

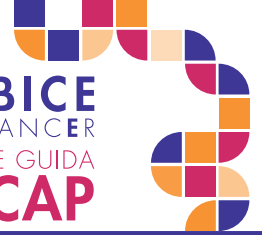
BICE
BEST POSSIBLE CARE
IN BREAST CANCER

LE NUOVE LINEE GUIDA
ASCO CAP



CONSENSUS
WORKSHOP
GROUP





COMITATO SCIENTIFICO

Coordinatore

Giuseppe Viale (Milano)

Vincenzo Arena (Roma)

Saverio Cinieri (Brindisi)

Gaetano De Rosa (Napoli)

Carmine Pinto (Bologna)

Anna Sapino (Torino)

Donatella Santini (Bologna)



BICE

BEST POSSIBLE CARE IN BREAST CANCER

LE NUOVE LINEE GUIDA

ASCO CAP

INDICE

Introduzione	5
Lo scenario terapeutico nel carcinoma mammario HER2+.....	7
Confronto tra Linee Guida ASCO CAP 2007 e 2013	9
Linee ASCO CAP 2013: i punti del cambiamento.....	14
Appendice A - Survey Genactis 2013: qualità, falsi positivi e falsi negativi, controllo di qualità	18
Appendice B - Gli statement votati	19
Bibliografia	25



BICE

BEST POSSIBLE CARE IN BREAST CANCER

LE NUOVE LINEE GUIDA

ASCO CAP



INTRODUZIONE

La caratterizzazione biologica e molecolare del carcinoma della mammella ha offerto negli ultimi anni elementi innovativi per quanto riguarda la terapia a bersaglio molecolare: un ruolo strategico è rappresentato dal recettore HER2. I dati della letteratura indicano che circa il 15-20% dei carcinomi della mammella presentano amplificazione del gene HER2 e sovraespressione del recettore. Questa tipologia di carcinomi si associa a una malattia aggressiva a prognosi infausta in assenza di una terapia mirata.

L'introduzione della terapia a bersaglio molecolare ha restituito al patologo un ruolo centrale nella selezione delle pazienti da inviare al trattamento in funzione del diverso stato di HER2.

L'iperespressione/amplificazione di HER2 deve essere valutata in ogni carcinoma invasivo mammario primitivo all'atto della prima diagnosi o della recidiva. I due metodi approvati per la valutazione dello stato di HER2 sono l'immunoistochimica (IHC) e l'ibridazione in situ (ISH).

Perché la terapia sia efficace è necessario che il carcinoma esprima la molecola HER2 ad alti livelli ed è indispensabile che i test siano eseguiti con la massima accuratezza e con l'applicazione di rigidi sistemi e controlli di qualità. Ancora oggi il tasso di errore nella diagnosi del carcinoma mammario HER2-positivo (HER2+) è elevato.

Il College of American Pathologists (CAP) e l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) nel 2007 hanno redatto linee guida comuni volte proprio a migliorare la precisione del test HER2. Nel 2013 è stato proposto un aggiornamento che fornisce nuove raccomandazioni su come testare l'espressione di HER2, interpretare correttamente i risultati e indirizzare le pazienti verso terapie mirate. Oltre al documento principale che contiene le linee guida (*Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, et. al Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical practice guideline update. J Clin Oncol 2013;31:3997-4014, <http://jco.ascopubs.org/content/31/31/3997.full.pdf+html>*), è altrettanto importante consultare il supplemento *Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update (http://www.asco.org/sites/www.asco.org/files/her2_testing_ds_5-23-14_1.pdf)*.

E' fondamentale che le acquisizioni metodologiche, a livello laboratoristico e clinico, siano di volta in volta discusse e condivise dalle figure professionali cui è demandata la valutazione dei pazienti, in particolare dal patologo e dall'oncologo.

Questo tipo di approccio è stato condiviso dal gruppo di lavoro dell'Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM) e della Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia diagnostica (SIAPEC) nel corso dei Consensus Workshop che si sono svolti negli ultimi anni a Palermo, Taormina e Paestum. Tra i passaggi più recenti vi sono gli atti del Consensus Workshop svoltosi a Catania il 14-15 aprile 2010 e la messa a punto di raccomandazioni per la determinazione dello stato di HER2 nel carcinoma mammario pubblicate sul sito dell'AIOM nel 2010.

In questo documento vengono riportati i contenuti del Consensus Workshop BICE svoltosi a Bologna il 17 aprile 2014 sotto l'egida di AIOM e SIAPEC, che si è posto i seguenti obiettivi:

- far emergere l'importanza strategica della corretta effettuazione del test HER2 per la cura delle pazienti con carcinoma mammario, minimizzando il problema dei falsi negativi e dei falsi positivi;
- mirare alla divulgazione delle nuove linee guida ASCO CAP 2013 tra i referenti dei principali centri di anatomia patologica italiani.

Durante il Consensus Workshop sono state riproposte le raccomandazioni (di seguito denominate *statement*) e le conclusioni discusse a Catania nel 2010 alla luce delle recenti evidenze e in particolare delle nuove linee guida ASCO CAP 2013: alcuni dei precedenti *statement* sono stati eliminati o sostanzialmente modificati e ne sono stati aggiunti di nuovi.

Dall'espressione di voto (Appendice B) dei partecipanti al Workshop sono emerse posizioni di larga maggioranza, ma non sempre unanimi, a dimostrazione che la novità e la complessità delle linee guida ASCO CAP 2013 ha suscitato discussioni e lasciato questioni aperte.

Di seguito le parole dei presidenti di AIOM e SIAPEC:

Carmino Pinto, presidente nazionale AIOM – *“La nostra attenzione costante a produrre linee guida e aggiornamenti, con il preciso intento di evitare posizioni statiche, rappresenta probabilmente una delle iniziative più accurate e rilevanti nel contesto europeo...”*

Gaetano De Rosa, presidente SIAPEC – *“E’ importante credere in un progetto congiunto AIOM e SIAPEC con un linguaggio univoco e chiaro da parte delle due società scientifiche”.*



LO SCENARIO TERAPEUTICO NEL CARCINOMA MAMMARIO HER2+

In Italia si contano circa 50.000 nuovi casi di carcinoma mammario all'anno. Per il 95% (quasi 48.000 pazienti) si tratta di forme precoci, il 16% delle quali (oltre 7.500 pazienti) viene trattato con terapia adiuvante anti-HER2. Del restante 5% di tumori avanzati e metastatici (oltre 2.500 pazienti), il 29% è HER2+.

Queste caratteristiche epidemiologiche rendono ragione dell'importanza di caratterizzare lo stato di HER2 ai fini della impostazione terapeutica, tenendo ben presente che gli studi clinici indicano chiaramente che una caratterizzazione non accurata può modificare sensibilmente la sopravvivenza della paziente.

Gli aspetti più impegnativi per la gestione della malattia sono attualmente: la resistenza ai trattamenti, la terapia delle localizzazioni metastatiche cerebrali, l'eterogeneità di HER2, la personalizzazione dell'approccio terapeutico.

Sviluppi della terapia HER2-targeted

Come noto, i passaggi che dall'individuazione di HER2 hanno condotto all'impiego della terapia con **trastuzumab** sono stati piuttosto rapidi e sono culminati nello studio di *Slalom DJ et al, 2001* che ha introdotto un rilevante elemento di novità, dimostrando un vantaggio significativo in termini di progressione libera da malattia (PFS) per le pazienti con carcinoma della mammella metastatico HER2+ trattate con trastuzumab (trastuzumab + chemioterapia vs chemioterapia: PFS mediana 7,4 vs 4,6 mesi, $p < 0,001$).

Uno studio successivo (*Dawood SS et al, 2010*) ha confermato che l'impiego di trastuzumab ha un impatto prognostico sulla sopravvivenza complessiva (OS a 5 anni: tumori HER2- 24,5%, tumori HER2+ trattati con trastuzumab 23,4%, tumori HER2+ non trattati con trastuzumab 13,2%).

Gli studi clinici hanno successivamente verificato il ruolo di trastuzumab in **terapia adiuvante, neo-adiuvante** e nelle varie situazioni della pratica clinica quotidiana secondo le indicazioni delle linee guida europee e statunitensi.

Lo studio HERA (*Goldhirsch et al, 2012*) ha reclutato in 478 centri di 39 Paesi 5.102 pazienti con carcinoma della mammella HER2+. Dopo la revisione centralizzata dello stato recettoriale con IHC o FISH, le pazienti sono state randomizzate in tre bracci: osservazione, trastuzumab per 1 anno, trastuzumab per 2 anni. Al secondo anno di follow up, la quota di casi liberi da malattia era significativamente maggiore nel braccio di trattamento per 1 anno (PFS, trattamento 85,8% vs osservazione 77,4%, $p < 0,0001$; hazard ratio 0,54), tanto che alle pazienti allocate nel braccio di controllo è stata offerta la possibilità di ricevere trastuzumab. D'altra parte, dopo 8 anni di follow up non si è osservata una differenza significativa in termini di sopravvivenza se il trattamento con trastuzumab era stato effettuato per 1 anno o per 2 anni (OS, trattamento per 2 anni 86,4% vs 1 anno 87,6%, $p = 0,63$; hazard ratio 1,05).

A seguito della pubblicazione dei dati dello studio HERA, l'Italia è stato uno tra i primi Paesi in Europa a poter utilizzare il farmaco nel *setting* adiuvante.

I risultati di molti studi (*SOLD, on going; ShortHER, Guarneri et al, 2008; HERA, Goldhirsch et al, 2012; PHARE, Pivrot et al, 2012*) hanno permesso di stabilire che la durata ottimale della terapia con trastuzumab è di un anno.

Per quanto riguarda il profilo di sicurezza, l'esperienza accumulata su circa un milione di pazienti permette di affermare che trastuzumab è ben tollerato e la frequenza degli eventi avversi è accettabile anche per quanto riguarda la cardiotoxicità.

Si sta ora affermando e diverrà verosimilmente lo standard nel futuro, la terapia con **trastuzumab per via sottocutanea**: la formulazione messa a punto al momento mostra una buona attività e biodisponibilità ed è preferita dalle pazienti.

Grazie a trastuzumab la sopravvivenza mediana delle pazienti con malattia metastatica è sensibilmente migliorata e si colloca intorno ai 4 anni.

Prospettive terapeutiche innovative

Il blocco di HER2 può essere ottenuto grazie a farmaci con diverso meccanismo di azione eventualmente somministrati in associazione (*doppio blocco recettoriale*) come trastuzumab + pertuzumab (*intervengono entrambi a livello di HER2*)

o trastuzumab + lapatinib (*quest'ultimo interviene a livello citoplasmatico*).

Lo studio multicentrico ALTO (NCT00490139, Adjuvant Lapatinib and/or Trastuzumab Treatment Optimization HER2 Adjuvant Trial), randomizzato e in aperto ha confrontato l'effetto di diversi schemi terapeutici con trastuzumab e lapatinib (lapatinib da solo, trastuzumab da solo, trastuzumab e lapatinib in sequenza o in co-somministrazione) in pazienti con carcinoma della mammella HER2+. Il braccio con lapatinib da solo è stato chiuso per evidente inferiorità, per quanto riguarda gli altri bracci non sono state osservate differenze significative tra i diversi trattamenti.

Un altro farmaco promettente è il **pertuzumab**, un anticorpo monoclonale che si lega a HER2 e ne inibisce la dimerizzazione. È stato utilizzato insieme con trastuzumab nello studio sperimentale CLEOPATRA (*Baselga et al, 2012*) in 808 pazienti con carcinoma metastatico della mammella HER2+. I risultati dopo un follow up di oltre 30 mesi mostrano un vantaggio significativo nel gruppo di intervento (PFS mediana 18,5 vs 12,4 mesi, $p < 0,0001$; hazard ratio 0,62).

