

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

---

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA TERRA,  
DELL'AMBIENTE E DELLA VITA (DISTAV)

Classe delle Lauree Magistrali in Biologia LM/6

Corso di Laurea Magistrale in  
Biologia Applicata e Sperimentale  
Curriculum Biosanitario



Caratterizzazione dei carcinomi mammari HER2-*low* e valutazione  
dell'emopoiesi clonale nella tossicità all'immunoterapia

Candidata: Virna Maltoni

Relatore interno: Prof.ssa Gabriella Pietra

Relatore esterno: Dott.ssa Barbara Cardinali

Relatore esterno: Prof. Marco Tagliamento

Correlatore: Prof.ssa Sonia Scarfi

ANNO ACCADEMICO 2024-2025

# RIASSUNTO

## Introduzione – Scopo della Tesi

Questo progetto di tesi è focalizzato sulla caratterizzazione molecolare del carcinoma mammario.

La parte principale del lavoro è stata svolta nell'ambito del progetto NextGIM, studio multicentrico nazionale coordinato dal Policlinico San Martino, volto alla profilazione genomica, immunologica e prognostico-predittiva dei carcinomi mammari ormono-positivi (ER+) e HER2-negativi, dovuti all'assenza di amplificazione del gene HER2 o con bassi livelli di HER2 (**HER2-low**, *score* immunoistochimico 1+ o 2+ senza amplificazione). È stata considerata anche la sotto-categoria *HER2-ultralow*, che definisce tumori con IHC HER2-0 e <10% di cellule positive. Sebbene tutti questi tumori siano tradizionalmente classificati come HER2-negativi, evidenze crescenti suggeriscono che diversi livelli di HER2 possano riflettere stati biologici distinti, con potenziali implicazioni terapeutiche.

Durante il tirocinio di tesi è stato possibile collaborare ad uno studio pilota, a sé stante, ancora in corso, volto a indagare la correlazione tra **emopoiesi clonale** — mutazioni somatiche nelle cellule staminali emopoietiche — e trattamenti sistemici, con particolare attenzione all'immunoterapia e alla possibile tossicità correlata.

## Materiali e Metodi

Per la caratterizzazione dei tumori *HER2-low* sono state incluse pazienti arruolate in tre studi clinici randomizzati (GIM2, GIM4 e GIM10) del Gruppo Italiano Mammella. I campioni FFPE sono stati sottoposti a rivalutazione dell'espressione di HER2 e dei linfociti infiltranti il tumore (TILs) secondo le linee guida ASCO/CAP e del TILs *Working Group*. Parallelamente, è stata condotta la profilazione genica mediante pannello *nCounter® Breast Cancer 360* su piattaforma NanoString. I dati clinici e di sopravvivenza sono stati integrati con i dati molecolari per identificare potenziali *marker* prognostici e meccanismi di resistenza.

L'emopoiesi clonale è stata analizzata tramite NGS su DNA estratto da sangue periferico utilizzando il pannello *oncoReveal™ Myeloid*, che indaga 58 geni rilevanti nei tumori mieloidi e potenzialmente implicati nella tossicità immuno-correlata.

La parte sperimentale è stata svolta presso il Laboratorio della UOC Clinica di Oncologia Medica, presso il Policlinico San Martino.

## Risultati

Lo studio NextGIM ha arruolato 320 pazienti in 5 centri italiani; 286 campioni sono stati profilati su piattaforma NanoString e 289 valutati per HER2, mentre 284 per TILs.

I dati hanno evidenziato che l'espressione di HER2 nello spettro HER2-negativo non identifica sottogruppi chiaramente distinti biologicamente o clinicamente.

Dal punto di vista molecolare, è stato possibile determinare che i tumori HER2-*low* mostrano maggiore instabilità genomica e alterazioni nei meccanismi di riparazione del DNA rispetto ai tumori HER2 0-null, con incremento della firma HRD (*Hologous Recombination Deficiency*) e arricchimento di *pathway* associati a ipossia e rischio genomico, più marcati nei tumori HER2 2+. I tumori HER2 1+ e 2+ presentano maggiore espressione di geni correlati alle *signatures* di p53, BRCAness, HRD, RB1, CDK4, proliferazione cellulare e Treg, mentre i tumori HER2 2+ risultano arricchiti anche per B7-H3, ipossia e rischio genomico.

L'analisi di espressione genica ha permesso di identificare i sottotipi intrinseci sulla base della *signature* PAM50, evidenziando prevalenza dei sottotipi luminali A e B.

Per quanto riguarda i TILs, i tumori sono stati suddivisi in tre categorie (0–10%, 11–59%, 60–100%). Tumori con  $\geq 11\%$  TILs presentano un programma trascrittomico di infiammazione, con elevata espressione di geni per la presentazione degli antigeni, *checkpoint* immunitari e firme HRD. Tumori con 0–10% TILs mostrano espressione predominante di geni luminali e ormono-correlati, ERBB2 e firme stromali, coerente con un microambiente *immune-cold*.

Dal punto di vista clinico, non sono emerse differenze significative in *Overall Survival* (OS) o *invasive Disease-Free Survival* (iDFS) tra le categorie HER2; l'espressione di PTEN è risultata l'unica associata in modo indipendente alla sopravvivenza globale.

A livello metodologico, è stata osservata maggiore prevalenza di tumori HER2 0-null nei campioni precedenti al 2011, suggerendo che la conservazione a lungo termine dei tessuti FFPE e la conseguente perdita di antigenicità possano portare a sottostimare l'espressione di HER2, con implicazioni per l'accesso a terapie target.

Lo studio pilota sull'emopoiesi clonale, ancora in corso, ha arruolato 24 pazienti; risultati preliminari in 12 pazienti indicano la presenza di mutazioni pre- e post-terapia, suggerendo un ruolo potenziale nella risposta a trattamenti sistemici, in particolare immunoterapici.

## Conclusioni

Il progetto NextGIM, grazie a un *dataset* traslazionale multicentrico, ha fornito nuove evidenze sull'eterogeneità dei tumori mammari ER+/HER2-negativi. Questi dati offrono una

solida base per comprendere la biologia di questi tumori, ed eventualmente supportare la personalizzazione dei trattamenti e sviluppare nuove strategie terapeutiche.

Lo studio pilota sull'emopoiesi clonale, seppur preliminare, appare promettente per approfondire il ruolo delle mutazioni somatiche nella risposta a immunoterapia e nella tossicità correlata.

# ABSTRACT

## Introduction – Aim of the Thesis

This thesis project focuses on the molecular characterization of breast cancer.

The main work was conducted within the NextGIM project, a national multicenter study coordinated by Policlinico San Martino, aimed at genomic, immunological, and prognostic-predictive profiling of hormone receptor-positive (HR+) and HER2-negative breast cancers, due to the absence of HER2 gene amplification, or with low HER2 expression (**HER2-low**, immunohistochemistry score 1+ or 2+ without amplification). The additional HER2-ultralow subclass, defined for tumors with HER2 IHC-0 and <10% positive cells, was also considered. Although these tumors are traditionally classified as HER2-negative, growing evidence suggests that different levels of HER2 expression may reflect distinct biological states with potential therapeutic implications.

During the Thesis training period it has been also possible to collaborate in an ongoing separate pilot study aimed at investigating the correlation between **clonal hematopoiesis**—somatic mutations in hematopoietic stem cells—and systemic treatments, with a particular focus on immunotherapy and potential related toxicity.

## Materials and Methods

For the characterization of HER2-low tumors, patients enrolled in three randomized clinical trials (GIM2, GIM4, and GIM10) of the Gruppo Italiano Mammella were included. FFPE tumor samples were reassessed for HER2 expression and tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) according to ASCO/CAP and TILs Working Group guidelines. Gene expression profiling was performed using the nCounter® Breast Cancer 360 Panel on the NanoString platform. Clinical and survival data were integrated with molecular data to identify potential prognostic markers and mechanisms of treatment resistance.

Clonal hematopoiesis was analyzed using the oncoReveal™ Myeloid panel, covering 58 genes relevant in myeloid malignancies and potentially involved in immunotherapy-related toxicity in breast cancer.

