa

(i): assenza di malattia residua

(ii): assenza di carcinoma invasivo ma presenza di CDIS

Tumore - classe 2: risposta parziale alla terapia:

(i): minima malattia residua/ *near total effect* (<10% di tumore residuo)

(ii): evidenza di risposta alla terapia ma 10-50% di tumore residuo

(iii): >50% di cellularità tumorale residua rispetto alla *core-biopsy*, sebbene alcune caratteristiche della risposta alla terapia siano presenti

Tumore-classe 3: non evidenza di risposta alla terapia

Linfonodi-classe 1: non evidenza di malattia metastatica e assenza di alterazioni linfonodali

Linfonodi-classe 2: assenza di metastasi con evidenza patologica di risposta terapeutica (es. fibrosi)

Linfonodi-classe 3: presenza di metastasi con evidenza patologica di risposta terapeutica (fibrosi)

Linfonodi-classe 4: presenza di metastasi senza evidenza patologica di risposta terapeutica (fibrosi)

Per risposta patologica completa è stata considerata la completa assenza di tumore invasivo residuo nel campione esaminato. La presenza di CDIS è stata inclusa nella pCR. La pCR mammaria e linfonodale è stata utilizzata per valutare il valore predittivo dei fattori noti.

2.4- Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software IBM SPSS Statistics 1.0.0.1213.

Le analisi di correlazione sono state condotte utilizzando test non parametrici (test del chi quadrato di Pearson). La determinazione delle probabilità di sopravvivenza, di recidiva globale, recidiva locale e a distanza sono state definite dalle curve di Kaplan-Meier e le differenze sono state confrontate utilizzando il test di Wilcoxon-Breslow.

È stato stabilito a priori un livello di significatività statistica pari a 0,05 e quindi considerati statisticamente significativi i valori di $p < 0,05$.

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il software SPSS software (version 19, IBM Inc, Armonk, USA).

3- RISULTATI

3.1- Caratterizzazione dei tumori HER2 Low e HER2 3+

Il campione di 508 pazienti è composto da 310 tumori HER2 negativi e 198 HER2 positivi.

Tra gli HER2 negativi, 209 pazienti sono Luminali e 101 triplo negativi (triple negative breast cancer [TNBC]). La distribuzione di HER2 0, HER2 1+ e HER2 2+ FISH negativo è rispettivamente di 140, 81 e 89 pazienti, con un totale di 170 di HER2 Low corrispondente al 54.9% degli HER2 negativi. La percentuale di HER2 Low sul totale delle pazienti è invece del 33.4% (170/508).

HER 2 negativi ^{n 310}	Numero casi	Percentuale
Sottotipo molecolare		
Luminali	209	67.4%
TNBC	101	32.6%
Sottocategoria		
HER2 0	140	45.1%
HER2 1+	81	26.2%
HER2 2+ FISH negativo	89	28.7%
➔ HER2 Low	170	54.9%

Tabella 8: HER2 negativi, sottotipo molecolare e sottocategoria HER2

Tra gli HER2 positivi, 142 pazienti presentano tumori ormono-responsivi (HR+) e 56 pazienti tumori ormono-negativi (HR-). In questa categoria, la distribuzione di HER2 2+ e HER2 3+ è rispettivamente di 29 e 169 casi con un 85.3% di tumori HER2 3+.

HER 2 positivi ^{n 198}	Numero casi	Percentuale
Sottotipo molecolare		
HR+	142	71.7%
HR-	56	28.3%
Sottocategoria		
HER2 2+	29	14.7%
HER2 3+	169	85.3%

Tabella 9: HER2 positivi, sottotipo molecolare e sottocategoria HER2

Le caratteristiche cliniche e istopatologiche del campione, stratificate per sottocategoria di HER2 (HER2 0 vs HER2 Low tra gli HER2 negativi e HER2 2+ vs HER2 3+ tra gli HER2 positivi) sono riportate nella Tabella 10.

In generale, sul totale della popolazione, la maggior parte dei tumori si presenta come istotipo duttale (95%), cT2 (39%), con linfonodi ascellari positivi alla diagnosi (64.3%), G3 (64.4%) e Ki67 elevato (89.3%). Nel gruppo HER2 negativi, tutte queste caratteristiche si presentano indipendentemente dalla sottocategoria di HER2 (HER2 0 vs HER2 Low). Nel gruppo HER2 positivo, invece, vi è una differenza statisticamente significativa tra le sottocategorie HER2 2+ e HER2 3+ per quanto concerne il grado tumorale all'esordio e il Ki67. I tumori HER2 3+, rispetto a quelli HER2 2+, si presentano più frequentemente come G3 (73.1% vs 53.6%, p 0.014) e con Ki67 elevato (94% vs 79 %, p 0.006).

Altro dato statisticamente significativo è la correlazione tra sottocategoria di HER2 e stato recettoriale per estrogeni e progesterone. Nell'ambito degli HER2 negativi, gli HER2 Low sono più frequentemente associati a tumori luminali rispetto agli HER2 0 (78.2% vs 54.3%, p<0.001). Tra gli HER2 positivi, invece, sono gli HER2 2+ ad essere più frequentemente associati a positività recettoriale (89.7% vs 68.6%, p<0.02).

HER2 negativo ^{n 310}				HER2 positivo ^{n 198}			
Caratteristica	HER2 0	HER2 Low	P value	Caratteristica	HER2 2 +	HER2 3+	P value
Istotipo ^{n. 293}			0.286	Istotipo ^{n. 187}			0.175

Duttale	116 (90.6%)	155 (93.9%)		Duttale	28 (96.6%)	157 (99.4%)	
Lobulare	12 (9.4%)	10 (6.1%)		Lobulare	1 (3.4%)	1 (0.6%)	
cT n. 307			0.751	cT n. 196			0.527
1	9 (6.6%)	10 (5.9%)		1	3 (10.3%)	15 (9%)	
2	77 (56.2%)	105 (61.8%)		2	20 (69.0%)	96 (57.5%)	
3	19 (13.9%)	23 (13.5%)		3	2 (6.9%)	27 (16.2%)	
4	32 (23.3%)	32 (18.8%)		4	4 (13.8%)	29 (17.4%)	
cN n. 310			0.452	cN n. 198			0.683
Neg	51 (36.4%)	55 (32.4%)		Neg	10 (34.5%)	65 (38.5%)	
Pos	89 (63.6%)	115 (67.6%)		Pos	19 (65.5%)	104 (61.5%)	
Grado nucleare n. 276			0.177	Grado nucleare n.173			0.014
1	1 (0.8%)	5 (3.3%)		1	1 (3.6%)	0	
2	43 (34.4%)	61 (40.4%)		2	12 (42.8%)	39 (26.9%)	
3	81 (64.8%)	85 (56.3%)		3	15 (53.6%)	106 (73.1%)	
Ki67 n. 269			0.40	Ki67 n.190			0.006
Ki67 -	16 (14.7%)	18 (11.3%)		Ki67 -	6 (21%)	9 (6%)	
Ki67 +	93 (85.3%)	142 (88.7%)		Ki67 +	23 (79%)	152 (94%)	
Sottotipo molecolare n. 310			<0.001	Sottotipo molecolare n. 198			0.020
Luminali	76 (54.3%)	133 (78.2%)		HR+	26 (89.7%)	116 (68.6%)	
TNBC	64 (45.7%)	37 (21.8%)		HR-	3 (10.3%)	53 (31.4%)	

Tabella 10: caratteristiche cliniche e patologiche delle 508 pazienti in studio, stratificate per sottocategoria di HER2 (HER2 0 vs HER2 Low tra gli HER2 negativi e HER2 2+ vs HER2 3+ tra gli HER2 positivi)

Di seguito, la tabella 11 mostra le caratteristiche cliniche e istopatologiche del campione, stratificate per sottotipo molecolare (Luminale o TNBC) e sottocategoria di HER2 negativo (HER2 0 vs HER2 Low).

La tabella 12 mostra le stesse caratteristiche, ma relative agli HER2 positivi (HER2 2+ vs HER2 3+) stratificate per sottotipo molecolare (HR+ e HR-).