Il passaggio all'utilizzo dell'associazione di trastuzumab e pertuzumab in terapia adiuvante è stato rapido. L'arruolamento nello studio APHINITY (*von Minckwitz et al, 2011*), di oltre 4.000 pazienti con carcinoma della mammella HER2+ si è recentemente concluso e a breve verranno pubblicati i risultati.

Sta anche emergendo la possibilità di utilizzare trastuzumab per veicolare farmaci con elevata tossicità (e quindi non somministrabili per via sistemica), come i derivati della famiglia delle maitansine, in una nuova molecola (**T-DM1**). Il legame tra i due agenti è stabile durante il passaggio nell'organismo e si scinde una volta raggiunta la cellula bersaglio del tumore mammario. In assenza del recettore HER2 il coniugato, che è privo di tossicità, viene eliminato, mentre in presenza del recettore HER2 viene internalizzato dalla cellula neoplastica, viene scisso, ed il chemioterapico esercita il suo effetto citotossico.

I risultati degli studi nella malattia avanzata evidenziano un vantaggio in termini di PFS, anche in pazienti con storia di trattamenti multipli. Il trattamento con T-DM1 ha conferito un vantaggio in termini di PFS, anche nelle pazienti con mutazione di PIK3CA che sono invece meno responsive a capecitabina + lapatinib.

Lo studio MARIANNE (NCT01120184), condotto in 332 centri di 40 paesi, ha assegnato 1.092 pazienti con carcinoma della mammella metastatico HER2+ mai sottoposte a chemioterapia, a trattamento con trastuzumab + un taxano, T-DM1 + pertuzumab o T-DM1 + placebo. I risultati verranno pubblicati a breve.

Sono in corso studi con T-DM1 in terapia adiuvante (NCT01358877). L'algoritmo per la malattia metastatica prevede già ora l'uso di T-DM1.

Continua a essere valida l'indicazione alla terapia endocrina nelle forme con tripla positività recettoriale.



CONFRONTO TRA LINEE GUIDA ASCO CAP 2007 E 2013

Limiti delle linee guida 2007 e obiettivi di miglioramento

Le linee guida ASCO CAP pubblicate nel 2007 necessitavano da tempo di una revisione e dell'aggiornamento di alcuni aspetti, come auspicato da più parti nella comunità scientifica.

Uno degli obiettivi da perseguire era la riduzione dei risultati falsamente positivi o negativi al di sotto del 5% complessivamente, tramite indicazioni su come gestire i casi per i quali i risultati di laboratorio divergono dall'atteso o non sono coerenti nella stessa paziente.

In letteratura le quote di false positività e di false negatività in IIC sono circa del 15-20% e del 10% rispettivamente, le quote di false negatività in FISH sono del 10-15%.

Anche nell'esperienza italiana è evidente che ci sono difficoltà nel raggiungere un'uniformità di comportamento in fase preanalitica, analitica, postanalitica (Appendice A).

Falsi positivi

Nelle linee guida ASCO CAP 2007 è stato enfatizzato il problema delle false-positività ed è stato dato particolare rilievo ad accorgimenti e cambiamenti nella pratica (procedure di fissazione, criteri di interpretazione) che possano ridurre l'occorrenza.

Falsi negativi

Il numero dei casi falsamente negativi è inferiore rispetto ai falsi positivi, e probabilmente in riduzione. Attualmente si stima che rappresenti lo 0,15% di tutte le nuove diagnosi anche se alcuni cambiamenti nei criteri diagnostici hanno determinato una certa difficoltà nella stima stessa basata su una revisione retrospettiva delle casistiche.

Per quanto contenuta, la frequenza di casi falsamente negativi può avere un impatto sfavorevole non trascurabile sulle strategie terapeutiche. Per esempio, solo negli Stati Uniti l'adozione di un cut-off per HER2 del 30% (criteri ASCO CAP) o del 10% (criteri FDA) può essere decisiva per l'accesso al trattamento con trastuzumab di 3.000-5.000 donne. **La conseguenza possibile in caso di falsa negatività è infatti negare a una paziente l'accesso a una terapia appropriata con trastuzumab.**

I cambiamenti

I cambiamenti tra le linee guida del 2007 e la loro revisione del 2013 si possono suddividere in 4 categorie:

- campione da testare
- trattamento del campione e criteri di esclusione
- non concordanza dei risultati
- nuove metodiche di determinazione.

Campione da testare

Nel 2007 lo statement affermava che *"andrebbero testati per HER2 tutti i carcinomi primitivi e le metastasi"*, mentre le linee guida 2013 affermano, sulla base di una ventina di lavori pubblicati nel periodo intercorso tra le due versioni delle

linee guida, che “il carcinoma primitivo e le metastasi devono avere almeno una determinazione per HER2”.

Nel dettaglio, il problema coinvolge le discordanze tra carcinoma primitivo e metastasi, riconducibili a un reale cambiamento della biologia del tumore o una eterogeneità tumorale o ancora a una variabilità della prestazione della tecnica di determinazione.

Le discordanze sono state oggetto di una recente analisi di *Aurilio et al, 2014* che ha preso in considerazione i 48 studi pubblicati sull'argomento dal 1983 al 2011 (coinvolte nell'insieme 4.200 pazienti) e ha stimato le quote di discordanza nella determinazione dello stato recettoriale. È interessante notare che associando metodiche IHC e ISH la discordanza aumenta (circa 10%), mentre resta più bassa se si ricorre solo all'IHC (circa 5%).

Il problema della conversione dello stato di HER2 tra la sede primitiva a quella metastatica è rilevante per la gestione della paziente, perché può modificare le strategie terapeutiche in una percentuale di casi stimata intorno al 12-14%, ed in alcuni studi di minore numerosità fino al 20%. Ne deriva l'opportunità che la determinazione venga effettuata sia sulla lesione primitiva che sulla metastasi.

Una questione aperta di particolare rilievo è la gestione dei casi negativi dopo terapia neoadiuvante. I dati disponibili suggeriscono che in questa situazione (la perdita di amplificazione di HER2 viene segnalata in un terzo circa dei casi), l'oncologo possa decidere di non continuare la terapia con trastuzumab, mentre in caso di risposta scarsa o di recidiva la determinazione va ripetuta perché ci si potrebbe trovare di fronte a una falsa positività del campione iniziale.

Le raccomandazioni emerse dal Consensus Workshop di Catania nel 2010 avevano già correttamente anticipato questa indicazione: eseguire la determinazione di HER2 all'atto della prima diagnosi o della recidiva, sulle biopsie pre-operatorie se è prevista una terapia neoadiuvante e in caso di progressione sul tumore primitivo (se non effettuata in precedenza) e sulla metastasi se disponibile.

Trattamento del campione e criteri di esclusione

Trattamento del campione

Una delle cause principali di scarsa accuratezza nella determinazione dello stato recettoriale (HER2, ER, PGR) è il non corretto trattamento del campione operatorio.

Tra le due versioni delle linee guida non cambia la raccomandazione relativamente al periodo di “ischemia fredda” del campione, che deve essere “il più breve possibile” (un'indicazione da interpretare idealmente come “entro un'ora”). Resta invariata anche la raccomandazione all'impiego di formalina tamponata al 10%, anche per i campioni citologici. Le nuove linee guida ammettono peraltro l'uso di fissativi alternativi, purché si effettui una validazione e si verifichi che il numero di risultati positivi e negativi è equivalente a quello ottenuto con la formalina tamponata al 10%. Nel Consensus Workshop di Catania si era già raggiunto il consenso sull'uso della formalina tamponata al 10%.

I campioni chirurgici, dopo un accurato esame dei margini, vanno sezionati a intervalli di 5-10 mm e posti in un adeguato volume di formalina. Le linee guida richiamano il fatto che un prolungamento dei tempi di ischemia fredda può portare a una perdita dell'espressione della proteina recettoriale sulle cellule.

Il problema del tempo trascorso prima della fissazione è noto da tempo e non ha implicazioni solo per HER2, ma anche per altri antigeni e per la conta mitotica. Ciò è particolarmente importante se i preparati provengono da altri centri rispetto a quello in cui vengono fissati (maggiore incertezza e prolungamento dei tempi).

Già negli anni '40 si parlava del paradosso permeazione-fissazione della formalina. La permeazione è infatti un fenomeno fisico che dipende da osmolarità dei liquidi, peso molecolare del fissativo e procede nei tessuti alla velocità di 1 mm all'ora. La fissazione è un fenomeno complesso, con passaggi intermedi la cui tempistica dipende da variabili in parte non controllabili e aspetti non del tutto conosciuti. Si può misurare la velocità di ingresso della sostanza nel tessuto, ma è difficile seguire la reazione chimica di formazione del legame dialdeidico e quindi predire la cinetica della fissazione. Esperienze recenti effettuate sottoponendo campioni biotipici di tessuto mammario a diverse condizioni sperimentali e differenti tempi di fissazione indicano che un ritardo di fissazione determina una perdita antigenica per HER2, ER e PGR. Un ritardo di fissazione anche solo di un'ora ha un impatto anche sulla FISH con una cattiva qualità delle immagini e la perdita di un numero significativo di casi altrimenti diagnosticati positivi.

Cambia invece, tra le linee guida del 2007 e quelle del 2013, il tempo di fissazione massima raccomandato che viene esteso a 72 ore. Nel caso si prolunghi la fissazione, è bene indicarlo nel referto. Questo prolungamento, infatti, può essere fonte di falsa negatività e richiedere il ricorso a tecniche speciali di smascheramento. Peraltro esistono in letteratura studi di confronto tra tempi di fissazione standard e prolungati a 96 o 120 ore che non hanno evidenziato risultati significativamente diversi per la determinazione di HER2. Secondo questi studi, sarebbe importante ai fini del mantenimento della proteina recettoriale, più che la durata della fissazione, un'adeguata preparazione del pezzo operatorio.

Va ricordato che i tempi indicati dalle linee guida 2007 (48 ore) non erano validati da studi sperimentali ma si basavano



sul consenso e per questo sono stati messi in discussione. Tra gli argomenti a sfavore, oltre al limite metodologico, veniva citato il fatto che i preparati operatori di interventi effettuati prima del fine settimana sono di fatto esposti a una fissazione superiore a 48 ore, ed il fatto che il vero problema nella fase pre-analitica della metodica è piuttosto la fissazione troppo breve o inaccurata del campione, cui segue una postfissazione alcolica che può portare all'aumento dei casi falsamente positivi per HER2.

Complessa resta la gestione di tessuti provenienti da laboratori periferici, dove la logistica può rendere la fissazione particolarmente problematica: quando non fosse possibile procedere ad una adeguata fissazione del campione nei tempi previsti, si raccomanda di incidere il campione operatorio in corrispondenza della neoplasia a partire dal versante fasciale, prima di immergerlo in una quantità sufficiente di formalina.

Si sottolinea, come già suggerito in occasione del Consensus Workshop di Catania, l'importanza del coinvolgimento di tutti gli operatori per ottimizzare il trattamento del campione: laddove non sia presente un patologo, è necessario che il chirurgo si faccia carico dell'appropriatezza della iniziale fissazione.

Criteri di esclusione

Circa i criteri di esclusione del campione, tra le due versioni delle linee guida ci sono stati piccoli cambiamenti. Nel 2007 erano state pubblicate tabelle molto chiare che stabilivano i criteri di esclusione anche in base alla metodica utilizzata.

Il campione è da considerare **indeterminato** quando:

- ha ricevuto un trattamento non adeguato
- sono presenti artefatti che impediscono una corretta determinazione dell'HER2
- si sono verificati problemi nella determinazione.

