

REFERTO ANATOMOPATOLOGICO DEI TUMORI DELLA MAMMELLA

Gruppo interdisciplinare di lavoro

Letterio Runza (Milano) e Roberto Giardini (Milano) – coordinatori

Giovanni Angiolucci (Arezzo), Rita Ceccherini (Trieste), Ildebrando D'Angelo (Cefalù), Alessandro D'Amuri (Tricase), Riccardo Ferrarini (Bologna), Luciano Galletto (Savigliano), Gianluca Gatta (Napoli), Alessandro Germano (Mantova), Giuseppe La Torre (Rionero in Vulture), Carmine Luciano (Campobasso), Pasquale Maddaluno (Napoli), Sarah Montechiarello (Pomezia), Filippo Narese (Caltanissetta), Claudio Pagliari (Desenzano del Garda), Ileana Parascandolo (Napoli), Francesca Pellini (Verona), Sabato Perrotta (Frattamaggiore), Quirino Piubello (Verona), Pier Carlo Rassa (Novi Ligure), Alberto Gaetano Riboldi (Brescia), Fabio Ricci (Latina), Paolo Antonino Riccio (Imola), Gianfranco Scaperrotta (Milano), Raffaele Spena (Napoli), Daniele Ugo Tari (Caserta), Roberto Travaglini (Milano), Umberto Torchia (Crotone).

I PARAMETRI FONDAMENTALI NEL REFERTO

- Grading (sec. Elston-Ellis) per i tumori invasivi
- Grading nucleare per i carcinomi duttali in situ (DCIS)
- Presenza/assenza d'invasione linfovaskolare
- Dimensione del tumore
- Istotipo
- Margini di resezione
- Numero di linfonodi metastatici rispetto al numero totale di linfonodi esaminati
- Tipo di metastasi nei linfonodi sentinella e/o ascellari (ITC, micro metastasi, macrometastasi).
- Stadiazione istopatologica sec. TNM aggiornato (2018).
- Parametri biologici (Estrogeni, Progesterone, Ki67, HER2) per tutti i tumori infiltranti sec. CAP 2019
- Parametri biologici (Estrogeni e Progesterone) per i tumori in situ (sec. CAP 2019).
- Se ha fatto terapia neoadiuvante (eseguire stadiazione sec. Pinder)

Grado istologico.

Il grado istologico (anche detto *grading*), definisce quanto una lesione sia ben differenziata (G1), moderatamente (G2) e scarsamente differenziata (G3) e costituisce pertanto un parametro fondamentale da valutare in ogni carcinoma mammario di nuova diagnosi. Il grado istologico è un importante fattore prognostico indipendente e ha anche un valore predittivo poiché correla con la risposta alle terapie mediche.

Il sistema di *grading* istologico è stato proposto da Elston ed Ellis e si basa sulla valutazione di tre parametri:

- percentuale di formazione di strutture tubulari;
- numero di mitosi;
- pleomorfismo nucleare.

Ad ognuno di questi parametri viene assegnato un punteggio che varia da 1 a 3; la somma dei tre punteggi determina uno score globale, in base al quale si definisce il grado istologico:

- grado 1 (G1), carcinoma ben differenziato (score da 3 a 5);
- grado 2 (G2) carcinoma moderatamente differenziato (score 6 o 7);
- grado 3 (G3) carcinoma scarsamente differenziato (score 8 o 9).

Tra tutte le caratteristiche morfologiche del carcinoma mammario, quella che meglio riflette la complessità delle alterazioni geniche nei carcinomi mammari è il grado istologico. I tumori ben differenziati (G1) sono, ad esempio, caratterizzati da un'elevata espressione di geni correlati all'espressione di ER, nonché da un basso indice proliferativo.

Studi di Comparative Genomic Hybridization (CGH) e array-CGH hanno dimostrato che il sottogruppo dei tumori ben differenziati mostra alterazioni geniche ricorrenti (come *loss* di 16q e *gain* di 1q e 16p), che possono essere indice di una traslocazione non bilanciata che coinvolge i cromosomi 1 e 16.

Viceversa, carcinomi scarsamente differenziati (G3) mostrano livelli di espressione di ER, e vie di attivazione ad esso correlato, molto più variabili, nonché un indice di proliferazione in genere elevato e cariotipi molto più complessi.