The experimental activity was conducted in the Laboratory of Clinica di Oncologia Medica, at Policlinico San Martino.

## Results

The NextGIM study enrolled 320 patients across five Italian centers. Of these, 286 samples were profiled using the NanoString platform and 289 evaluated for HER2, while 284 were assessed for TILs. The results showed that HER2 expression within the HER2-negative range does not identify clear biologically or clinically distinct subgroups.

At the molecular level, it has been possible to assess that HER2-low tumors exhibited greater genomic instability and alterations in DNA repair mechanisms compared with HER2 0-null tumors, with increased HRD signature and enrichment of pathways associated with hypoxia and genomic risk, particularly pronounced in HER2 2+ tumors. HER2 1+ and 2+ tumors showed higher expression of genes related p53, BRCAness, HRD, RB1, CDK4, cell proliferation, and Treg signatures, while HER2 2+ tumors were also enriched for B7-H3, hypoxia, and genomic-risk signatures.

Gene expression analysis allowed molecular classification intrinsic subtyping according to PAM50, revealing a predominance of luminal A and B subtypes.

Regarding TILs, tumors were categorized as 0–10%, 11–59%, and 60–100%. Tumors with  $\geq 11\%$  TILs exhibited an inflamed transcriptional program, with high expression of antigen presentation genes, immune checkpoints, and HRD signatures. Tumors with 0–10% TILs showed higher expression of luminal and hormone-related genes, ERBB2 and stromal signatures, consistent with an immune-cold microenvironment.

Clinically, no significant differences in Overall Survival (OS) or invasive Disease-Free Survival (iDFS) were observed among HER2 categories; the expression of PTEN was the only one independently associated with overall survival.

In addition, HER2 0-null tumors were more prevalent in samples collected before 2011, suggesting that long-term FFPE preservation and potential antigen loss may result underestimate HER2 expression, impacting patient eligibility for targeted therapies.

The ongoing pilot study on clonal hematopoiesis enrolled 24 patients; preliminary results in 12 patients indicate the presence of mutations pre- and post-treatment, suggesting a potential role in response to systemic therapy, particularly immunotherapy.

## Conclusions

The NextGIM project, leveraging a multicenter translational dataset, has provided new insights into the heterogeneity of HR+/HER2-negative breast cancers. These findings offer a solid foundation for understanding the biology of these tumors, potentially supporting treatment personalization, and guiding the development of novel therapeutic strategies.

The pilot study on clonal hematopoiesis, although preliminary, appears promising for exploring the role of somatic mutations in immunotherapy response and associated toxicity.

# INDICE

RIASSUNTO.....	1
ABSTRACT .....	4
INTRODUZIONE .....	1
1.1. Inquadramento generale del tumore alla mammella .....	1
1.1.1. Epidemiologia.....	1
1.1.2. Fattori di rischio .....	3
1.1.3. Evoluzione della diagnosi e classificazione istopatologica e molecolare del tumore alla mammella .....	6
1.2. Cenni di strategie terapeutiche .....	8
1.2.1. Strategie terapeutiche per il carcinoma mammario in stadio iniziale.....	8
1.2.2. Strategie terapeutiche per il carcinoma mammario metastatico.....	9
1.2.3. Effetti a lungo termine delle terapie oncologiche nel carcinoma mammario.....	10
1.3. <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2 (HER2)</i> .....	10
1.3.1. Strategie terapeutiche specifiche .....	13
1.3.2. Significato di espressione HER2-low, HER2-very low .....	15
SCOPO DELLA TESI.....	16
MATERIALI E METODI .....	17
3.1. Caratterizzazione del tumore mammario HER2-low .....	17
3.2. Criteri di inclusione ed esclusione.....	17
3.3. Preparazione, caratterizzazione immunoistochimica e valutazione dell'adeguatezza delle sezioni di tumore per analisi molecolari .....	18
3.4. Estrazione dell'RNA da FFPE.....	19
3.5. Valutazione di quantità e qualità dell'RNA .....	20
3.6. Profilazione trascrittomica.....	21
3.7. Analisi dei dati.....	27
RISULTATI E DISCUSSIONE .....	30
4.1. Arruolamento delle pazienti .....	30
4.2. Selezione dei campioni biologici.....	31
4.3. Rivalutazione dello stato di HER2 .....	31
4.4. Valutazione dei TILs .....	34
4.5. Controllo quantità e qualità dell'RNA estratto.....	36
4.6. Normalizzazione dei campioni e controllo qualità.....	38
4.7. Valutazione di qualità dei campioni e affidabilità delle misurazioni molecolari.....	38
4.8. Caratterizzazione genomica dei tumori mammari ER+/HER2-low e ER+/HER2-0.....	39

4.8.1. Analisi Complessiva: Correlazione con il Grado di HER2 e presenza dei TILs.....	39
4.8.2. Classificazione dei sottotipi molecolari.....	45
4.8.3. Rischio di Recidiva.....	47
4.8.4. Firma di Infiammazione Tumorale e Attività immunitaria anti-tumorale (TIS).....	48
4.8.5. Valutazione del microambiente immunitario .....	49
4.8.6. Altre <i>signatures</i> .....	51
4.9. Analisi di sopravvivenza e integrazione con dati traslazionali .....	51
4.10. Discussione.....	53
CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE.....	56
ALTRE ATTIVITA': valutazione dell'emopoiesi clonale nella tossicità all'immunoterapia..	57
7.1. Introduzione.....	57
7.2. Materiali e Metodi .....	58
7.3. Risultati.....	60
BIBLIOGRAFIA .....	61
RINGRAZIAMENTI .....	70

# INTRODUZIONE

## 1.1. Inquadramento generale del tumore alla mammella

Il carcinoma della mammella è una neoplasia altamente eterogenea, che comprende sottotipi distinti per caratteristiche morfologiche, profili molecolari, andamento clinico e prognosi. Diversi meccanismi biologici regolano la crescita, la progressione e la risposta ai trattamenti; per questo motivo, tumori con fenotipo simile possono mostrare comportamenti biologici e sensibilità terapeutiche differenti (Łukasiewicz S. et al., 2021).

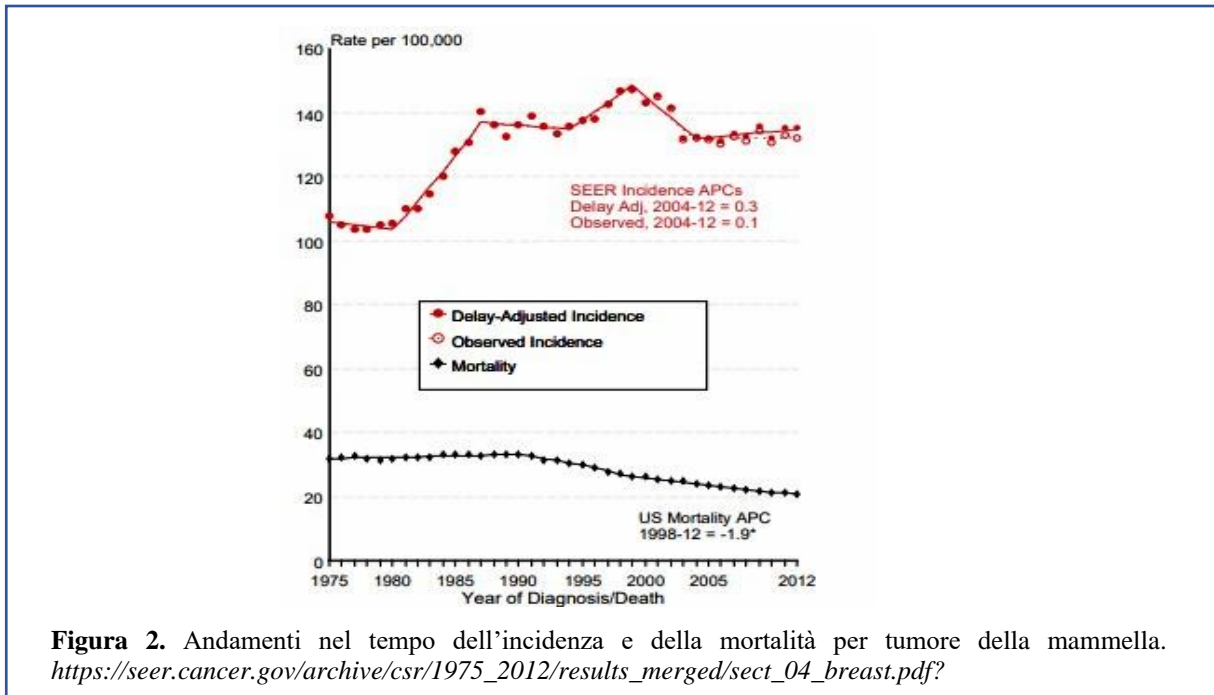
Storicamente, la classificazione del carcinoma mammario si è basata sull'osservazione morfologica del tumore e sulla valutazione dell'interessamento linfonodale ascellare (**Figura 1**), riconosciuto come uno dei principali fattori prognostici. Sebbene la classificazione istopatologica tradizionale continui a rivestire un ruolo fondamentale nella diagnosi, lo sviluppo delle tecnologie molecolari e della bioinformatica ha ampliato le metodiche di indagine clinica, consentendo una stratificazione più accurata dei tumori e l'adozione di approcci terapeutici personalizzati (Rakha EA. et al., 2023).