In linea generale, è preferibile definire un campione indeterminato e rimandare alla FISH piuttosto che ricorrere alla categoria del 2+.

Devono destare sospetto ed essere definiti **indeterminati**:

in IIC:

- segnali di membrana forti a livello di strutture normali (dotti e lobuli)
- presenza di *crush artifacts* specie nelle biopsie;

in FISH:

- depositi eccessivi di formalina
- eccesso di digestione dei nuclei
- ibridazione parziale
- precipitati che impediscono la lettura.

Non concordanza dei risultati

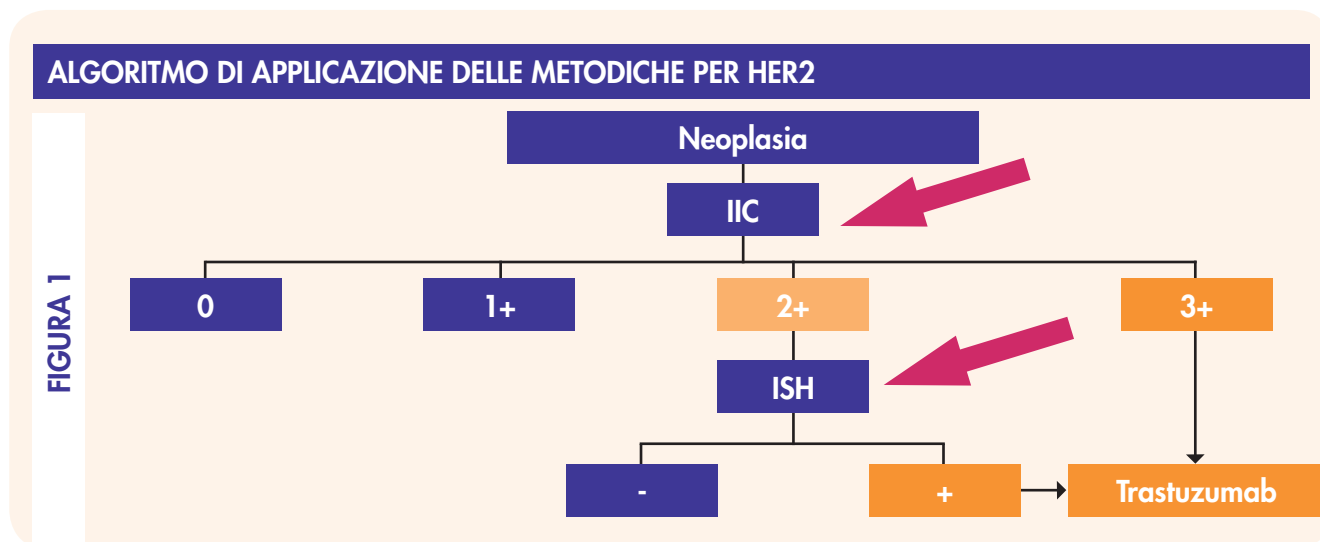
Si tratta di una problematica non affrontata nelle linee guida 2007. Il Consensus Workshop di Catania aveva raccomandato che l'interpretazione dei risultati relativi allo stato di HER2 venisse effettuata da personale esperto e i risultati fossero parte integrante del referto, con la congruità del tutto garantita dal patologo.

In caso di dati non concordanti, le indicazioni a rivedere il caso e a ripetere la determinazione sono le seguenti:

- carcinoma invasivo, ER+, PGR+, tubulare o cribriforme o mucinoso o adenoido-cistico, risultato HER2 negativo: non ripetere (questi tipi tumorali sono in genere associati a negatività per HER2)
- carcinoma invasivo, con le caratteristiche precedenti ma HER2 positivo: ripetere
- ripetizione del test sul campione chirurgico se una biopsia pre-operatoria è risultata HER2 negativa, ma:
 - la quota di tessuto neoplastico invasivo è scarsa nella biopsia pre-operatoria (quota non definita quantitativamente per ora)
 - il tumore nel resecato chirurgico è differente (*high grade/morphologically distinct*) rispetto a quanto visto nella biopsia
 - il grading è G3
 - il risultato per HER2 della biopsia è equivoco in IIC e ISH (entrambe)
 - il risultato per HER2 della biopsia fa sospettare l'esistenza di problemi in fase pre-analitica.

Nuove metodiche di determinazione

L'algoritmo di applicazione (Figura 1) contempla IIC e ISH. Deve essere accurato e utilizzare metodiche riproducibili. Il passaggio dalle linee guida 2007 a quelle 2013, viene sintetizzato dalle tabelle relative a IIC e ISH pubblicate nei due documenti (Figura 2).



La tipizzazione molecolare

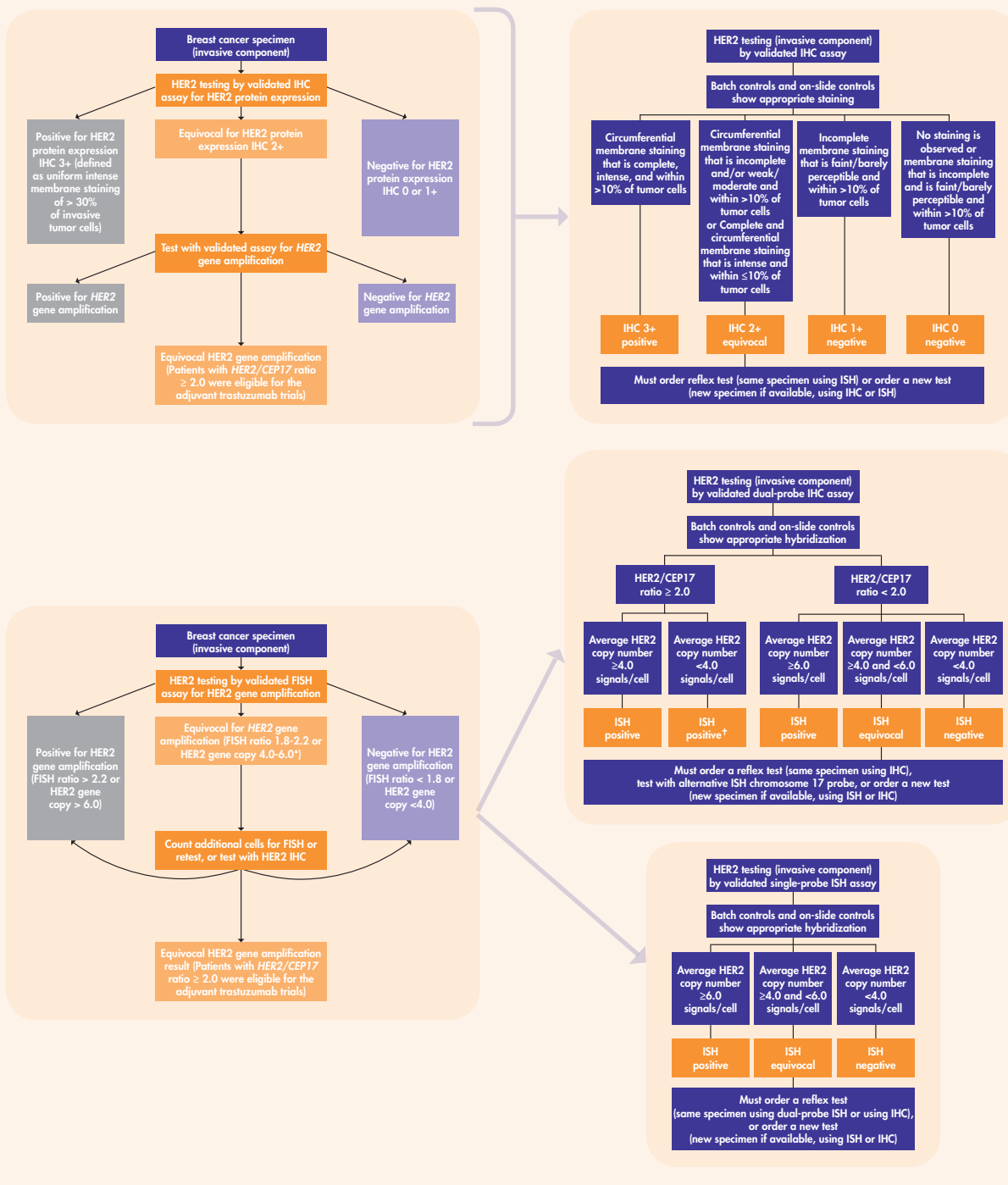
Per quanto riguarda l'impiego di metodiche alternative a quelle classiche, il panel delle linee guida 2013 afferma che al momento non ci sono prove sufficienti per raccomandare l'utilizzo di metodiche basate sulla determinazione di DNA o mRNA per stabilire lo stato di HER2 in pazienti non selezionate.

Tra le ragioni addotte ci sono la mancanza di una validazione clinica dei risultati e la presenza di fattori interferenti (come ad esempio ricca infiltrazione linfocitaria del campione, commistione di tessuto fibroadiposo e neoplasia intraduttale).

Per ora può essere ragionevole riservare l'impiego delle tecniche molecolari alle pazienti con risultati equivoci ad entrambe le metodiche tradizionali (IIC e ISH).

CONFRONTO SINTETICO FRA LINEE GUIDA 2007 E 2013

FIGURA 2



LINEE ASCO CAP 2013: I PUNTI DEL CAMBIAMENTO

Le linee guida ASCO CAP 2013, redatte da 20 esperti, 2 dei quali europei con una rappresentanza equilibrata di patologi e oncologi, rappresentano il miglior compromesso attualmente possibile.

Stato di HER2

Il recettore per HER2, insieme a quello per ER, continua a essere il target più importante per il trattamento del carcinoma mammario. Dopo oltre 30 anni è ancora in parte controversa la definizione di positività per HER2 (in termini di soglia di positività in IIC, ratio, numero di copie del gene, numero di cellule amplificate): la classificazione del singolo caso può dipendere dal centro dove viene effettuata la diagnosi. Il tasso di risultati falsamente positivi si colloca intorno al 10-14% (secondo i dati delle revisioni centralizzate negli studi ALTO e APHINITY). Non si è in grado di definire con precisione il tasso di false negatività, per la mancanza di dati disponibili, ma è ragionevole stimarlo in circa l'1%. Complessivamente il tasso di errore sarebbe intorno al 15%, il che rappresenta un numero assoluto molto rilevante di pazienti che non riceve la cura appropriata (circa 225.000 casi ogni anno nel mondo e circa 7.000 in Italia, senza contare il rischio di errore nella determinazione dei recettori ormonali, con un tasso di risultati falsamente negativi per i recettori degli estrogeni che si colloca intorno al 15-20%). Nello scenario peggiore, risultati falsamente positivi per HER2 combinati con risultati falsamente negativi per i recettori ormonali comportano che molte donne non solo ricevano trattamenti inappropriati ma vadano anche incontro a effetti collaterali evitabili.

Questioni controverse

- Le questioni controverse sono:
- le soglie attuali per la positività di HER2
- la definizione di polisomia e monosomia
- l'affidabilità della ratio HER2/CEP17
- la gestione della eterogeneità tumorale
- il cambiamento delle caratteristiche dal tumore primitivo alle metastasi.

Soglie attuali per la positività di HER2

In merito alla definizione delle soglie attuali per la positività di HER2 si confrontano la definizione FDA (sovraespressione del recettore >10% delle cellule, ratio HER2/CEP17 >2, numero di copie del gene >4) e la precedente definizione ASCO CAP (sovraespressione del recettore >30% delle cellule, ratio HER2/CEP17 >2,2, numero di copie del gene >6). E' noto che l'innalzamento del cut off adottato da ASCO CAP rappresentava la soluzione più lineare per aumentare il livello di concordanza tra IIC e FISH, per quanto ininfluenza sulle determinazioni della FDA e quindi sulla candidabilità al trattamento con trastuzumab. Il numero di pazienti con sovraespressione compresa tra il 30% e il 10% e per le quali cambia quindi l'indicazione al trattamento è in termini relativi intorno al 3%.