Ad esempio, la delezione di 16q associata a *gain* di 1q e 16p, tipica dei tumori ben differenziati, e un'alterazione genica presente solo nel 50% circa dei tumori mammari scarsamente differenziati e solo se ER-positivi: questo sembra suggerire che la progressione dei tumori da G1 a G3 sia un fenomeno che si verifica nei tumori positivi per ER, mentre i tumori G1 ed ER-positivi non sembrano essere biologicamente correlati alle neoplasie G3 ed ER-negative.

Stadiazione istopatologica.

Il sistema di stadiazione (TNM) dei carcinomi della mammella tiene conto principalmente di due parametri:

- il diametro della neoplasia;
- lo stato linfonodale.

Il valore prognostico del diametro tumorale è ben consolidato nei carcinomi mammari ER-positivi ed HER2-negativi: all'aumentare delle dimensioni aumenta lo stadio. Il parametro "T" peggiora la prognosi, indipendentemente dal valore del Ki67 e dalle caratteristiche geniche, che si basano in larga parte su geni correlati alla proliferazione. Allo stesso modo, più linfonodi sono coinvolti (parametro "N"), ed in sedi multiple, maggiore sarà lo stadio nonché peggiore la prognosi.

Effettuare una corretta stadiazione può essere difficile nei pezzi operatori (mammella e linfonodi) asportati dopo chemioterapia neoadiuvante: in questo caso, infatti, tumori che hanno risposto bene alle terapie mediche possono non essere più identificabili a livello macroscopico, e diventa pertanto necessario un esteso campionamento del pezzo operatorio da parte dell'anatomo-patologo, alla ricerca degli elementi cellulari neoplastici residui, dopo un'adeguata marcatura del radiologo del pezzo operatorio onde potere avere una correlazione clinico-patologica.

Bisogna sottolineare che il TNM non è un sistema di stadiazione statico ma bensì dinamico in quanto viene aggiornato periodicamente, sulla base delle più recenti evidenze scientifiche, al fine di migliorare la valutazione della prognosi delle pazienti e offrire, di conseguenza, terapie sempre più mirate.

Esistono due versioni principali del TNM:

1. quella americana (il cosiddetto “TNM sec. AJCC”, American Joint Committee on Cancer);
2. quella europea (il “TNM sec. UICC”, Union for International Cancer Control).

Entrambe le versioni sono state aggiornate nel 2018.

Le principali modifiche della nuova versione di stadiazione AJCC si possono così riassumere:

- il carcinoma lobulare *in situ* (LICIS) di tipo classico è stato rimosso dalla categoria patologica T in quanto viene considerato un precursore non obbligato delle neoplasie mammarie, quindi solamente il carcinoma duttale *in situ* (DCIS) ed il carcinoma lobulare *in situ* pleomorfo (LCIS pleomorfo) viene stadionato come pTis;
- si approssimano a 2 mm i tumori con diametro superiore a 1 mm e inferiore a 2 mm;
- è stato introdotto il concetto di “nodi tumorali satelliti”, cioè quei piccoli depositi tumorali che si localizzano in prossimità della lesione principale, che non siano stati descritti radiologicamente in fase pre-operatoria e non siano stati evidenziati macroscopicamente dall’anatomo-patologo nel pezzo operatorio, e che vengono identificati solo al microscopio: il nuovo TNM indica che i nodi satelliti non devono essere inclusi dal patologo nella misurazione del diametro massimo della neoplasia, e non modificano quindi la stadiazione patologica;
- per i carcinomi multifocali si raccomanda di effettuare correlazioni radiologiche grazie alle quali si può essere guidati nell’identificazione di due tumori come distinti; non si esclude che un tumore multifocale sia riscontrato esclusivamente a livello anatomo-patologico microscopico, senza un’evidenza radiologica;
- per la valutazione anatomo-patologica di tumori sottoposti a terapia neoadiuvante si ribadisce come la valutazione della dimensione tumorale (ypT) vada effettuata esclusivamente misurando il *focus* maggiore di neoplasia residua (se presente) e non il letto tumorale riscontrabile dalla cicatrice di fibrosi che spesso permane; stesso approccio per la valutazione dei linfonodi (ypN);

Per linfonodi metastatici (definizione del pN patologico) si deve misurare il maggiore aggregato di cellule tumorali tra loro contigue senza sommare cluster tumorali separati. Tipi di metastasi sono: ITC (isolate cellule tumorali maligne), micrometastasi (<2 mm) e macrometastasi >2 mm con e senza estensione extracapsulare.