Nel primo caso, le analisi confermano l'assenza di correlazione tra sottocategoria di HER2 e le caratteristiche istopatologiche del tumore all'esordio. Per gli HER2 positivi, la differenza statisticamente significativa tra HER2 2+ e HER2 3+ si mantiene per quanto concerne sia il grado tumorale che il Ki67 nei tumori che esprimono i recettori ormonali.

HER negativi n 310	Luminale n 209				TNBC n 101		
	HER2 0	HER2 Low	p		HER2 0	HER2 Low	p
Istotipo n. 195			0.075	Istotipo n. 94			0.428
Duttale	57 (83.8%)	117 (92.1%)		Duttale	57 (98.3%)	36 (100%)	
Lobulare	11 (16.2%)	10 (7.9%)		Lobulare	1 (1.7%)	0	
cT n. 205			0.150	cT n. 98			0.763
1	2 (2.7%)	8 (6.1%)		1	6 (9.7%)	2 (5.6%)	
2	40 (54.8%)	80 (60.6%)		2	36 (58.1%)	24 (66.6%)	
3	7 (9.6%)	18 (13.6%)		3	12 (19.3%)	5 (13.9%)	
4	24 (32.9%)	26 (19.7%)		4	8 (12.9%)	5 (13.9%)	
cN n. 208			0.645	cN n. 98			0.439
Neg	23 (30.3%)	36 (27.3%)		Neg	26 (41.9%)	18 (50%)	
Pos	53 (69.7%)	96 (72.7%)		Pos	36 (58.1%)	18 (50%)	
Grado nucleare n. 185			0.608	Grado nucleare n. 87			0.302
1	1 (1.5%)	5 (4.2%)		1	0	0	
2	31 (47.7%)	58 (48.3%)		2	11 (19%)	3 (10.3%)	
3	33 (50.8%)	57 (47.5%)		3	47 (81%)	26 (89.7%)	
Ki67 n 183			0.107	Ki67 n 83			0.233
Ki67 -	14 (24.1%)	18 (14.4%)			2 (4.1%)	0	

Ki67 +	44 (75.9%)	107 (85.6%)			47 (95.9%)	34 (100%)	
---------------	------------	-------------	--	--	------------	-----------	--

Tabella 11: caratteristiche cliniche e istopatologiche di HER2 negativi, stratificate per sottotipo molecolare

HER positivi n. 198	HR+ n. 142				HR- n. 56		
	HER2 2+	HER2 3+	p		HER2 2+	HER2 3+	p
Istotipo n. 132			0.278	Istotipo n. 55			-
Duttale	25 (96.2%)	105 (99.1%)		Duttale	3 (100%)	52 (100%)	
Lobulare	1 (3.8%)	1 (0.9%)		Lobulare	0	0	
cT n. 141			0.617	cT n. 54			0.377
1	2 (7.7%)	11 (9.5%)		1	1 (33.3%)	4 (7.8%)	
2	18 (69.2%)	67 (57.8%)		2	2 (66.7%)	29 (56.9%)	
3	2 (7.7%)	20 (17.2%)		3	0	7 (13.7%)	
4	4 (15.4%)	18 (15.5%)		4	0 (%)	11 (21.6%)	
cN n. 142			0.217	cN n. 56			0.133
Neg	8 (30.8%)	51 (44%)		Neg	2 (66.7%)	14 (26.4%)	
Pos	18 (69.2%)	65 (56%)		Pos	1 (33.6%)	39 (73.6%)	
Grado nucleare n. 123			0.04	Grado nucleare n. 50			0.320
1	1 (4%)	0		1	0	0	
2	11 (44%)	33 (33.7%)		2	1 (33.3%)	6 (12.8%)	
3	13 (52%)	65 (66.3%)		3	2 (66.7%)	41 (87.2%)	
Ki67 n.137			0.09	Ki67 n.49			0.796
Ki67 -	6 (23%)	7 (6.3%)		Ki67 -	0	1 (2.1%)	
Ki67 +	20 (77%)	104 (93.7%)		Ki67 +	3 (100%)	45 (97.9%)	

Tabella 12: caratteristiche cliniche e istopatologiche di HER2 positivi, stratificate per sottotipo molecolare

3.2- HER2 Low e HER2 3+ e risposta al trattamento chemioterapico neoadiuvante

Sul totale delle pazienti, una **risposta patologica completa** sia mammaria che linfonodale è stata raggiunta nel 31% dei casi. Considerando solo la risposta a livello mammario, il tasso di pCR è stato del 37.1%.

Risposta mammaria e linfonodale n.	Numero di casi
pCR	140 (31%)
Persistenza di malattia	311 (69%)
Risposta solo mammaria n. 506	Numero di casi
pCR	188 (37.1%)
Persistenza di malattia	318 (62.9%)

Tabella 13: Tassi di risposta patologica al trattamento neoadiuvante

Le tabelle che seguono presentano i tassi di pCR (mammaria e linfonodale e solo mammaria) correlati allo stato di HER2. I tassi di pCR mammaria e linfonodale sono maggiori per gli HER2 positivi (49.1%) rispetto agli HER2 negativi (18.6%). Stessa tendenza per la pCR solo mammaria (Tabella 14).

Risposta mammaria e linfonodale n. 451	HER2 negativi n. 268	HER2 positivi n. 183
pCR	50 (18.6%)	90 (49.1%)
Persistenza di malattia	218 (81.4%)	93 (50.9%)
Risposta solo mammaria n. 506	HER2 negativi n. 308	HER2 positivi n. 198
pCR	74 (23.8%)	114 (57.5%)
Persistenza di malattia	234 (76.2%)	84 (42.5%)

Tabella 14: Tassi di risposta patologica al trattamento neoadiuvante, HER2 negativi vs HER2 positivi

Tra gli **HER2 negativi**, la sottocategorizzazione HER2 0 / HER2 Low correla in maniera statisticamente significativa con il tasso di pCR mammaria e linfonodale, dove gli HER2 Low, rispetto agli HER2 0, raggiungono un minor tasso di pCR (13.9% vs 24.7%, p 0.023). A livello solo mammario abbiamo una tendenza ad una minor risposta da parte degli HER2 Low (20.6% vs 28.3%, p 0.117) che non raggiunge la significatività (Tabella 15). Anche tra gli **HER2 positivi**, la sottocategorizzazione HER2 2+ / HER2 3+ correla in maniera statisticamente significativa con il tasso di pCR. In questo caso, gli HER2 3+,

rispetto agli HER2 2+, raggiungono un maggior tasso di pCR sia mammario e linfonodale (53.8% vs 24.1%, p 0.003) che solo mammario (63% vs 28%, p < 0.001). Tabella 15.

	HER2 negativo			HER2 positivo		
	HER2 0	HER2 Low		HER2 2 +	HER2 3+	
pCR mammaria e linfonodale	29 (24.7%)	21 (13.9%)	p 0.023	7 (24.1%)	83 (53.8%)	p 0.003
Malattia Residua	88 (75.3%)	130 (86.1%)		22 (75.9%)	71 (46.2%)	
	HER2 0	HER2 Low		HER2 2 +	HER2 3+	
pCR solo mammaria	39 (28.2%)	35 (20.6%)	p 0.117	8 (28%)	116 (63%)	p <0.001
Malattia Residua	99 (71.8%)	135 (79.4%)		21 (72%)	63 (37%)	

Tabella 15: Tassi di risposta patologica al trattamento neoadiuvante stratificati per stato di HER2 e sottocategoria

Di seguito, la tabella 16 mostra i tassi di pCR stratificati per sottotipo molecolare (Luminale o TNBC) e sottocategoria di HER2 negativo (HER2 0 vs HER2 Low). La tabella 17 mostra le stesse caratteristiche, ma relative agli HER2 positivi (HER2 2+ vs HER2 3+) stratificate per sottotipo molecolare (HR+ e HR-). Nel primo gruppo si conferma una tendenza, anche se non significativa, ad un minor tasso di pCR per gli HER2 Low rispetto agli HER2 0 sia nel gruppo lunalini (10% vs 17%) che tra i TNBC (31% vs 38%). Tra gli HER2 positivi, nel gruppo HR+ i tumori HER2 3+ raggiungono tassi significativamente superiori di pCR rispetto agli HER2-. La bassa numerosità del gruppo HR- non consente di trarre conclusioni coerenti coi precedenti risultati.