La revisione delle soglie effettuata con le linee guida ASCO CAP 2013 è orientata a evitare che pazienti che potenzialmente possono beneficiare di un trattamento antiHER2 siano escluse dal trattamento.

Per quanto riguarda l'IIC (Figura 3):

- **3+** si ritorna alla soglia del >10% e viene specificato che la colorazione deve essere circonferenziale (di membrana), completa (sull'intera circonferenza) e intensa
- **2+ o equivoco** rappresenta un'indicazione a effettuare la determinazione in ISH. In precedenza si prendeva come riferimento

una colorazione circonferenziale, completa, non debole-moderata in >10% delle cellule. Ci si è accorti che con questa definizione si perdeva una quota di casi che pur non avendo queste caratteristiche di immunoreattività erano amplificati. Si è pertanto deciso di includere nella definizione i casi con colorazione circonferenziale, incompleta, intensa o di intensità moderata in >10% delle cellule, oppure con colorazione circonferenziale completa, intensa in ≤10% delle cellule).

La definizione di **equivoco** può essere chiarita come segue:

- colorazione completa debole-moderata, circonferenziale in >10% delle cellule (ex 2+)
 - colorazione incompleta (baso-laterale o laterale) moderata o intensa in >10% delle cellule (ex 1+)
 - colorazione completa intensa circonferenziale in <10% delle cellule (ex 0).
- **1+ o negativo** colorazione incompleta debole o debolissima in >10% delle cellule
 - **0 o negativo** assenza di colorazione o colorazione incompleta debole o debolissima in ≤10% delle cellule.

E' utile ricordare che la frequenza dei risultati falsamente positivi in IIC è notevolmente inferiore alla variabilità intrinseca del metodo, per cui non è ragionevole raccomandare la ripetizione della determinazione dello stato di HER2 con tecniche ISH quando risulti 3+ in IIC. Tuttavia, potrebbe essere utile valutare con l'oncologo l'attendibilità del dato caso per caso. Il cambiamento della classificazione pone peraltro il problema di come gestire le pazienti, il cui tumore sia stato recentemente (pochi mesi prima dell'adozione delle nuove linee guida) classificato con score 1+ o 0 e che con la revisione 2013 rientri nella definizione di equivoco.

ALGORITMO PER L'IIC

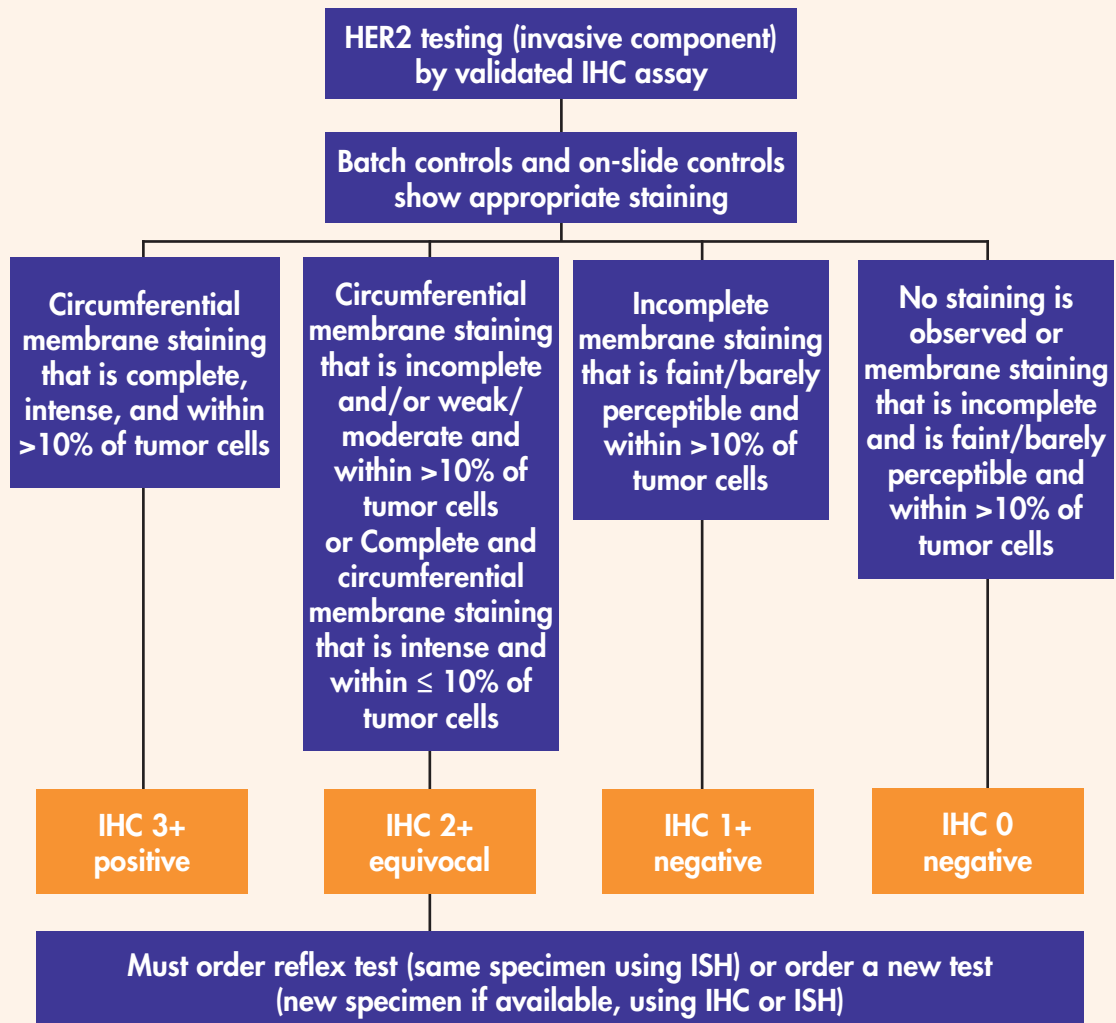


FIGURA 3

Le linee guida 2013 non esprimono alcuna raccomandazione in proposito: è lasciato alla scienza e alla coscienza del curante richiedere eventualmente un test ISH ed eventualmente prescrivere trastuzumab in casi selezionati in base alle caratteristiche e all'andamento della malattia.

Ratio HER2/CEP17, monosomia e polisomia

Per quanto riguarda la FISH (Figura 4), sono state considerate equivalenti FISH, CISH, SISH e raggruppate nell'acronimo ISH, suddividendole poi in ISH dual color e monocolor.

Usando ISH dual color, si deve valutare in prima battuta la ratio:

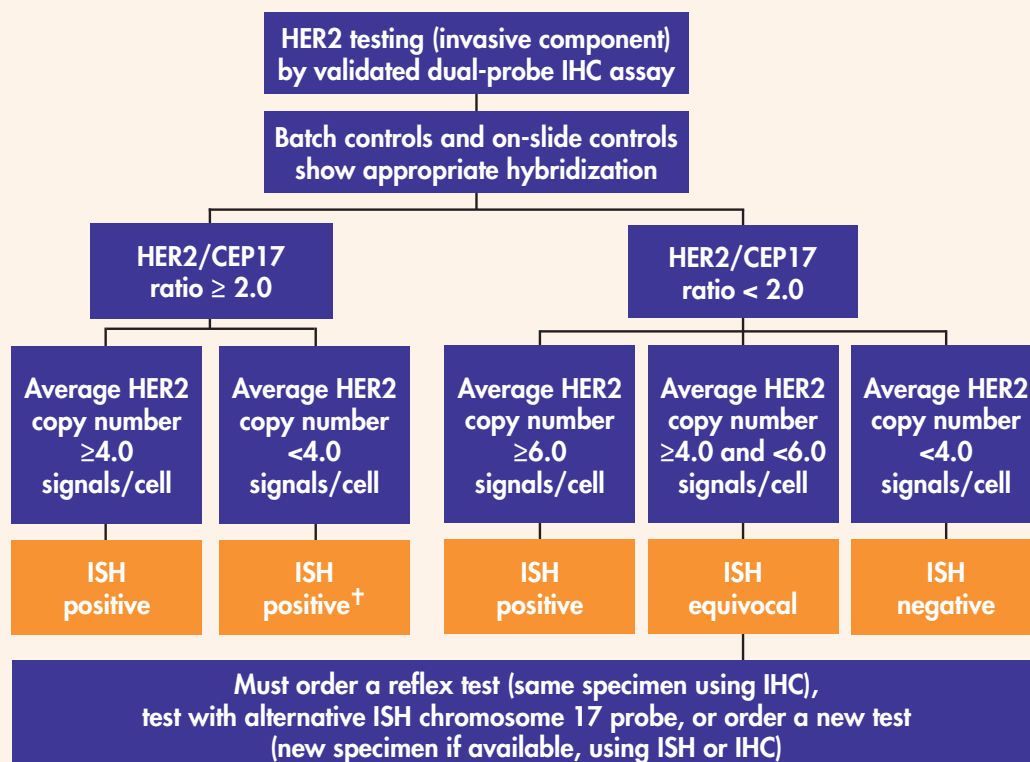
- **positività** ratio ≥ 2 indipendentemente dal numero di copie del gene. In particolare si è ottenuto il consenso, non unanime, sul fatto di definire positivi i casi con ratio ≥ 2 anche con un numero medio di copie del gene < 4 . Questa raccomandazione è stata facilitata dalle considerazioni sull'ottimo profilo di tollerabilità di trastuzumab. Alcuni membri del panel hanno comunque espresso l'orientamento a eseguire ulteriori indagini in questo sottogruppo
- **positività** ratio < 2 e numero di copie del gene ≥ 6
- **risultato equivoco** ratio < 2 e numero di copie del gene ≥ 4 e < 6 . Significa che occorre effettuare altri test: IHC se non eseguita precedentemente, studio di altre inclusioni del tumore primario o delle eventuali metastasi linfonodali sincrone
- **negatività** ratio < 2 e numero di copie del gene < 4 .

Questi criteri rispecchiano ancora una volta la volontà di non escludere dal trattamento pazienti che potrebbero ricavare un beneficio da trastuzumab. I criteri di eleggibilità per i trial che hanno validato l'uso di trastuzumab in terapia adiuvante prevedevano una ratio ≥ 2 , indipendentemente dal numero medio di copie del gene, e non si è vista correlazione tra l'entità del beneficio ottenuto da trastuzumab e il numero delle copie del gene.

La definizione della polisomia del cromosoma 17 può influire in misura significativa sulle decisioni e quindi sulla prognosi. È utile ribadire che la vera polisomia (duplicazione dell'intero cromosoma) è piuttosto rara, mentre è più frequente l'amplificazione della regione pericentromerica del cromosoma 17. Di questo aspetto bisogna tenere conto quando si calcola la ratio HER2/CEP17, proprio per evitare risultati falsamente negativi. Le linee guida 2013 tengono conto di questo problema e forniscono indicazioni operative in merito.

ALGORITMO PER L'ISH DUAL COLOR

FIGURA 4





I criteri adottati per la ISH monocolor sono simili, con la differenza che non si può calcolare la ratio (Figura 5):

- **positività** numero di copie del gene ≥ 6
- **risultato equivoco** numero di copie del gene ≥ 4 e < 6
- **negatività** numero di copie del gene < 4 .