Valutazione dei fattori prognostici/predittivi.

L’immunoistochimica è un importante strumento diagnostico fondamentale per definire la prognosi e la terapia. I principali fattori prognostico/terapeutici nei carcinoma invasivi sono: ER e PgR, Ki67 ed Her2.

Per quanto riguarda ER e PgR bisogna valutare la percentuale di cellule positive e talora anche l’intensità. È stato dimostrato che la percentuale di cellule positive sia correlata al probabile grado di risposta al trattamento. Le linee-guida ASCO/CAP hanno fissato un cut-off pari a 1% per definire la positività di ER e PgR.

Nonostante queste linee-guida, rimane motivo di dibattito come debbano essere classificati i carcinomi della mammella che mostrino una percentuale di cellule positive pari a 1-9%.

L'utilizzo di anticorpi anti-HER2 identifica una frazione di carcinomi della mammella, che è stimata essere circa il 10-15% che "overesprimono" questa proteina e che pertanto possono essere bersagliati (terapia target) con farmaci specifici (anticorpi monoclonali, quali trastuzumab/ pertuzumab, o inibitori delle tirosinchinasi come il lapatinib, o nuovi composti che associano un anticorpo monoclonale ad agenti chemioterapici, ad esempio TDM1).

L'overespressione è definita basandosi sull'intensità e la completezza della colorazione della membrana cellulare nonché sulla percentuale di cellule positive. Il sistema di punteggio ha uno score (da 0 a 3+):

- negativi (score 0 e 1+)
 - a) assenza oppure <10% delle cellule di colorazione della membrana delle cellule di carcinoma invasivo
 - b) colorazione della membrana delle cellule di carcinoma invasivo, lieve o appena percettibile in >10% delle cellule neoplastiche del carcinoma invasivo;
- positivi (score 3+) percentuale di positività > del 10%, con positività intensa e completa della membrana
- equivoci /borderline (score 2+), e percentuale di positività > del 10%, con intensità lieve/moderata e completa della membrana. Nel caso di un risultato equivoco all'ICC si deve procedere a conferma tramite test di ibridizzazione *in situ* (FISH/CISH/SISH).

L'ultimo marcatore prognostico/ predittivo che viene valutato routinariamente è il Ki67, un antigene espresso dalle cellule in ciascuna delle fasi del ciclo cellulare ad eccezione di G0. Il Ki67 è un marcatore di proliferazione ed è stato dimostrato avere una valenza prognostica e predittiva di risposta patologica completa dopo chemioterapia neoadiuvante, in particolare nell'ambito dei carcinomi ER-positivi. Esistono delle raccomandazioni di riferimento, anche se va sottolineato che tra tutti i marcatori il Ki67 è quello che si è dimostrato meno riproducibile con una scarsa concordanza tra i laboratori, soprattutto quando l'indice di proliferazione Ki67 presenta eterogeneità intratumorale, si possono porre delle difficoltà interpretative.

Va sottolineato come un allestimento appropriato della IIC dovrebbe tener conto anche della cosiddetta "fase pre-analitica", poiché l'analisi dei biomarcatori stabilisce se un paziente possa beneficiare o meno di un trattamento potenzialmente salva-vita, non sorprende che le linee-guida ASCO/CAP sottolineino, per entrambi i recettori ormonali e per la valutazione di HER2, l'importanza delle condizioni pre-analitiche al fine di garantire risultati affidabili per la migliore pianificazione del trattamento.