HER2 negativi	Luminali			TNBC		
	HER2 0	HER2 Low	P value	HER2 0	HER2 Low	P value
pCR mammaria e linfonodale	13 (17%)	14 (10%)	0.155	24 (38%)	11 (31%)	0.473
Malattia Residua	62 (79.4%)	120 (90%)		38 (62%)	24 (69%)	

Tabella 16: Tassi di risposta patologica tra gli HER2 negativi, stratificati per sottotipo molecolare (Luminale o TNBC) e sottocategoria (HER2 0 vs HER2 Low)

HER2 positivi	HR +			HR -		
	HER2 2+	HER2 3+	P value	HER2 2 +	HER2 3+	P value
pCR mammaria e linfonodale	4 (15.4%)	64 (55.1%)	<0.001	3 (100%)	30 (56%)	0.137
Malattia Residua	22 (84.6%)	52 (44.9%)		0	23 (44%)	

Tabella 17: Tassi di risposta patologica tra gli HER2 positivi, stratificati per sottotipo molecolare (HR+ o HR -) e sottocategoria (HER2 2+ vs HER2 3+)

Per quanto riguarda gli **outcomes di sopravvivenza**, valutati attraverso il DFS e OS con un follow-up medio per tutto il campione di 41 mesi. Nell'ambito dei tumori HER2 negativi, il **DFS** (tempo libero da ripresa locale o a distanza) risulta inferiore tra gli HER2 0 rispetto agli HER2 Low (p 0.023), come mostrato nella figura 14.

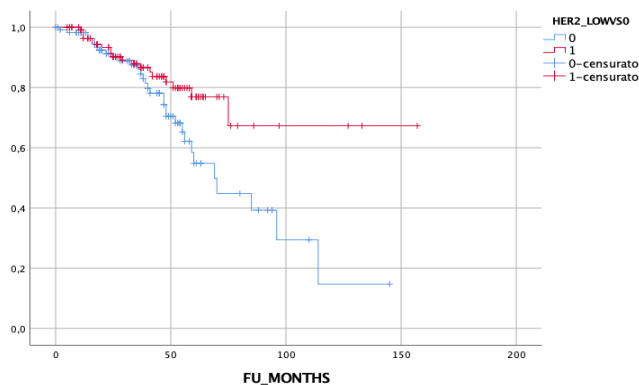


Figura 14: DFS HER2 0 vs HER2 Low sull'intera popolazione HER2 positiva (p 0.023)

Questa significatività viene persa stratificando il campione per sottotipo molecolare (Luminale o TNBC), come illustrato nella figura 15.

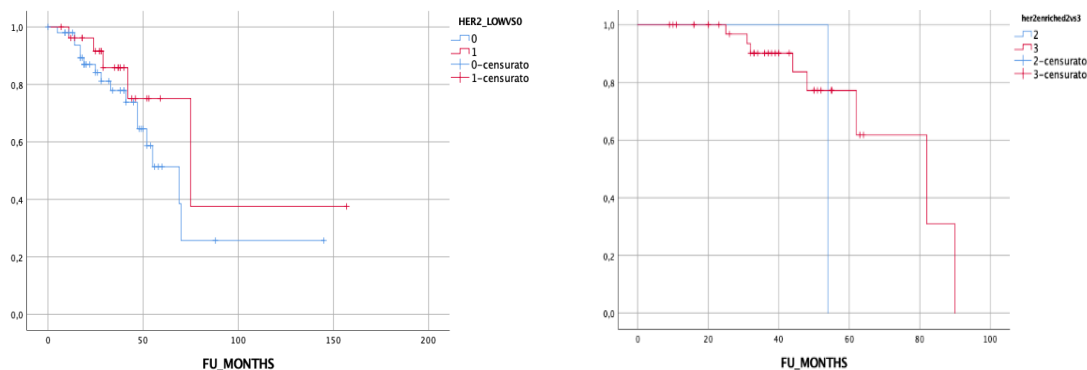


Figura 15: A) DFS in HER2 0 vs HER2 Low in Luminali p 0.50, B) DFS in HER2 0 vs HER2 Low in TNBC p 0.25

Tra gli HER2 positivi, invece, la sottocategorizzazione in HER2 2 + e HER2 3 + non sembra influire su DFS né considerando l'intera popolazione, né stratificandola per sottotipo molecolare. Figura 16.

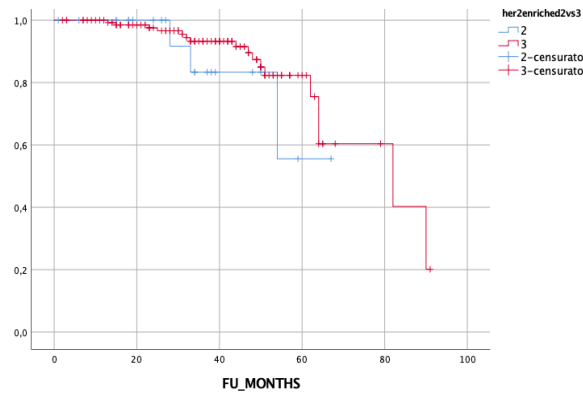


Figura 16: DFS HER2 2+ vs HER2 3+ sull'intera popolazione HER2 positiva (p 0.40)

Per quanto riguarda l'overall survival, le curve non mostrano differenza significative tra le diverse sottocategorie di HER2 sia nel gruppo HER2 positivo che in quello HER2 negativo, come mostrato dalle figure 17 e 18.

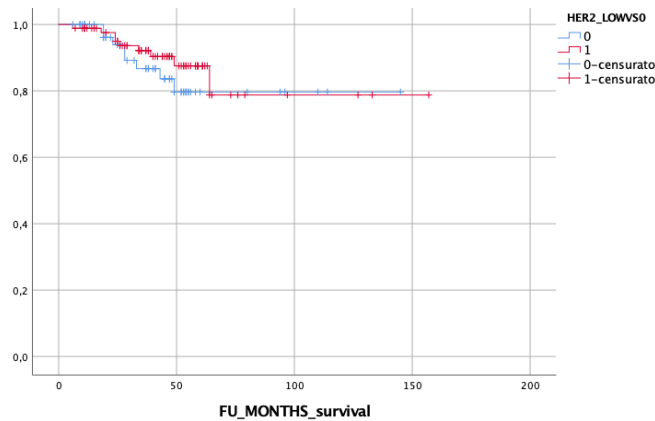


Figura 17: OS HER2 0 vs HER2 Low sull'intera popolazione HER2 negativa (p 0.40)

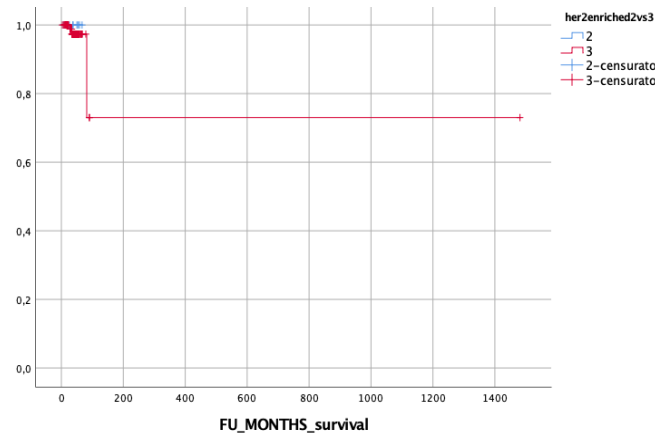


Figura 18: OS HER2 2+ vs HER2 3+ sull'intera popolazione HER2 positiva (p 0.57)

4- DISCUSSIONI

Nel presente studio abbiamo preso in esame una casistica multicentrica retrospettiva di 508 pazienti affette da carcinoma infiltrante della mammella e sottoposte a chemioterapia neoadiuvante. Le pazienti sono state caratterizzate dal punto di vista clinico, istologico e molecolare ed i dati di risposta alla chemioterapia neoadiuvante come gli outcomes di sopravvivenza sono stati messi in relazione con lo stato di HER2.