I casi più critici sono quelli risultati equivoci sia in IHC sia in ISH: in queste circostanze l'oncologo è autorizzato a considerare la prescrizione di una terapia antiHER2. La decisione clinica finale deve essere individualizzata tenendo conto delle caratteristiche della paziente e della malattia e deve essere discussa e condivisa con la paziente.

Gestione della eterogeneità tumorale

L'eterogeneità intratumorale dello stato di HER2 è stata sottovalutata per molto tempo ma sta diventando sempre più importante con la disponibilità di farmaci, come il T-DM1.

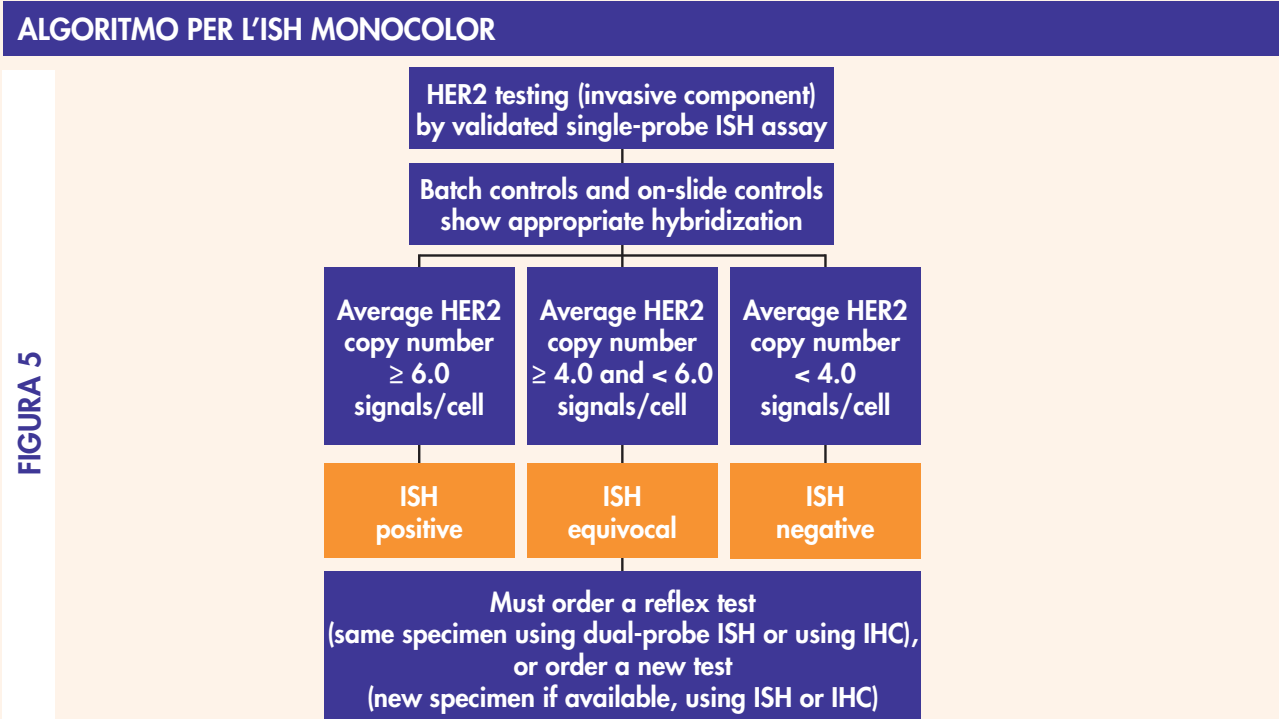
Si tratta di un fenomeno evidenziabile sia con l'IHC (metodica che esplora le singole cellule ed è in grado di rilevare la positività anche solo di una singola cellula) che con la ISH (metodica che esplora il numero medio di copie del gene di una popolazione cellulare, e il cui risultato finale dipende dal numero delle cellule amplificate in rapporto a quello delle cellule non amplificate).

Nella massima parte dei casi, le cellule che risultano 3+ in IHC sono anche amplificate, e pertanto è necessario che i criteri per la definizione di un tumore HER2 positivo in IHC ($>10\%$ delle cellule positive) siano consistenti con quelli utilizzati nella valutazione dei test ISH. Si è quindi giunti alla seguente indicazione: "Ogni popolazione di cellule amplificate che rappresenti più del 10% dell'intera popolazione neoplastica deve essere valutata separatamente. I casi che contengono aree amplificate e non amplificate dovrebbero essere riportati come positivi per HER2. Bisogna indicare la quota della popolazione tumorale amplificata." Nelle indicazioni si specifica che le cellule amplificate devono essere aggregate tra loro, ma questa precisazione ha sollevato discrete controversie.

Il panel ASCO CAP 2013 suggerisce quindi di esaminare l'intera sezione in ISH; se c'è omogeneità si contano almeno 20 cellule in qualsiasi area del tumore infiltrante; se c'è eterogeneità, si valuta la percentuale di cellule amplificate (se $>10\%$ il caso viene considerato amplificato). L'uso delle tecniche cromogeniche invece che quelle a fluorescenza, e la valutazione del risultato delle metodiche immunostochimiche rendono più agevole l'esame della intera sezione colorata con tecniche di ISH.

In ogni caso con le nuove linee guida si ha il vantaggio di un'unica soglia per la definizione di un tumore HER2 positivo: è sufficiente che siano presenti $>10\%$ delle cellule neoplastiche con iperespressione della proteina in IHC(3+) o con amplificazione del gene.

FIGURA 5



APPENDICE A

SURVEY GENACTIS 2013: QUALITÀ, FALSI POSITIVI E FALSI NEGATIVI, CONTROLLO DI QUALITÀ

La survey Genactis fornisce un quadro su scala nazionale: si riferisce a oltre 23.000 schede raccolte in 2 anni, da marzo-aprile 2011 a marzo-aprile 2013, in 5 wave successive.

Dall'analisi complessiva dei 23.214 casi HER2+ con il contributo di tutte le 5 wave, emerge una positività di HER2 del 16%.

Emerge che in genere l'analisi viene effettuata sul tumore primitivo, la metodologia di primo livello è l'IIC, la centralizzazione dell'attività di FISH è del 17-18% circa.

Tra gli anticorpi utilizzati prevale l'Herceptest, seguito da 4B5 e CB11.

Per l'ibridazione in situ si impiegano, nell'ordine, FISH, SISH e CISH.

Circa l'interpretazione, mettendo in relazione la positività di HER2 con il grado di differenziazione si osserva una distribuzione coerente, con un 1,7% di casi G1 e un 28,1% di casi G3 che sono HER2+. E' forse migliorabile il dato dei casi G2 (l'8,3% dei casi risulta HER2+).

L'analisi delle ultime wave mostra una differenza statisticamente significativa nel numero di casi primitivi e metastatici diagnosticati come positivi. Si tratta di valutazioni effettuate sia in IIC e in ISH.

Circa la positività anticorpale in IIC, la situazione è simile tra una wave e l'altra (con una differenza di positività complessiva che differisce dell'1-2%, per quanto l'impiego di diversi anticorpi modifichi sensibilmente il risultato).

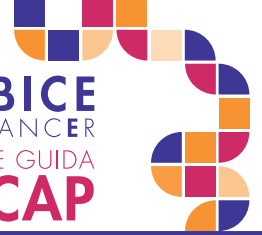
Per quanto riguarda l'ibridazione in situ, su numero di casi minore, si osserva invece una differenza abbastanza marcata tra wave (con una differenza di positività complessiva che differisce del 10% circa con SISH e dell'1-2% con CISH o FISH). La differenza riscontrata con SISH nelle prime wave si spiega verosimilmente con una fase iniziale di impiego del metodo: si è poi allineata sui valori delle altre due metodiche successivamente.

L'anticorpo 4B5 fornisce una quota di casi HER2+ con amplificazione stabile intorno al 23-24%, con Herceptest si evidenzia un incremento di un paio di punti percentuali (dal 24% al 26%), con l'anticorpo CB11 l'incremento è decisamente più marcato (dal 22% al 37% circa).

In Italia si osserva una variabilità ancora eccessiva tra i singoli centri, per quanto migliorata nel corso del tempo. Ai controlli di qualità per la FISH partecipano attualmente 71 centri.

I risultati dei controlli (su campioni standard uguali per tutti i centri) mostrano, relativamente alla valutazione del gene HER2, una concordanza buona per i campioni con amplificazione, meno soddisfacente sui campioni con gain o normali. Anche la valutazione del CEP 17 è migliorabile.

E' quindi particolarmente importante proseguire iniziative sia di miglioramento della qualità delle determinazioni sia di allargamento del consenso sull'interpretazione dei risultati, specialmente perché le linee guida introducono aspetti interpretativi delicati e complessi sui quali è bene fare chiarezza.



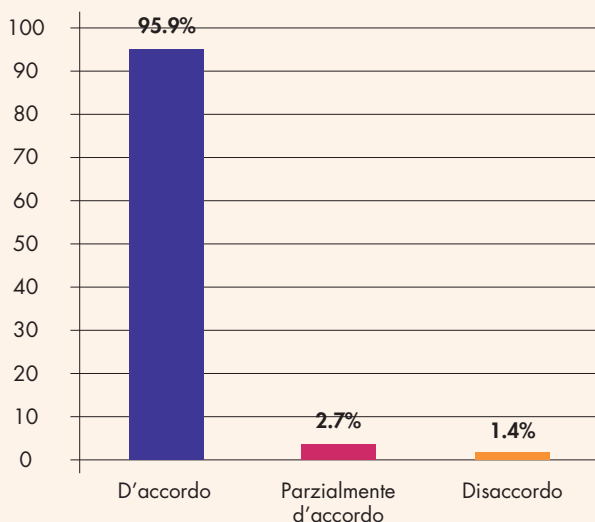
APPENDICE B GLI STATEMENT VOTATI

Dopo le sessioni del Consensus Workshop dedicate alle linee guida ASCO CAP 2013 e alle differenze con le precedenti del 2007, sono stati votati gli statement con un focus su alcuni degli argomenti più attuali.

Requisiti minimi e standard di refertazione

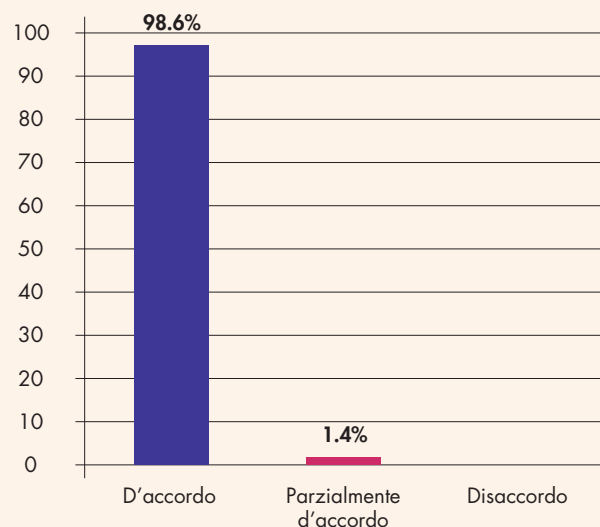
1. DETERMINAZIONE DI HER2

L'iperespressione/amplificazione di HER2 deve essere valutata in ogni carcinoma invasivo mammario all'atto della prima diagnosi o della recidiva/metastasi.