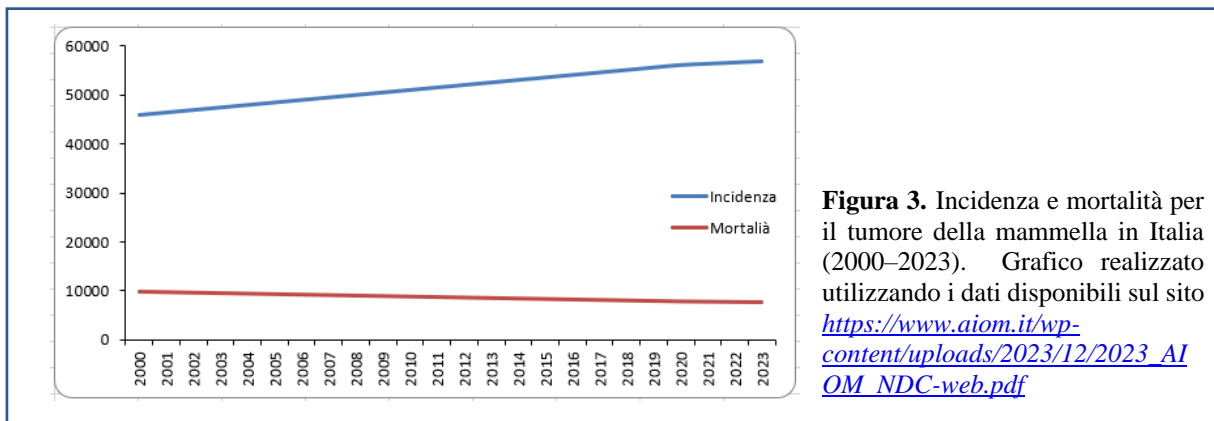
**Figura 1.** Rappresentazione schematica della mammella. La colorazione mette in evidenza il tessuto mammario e il sistema linfatico che porta ai linfonodi ascellari. <https://www.popsi.it/carcinoma-mammario-parte-studio-destiny-breast05-valutera-trastuzumab-deruxtecan-come-terapia-adiuvante/>

### 1.1.1. Epidemiologia

A livello globale, il carcinoma della mammella rappresenta la neoplasia più frequentemente diagnosticata nelle donne, con un'incidenza in crescita, ma con una tendenza alla riduzione della mortalità grazie ai progressi nella diagnosi precoce e nelle strategie terapeutiche mirate. Le stime più recenti indicano un aumento del numero di nuovi casi anche grazie all'applicazione dello *screening*, accompagnato da un miglioramento della sopravvivenza a lungo termine (**Figura 2**).



In Italia, i dati epidemiologici più aggiornati (Linee guida AIOM Ed. 2024) confermano questa tendenza: il carcinoma mammario continua a essere la neoplasia più comune tra le donne, con circa 53.600 nuovi casi nel 2024, corrispondenti a circa il 30 % di tutte le diagnosi tumorali femminili. Secondo il rapporto dell'Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM), la sopravvivenza relativa a 5 anni per le pazienti con carcinoma mammario supera l'86 % (**Figura 3**).



Secondo le stime GLOBOCAN, i tassi di incidenza standardizzati per età (ASIR) del carcinoma mammario evidenziano significative differenze tra paesi con diversi livelli di sviluppo socio-economico. Nei paesi ad alto indice di sviluppo (*High SDI*), l'ASIR era di circa 66,9 nuovi casi per 100 000 donne, significativamente superiore ai 6,99 casi per 100 000 osservati nei paesi a basso SDI, confermando l'esistenza di un gradiente epidemiologico legato al reddito nazionale (Łukasiewicz S. et al., 2021, Yang M. et al., 2024, Yeong SW. et al., 2024, Sha R. et al., 2024).

Questa discrepanza nell'incidenza è in parte attribuibile alle differenze nella disponibilità e nell'implementazione di programmi di *screening* proposti dai sistemi sanitari in paesi ad alto SDI.

In questi contesti, l'ampio accesso a strategie di prevenzione secondaria, finalizzate alla diagnosi precoce contribuisce alla maggiore incidenza segnalata. Nello specifico, le donne di età compresa tra 50 e 69 anni sono invitate a sottoporsi a mammografia biennale, mentre le donne ad alto rischio (ad esempio portatrici di mutazioni *BRCA* o con forte familiarità per carcinoma mammario) sono raccomandate a eseguire controlli annuali, generalmente mediante mammografia e, nei casi selezionati, risonanza magnetica (MRI), al fine di facilitare la diagnosi precoce e migliorare gli esiti clinici.

### 1.1.2. Fattori di rischio

I fattori di rischio possono distinguersi in non modificabili e modificabili (Harbeck N. et al., 2019, Łukasiewicz S. et al., 2021) (**Tabella 1**).

**Tabella 1.** Riassunto dei principali fattori di rischio per il carcinoma mammario, distinguendo tra fattori non modificabili e fattori modificabili.

Fattori Non Modificabili	Fattori Modificabili
Sesso femminile	Terapia ormonale sostitutiva
Età avanzata	Dietilstilbestrolo
Storia familiare (di tumore al seno o all'ovaio)	Attività fisica
Mutazioni genetiche	Sovrappeso/obesità
Razza/etnia	Assunzione di alcol
Gravidanza e allattamento	Fumo
Ciclo mestruale e menopausa	Integrazione vitaminica insufficiente
Densità del tessuto mammario	Esposizione eccessiva alla luce artificiale
Precedente storia di tumore al seno	Consumo di cibi trasformati
Malattie benigne della mammella	Esposizione a sostanze chimiche
Precedente terapia radiante	Altri farmaci

Tra i fattori di rischio non modificabili per il carcinoma mammario, il sesso femminile rappresenta uno dei principali. La maggiore e prolungata esposizione agli ormoni sessuali, in particolare estrogeni e progesterone, gioca un ruolo cruciale nello sviluppo della malattia, poiché le cellule della ghiandola mammaria sono particolarmente sensibili all'azione di questi ormoni. (Nelson HD. et al., 2012).