4.1- Caratterizzazione dei tumori HER2 Low e HER2 3+

Il campione utilizzato nello studio rispecchia, per caratteristiche cliniche e istopatologiche del tumore, la popolazione che generalmente viene inviata a NACT; ovvero pazienti con istotipo duttale e patologia più aggressiva (di alto grado e alto indice proliferativo), caratteristiche che vengono suggerite dalle linee guida (AIOM)⁵.

In linea con la letteratura²⁷⁻²⁸ la maggior parte delle pazienti presenta tumori T2, con interessamento linfonodale (64.3% N+ nella nostra casistica, 54.8% in *Houssami et al.*²⁷ e 100% in *Haque et al.*²⁸).

La percentuale di HER2 positivi del 38.9% è particolarmente alta rispetto ai dati riportati in letteratura (10-25%), questo dato deriva dal fatto che le pazienti del nostro studio non appartengono ad una popolazione generale di tumori mammari a cui si riferiscono le percentuali sopra riportate, ma sono pazienti selezionate per essere sottoposte a chemioterapia neoadiuvante e sappiamo che la positiva per HER2 è uno dei principali fattori predittivi di risposta al trattamento. L'alto tasso di tumori HER2 è quindi una naturale conseguenza in una popolazione selezionata per essere sottoposta a NACT.

Nel campione HER2 negativo, la percentuale di HER2 Low del 54.9% è in linea con i dati presentati in letteratura in cui la prevalenza di questa categoria si aggira attorno al 40-50%⁸⁵⁻³⁹. Solo De Moura Leite et al. riporta una percentuale inferiore, con un 33% di HER2 Low⁴¹.

In merito alle **caratteristiche clinico istopatologiche** di presentazione all'esordio della malattia, nella nostra serie, nel gruppo **HER2 negativo**, non vi è differenza statisticamente significativa tra nessuna delle caratteristiche analizzate e la sottocategoria di HER2 0 / HER2 Low, sia considerando la popolazione in generale che analizzando il dato separatamente nei due sottotipi Luminali e TNBC. L'espressione di HER2 è sempre stata associata a caratteristiche più aggressive del tumore che esordisce con linfonodi positivi, stadio avanzato e tasso di proliferazione più elevato. Queste caratteristiche sono tipiche dei tumori HER2 positivi, ma non sono così marcatamente osservabili nei tumori HER2 Low (che esprimono comunque una quota di recettore), quando confrontati con gli HER2 0. I dati in letteratura sono fortemente contrastanti e probabilmente gran parte della variabilità dipende da come sono stati classificati i tumori HER2 Low nel tempo. I lavori più datati includevano in questa categoria solo i tumori con IHC score 2+ FISH negativo, contrapponendoli ai tumori HER2 0 e 1+. Considerando che all'interno dell'attuale classificazione circa il 67% degli HER2 Low ha score 1+, si capisce come

sia difficile confrontare studi che utilizzano classificazioni differenti. Per esempio, Rossi et al³⁹, in un articolo relativamente datato, ha concluso che lo stato HER2 Low rappresenta un fattore prognostico negativo determinando un peggiore DFS e OS, ma mettendo a confronto pazienti con carcinoma mammario HER2 2+/FISH-negativo (considerate HER2 Low) vs HER2 0 o 1+. Analogamente, Eggemann et al⁴⁰ ha studiato 5.907 casi di carcinoma mammario, concludendo che, rispetto ai tumori HER2 0 o 1+, i tumori HER2 2+ FISH negativi hanno dimensioni maggiori, più frequentemente linfonodi positivi, grado tumorale più elevato, e maggiore Ki-67, presentando quindi una prognosi peggiore. Arrivando a studi più recenti che utilizzano l'attuale classificazione, nella maggior parte delle analisi, i tumori HER2 Low rispetto a quelli HER2 0 non sembrano presentare significative differenze. De Moura Leite et al⁴¹ in un'interessante analisi retrospettiva su una casistica di 855 pazienti con tumore HER2 negativo, non ha riscontrato differenze significative in termini di dimensioni del tumore, interessamento linfonodale, stadio di malattia, grado tumorale o Ki67. L'analisi è stata effettuata confrontando HER2 Low vs HER2 0 nell'intera popolazione e all'interno dei due sottotipi molecolari Luminale e TNBC, ottenendo risultati sovrapponibili. Unico dato statisticamente significativo è la prevalenza di sottotipo molecolare Luminale tra gli HER2 Low (82%), mentre la distribuzione tra gli HER2 0 è meno sbilanciata con il 53% di Luminali e 47% di TNBC. Anche nella nostra serie la maggioranza degli HER2 Low sono associati a tumori luminali piuttosto che TNBC (78.2% vs 54.3%, $p < 0.001$).

Altro motivo della discordanza tra i risultati dei diversi trial potrebbe essere dovuta all'imprecisione dei patologi nel refertare i bassi score in IHC, poichè fino ad oggi la distinzione HER2 0 e HER2 1+ non comportava alcuna conseguenza clinica. Un lavoro, addirittura, riporta un tasso di concordanza tra patologi differenti per lo score HER2 0 del 15% con una riclassificazione a HER2 1+ del 75%⁸⁶.

Nel **gruppo HER2 positivo**, invece, la differenza statisticamente significativa tra le due sottocategorie riguarda due caratteristiche correlate con la risposta al trattamento chemioterapico neoadiuvante: i tumori HER2 3+, rispetto a quelli HER2 2+, si presentano più frequentemente con un grado e un Ki67 elevato. Inoltre, i tumori HER2 3+ sono più frequentemente HR-, ulteriore aspetto correlato con una particolare chemiosensibilità.

4.2- HER2 Low e HER2 3+ e risposta al trattamento chemioterapico neoadiuvante

La **risposta patologica completa** (mammaria e linfonodale) è stata raggiunta nel 31% delle pazienti, il dato risulta in linea con quelli generalmente riportati in letteratura dove si attesta intorno al 12-40%.

Come noto, la positività ad HER2 è uno dei principali fattori di raggiungimento di una pCR, dato confermato nella nostra serie, con tassi di pCR mammaria e linfonodale del 49.1% per gli HER2 positivi vs il 18.6% per gli HER2 negativi.

Tra gli **HER2 negativi**, la sottocategorizzazione HER2 0 / HER2 Low correla in maniera statisticamente significativa con il tasso di pCR mammaria e linfonodale, dove gli HER2 Low, rispetto agli HER2 0, raggiungono un minor tasso di pCR. Questo dato è molto interessante e trova il razionale in un possibile sotto-trattamento degli HER2 Low che potrebbero beneficiare di terapie mirate anti HER2 anche se tradizionalmente considerati HER2 negativi.

Tuttavia, i nostri risultati sono in contrasto con alcune precedenti pubblicazioni. A San Antonio 2020 è stata presentata una serie retrospettiva di 331 pazienti, nella quale non è stata riscontrata alcuna differenza nei tassi di pCR tra i Luminale HER2 0 e HER2 Low (8% vs 13%, $p=0,35$), un tasso di pCR più elevato, anche se non statisticamente significativo, viene riportato nell'ambito dei TNBC tra gli HER2 0 rispetto a HER2 Low (56% vs. 39%, $p=0,09$)⁸⁷. Anche De Moura Leite et al⁴¹, ottiene gli stessi risultati, una pCR è stata ottenuta nel 13% dei casi di tumori Luminali HER2 Low vs 9.5 nei luminali HER2 0 ($p=0.27$) e nel 51% dei TNBC HER2 Low vs 47% dei TNBC HER 2 0 ($p=0.64$), suggerendo l'assenza di impatto di HER2 Low sulla pCR.

Un recente lavoro che ha effettuato un'analisi aggregata di 2310 pazienti provenienti da quattro studi prospettici in ambito neoadiuvante, ha invece ottenuto risultati differenti e che si allineano con le nostre conclusioni⁸⁸. I tumori Luminali HER2 Low avevano tassi di pCR più bassi quando confrontati con gli HER2 0 (17,5% vs 23,6%, $p=0,024$), ma questa tendenza non raggiunge la significatività nella categoria TNBC.