2. TUMORI HER2+ DI PICCOLE DIMENSIONI PROGNOSI E TERAPIA

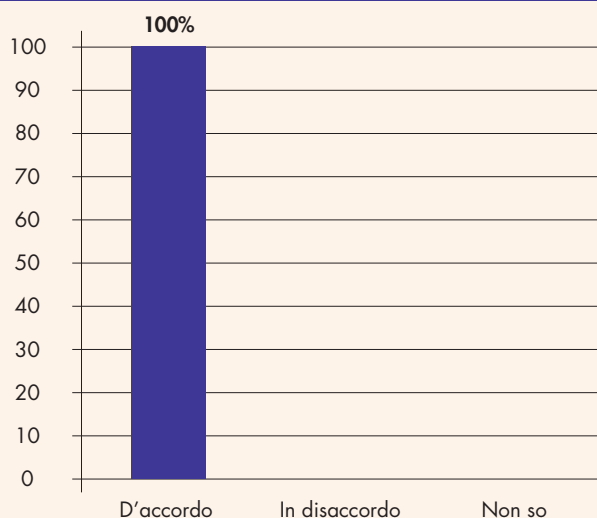
- La presenza di iperespressione/amplificazione di HER2 è associata a prognosi peggiore anche nei tumori T1 di piccole dimensioni (pT1a-b) pNO.
- Il trattamento adiuvante con trastuzumab è raccomandato anche in pazienti con tumore mammario HER2-positivo di dimensioni pari od inferiori ad 1 cm.



Le metodiche di rilevazione

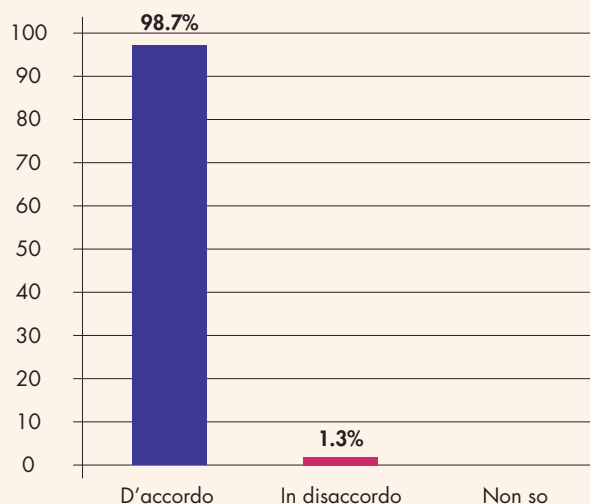
3. QUANDO E SU QUALI CAMPIONI EFFETTUARE IL TEST

La determinazione dello stato di HER2 deve essere effettuata sempre al momento della diagnosi sul tumore primario infiltrante.



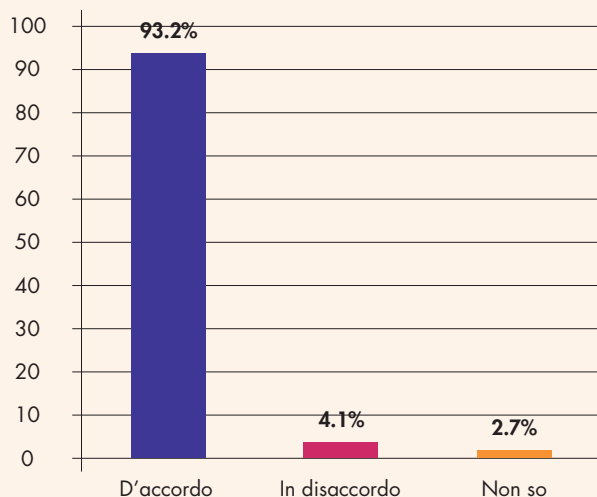
4. QUANDO E SU QUALI CAMPIONI EFFETTUARE IL TEST

In presenza di progressione di malattia la determinazione va effettuata sulla lesione/recidiva metastatica, se disponibile, o sul tumore primario se il test non è valutato secondo gli attuali standard.



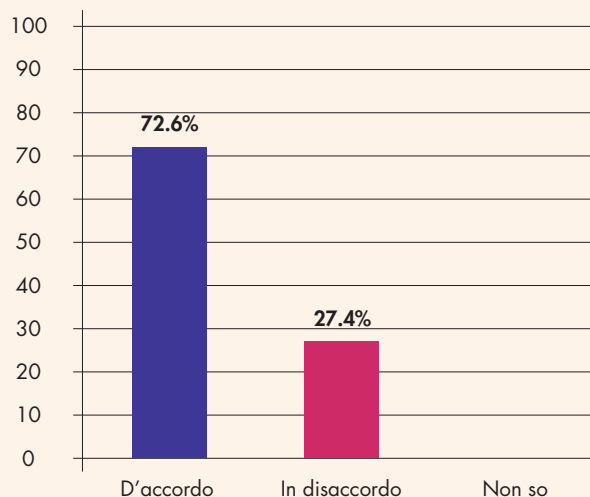
5. QUANDO E SU QUALI CAMPIONI EFFETTUARE IL TEST

Qualora siano disponibili solo preparati citologici non inclusi, si raccomanda l'utilizzo di ibridazione in situ come metodo di determinazione.



6. MODALITÀ E TEMPI DI FISSAZIONE DEI CAMPIONI TESSUTALI

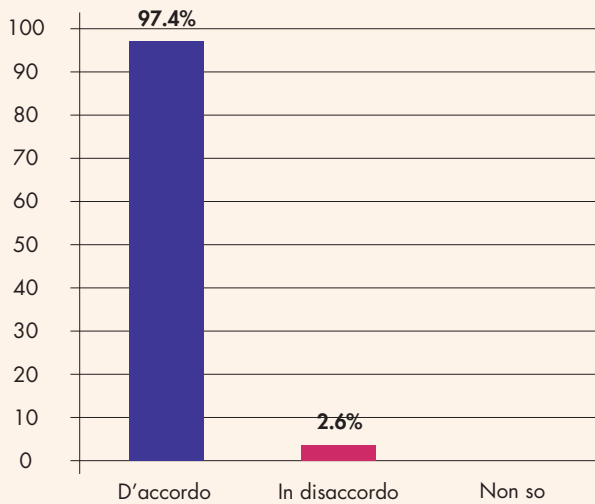
I campioni tissutali da sottoporre a valutazione dello stato di HER2 devono essere fissati in formalina neutra tamponata al 10%.





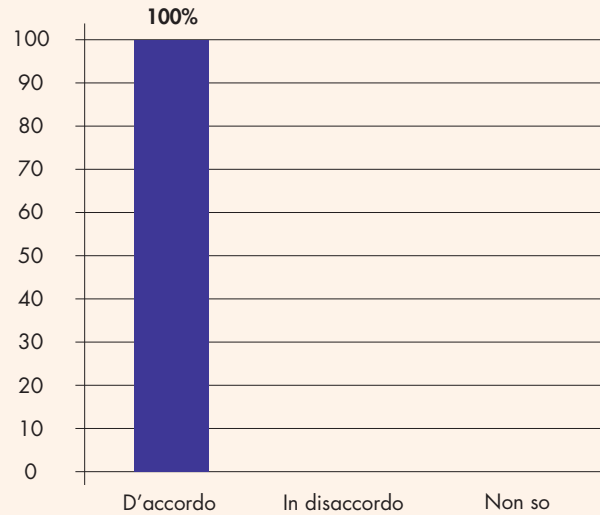
7. MODALITÀ E TEMPI DI FISSAZIONE DEI CAMPIONI TESSUTALI

Il tempo di fissazione ottimale in formalina neutra tamponata è compreso fra le 6 ore e le 72 ore, in relazione alla tipologia del campione.



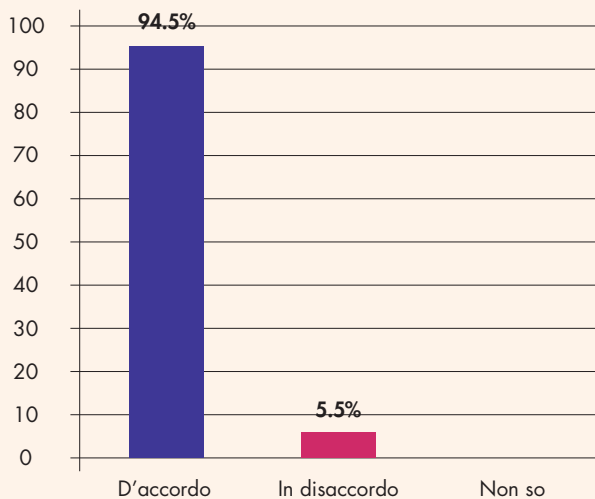
8. SCORING SYSTEM

Si raccomanda di esprimere lo stato di HER2 mediante uno scoring system (linee guida ASCO/CAP) e con la valutazione descrittiva che comprenda la percentuale di cellule positive.



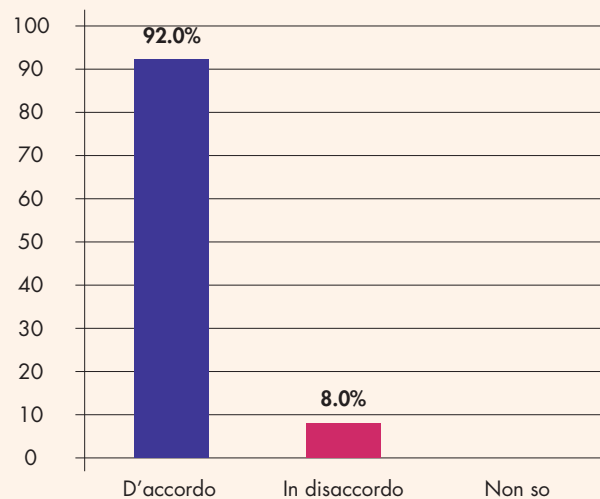
9. CORRELAZIONI DEI TEST IIC VS ISH

È necessario che ciascun laboratorio provveda periodicamente a validare una quota parte della casistica valutata in IIC con ibridazione in situ, ottenendo una concordanza non inferiore al 90% nei casi 3+.



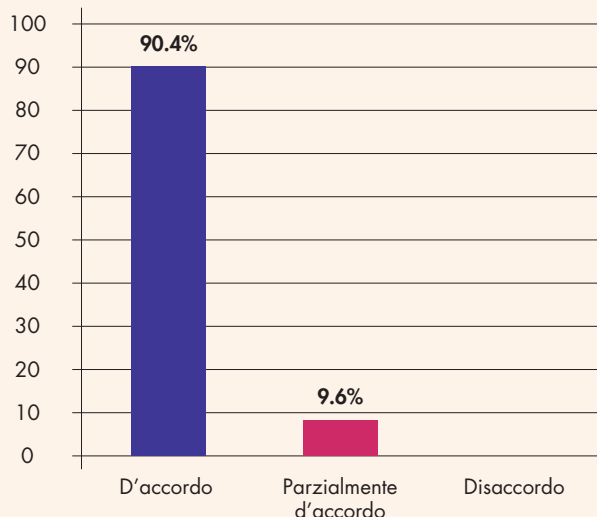
10. ISH: QUANDO UTILIZZARLA

Lo studio dell'amplificazione genica di HER2 nel carcinoma della mammella mediante tecniche di ISH è utilizzato come indagine di secondo livello successivo alla valutazione con immunohistochimica.



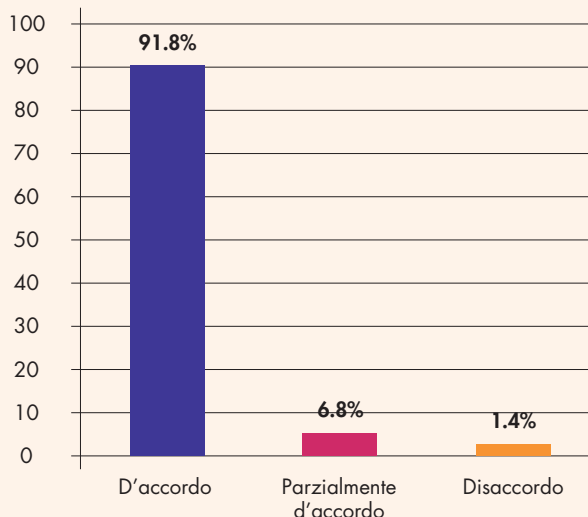
11. ISH: QUANDO UTILIZZARLA

La ISH va eseguita su tutti i casi 2+ (o "equivoci" secondo le linee guida ASCO/CAP) in IIC o negli altri casi su richiesta del medico curante.