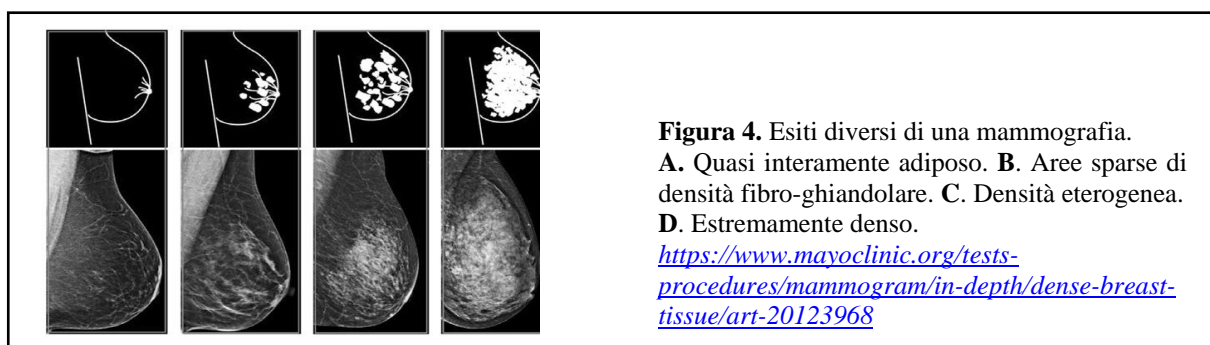
Anche l'età rappresenta un importante fattore predisponente: l'incidenza aumenta con l'invecchiamento, verosimilmente per l'accumulo di mutazioni cellulari nel tempo (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer., 2001). Inoltre, è stato osservato che i sottotipi molecolari del carcinoma possono variare in base all'età: ad esempio, il tipo triplo negativo è più frequente nelle donne giovani, mentre il sottotipo luminale A è prevalente nelle pazienti più anziane. (Łukasiewicz S. et al., 2021).

La storia familiare costituisce un altro fattore di rischio ben documentato. Avere parenti di primo grado con carcinoma mammario diagnosticato in età giovane, incrementa significativamente il rischio individuale. (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer., 2001). Ciò è legato sia a fattori ambientali condivisi, sia a alterazioni epigenetiche (Mavaddat N. et al., 2015) e mutazioni genetiche ereditarie, in particolare nei geni *BRCA1* e *BRCA2* (Narod SA., 2021).

Un altro elemento da considerare è la densità del tessuto mammario (**Figura 4**). Le donne con mammelle ad alta densità, in cui prevale il tessuto fibro-ghiandolare rispetto a quello adiposo, presentano un rischio aumentato di insorgenza neoplastica (Bodewes FTH. et al., 2022).

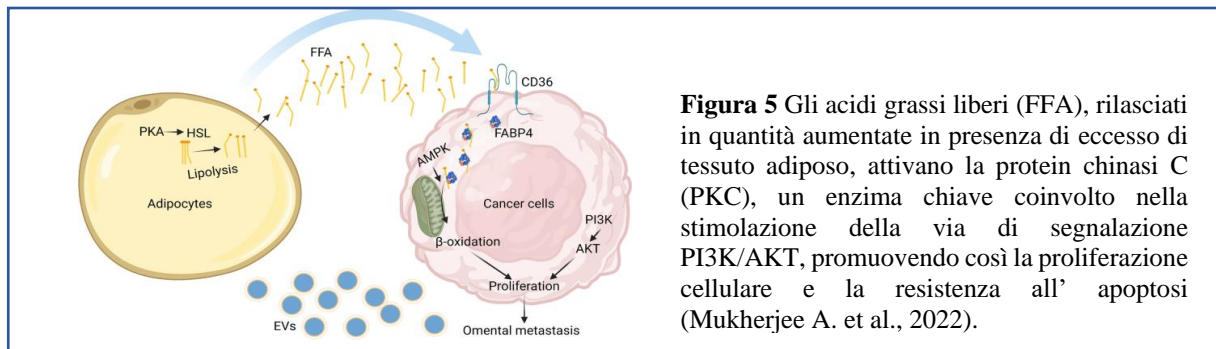
Parallelamente, l'elevata densità mammaria può interferire con la diagnosi precoce, poiché il tessuto fibro-ghiandolare riduce il contrasto radiologico e può mascherare la presenza di lesioni neoplastiche (Boyd NF. et al., 2007).

Condizioni benigne della mammella, come iperplasia atipica o carcinoma in situ, e fattori riproduttivi/ormonali, come menarca precoce e menopausa tardiva, nulliparità e prima gravidanza tardiva aumentano l'esposizione agli estrogeni e quindi il rischio complessivo (Lukasjewicz S. et al., 2021).



Per quanto riguarda i fattori di rischio modificabili, è stata riscontrata una possibile associazione tra l'assunzione di determinati farmaci e l'aumentato rischio di sviluppo di carcinoma mammario; tra i più studiati figura il dietilstilbestrolo (DES), un estrogeno sintetico impiegato in passato in gravidanza e oggi abolito (Lukasjewicz S. et al., 2021) e l'uso prolungato della terapia ormonale sostitutiva (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer., 2001).

Altri fattori di rischio modificabili sono l'indice di massa corporea (BMI) elevato e sarcopenia, in condizioni di sovrappeso o obesità, che risultano correlati a un rischio aumentato di carcinoma mammario, soprattutto nelle donne in postmenopausa (Escala-Garcia M. et al., 2020). L'eccesso di tessuto adiposo può peggiorare la prognosi, poiché è metabolicamente attivo e favorisce infiammazione cronica, insulino-resistenza e produzione di estrogeni. Gli acidi grassi liberi (FFA) attivano la proteina chinasi C (PKC), che stimola la via PI3K/AKT, promuovendo proliferazione cellulare e resistenza all'apoptosi (**Figura 5**).



Un BMI elevato spesso coesiste con il diabete di tipo 2, condizione che peggiora la prognosi nel carcinoma mammario. Il diabete di tipo 2 aumenta la mortalità generale e specifica per tumore, a causa di iperglicemia, iperinsulinemia e infiammazione cronica, che favoriscono crescita tumorale e progressione della malattia (Escala-Garcia M. et al., 2020).

Il consumo di alcol e di fumo rappresentano importanti fattori di rischio per il carcinoma mammario, poiché l'alcol aumenta i livelli di estrogeni e attiva meccanismi cancerogeni, mentre le sostanze tossiche del fumo inducono mutazioni del DNA, in particolare del gene *p53* (Lukasiewicz S. et al., 2021).

Anche la dieta influisce sul rischio di carcinoma mammario: il consumo di alimenti ultra-processati, grassi saturi e carni lavorate aumenta il rischio (Narod SA., 2021).

L'esposizione cronica a sostanze chimiche ambientali, come il diclorodifeniltricloroetano (DDT), i policlorobifenili (PCB) e gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), solventi e insetticidi, può alterare l'equilibrio endocrino e favorire la cancerogenesi mammaria, soprattutto nelle fasi precoci dello sviluppo. Questi agenti, interferenti endocrini o promotori di modifiche epigenetiche, provocano alterazioni cellulari potenzialmente irreversibili e fanno parte dell'esposoma, ossia tutte le esposizioni ambientali non genetiche che influenzano la salute nel corso della vita (Boyd NF. et al., 2007, Lukasiewicz S. et al., 2021).

Per quanto riguarda i fattori protettivi, uno dei principali documentati è l'attività fisica regolare, in grado di ridurre l'esposizione agli ormoni sessuali, modulare la risposta immunitaria e regolare fattori di crescita quali l'IGF-1 (Nelson HD. et al., 2012).

Altri fattori protettivi: sono multiparietà, prima gravidanza in età giovane (<30 anni) e allattamento al seno.

Anche la dieta svolge un ruolo rilevante nella modulazione del rischio di carcinoma mammario. In particolare, l'integrazione di vitamina D è stata associata a una riduzione dell'incidenza e della mortalità, probabilmente grazie ai suoi effetti immunomodulanti e alla capacità di inibire la proliferazione cellulare. Inoltre, un'alimentazione ricca di vegetali, fibre, acidi grassi omega-3 e fitoestrogeni sembra esercitare un effetto protettivo; tuttavia, l'impatto di alcuni composti, quali daidzeina e genisteina, soprattutto se assunti a dosi elevate, rimane oggetto di dibattito in letteratura (Narod SA., 2021).