Nella nostra casistica, anche tra gli **HER2 positivi**, la sottocategorizzazione HER2 2+ / HER2 3+ correla in maniera statisticamente significativa con il tasso di pCR. In questo caso, gli HER2 3+, rispetto agli HER2 2+, raggiungono un maggior tasso di pCR sia mammario e linfonodale, che solo mammario.

Questo risultato è coerente con il noto potere predittivo di risposta dell'HER2 quando si utilizza uno schema chemioterapico contenente agenti anti HER2. I tumori HER2 3+, esprimendo una quantità maggiore di recettori, risultano più sensibili ai trattamenti e conseguentemente più responsivi. Dall'altro canto è interessante considerare la scarsa risposta al trattamento dei tumori HER2 2+ che, appartenendo alla categoria HER2 positiva, vengono trattati con agenti mirati, ricavandone un beneficio relativo.

In merito a questa sottocategoria, abbiamo pochissima letteratura che ne definisca le caratteristiche; possiamo estrapolare alcune informazioni a partire dai dati relativi ai tumori HER2 Enriched (HER2 E) che rappresentano un sottotipo molecolare identificato attraverso l'analisi dell'espressione genica, caratterizzato da un'alta espressione di geni ErbB2 e conseguentemente una massiva espressione dei recettori HER2. Non vi è una corrispondenza diretta e univoca tra tumori HER2 Enriched ed HER2 score 3+ in IHC, ma alcune informazioni preliminari sugli HER2 3+ possono essere estrapolate dagli studi sugli HER2 Enriched. Dai pochi studi pubblicati, sembra che i tumori HER2 E siano associati ad un tasso maggiore di pCR a seguito di regimi a base di farmaci anti HER2. Una recente metanalisi condotta da Schettini et al⁵² ha incluso sedici studi ed in tutti i lavori il sottotipo HER2 E è risultato significativamente associata a pCR (odds ratio [OR] = 3,50, $p < 0,001$), nel sottotipo Luminale (OR = 3,61, $p < 0,001$), nei tumori HR-negativi (OR = 2,28, $p = 0,01$). Gli autori concludono affermando che i tumori HER2 E hanno una maggiore probabilità di ottenere una pCR dopo una terapia neoadiuvante a base di anti-HER2, indipendentemente dello stato HR e dell'uso della TC. Risultati simili vengono raggiunti da uno studio ben condotto su 451 pazienti HER2 positive sottoposte a NACT in cui il sottotipo HER2 E è significativamente associato ad un maggior tasso di pCR⁵³.

Per quanto riguarda gli **outcomes di sopravvivenza**, valutati attraverso il DFS e OS con un follow-up medio per tutto il campione di 41 mesi. Analizzando il **DFS** (tempo libero da ripresa locale o a distanza), nell'ambito dei tumori HER2 negativi, risulta significativamente inferiore tra gli HER2 0 rispetto agli HER2 Low. Questo dato potrebbe essere giustificato dal fatto che, come abbiamo riscontrato anche nella nostra serie, i tumori HER2 0 sono più frequentemente TNBC e la negatività per i recettori ormonali è un noto fattore prognostico negativo. Infatti, stratificando il campione per sottotipo molecolare, questa significatività viene persa, a dimostrare il non impatto di HER2 0 /HER2 Low all'interno delle categorie Luninale e TNBC quando analizzate separatamente. Tra gli HER2 positivi, la sottocategorizzazione in HER2 2 + e HER2 3 + non sembra influire su DFS né considerando l'intera popolazione, né stratificandola per sottotipo molecolare. Per quanto riguarda l'**overall survival**, le curve non mostrano differenza significative tra le diverse sottocategorie di HER2 sia nel gruppo HER2 positivo che in quello HER2 negativo. Risultati simili sono riportati nell'articolo di De Moura et al, dove valutando tutta la popolazione HER2 negativa, inizialmente sembra che tumori HER2 Low abbiano una prognosi migliore, ma questo dato perde di significatività quando si differenzia per sottotipo molecolare ed altri fattori prognostici maggiormente trainanti⁴¹. Il ruolo prognostico di HER2 Low rimane controverso, con alcuni studi retrospettivi che suggeriscono prognosi peggiore per tumori Luminali HER2 Low con localizzazione linfonodale. Da notare che questi lavori, relativamente datati, associavano i tumori HER2 1+ con gli HER2 0³⁹. Un altro recente articolo, che ha utilizzato l'attuale classificazione per gli HER2 Low non ha trovato un impatto prognostico per HER2 Low stato di sopravvivenza globale in un'ampia coorte di 3.689 pazienti con BC prevalentemente avanzato³⁶.

4.3- Considerazioni generali

Punto di forza dello studio è che la popolazione iniziale di 508 pazienti rispecchia, per caratteristiche cliniche e istopatologiche del tumore, la popolazione che generalmente viene inviata a NACT; ovvero pazienti con istotipo duttale e patologia più aggressiva (di alto grado e alto indice proliferativo). Anche i tassi di risposta patologica completa sono allineati con gli studi presenti in letteratura con più alta numerosità campionaria.

Inoltre, uno studio che coinvolge una popolazione sottoposta a chemioterapia neoadiuvante e successivamente ad intervento chirurgico, rappresenta un'eccellente piattaforma di ricerca per testare nuove terapie e biomarcatori predittivi, fornendo campioni tumorali prima, durante e dopo il trattamento sistemico e consentendo di testare in vivo tipo di risposta del tumore al trattamento.

Infine, l'end point primario delle nostre valutazioni è stato il raggiungimento di una risposta patologica completa, al contrario di altri studi che avevano come obiettivo il *down staging* di malattia, considerando come buona risposta anche la persistenza di tumore residuo.

Il limite principale dello studio è rappresentato dalla sua natura retrospettiva con un tempo di reclutamento di 13 anni, questo può aver determinato una eterogeneità nella determinazione delle sottocategorie di HER2. In primis per l'imprecisione con cui i patologi fino a qualche anno fa hanno determinato i bassi score in IHC, poiché la distinzione HER2 0 e HER2 1+ non comportava alcuna conseguenza clinica. In secondo luogo, la definizione stessa di HER2 2+ fornita dall'ASCO/CAP, riferimento dei patologi, ha subito per un periodo da 2013 al 2018 una modifica per cui un numero maggiore di tumori rientrava nello score 2+ con conseguente aumento dei FISH test e possibile ricollocazione di alcuni casi in una categoria diversa. Infine, il confronto tra diversi lavori sugli HER2 Low non sempre consente di confrontare gruppi omogenei per l'inserimento degli score 1+ in questa sottocategoria solo nei lavori più recenti.

5- CONCLUSIONI

In conclusine, i risultati del nostro studio ci consentono di affermare quanto segue:

- 1- Il campione utilizzato nello studio rispecchia, per caratteristiche cliniche e istopatologiche del tumore, la popolazione che generalmente viene inviata a NACT, inoltre anche la distribuzione di HER2 Low e HER2 3+ ed i tassi di risposta patologica completa al trattamento sono in linea con i dati registrati in letteratura.
- 2- Nell'ambito degli **HER2 negativi**, non sembra che le due sottocategorie HER2 0 / HER2 Low presentino differenze nelle caratteristiche del tumore all'esordio, se non per una maggior espressione di HER2 Low nei tumori Luminali. Al pari di trattamento neoadiuvante a base di

antracicline senza l'utilizzo di farmaci anti HER2, la sottocategoria HER2 Low, raggiunge un minor tasso di pCR mammaria e linfonodale, rispetto agli HER2 0.

- 3- Nel gruppo **HER2 positivo**, i tumori HER2 3+ esordiscono più frequentemente con un grado e un Ki67 elevato. Al pari di trattamento neoadiuvante, al quale è sempre stato associato un agente anti HER2, gli HER2 3+, raggiungono un maggior tasso di pCR mammaria e linfonodale, rispetto agli HER2 2+.