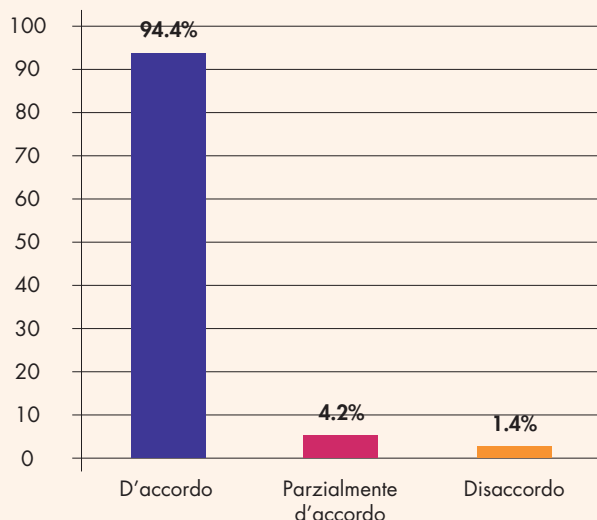
12. ISH: L'INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

- I preparati istologici e citologici vanno esaminati interamente.
- In caso di omogeneità si raccomanda di valutare non meno di 20 cellule/campo in almeno 2 campi della componente invasiva identificata sulla sezione in E/E.
- In caso di eterogeneità è necessario definire la percentuale di cellule amplificate nel campione esaminato.



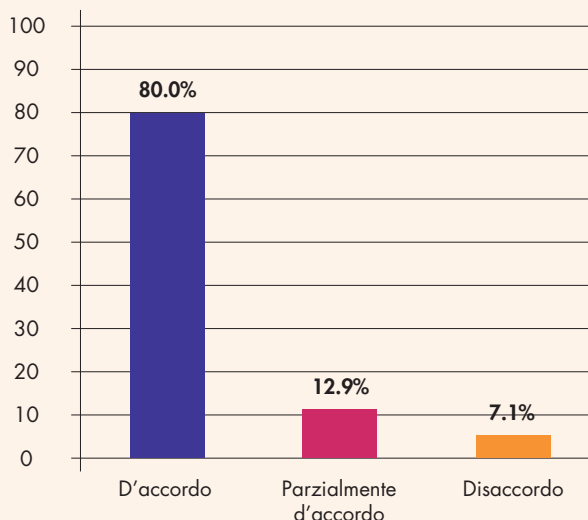
13. ISH: L'ETEROGENEITÀ TUMORALE

- In caso di popolazione neoplastica eterogenea è necessario refertare la percentuale di cellule amplificate.
- Può essere vantaggioso esaminare il preparato allestito con la ISH sulla base della reattività dell'IIC.



14. ISH DUAL COLOR: L'INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

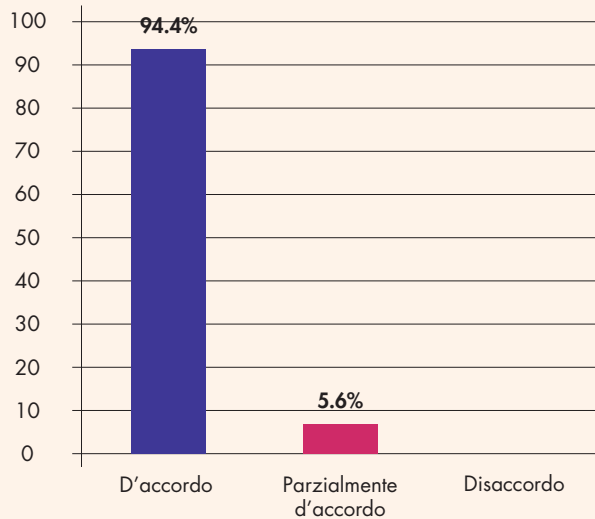
- Lo stato del gene con tecniche dual color si valuta tramite il rapporto tra le copie di geni HER2 e i segnali centromerici del cromosoma 17.
- Un rapporto ≥ 2 dimostra amplificazione del gene.
- Se il rapporto è < 2 si valuta il numero medio di segnali HER2: un numero medio ≥ 6 dimostra amplificazione del gene.





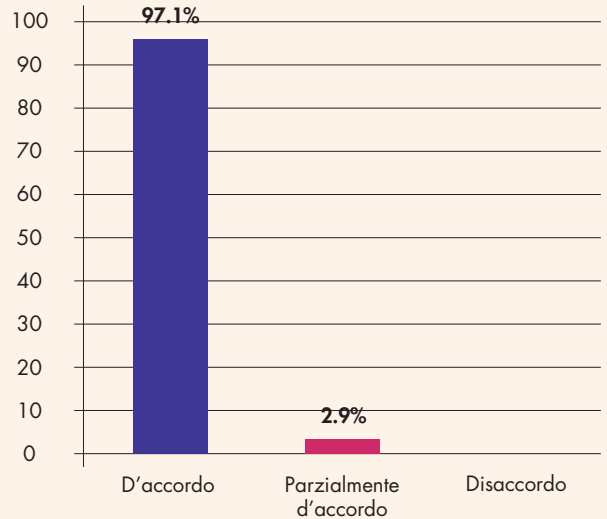
15. ISH SINGLE COLOR: L'INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Si deve valutare il numero medio di segnali HER2: un numero medio ≥ 6 dimostra amplificazione del gene.



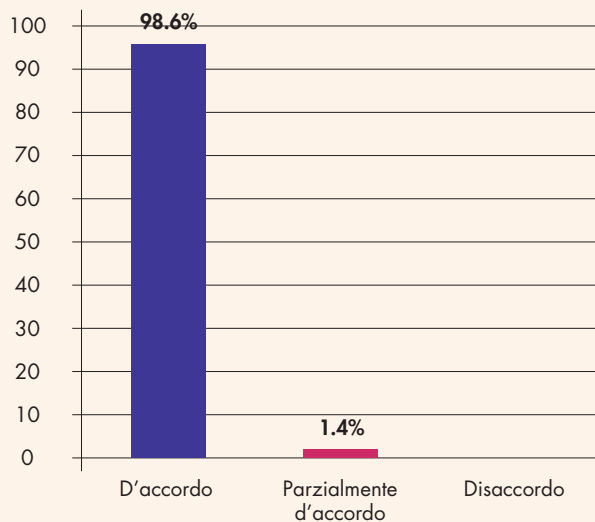
16. ISH: L'INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

- Nei casi con risultato equivoco la conta dovrebbe essere ripetuta dallo stesso o da un secondo osservatore.
- In alternativa la reazione dovrebbe essere effettuata su altre sezioni o, se disponibile, su una diversa inclusione della neoplasia.



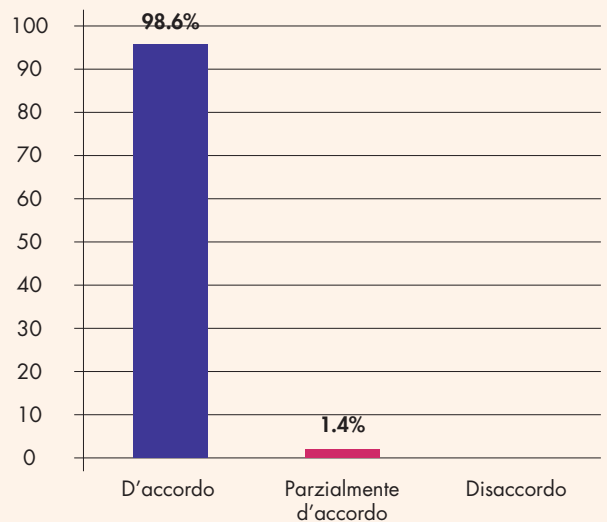
17. ETEROGENITÀ DI HER2

- Non è raro il riscontro di eterogeneità nella iperespressione/amplificazione di HER2 nei tumori mammari.
- Se la frazione di cellule positive infiltranti è pari o inferiore al 10%, la paziente non è candidata al trattamento con trastuzumab (equivoco per ASCO/CAP).
- Prima di escludere la paziente dal possibile beneficio del trattamento è necessario che lo stato di HER2 venga accuratamente rivalutato con ulteriori colorazioni immunohistochimiche e/o con tecniche di ibridazione in situ.



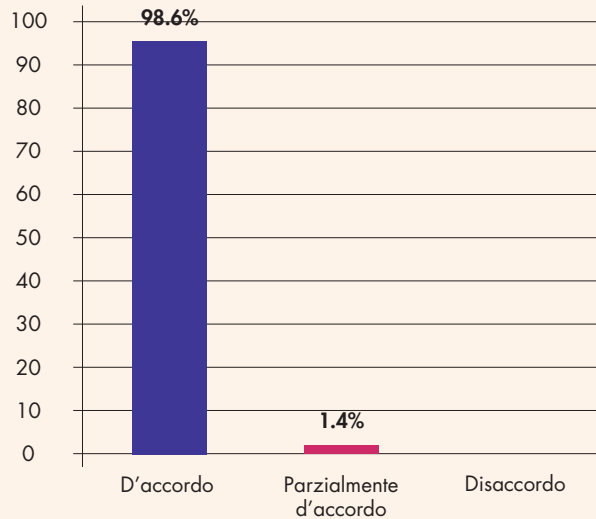
17bis. ETEROGENITÀ DI HER2

Quando si sia evidenziata iperespressione/amplificazione in $\leq 10\%$ cellule in una inclusione è raccomandato di testare ulteriori inclusioni della neoplasia primaria e/o delle eventuali metastasi linfonodali.



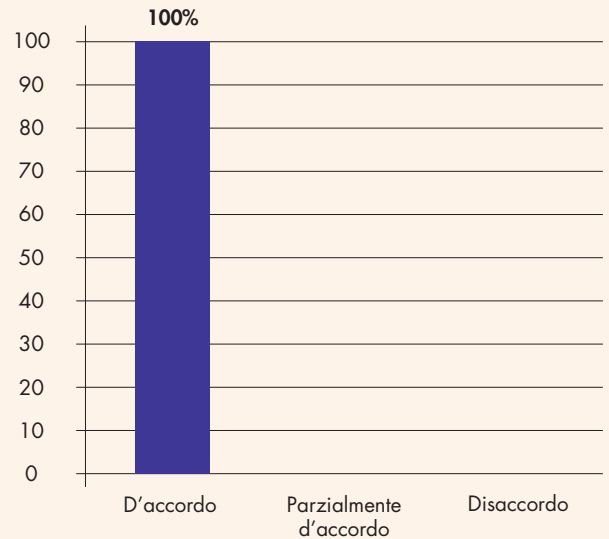
18. CLONI FOCALI AMPLIFICATI: IL REFERTO

È opportuno aggiungere nel referto la percentuale di cellule con iperespressione della proteina o amplificazione del gene (ratio ≥ 2 o numero di copie HER2 ≥ 6 o cluster), anche se inferiore o pari al 10%.