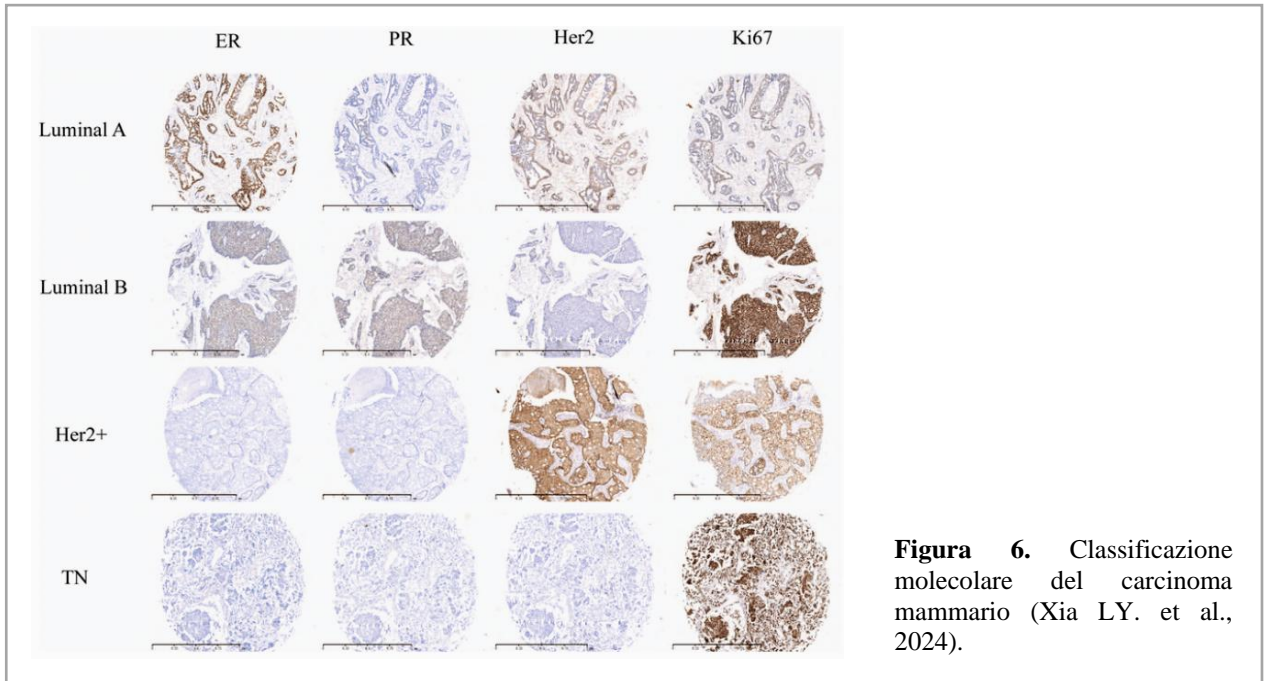
### 1.1.3. Evoluzione della diagnosi e classificazione istopatologica e molecolare del tumore alla mammella

La diagnosi e la classificazione del carcinoma mammario sono notevolmente evolute negli ultimi decenni grazie ai progressi scientifici e tecnologici (Rakha EA. et al., 2023, Lukasiewicz S. et al., 2021). La scoperta del significato biologico dei recettori ormonali avvenuta negli anni '60, aprì la strada a classificazioni basate non solo sulla morfologia, ma anche sulla biologia del tumore (Rakha EA. et al., 2023). Negli anni '80, lo *screening* mammografico e l'aggiornamento dei criteri istologici migliorarono la diagnosi precoce e la prognosi (Linee guida AIOM ed. 2024). Negli anni '90, l'introduzione della biopsia del linfonodo sentinella, l'identificazione delle mutazioni *BRCA* e le prime terapie mirate segnarono ulteriori passi avanti, accompagnati dall'integrazione di parametri biologici come l'espressione di recettori per estrogeno e/o progesterone, (ER, PR), HER2 e Ki-67 nella classificazione molecolare (Rakha EA. et al., 2023, Linee guida AIOM ed. 2024). Oggi, la classificazione del carcinoma mammario si basa su:

1. **Tipo istologico:** distingue forme invasive e non invasive e considera l'origine tissutale del tumore (carcinomi duttale o lobulare) con sottotipi che differiscono per caratteristiche biologiche e prognosi (Rakha EA. et al., 2023).
2. **Stadiazione TNM (*Tumor, Nodes, Metastasis*):** valuta dimensione del tumore, interessamento linfonodale e la presenza di metastasi (AJCC/UICC, 8th ed.).
3. **Grado istologico (Nottingham/Elston-Ellis):** considera differenziazione, atipie nucleare e attività mitotica delle cellule tumorali, (gradi G1–G3) (Rakha EA. et al., 2023, Linee Guida AIOM ed. 2024).
4. **Classificazione molecolare:** si basa sull'espressione immunohistochimica di estrogeno (ER), progesterone (PR), HER2 e Ki-67, a fine di identificare sottogruppi tumorali con caratteristiche biologiche e risposte terapeutiche differenti (Perou CM. et al., 2000, Rakha EA. et al., 2023).

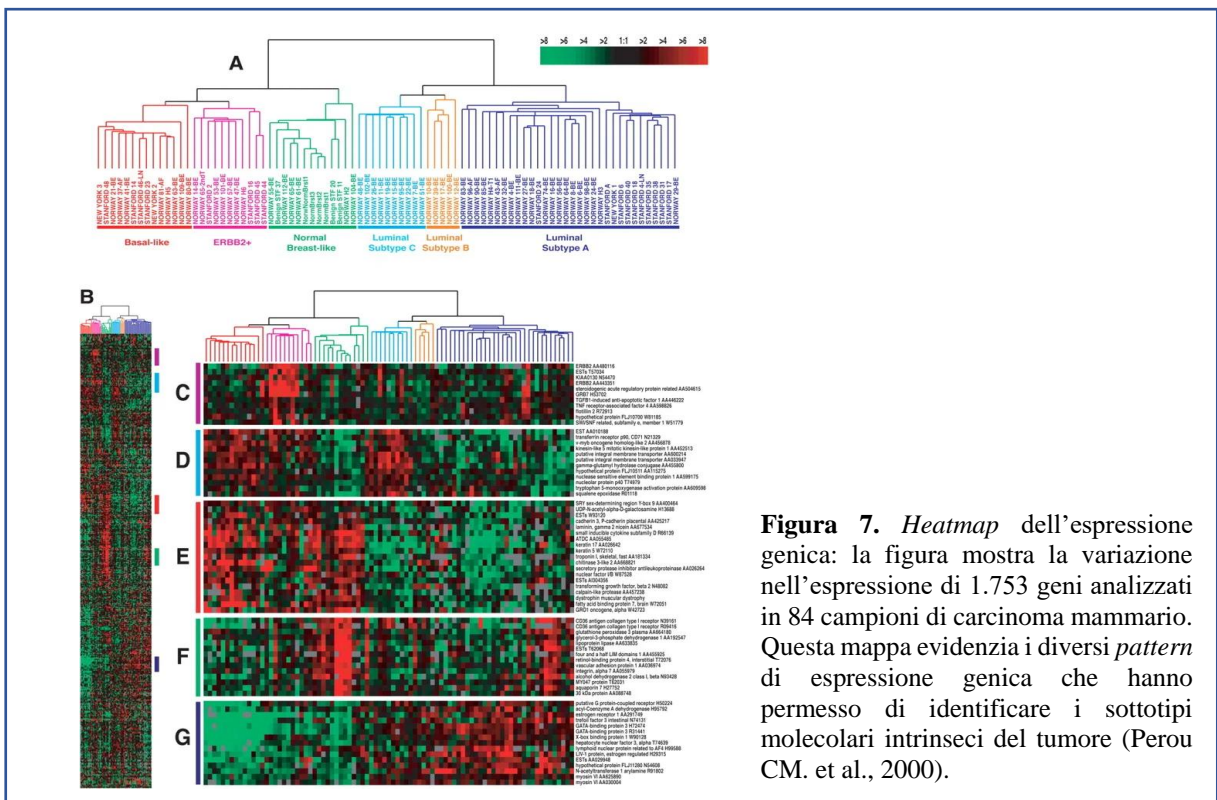
In base a queste espressioni, Sørli T. et al. nel 2001 e nel 2003 hanno raffinato la classificazione:

- Luminale A: ER+/PR+, HER2-, Ki-67 basso: migliore prognosi, sensibilità all'ormonoterapia.
- Luminale B: ER+/PR variabile, può essere HER2+, Ki-67 alto: prognosi intermedia.
- HER2-enriched: HER2+, ER/PR-: più aggressivo ma responsivo alle terapie anti-HER2.
- Basal-like (triplo negativo): ER-, PR-, HER2-: prognosi peggiore, colpisce spesso pazienti giovani (**Figura 6**).