In conclusione, l'analisi della nostra casistica ha evidenziato come, da un punto di vista terapeutico, la classica distinzione dicotomica tra tumori HER2 negativi / positivi, sia un concetto da rivalutare. L'inserimento di sottocategorie potrebbe consentire di identificare, all'interno di questi gruppi, sottopopolazioni a comportamento differente. Nell'ambito degli HER2 negativi, gli HER2 Low potrebbero beneficiare dell'utilizzo di farmaci anti HER2 mirati; nell'ambito degli HER2 positivi, gli HER2 2+ potrebbero, in alcuni casi, non avere il beneficio generalmente atteso da un trattamento anti HER2 mirato.

6- RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la *Prof.ssa Anna Maria Ferrero* che, in un momento delicato, con attenzione e disponibilità, mi ha accompagnata fino al compimento del mio percorso di dottorato.

Ringrazio la *Prof.ssa Nicoletta Biglia*, che ha sempre creduto in me fin dal primo giorno in cui ho deciso che sarei diventata una ginecologa, che mi ha sempre aiutata e permesso di fare quello che più desideravo, rispettando le mie propensioni ed i miei limiti e riconoscendo le mie capacità.

Il seme piantato cresce per sempre.

Grazie Prof!

7- BIBLIOGRAFIA

- ¹ *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT05911958. A Study of SHR-A1811 as Neoadjuvant Treatment for Patients With HR-Positive, Low HER2 Expression Breast Cancer*
- ² *Linee guida AIOM. Neoplasie della mammella 2022*
- ³ *Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JP. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. J Natl Cancer Inst 2005;97:188-194.*
- ⁴ *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Long-term outcomes for neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy in early breast cancer: meta-analysis of individual patient data from ten randomised trials. Lancet Oncol 2018; 19:27-39.*
- ⁵ *Killelea BK, Yang VQ, Mougalian S, et al. Neoadjuvant chemotherapy for breast cancer increases the rate of breast conservation: results from the National Cancer Database. J Am Coll Surg 2015;220:1063-1069.*
- ⁶ *Galimberti V, Ribeiro Fontana SK, Maisonneuve P, Steccanella F et al., Sentinel node biopsy after neoadjuvant treatment in breast cancer: Five-year follow-up of patients with clinically node-negative or node-positive disease before treatment. Eur Surg Oncol 2016 Mar;42(3):361-8*
- ⁷ *Von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. J Clin Oncol 2012;30:1796-1804.*
- ⁸ *Symmans WF, Wei C, Gould R, et al. Long-Term Prognostic Risk After Neoadjuvant Chemotherapy Associated With Residual Cancer Burden and Breast Cancer Subtype. J Clin Oncol 2017; 35:1049.*
- ⁹ *Cortazar P, Zhang L, Untch M, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. Lancet 2014; 384:164.*
- ¹⁰ *Masuda N, Lee SJ, Ohtani S, Im YH, Lee ES, Yokota I, Kuroi K, Im SA, Park BW, Kim SB, Yanagita Y, Ohno S, Takao S, Aogi K, Iwata H, Jeong J, Kim A, Park KH, Sasano H, Ohashi Y, Toi M Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy. N Engl J Med 2017;376:2147-59*
- ¹¹ *Von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, Loibl S, Mamounas EP, Untch M, Wolmark N, Rastogi P, Schneeweiss A, Redondo A, Fischer HH, Jacot W, Conlin AK, Arce-Salinas C, Wapnir IL, Jackisch C, DiGiovanna MP,^{SEP}Fasching PA, Crown JP, Wülfing P, Shao Z, Rota Caremoli E, Wu H, Lam LH, Tesarowski D, Smit M, Douthwaite H, Singel SM,^{SEP}Geyer CE. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer N Engl J Med 2019; 380:617-628*
- ¹² *National Comprehensive Cancer Network Guidelines Version 1.2023 NCCN Guidelines for Patients https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf*
- ¹³ *Buzdar AU, Valero V, Theriault RL, et al. Pathological complete response to chemotherapy is related to hormone receptor status. Breast Cancer Res Treat 2003; 88: abstr 302*
- ¹⁴ *Volders JH, Negenborn VL, Spronk PE, Krekel NMA, Schoonmade LJ, Meijer S, Rubio IT, van den Tol MP. Breast-conserving surgery following neoadjuvant therapy—a systematic review on surgical outcomes. Breast Cancer Res Treat. 2018 Feb;168(1):1-12*
- ¹⁵ *Parmar V, Hawaldar R, Nair NS, Shet T, Desai S, Badwe RA Pathological complete response in locally advanced breast cancer: determinants and predictive significance natl med j india 2012;25:132–6*
- ¹⁶ *Nakashoji A, Matsui A, Nagayama A, Iwata Y, Sasahara M, Murata Y. Clinical predictors of pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. Oncol Lett. 2017 Oct;14(4):4135-4141*
- ¹⁷ *Elsamany S, Alzahrani A, Abozeed WN, et al. Mammographic breast density: Predictive value for pathological response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. Breast. 2015;24(5):576–581.*
- ¹⁸ *Parekh T, Dodwell D, Sharma N, Shaaban AM. Radiological and Pathological Predictors of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer: A Brief Literature Review. Pathobiology 2015;82:124–132*
- ¹⁹ *Cristofanilli M, Gonzalez-Angulo A, Sneige N, et al: Invasive lobular carcinoma classic type: response to primary chemotherapy and survival outcomes. J Clin Oncol 2005;23:41– 48. ^{SEP}*

-
- ²⁰. Tsung K, Grobmyer SR, Tu C, Abraham J, Budd GT, Valente SA. Neoadjuvant systemic therapy in invasive lobular breast cancer: Is it indicated? *Am J Surg.* 2018 Mar;215(3):509-512.
- ²¹. Tan W, Yang M, Yang H, Zhou F, Shen W. Predicting the response to neoadjuvant therapy for early-stage breast cancer: tumor-, blood-, and imaging-related biomarkers, *Cancer Management and Research* 2018;10 4333–4347
- ²². Tao M, Chen S, Zhang X, Zhou Q. Ki-67 labeling index is a predictive marker for a pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Medicine (Baltimore).* 2017 Dec;96(51):e9384.
- ²³. Chen X, He C, Han D, Zhou M, Wang Q, Tian J, Li L, Xu F, Zhou E, Yang K. The predictive value of Ki-67 before neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Future Oncol.* 2017 Apr;13(9):843-857.
- ²⁴. Houssami N, Macaskill P, von Minckwitz G, Marinovich ML, Mamounas E. Meta-analysis of the association of breast cancer subtype and pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Cancer.* 2012 Dec;48(18):3342-54
- ²⁵. Haque W, Verma V, Hatch S, Suzanne Klimberg V, Brian Butler E, Bin S, Teh BS. Response rates and pathologic complete response by breast cancer molecular subtype following neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Research and Treatment. Breast Cancer Res Treat.* 2018 Aug;170(3):559-567
- ²⁶. Horimoto Y, Arakawa A, Tanabe M, Sonoue H, Igari F, Senuma K, Tokuda E, Shimizu H, Kosaka T, Saito M. Ki67 expression and the effect of neo-adjuvant chemotherapy on luminal HER2-negative breast cancer. *BMC Cancer.* 2014 Jul 30;14:550
- ²⁷. Mishra AK, Agrawal U, Negi S, et al.: Expression of androgen receptor in breast cancer and its correlation with other steroid receptors and growth factors. *Indian J Med Res* 2012; 135: 843–852.
- ²⁸. Loibl S, Müller BM, von Minckwitz G, Schwabe M et al. Androgen receptor expression in primary breast cancer and its predictive and prognostic value in patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* (2011) 130:477–487
- ²⁹. Sillem M, Timme S, Bronsert P, Bogatyreva L, Hauschke D, Zur Hausen A, Werner M, Stickeler E. Anti-Phosphohistone H3-Positive Mitoses Are Linked to Pathological Response in Neoadjuvantly Treated Breast Cancer. *Breast Care* 2017;12:244–250
- ³⁰ Wolff AC, Somerfield MR, Dowsett M, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: ASCO-CAP guideline update [published online June 7, 2023]. *Arch Pathol Lab Med.* 2023. doi:10.5858/arpa.2023-0950-SA
- ³¹ Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, et al. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist.* 2003;8:307-325.
- ³² Wolff AC, Somerfield MR, Dowsett M, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: ASCO-CAP guideline update [published online June 7, 2023]. *Arch Pathol Lab Med.* 2023. doi:10.5858/arpa.2023-0950-SA
- ³³ Goutsouliak K, Veeraraghavan J, Sethunath V et al (2020) Towards personalized treatment for early stage HER2-positive breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 17:233–250. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0299-9>
- ³⁴ Modi S, Jacot W, Yamashita T, et al. Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2 Low advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 2022; 387(1):9-20.
- ³⁵ Schalper KA, Kumar S, Hui P, et al. A retrospective population-based comparison of HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization in breast carcinomas: impact of 2007 American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists criteria. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138:213-219
- ³⁶ Schettini F, Chic N, Brasó-Maristany F, et al. Clinical, pathological, and PAM50 gene expression features of HER2 Low breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* 2021;7:1.
- ³⁷ Zhang G, Ren C, Li C, Wang Y, Chen B, Wen L, Jia M, Li K, Mok H, Cao L, Chen X, Lin J, Wei G, Li Y, Zhang Y, Balch CM, Liao N., «Distinct clinical and somatic mutational features of breast tumors with high-, low-, or non-expressing human epidermal growth factor receptor 2 status. *BMC Med.* 2022 Apr 29;20(1):142. doi: 10.1186/s12916-022-02346-9. PMID: 35484593; PMCID: PMC9052533.»
- ³⁸ Berrino E, Annaratone L, Bellomo SE, Ferrero G, Gagliardi A, Bragoni A, Grassini D, Guarrera S, Parlato C, Casorzo L, Panero M, Sarotto I, Giordano S, Cereda M, Montemurro F, Ponzzone R, Crosetto N, Naccarati A, Sapino A, Marchiò C., «Integrative genomic and transcriptomic analyses illuminate the ontology of HER2 Low breast carcinomas. *Genome Med.* 2022 Aug 29;14(1):98. doi: 10.1186/s13073-022-01104-z. PMID: 36038884; PMCID: PMC9426037.»
- ³⁹ Rossi V, Sarotto I, Maggiorotto F, et al. Moderate immunohistochemical expression of HER-2 (2+) without HER-2 gene amplification is a negative prognostic factor in early breast cancer. *Oncologist.* 2012;17:1418-1425.