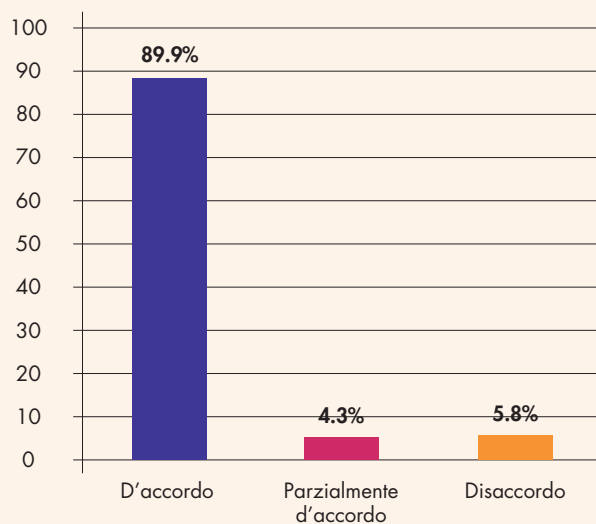
19. NUOVE TECNOLOGIE

Al momento attuale l'uso di metodiche volte alla valutazione dell'espressione di mRNA non è considerato clinicamente validato.



20. QUALITY ASSURANCE

- È necessario che il patologo garantisca la congruità di tutti i dati morfologici, immunostochimici e di ibridazione in situ.
- È necessaria la partecipazione a controlli di qualità esterni.



Bibliografia

- Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, et. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013;31:3997-4014.
<http://www.asco.org/quality-guidelines/recommendations-human-epidermal-growth-factor-receptor-2-testing-breast-cancer> oppure <http://jco.ascopubs.org/content/31/31/3997.full.pdf+html>
- Supplemento Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update
http://www.asco.org/sites/www.asco.org/files/her2_testing_ds_5-23-14_1.pdf
- Amir E, Miller N, Geddie W, et al. Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:587-92.
- Aurilio G, Disalvatore D, Pruneri G, et al. A meta-analysis of oestrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 discordance between primary breast cancer and metastases. *Eur J Cancer* 2014;50:277-89.
- Baehner FL, Yoshizawa C, Shak S. Accurate assessment of human epidermal growth factor receptor 2. *J Clin Oncol* 2012;30:1727-8.
- Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376:687-97.
- Bartlett JM, Starczynski J. Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction and the Oncotype DX test for assessment of human epidermal growth factor receptor 2 status: time to reflect again? *J Clin Oncol* 2011;29:4219-21.
- Baselga J, Cortés J, Kim SB, et al, for the CLEOPATRA Study Group. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2012;366:109-19.
- Bhargava R, Dabbs DJ. Oncotype DX test on unequivocally HER2-positive cases: potential for harm. *J Clin Oncol* 2012;30:570-1.
- Burandt E, Sauter G. HER2 ASCO guidelines. The answer to everything? *Pathologie* 2010;31(suppl 2):285-91.
- Carter P, Presta L, Gorman CM, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4285-9.
- Cross SS, Start RD, Smith JHF. Does delay in fixation affect the number of mitotic figures in processed tissues? *J Clin Pathol* 1990;43:597-9.
- Curigliano G, Bagnardi V, Viale G, et al. Should liver metastases of breast cancer be biopsied to improve treatment choice? *Ann Oncol* 2011;22:2227-33.
- Dabbs DJ, Klein ME, Mohsin SK, et al. High false-negative rate of HER2 quantitative reverse transcription polymerase chain reaction of the Oncotype DX test: an independent quality assurance study. *J Clin Oncol* 2011;29:4279-85.
- Dawood SS, Broglio K, Buzdar AU, et al. Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: an institutional-based review. *J Clin Oncol* 2010;28:92-8.
- Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, et al. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 1987;237:178-82.
- Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem* 1985;33:845-53.
- Gancberg D, Di Leo A, Cardoso F, et al. Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Ann Oncol* 2002;13:1036-43.
- 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 randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet* 2010;375:377-84.
- Gianni L, Dafni U, Gelber RD, et al, Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team. Treatment with trastuzumab for 1 year after adjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive early breast cancer: a 4-year follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2011;12:236-44.
- Goldhirsch A et al. HERA trial: 2 years versus 1 year of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in women with HER2-positive early breast cancer at 8 years of median follow-up. *Proc SABCS* 2012;abstract S5-2.

- Gong Y, Booser DJ, Sneige N. Comparison of HER-2 status determined by fluorescence in situ hybridization in primary and metastatic breast carcinoma. *Cancer* 2005;103:1763-9.
- Gown AM, Goldstein LC, Hwang HC, Tse CH. Concordance between human epidermal growth factor receptor 2 testing by reverse transcriptase polymerase chain reaction and fluorescent in situ hybridization. *J Clin Oncol* 2012;30:1726-7.
- Guarneri V, Frassoldati A, Bruzzi P, et al. Multicentric, randomized phase III trial of two different adjuvant chemotherapy regimens plus three versus twelve months of trastuzumab in patients with HER2- positive breast cancer (Short-HER Trial; NCT00629278). *Clin Breast Cancer* 2008;8:453-6.
- Hammond EH, Wolff AC, Hayes DF, et al. Reply to G. Sauter et al. *J Clin Oncol* 2009;27:e153-4; author reply e155-7.
- Hammond ME, Hayes DF, Wolff AC. Clinical notice for American Society of Clinical Oncology-College of American Pathologists guideline recommendations on ER/PgR and HER2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:e458.
- Hanna WM, Ruschoff J, Bilous M, et al. HER2 in situ hybridization in breast cancer: Clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. *Mod Pathol* 2014;27:4-18.
- Hortobagyi GN. Trastuzumab in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1734-6.
- Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, et al. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 1989;9:1165-72.
- Ibarra JA, Rogers LW. Fixation time does not affect expression of HER2/neu: a pilot study. *Am J Clin Pathol* 2010;134:594-6.
- Ishii S, Xu YH, Stratton RH, et al. Characterization and sequence of the promoter region of the human epidermal growth factor receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4920-4.
- Ismael G, Hegg R, Muehlbauer S, et al. Subcutaneous versus intravenous administration of (neo)adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive, clinical stage III breast cancer (HannaH study): a phase 3, open-label, multicentre, randomised trial. *Lancet Oncol* 2012;13:869-78.
- Iz YA, Dabbs DJ, Cooper KL. The effect of 96-hour formalin fixation on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2012;137:691-8.
- Junttila TT, Akita RW, Parsons K, et al. Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell* 2009;15:353-55.
- Khoury T, Sait S, Hwang H, et al. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. *Mod Pathol* 2009;22:1457-67.
- Linee guida AIOM. Neoplasie della mammella. Luglio 2013.
<http://www.aiom.it/area+pubblica/area+medica/prodotti+scientifici/linee+guida/1%2C333%2C1%2C>
- Lombardo JF. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guidelines should be scientifically validated. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:1510-1.
- Marchiò C, Lambros MB, Gugliotta P, et al. Does chromosome 17 centromere copy number predict polysomy in breast cancer? A fluorescence in situ hybridization and microarray-based CGH analysis. *J Pathol* 2009;219:16-24.
- Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol* 2005;23:4265-74.
- Medawar PB. The rate of penetration of fixatives. *J R Microsc Soc* 1942;61:46-57.
- Mittendorf EA, Wu Y, Scaltriti M, et al. Loss of HER2 amplification following trastuzumab-based neoadjuvant systemic therapy and survival outcomes. *Clin Cancer Res* 2009;15:7381-8.
- Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, et al. HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1991-8.
- Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, et al. Sequential versus concurrent trastuzumab in adjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:4491-7.
- Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, et al. Cardiac safety analysis of doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel with or without trastuzumab in the North Central Cancer Treatment Group N9831 Adjuvant Breast Cancer Trial. *J Clin Oncol* 2008;26:1231-8.
- Perez EA, Romond EH, Suman VJ, et al. Four-year follow-up of trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. Joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31. *J Clin Oncol* 2011;29:3366-73.
- Perez EA, Amylou C, Dueck AE, et al. Predictability of adjuvant trastuzumab benefit in N9831 patients using the ASCO/CAP HER2-positivity criteria. *J Natl Cancer Inst* 2012;104:159-62.
- Pestalozzi BC, Holmes H, de Azambuja E, et al. CNS relapses in patients with HER2-positive early breast cancer



who have and have not received adjuvant trastuzumab: a retrospective substudy of the HERA trial (BIG 1-01). *Lancet Oncol* 2013;14:244-8.

- Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1659-72.
- Pivot X, Romieu G, Bonnefoi H, et al. PHARE Trial results comparing 6 to 12 months of trastuzumab in adjuvant early breast cancer. *ESMO 2012*, abstract LBA5_PR.
- Pivot X, Romieu G, Debled M, et al, for PHARE trial investigators. 6 months versus 12 months of adjuvant trastuzumab for patients with HER2-positive early breast cancer (PHARE): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013;14:741-8.
- Procter M, Suter TM, de Azambuja E, et al. Longer-term assessment of trastuzumab-related cardiac adverse events in the Herceptin Adjuvant (HERA) Trial. *J Clin Oncol* 2010;28:3422-8.
- Rastogi P, Jeong J, Geyer CE, et al. Five year update of cardiac dysfunction on NSABP B-31, a randomized trial of sequential doxorubicin/ cyclophosphamide (AC)→paclitaxel (T) vs. AC→T with trastuzumab(H). *ASCO 2007*, abstract LBA513.
- Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1673-84.
- Rossi S, Crocetti E, Capocaccia R, Gatta G. AIRTUM Working Group: Estimates of cancer burden in Italy. *Tumori* 2013;99:416-24.
- Sainsbury JR, Farndon JR, Sherbet GV, et al. Epidermal-growth-factor receptors and oestrogen receptors in human breast cancer. *Lancet* 1985;1:364-6.
- Simon R, Nocito A, Hübscher T, et al. Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1141-6.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-92.
- Slamon D, et al. Phase III trial comparing AC-T with AC-TH and with TCH in the adjuvant treatment of HER2 positive early breast cancer patients: first interim efficacy analysis, BCIRG 006, SABCS 2005.
- Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2011;365:1273-83.
- Start RD, Flynn MS, Cross SS, et al. Is the grading of breast carcinomas affected by a delay in fixation? *Virchows Archiv A* 1991;419:475-7.
- Suter TM, Procter M, van Veldhuisen DJ, et al. Trastuzumab-associated cardiac adverse effects in the herceptin adjuvant trial. *J Clin Oncol* 2007;25:3859-65.
- Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 1984;309:418-25.
- Verma S, Miles D, Gianni L, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2012;367:1783-91.
- von Minckwitz G, Balsega J, Bradbury I, et al. Adjuvant pertuzumab and Herceptin in initial therapy of breast cancer: APHINITY. *Cancer Res* 2011;71(suppl 24):602S.
- Wynne C, Harvey V, Schwabe C, et al. Comparison of subcutaneous and intravenous administration of trastuzumab: a phase I/Ib trial in healthy male volunteers and patients with HER2-positive breast cancer. *J Clin Pharmacol* 2012;53:192-201.
- Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:118-45.
- Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:18-43.
- Wolff AC, Hammond ME, Hayes DF. Predictability of adjuvant trastuzumab benefit in N9831 patients using the ASCO/CAP HER2-positivity criteria. *J Natl Cancer Inst* 2012;104:957-8.
- Yildiz-Aktas IZ, Dabbs DJ, Bhargava R. The effect of cold ischemic time on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast carcinoma. *Modern Pathology* 2012;25:1098-105.
- Zidan J, Dashkovsky I, Stayerman C, et al: Comparison of HER-2 overexpression in primary breast cancer and metastatic sites and its effect on biological targeting therapy of metastatic disease. *Br J Cancer*. 2005 Sep 5;93:552-6.



BICE

BEST POSSIBLE CARE IN BREAST CANCER

LE NUOVE LINEE GUIDA

ASCO CAP



Con il contributo educativo di



Provider ECM
e Segreteria Scientifico-Organizzativa



Via A. Fava, 25 - 20125 Milano
Tel. 02.67972208 - Fax 02.67972300
e-mail: sosc@prex.it - website: www.prex.it