Una grande fonte di variabilità è rappresentata dalla fissazione, in termini di tipo di fissativo, di tempo alla fissazione (*tempo di ischemia a freddo*) e di durata dell'intero processo di fissazione dall'inizio alla fine. Le linee-guida raccomandano di assicurarsi che il tempo alla fissazione e il tempo in fissativo siano registrati e presi in considerazione nella definizione del risultato del test: il tempo che intercorre tra la rimozione del campione dal paziente e la sua riduzione deve essere il più breve possibile (idealmente il tempo d'ischemia fredda circa 30 minuti) ed il tempo in fissativo dovrebbe essere compreso tra le 6 e le 72 ore. Bisogna precisare che talora bisogna evitare assolutamente una sottofissazione perché è più dannosa rispetto alla sovralfissazione.

Ibridizzazione in situ

Nell'ambito della patologia mammaria sono stati introdotti tre diversi metodi di ibridizzazione *in situ* (ISH):

- fluorescente (FISH);
- cromogenica (CISH);
- argentica (silver, SISH).

Nel corso degli ultimi anni la valutazione dell'amplificazione del gene *HER2* attraverso test ISH ha subito diversi cambiamenti. L'aggiornamento delle linee-guida ASCO/CAP 2013 ha modificato il sistema di valutazione, introducendo il cosiddetto "algoritmo ISH", che prima calcola la ratio *HER2/CEP17* seguita poi dall'analisi del numero di copie di *HER2*. Ciò ha consentito di non sottostimare l'amplificazione del gene *HER2* in quel sottogruppo di tumori che presentano un alto numero di copie di *HER2* associato al *gain* o all'amplificazione del CEP17. Recentemente è stato pubblicato un aggiornamento delle linee-guida ASCO/CAP per la valutazione di *HER2*, a cui si rimanda per i dettagli. In breve, le nuove linee-guida hanno apportato alcune modifiche all'algoritmo ISH: è stata infatti rivista la definizione di score 2+ in ICC e, per alcune categorie di carcinomi della mammella (casi con ratio *HER2/CEP17* ≥ 2 ma con media di segnali di *HER2* < 4 ; casi con media di segnali di *HER2* ≥ 6 ma con ratio *HER2/CEP17* < 2 ; casi con media di segnali di *HER2* ≥ 4 ma < 6 e con ratio *HER2/CEP17* < 2), è stato stabilito che una diagnosi definitiva possa essere formulata solo a seguito di un *work-up* aggiuntivo, che integra i pattern di IHC e ISH. Sono stati predisposti anche commenti specifici per alcuni risultati, come ad esempio il risultato equivoco in IHC e contemporaneamente in ISH (carcinomi *HER2* doppi-equivoci), e per i casi che presentano assenza di overespressione della proteina *HER2* e ratio *HER2/CEP17* ≥ 2 con numero di copie di *HER2* < 4 . Sconsigliato l'utilizzo di sonde alternative al CEP17 in ogni ambito di dubbio ISH.

Profili di espressione genica

Le tecnologie basate su sistemi di microarray hanno contribuito allo sviluppo di profili di espressione genica a valore prognostico e, a oggi, sono disponibili diversi test molecolari commerciali. Infatti, Oncotype DX, MammaPrint, Breast Cancer Index (BCI), PAM50 ROR/Prosigna ed EndoPredict sono stati implementati in ambito clinico, quantomeno nel sottogruppo delle lesioni ER-positive in cui forniscono un dato prognostico indipendente.

Il valore prognostico offerto da questi profili di espressione genica, basati sulla proliferazione, e complementare a quello dei classici parametri clinico-patologici. Questi test supportano quindi i clinici nella scelta dei pazienti ai quali può essere evitato il trattamento chemioterapico. Va notato, tuttavia, che il livello di concordanza ottenuto con i diversi test commerciali nella valutazione del singolo paziente è subottimale.

Il trial britannico OPTIMA-Prelimha ha mostrato che, sebbene vi sia un discreto accordo tra i test, quando si dicotomizzano i risultati tra rischio elevato e rischio basso/intermedio, non è raro il disaccordo tra i diversi test nell'assegnazione di singoli tumori alle categorie di rischio: fino al 52% dei tumori sono stati infatti assegnati a categorie di rischio diverse utilizzando test diversi.

BIBLIOGRAFIA

S.J.Schnitt, L.C.Collins “ Biopsy Interpretation of the Breast” 2018

WHO Classification of tumours of the breast, 2012

S.A.Hoda, E.Brogi, F.C. Koerner, P.P.Rosen “Rosen’s Breast Pathlogy” 2014