-
- ⁴⁰ Eggemann H, Ignatov T, Burger E, et al. Moderate HER2 expression as a prognostic factor in hormone receptor positive breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22:725-733.
- ⁴¹ Luciana de Moura Leite, Marcelle Goldner Cesca, Monique Celeste Tavares, Debora Maciel Santana, Erick Figueiredo Saldanha, Paula Tavares Guimarães et al. HER2-low status and response to neoadjuvant chemotherapy in HER2 negative early breast cancer. *2021 Breast Cancer Research and Treatment*. <https://doi.org/10.1007/s10549-021-06365-7>
- ⁴² Di Cosimo S, La Rocca E, Ljevar S, De Santis MC, Bini M, Cappelletti V, Valenti M, Baili P, de Braud FG, Folli S, Scaperrotta G, Volpi C, Vingiani A, Vernieri C, Verderio P, Miceli R, Pruneri G., «Moving HER2 Low breast cancer predictive and prognostic data from clinical trials into the real world. *Front Mol Biosci*. 2022 Sep 26;9:996434. doi: 10.3389/fmolb.2022.996434. PMID: 36225259; PMCID: PMC9549400.»
- ⁴³ Zhang Y, Liu F, Gao Q, Chai Y, Ren Y, Tian H, Ma B, Song A., «Comparing the outcome between multicentric/multifocal breast cancer and unifocal breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Front Oncol*. 2022 Dec 16;12:1042789. doi: 10.3389/fonc.2022.1042789. PMID: 36591500; PMCID: PMC9801517.»
- ⁴⁴ Gilcrease MZ, Woodward WA, Nicolas MM, Corley LJ, Fuller GN, Esteva FJ, Tucker SL, Buchholz TA., «Even low-level HER2 expression may be associated with worse outcome in node-positive breast cancer. *Am J Surg Pathol*. 2009 May;33(5):759-67. doi: 10.1097/PAS.0b013e31819437f9. PMID: 19252432; PMCID: PMC3063383.»
- ⁴⁵ Ergun Y, Ucar G, Akagunduz B., «Comparison of HER2-zero and HER2 Low in terms of clinicopathological factors and survival in early-stage breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2023 Apr;115:102538. doi: 10.1016/j.ctrv.2023.102538. Epub 2023 Mar 6. PMID: 36898351.»
- ⁴⁶ Wei T, Wang D, Gao S, Wang X, Yue J, Kang Y, Ju J, Yang Z, Shuai Y, Yuan P., «Clinicopathologic characteristics and prognostic significance of HER2 Low expression in patients with early breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Front Oncol*. 2023 Feb 2;13:1100332. doi: 10.3389/fonc.2023.1100332. PMID: 36816954; PMCID: PMC9931719.»
- ⁴⁷ Almstedt K, Heimes AS, Kappenberg F, Battista MJ, Lehr HA, Krajnak S, Lebrecht A, Gehrman M, Stewen K, Brenner W, Weikel W, Rahnenführer J, Hengstler JG, Hasenburg A, Schmidt M., «Long-term prognostic significance of HER2 Low and HER2-zero in node-negative breast cancer. *Eur J Cancer*. 2022 Sep;173:10-19. doi: 10.1016/j.ejca.2022.06.012. Epub 2022 Jul 12. PMID: 35839597.»
- ⁴⁸ Lambein K, Van Bockstal M, Vandemaele L et al (2013) Distinguishing score 0 from score 1+ in HER2 immunohistochemistry-negative breast cancer: clinical and pathobiological relevance. *Am J Clin Pathol* 140:561–566. <https://doi.org/10.1309/AJCP4A7KTA YHZSOE>
- ⁴⁹ Haque W, Verma V, Hatch S, Suzanne Klimberg V, Brian Butler E, Bin S. Teh BS. Response rates and pathologic complete response by breast cancer molecular subtype following neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Research and Treatment. Breast Cancer Res Treat*. 2018 Aug;170(3):559-567
- ⁵⁰ Houssami N, Macaskill P, von Minckwitz G, Marinovich ML, Mamounas E. Meta-analysis of the association of breast cancer subtype and pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2012 Dec;48(18):3342-54
- ⁵¹ Haque W, Verma V, Hatch S, Suzanne Klimberg V, Brian Butler E, Bin S. Teh BS. Response rates and pathologic complete response by breast cancer molecular subtype following neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Research and Treatment. Breast Cancer Res Treat*. 2018 Aug;170(3):559-567
- ⁵² Francesco Schettini. HER2-enriched subtype and pathological complete response in HER2- positive breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treatment Reviews* 2020
- ⁵³ Davey MG, Kerin E, O'Flaherty C, Maher E, Richard V, McAnena P, McLaughlin RP, Sweeney KJ, Barry MK, Malone CM, Wyns W, Soliman O, Miller N, Keane MM, Lowery AJ, Kerin MJ. Clinicopathological response to neoadjuvant therapies and pathological complete response as a biomarker of survival in human epidermal growth factor receptor-2 enriched breast cancer - A retrospective cohort study. *Breast*. 2021 Oct;59:67-75. doi: 10.1016/j.breast.2021.06.005. Epub 2021 Jun 18. PMID: 34171619
- ⁵⁴ Poggio F, Bruzzone M, Ceppi M, et al. Platinum-based neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*. 2018 Jul 1;29(7):1497-1508.
- ⁵⁵ Schmid P, Cortes J, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J, et al; KEYNOTE-522 Investigators. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2020 Feb 27;382(9):810- 821. doi: 10.1056/NEJMoa1910549. PMID: 32101663.
- ⁵⁶ Schmid P, Cortes J, Dent R, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, et al; KEYNOTE-522 Investigators. Event-free Survival with Pembrolizumab in Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2022 Feb 10;386(6):556-567. doi: 10.1056/NEJMoa2112651. PMID: 35139274