**Figura 6.** Classificazione molecolare del carcinoma mammario (Xia LY. et al., 2024).

I sottotipi molecolari descritti da Sørlie et al. si basano su differenze biologiche descritte in lavori di Perou CM. et al. nel 2000 che hanno dimostrato l'esistenza di *pattern* distinti di espressione genica. Perou et al. hanno utilizzato analisi di espressione genica su *microarray* per identificare *cluster* tumorali biologicamente distinti (**Figura 7**).



**Figura 7.** Heatmap dell'espressione genica: la figura mostra la variazione nell'espressione di 1.753 geni analizzati in 84 campioni di carcinoma mammario. Questa mappa evidenzia i diversi *pattern* di espressione genica che hanno permesso di identificare i sottotipi molecolari intrinseci del tumore (Perou CM. et al., 2000).

I profili di espressione genica identificati da Perou et al. hanno costituito il razionale biologico per lo sviluppo di test molecolari standardizzati finalizzati all'applicazione clinica della classificazione intrinseca. In questo contesto, Parker et al. hanno sviluppato nel 2009 il test PAM50 (*Prediction Analysis of Microarray 50*), test di espressione genica per classificare il tumore in sottotipi molecolari intrinseci e fornire informazioni prognostiche e, in parte, predittive. Si tratta di un'analisi di 50 geni che permette di assegnare con un'accuratezza del 93% i sottotipi molecolari del tumore, stimare il rischio di recidiva a distanza e supportare decisioni terapeutiche, come l'impiego della chemioterapia adiuvante (Łukasiewicz S. et al., 2021).

Inoltre, è stato sviluppato il *Prosigna*® *Stage* che integra i risultati molecolari derivati dal test PAM50, con le caratteristiche clinico-patologiche tradizionali (parametri anatomici della stadiazione TNM con il grado istologico, lo stato dei recettori ormonali (ER e PR), e rappresenta un sistema di stadiazione prognostica integrata per una più accurata stratificazione del rischio di recidiva nel carcinoma mammario.

## **1.2. Cenni di strategie terapeutiche**

Il trattamento del carcinoma mammario è multidisciplinare e personalizzato.

Le strategie vengono definite in funzione dell'estensione della malattia, delle condizioni cliniche della paziente e delle caratteristiche biologiche e molecolari del tumore.

L'approccio terapeutico può includere trattamenti locali e trattamenti sistemici, spesso combinati in modo sequenziale o integrato. I trattamenti locali mirano al controllo della malattia in sedi specifiche e comprendono la chirurgia, la radioterapia e, in contesti selezionati, procedure interventistiche, ovvero tecniche mini-invasive come radiofrequenze e crioablazione. Questi approcci possono avere finalità curative, di consolidamento o palliative, a seconda del quadro clinico e dello stadio.

Le terapie sistemiche sono scelte principalmente sulla base del profilo molecolare del tumore. Esse includono la chemioterapia, l'ormonoterapia, le terapie a bersaglio molecolare e l'immunoterapia.

### **1.2.1. Strategie terapeutiche per il carcinoma mammario in stadio iniziale**

Quando il tumore è confinato alla mammella e/o ai linfonodi regionali, senza diffusione ad altri organi, l'obiettivo principale del trattamento è la guarigione.

Le opzioni terapeutiche includono:

- **Chirurgia:** la chirurgia conservativa (quadrantectomia, tumorectomia), prevede l'asportazione del tumore con margini liberi da cellule neoplastiche, preservando la maggior parte del tessuto mammario; la mastectomia comporta la rimozione completa della ghiandola mammaria.

La chirurgia mammaria può essere associata alla chirurgia linfonodale ascellare nei casi in cui il linfonodo sentinella risulti positivo, o vi sia malattia clinicamente evidente.

- Terapia neoadiuvante: il trattamento sistemico somministrato prima della chirurgia ha diversi scopi e offre diversi vantaggi. Può ridurre la massa tumorale quando, per dimensioni o localizzazione, la neoplasia risulta inizialmente non operabile. Inoltre, la risposta al trattamento consente di adattare la strategia terapeutica dopo l'intervento chirurgico in caso di risposta subottimale, come avviene ad esempio nei tumori HER2-positivi e nei tumori triplo negativi; la presenza di malattia residua dopo terapia neoadiuvante assume un significativo valore prognostico, essendo associata a una prognosi sfavorevole. Tale terapia preoperatoria è stata introdotta e validata nel carcinoma mammario da Bernard Fisher attraverso gli studi del *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP)* (Fisher B. et al., 1997).
- Terapia sistemica adiuvante: terapia postoperatoria con l'obiettivo di eliminare eventuali cellule tumorali residue e prevenire la recidiva della malattia. L'introduzione della terapia adiuvante post-chirurgica è stata storicamente attribuita al Professor Gianni Bonadonna e ai suoi collaboratori dell'Istituto Nazionale dei Tumori di Milano. Questa strategia rappresentò un'importante innovazione, poiché il carcinoma mammario divenne la prima neoplasia in cui la chemioterapia post-chirurgica dimostrò un effetto significativo sulla sopravvivenza (Bonadonna G. et al., 1976).

### **1.2.2. Strategie terapeutiche per il carcinoma mammario metastatico**

Il carcinoma in stadio avanzato (tumore metastatico) è una neoplasia caratterizzata dalla diffusione delle cellule tumorali dal sito primario a organi o tessuti distanti, attraverso vie linfatiche o ematiche, con conseguente formazione di metastasi. In questa fase di malattia, l'obiettivo terapeutico è il prolungamento della sopravvivenza, il controllo dei sintomi e il miglioramento della qualità della vita.

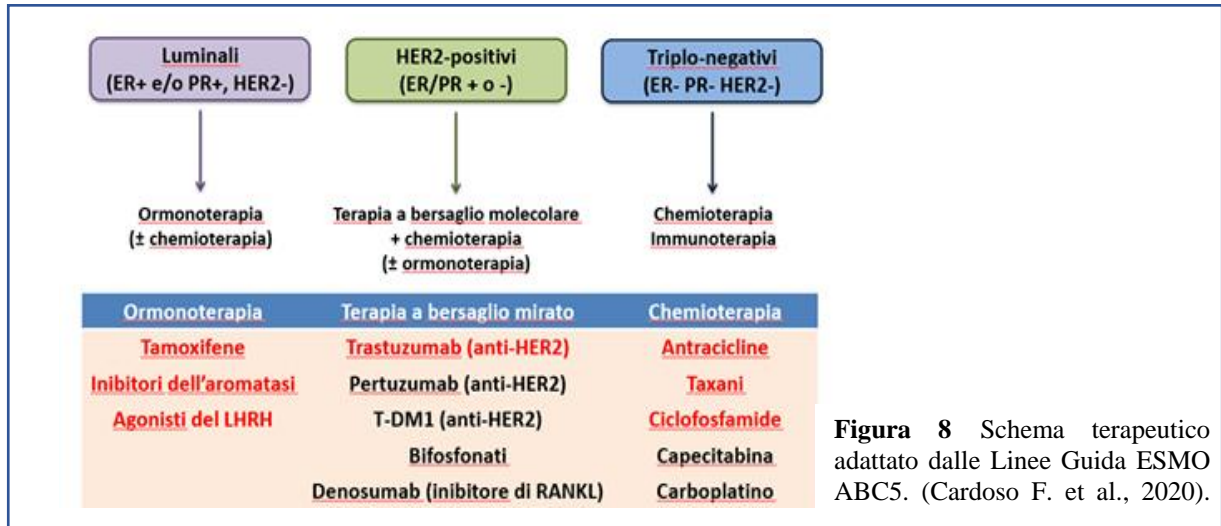
Per queste pazienti è standard l'utilizzo immediato di terapia sistemica.