-
57. Buzdar AU, Suman VJ, Meric-Bernstam F et al. Fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide (FEC-75) followed by paclitaxel plus trastuzumab versus paclitaxel plus trastuzumab followed by FEC-75 plus trastuzumab as neoadjuvant treatment for patients with HER2-positive breast cancer (Z1041): a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013 Dec;14(13):1317-1325.
58. Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:3676-3685.
59. Buzdar AU, Valero V, Ibrahim NK, et al. Neoadjuvant therapy with paclitaxel followed by 5-fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide chemotherapy and concurrent trastuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer: an update of the initial randomized study population and data of additional patients treated with the same regimen. *Clin Cancer Res* 2007;13:228-233.
60. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V et al. Neoadjuvant and adjuvant trastuzumab in patients with HER2- positive locally advanced breast cancer (NOAH): follow-up of a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet Oncol.* 2014;15:640-647.
61. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, et al. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial) a randomized controlled superiority trial with a parallel HER2- negative cohort. *Lancet* 2010;375:377-384.
62. Valachis A, Mauri D, Polyzos NP, Chlouverakis G, Mavroudis D, Georgoulas V. Trastuzumab combined to neoadjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Breast.* 2011 Dec;20(6):485-90.
63. Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, et al. NeoALTO Study Team. Lapatinib with trastuzumab for HER2- positive early breast cancer (NeoALTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet* 2012;379:633-640.
64. Schneeweiss A, Chia S, Hickish T et al. Pertuzumab plus trastuzumab in combination with standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy regimens in patients with HER2- positive early breast cancer: a randomized phase II cardiac safety study (TRYPHAENA). *Ann Oncol.* 2013 ;24:2278-2284
65. Untch M, Schneeweiss A, Salat C, et al. Long-term survival analysis of the randomized phase II trial investigating the addition of carboplatin to neoadjuvant therapy for triple-negative (TNBC) and HER2-positive early breast cancer (Gepar-Sixto). *Ann Oncol* 2017; 28(Suppl 5): mdx362.014.
66. Sikov WM, Berry DA, Perou CM, et al. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: cALGB 40603 (Alliance). *J Clin Oncol.* 2015; 33(1): 13–21. 2.
67. Sikov WM, Berry DA, Perou CM, et al. Event-free and overall survival following neoadjuvant weekly paclitaxel and dose-dense AC +/- carboplatin and/or bevacizumab in triple-negative breast cancer: outcomes from CALGB 40603 (Alliance). *Cancer Res* 2016; 76(Suppl 4): S2-05. 3.
68. von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(7): 747–56.
69. Geyer CE Jr, Garber JE, Gelber RD, Yothers G, Taboada M, Ross L, et al; OlympiA Clinical Trial Steering Committee and Investigators. Overall survival in the OlympiA phase III trial of adjuvant olaparib in patients with germline pathogenic variants in BRCA1/2 and high risk, early breast cancer. *Ann Oncol.* 2022 Oct 10:S0923-7534(22)04165-5. doi: 10.1016/j.annonc.2022.09.159. Epub ahead of print. PMID: 36228963.
70. Fowler AM, Mankoff DA, Joe BN. Imaging Neoadjuvant Therapy Response in Breast Cancer. *Radiology.* 2017 Nov;285(2):358-375
71. Croshaw R, Shapiro-Wright H, Svensson E, Erb K, Julian T. Accuracy of clinical examination, digital mammogram, ultrasound, and MRI in determining postneoadjuvant pathologic tumor response in operable breast cancer patients. *Ann Surg Oncol* 2011;18(11):3160–3163.
72. Huber S, Wagner M, Zuna I, Medl M, Czemberek H, Delorme S. Locally advanced breast carcinoma: evaluation of mammography in the prediction of residual disease after induction chemotherapy. *Anticancer Res* 2000;20(1B):553–558.
73. Adrada BE, Huo L, Lane DL, Arribas EM, Resetkova E, Yang W. Histopathologic correlation of residual mammographic microcalcifications after neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2015;22(4):1111–1117.

-
- ⁷⁴. Herrada J, Iyer RB, Atkinson EN, Sneige N, Buzdar AU, Hortobagyi GN. Relative value of physical examination, mammography, and breast sonography in evaluating the size of the primary tumor and regional lymph node metastases in women receiving neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 1997;3(9):1565–1569.
- ⁷⁵. Keune JD, Jeffe DB, Schootman M, Hoffman A, Gillanders WE, Aft RL. Accuracy of ultrasonography and mammography in predicting pathologic response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Am J Surg* 2010;199(4):477–484.
- ⁷⁶. Sheikhabaei S, Trahan TJ, Xiao J, et al. FDG-PET/CT and MRI for evaluation of pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer: a meta-analysis of diagnostic accuracy studies. *Oncologist* 2016;21(8):931–939.
- ⁷⁷. Weber JJ, Jochelson MS, Eaton A, Zabor EC, Barrio AV, Gemignani ML, Pilewskie M, Van Zee KJ, Morrow M, El-Tamer M. MRI and Prediction of Pathologic Complete Response in the Breast and Axilla after Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. *Journal of the American College of Surgeons* vol. 225,6 (2017): 740-746.
- ⁷⁸. Mukhtar RA, Yau C, Rosen M, et al. Clinically meaningful tumor reduction rates vary by prechemotherapy MRI phenotype and tumor subtype in the I-SPY 1 TRIAL (CALGB 150007/150012; ACIN 6657). *Ann Surg Oncol* 2013;20(12):3823–3830.
- ⁷⁹. Denis F, Desbiez-Bourcier AV, Chapiron C, Arbion F, Body G, Brunereau L. Contrast enhanced magnetic resonance imaging underestimates residual disease following neoadjuvant docetaxel based chemotherapy for breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2004;30(10):1069–1076.
- ⁸⁰. Wasser K, Sinn HP, Fink C, et al. Accuracy of tumor size measurement in breast cancer using MRI is influenced by histological regression induced by neoadjuvant chemotherapy. *Eur Radiol* 2003;13(6):1213–1223.
- ⁸¹. ACR Practice Parameter for the Performance of Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging (MRI) of the Breast. American College of Radiology. https://www.acr.org/~media/2a0eb28eb59041e_2825179afb72ef624.pdf. Published 2014. Accessed December 22, 2015
- ⁸². Mann RM, Kuhl CK, Kinkel K, Boetes C. Breast MRI: guidelines from the European Society of Breast Imaging. *Eur Radiol* 2008;18(7):1307–1318.
- ⁸³. Pinder SE, Provenzano E, Earl H, Ellis IO. Laboratory handling and histology reporting of breast specimens from patients who have received neoadjuvant chemotherapy. *Histopathology* 2007, 50, 409–417
- ⁸⁴. Smith IC, Heys SD, Hutcheon AW et al. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: significantly enhanced response with docetaxel. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20; 1456–1466.
- ⁸⁵ Schalper KA, Kumar S, Hui P et al (2013) A retrospective population-based comparison of HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization in breast carcinomas: impact of 2007 American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists Criteria. *Arch Pathol Lab Med* 138:213–219. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0617-OA>
- ⁸⁶ Lambein K, Van Bockstal M, Vandemaele L et al (2013) Distinguishing score 0 from score 1+ in HER2 immunohistochemistry-negative breast cancer: clinical and pathobiological relevance. *Am J Clin Pathol* 140:561–566. <https://doi.org/10.1309/AJCP4A7KTA YHZSOE>
- ⁸⁷ Reinert T, Sartori GP, Souza AAB et al (2021) Abstract PS4–22: Prevalence of HER2 Low and HER2-zero subgroups and correlation with response to neoadjuvant chemotherapy (NACT) in patients with HER2-negative breast cancer. *Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS20-PS4-22>
- ⁸⁸ Denkert C, Seither F, Schneeweiss A et al (2021) Clinical and molecular characteristics of HER2 Low-positive breast cancer: pooled analysis of individual patient data from four prospective, neoadjuvant clinical trials. *Lancet Oncol.* [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00301-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00301-6)