Le principali opzioni terapeutiche includono (**Figura 8**):

- Chemioterapia: con attività citotossica.
- Ormonoterapia per tumori ER+: comprende gli inibitori dell'aromatasi (ad es. Letrozolo), che agiscono bloccando la sintesi degli estrogeni a partire da androgeni; il Tamoxifene, modulatore selettivo del recettore estrogenico (*SERM*); i *Selective estrogen receptor degraders (SERDs)*, come Fulvestrant, che determinano la degradazione del recettore per estrogeni. Nelle pazienti giovani e in età pre-menopausale, l'ormonoterapia viene spesso associata al trattamento con analoghi del LHRH (es. Goserelina), al fine di ridurre la stimolazione estrogenica ovarica, inducendo menopausa farmacologica.
- Terapie target: includono gli inibitori di CDK4/6 (come Abemaciclib), le terapie anti-HER2 (es. Trastuzumab, Pertuzumab), i PARP-inibitori nelle pazienti con mutazioni *BRCA1/2*, nonché farmaci diretti contro specifiche alterazioni molecolari, quali

mutazioni di *ESR1* (SERD orali come Elacestrant) e mutazione di *PIK3CA* (inibitori di *PI3K* come Alpelisib).

- Immunoterapia: utilizzata in combinazione con chemioterapia. Negli ultimi anni, in particolare in alcuni sottogruppi di carcinoma mammario triplo negativo, l'immunoterapia è stata progressivamente integrata sia nel *setting* precoce che metastatico.



**Figura 8** Schema terapeutico adattato dalle Linee Guida ESMO ABC5. (Cardoso F. et al., 2020).

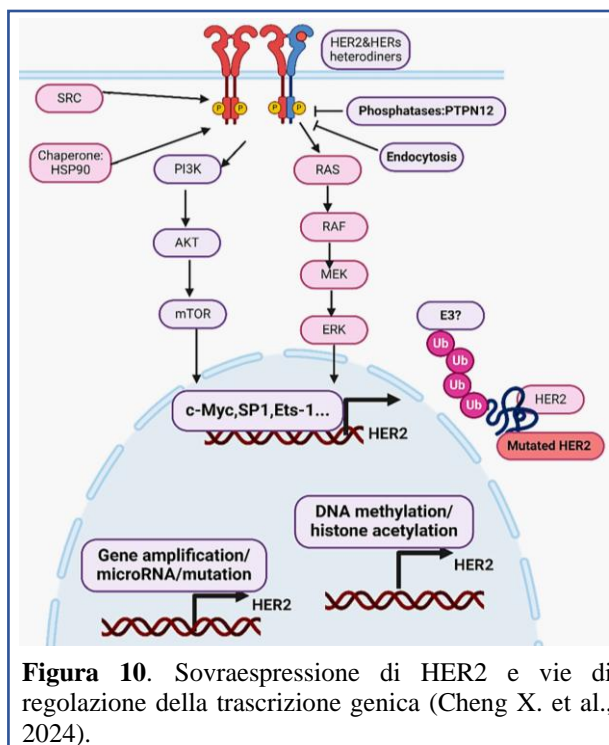
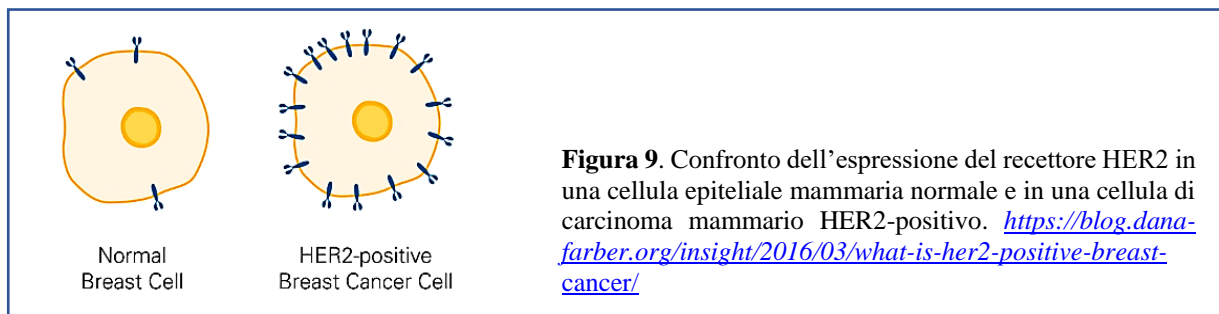
### 1.2.3. Effetti a lungo termine delle terapie oncologiche nel carcinoma mammario

Negli ultimi decenni, i progressi nelle terapie oncologiche hanno determinato un significativo miglioramento della prognosi e della sopravvivenza delle pazienti con carcinoma mammario, in particolare nelle forme *HER2-positive* e nelle fasi iniziali di malattia. Tuttavia, l'aumento della sopravvivenza ha messo in evidenza nuove problematiche legate agli effetti a lungo termine dei trattamenti antitumorali, tra cui cardiotoxicità (es. insufficienza cardiaca), neurotossicità (es. neuropatia periferica), disfunzioni endocrine (es. alterazioni della funzione tiroidea, ipogonadismo, osteoporosi), rischio di neoplasie secondarie in particolare in relazione alla tossicità ematologica e alla comparsa di emopoiesi clonale [argomento in dettaglio nella sezione “Altre Attività”], (Gegechkori N. et al., 2017, Steensma DP. and Bolton KL., 2020, Reed SC. et al., 2023, Nguyen YTM. et al., 2025).

### 1.3. Human Epidermal growth factor Receptor 2 (HER2)

HER2 è una proteina transmembrana appartenente alla famiglia dei recettori del fattore di crescita epidermico (EGFR/ErbB), dotata di attività tirosin-chinasica. Questi recettori mediano segnali intracellulari che regolano la proliferazione, la sopravvivenza e la crescita cellulare.

Normalmente espresso a livelli bassi sulle cellule sane, in una sottopopolazione di tumori mammari risulta sovraespresso, contribuendo alla proliferazione cellulare incontrollata e alla progressione neoplastica (**Figura 9**).



HER2, in seguito a dimerizzazione, viene attivato, determinando la fosforilazione del dominio intracellulare, l'attivazione delle principali vie di segnalazione:

- PI3K/AKT, che promuove la sopravvivenza cellulare e inibisce l'apoptosi;
- mTOR, che stimola la crescita e la proliferazione cellulare;
- RAS-RAF-MEK-ERK, che trasloca nel nucleo attivando la trascrizione di geni proliferativi, come *c-Myc* (**Figura 10**).

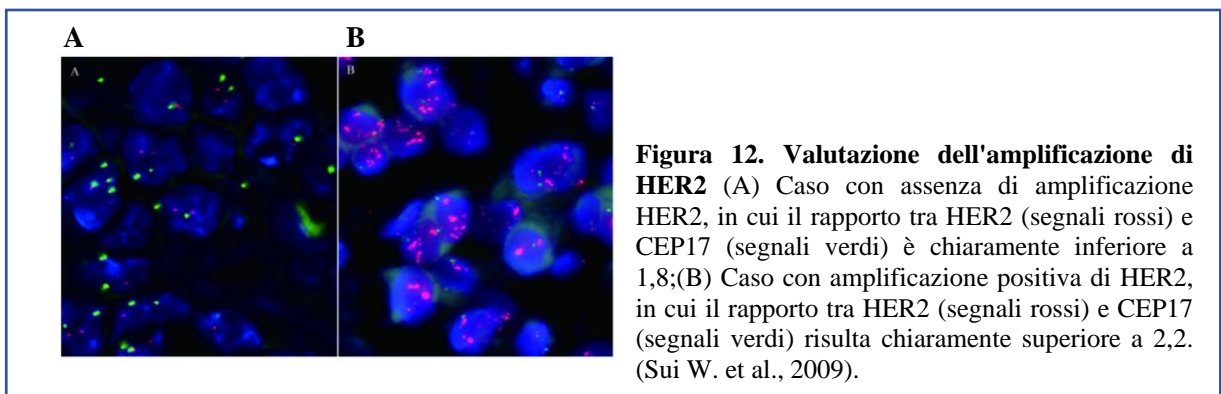
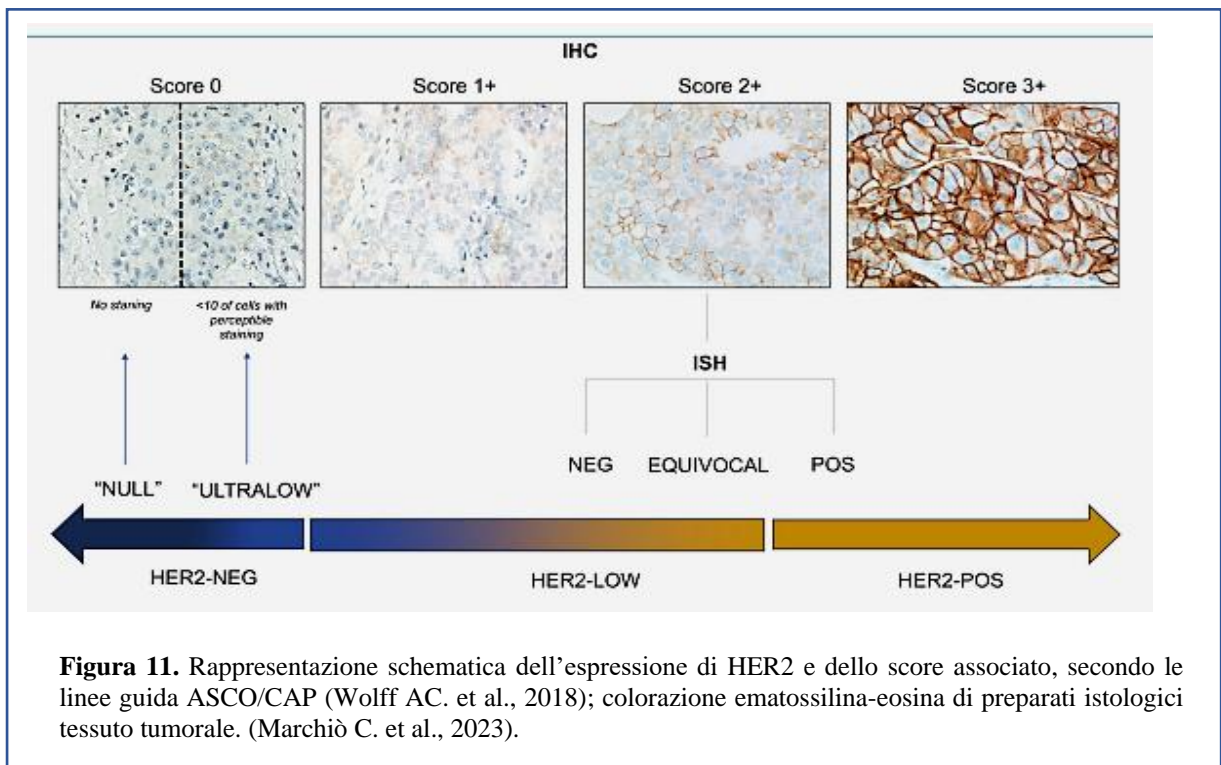
I tumori mammari HER2-positivi tendono a presentare una crescita più rapida e un maggiore potenziale metastatico rispetto ad altri sottotipi.

L'espressione di questo recettore si riscontra in circa il 15–25% dei tumori mammari, ed è un parametro fondamentale per la scelta della strategia terapeutica.

Secondo l'algoritmo di valutazione proposto dalle linee guida ASCO-CAP 2018 (Wolff AC. et al., 2018) il tumore può essere classificato in base allo stato HER2 tramite analisi di immunohistochimica (IHC) e classificato come segue:

- HER2-negativo (*score* 0): assenza di colorazione della membrana cellulare. Questi tumori non rispondono ai trattamenti mirati contro HER2;
- HER2-ultralow (*score* 0): colorazione debole presente in meno del 10% delle cellule. Questa categoria è in fase di studio per valutare la risposta a trattamenti HER2-specifici;

- **HER2-low:** *score 1+* indica una colorazione debole in oltre il 10% della membrana cellulare delle cellule; *score 2+*, invece, indica una colorazione moderata in più del 10% delle cellule, e richiede conferma tramite il test di ibridazione in situ fluorescente (FISH). Per essere considerato *low* deve dimostrare una mancata amplificazione del gene sul DNA. Questi tumori possono rispondere a trattamenti HER2-specifici di nuova generazione.
- **HER2-positivo:** *score 2+* con FISH positiva indica tumori con colorazione moderata in più del 10% delle cellule; *score 3+* in tumori con colorazione intensa e completa in più del 10%. Questi tumori vengono sempre trattati con farmaci mirati contro HER2 (**Figura 11, Figura 12**) (Perou CM. et al., 2000, Tarantino P. et al., 2020, Modi S. et al., 2022, Molinelli C. et al., 2022, Marchiò C. et al., 2023).



### 1.3.1. Strategie terapeutiche specifiche

La maggior parte dei carcinomi mammari HER2-positivi è caratterizzata da un fenotipo biologicamente aggressivo. Circa il 50% di questi tumori co-esprime i recettori ormonali per estrogeni e/o progesterone, mantenendo una potenziale sensibilità alla terapia endocrina.

Dal punto di vista terapeutico, i tumori HER2-positivi mostrano una risposta significativa al trattamento con terapie anti HER2; gli anticorpi monoclonali come trastuzumab e pertuzumab sono stati i primi farmaci impiegati in tale ambito.

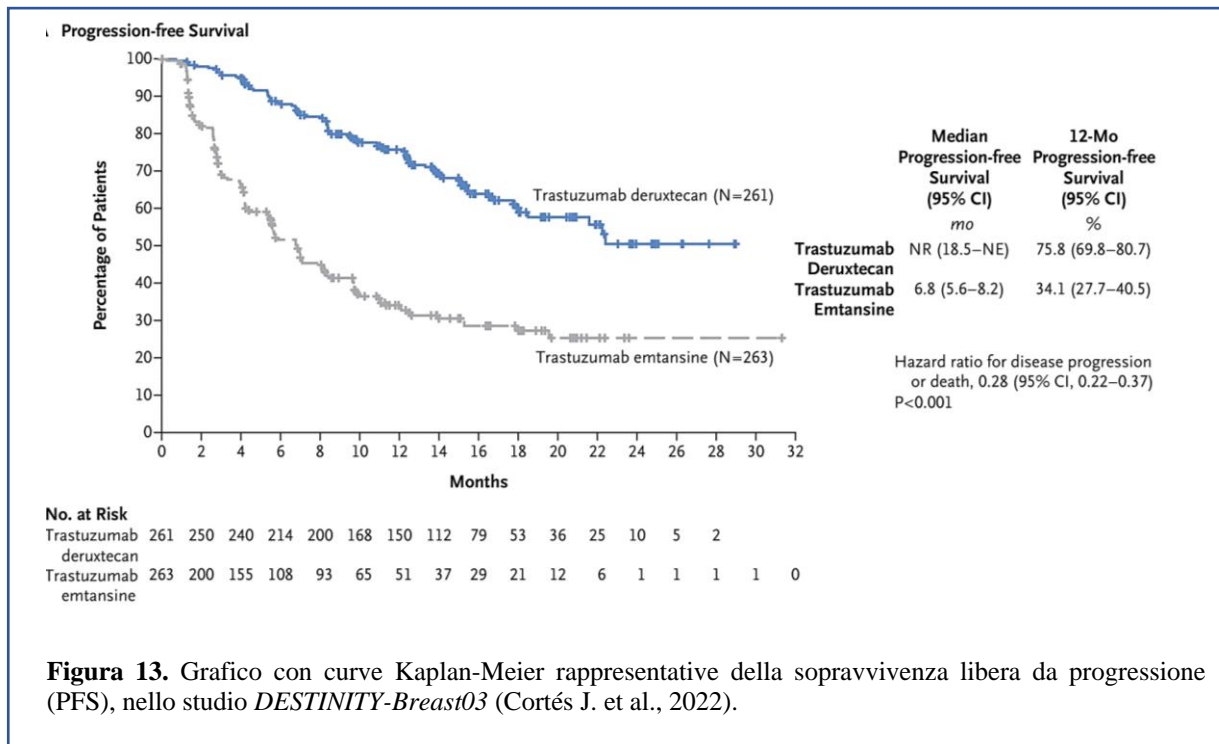
La scelta della terapia dipende da vari fattori, tra cui lo stadio, l'età, lo stato menopausale, il carico tumorale, l'assetto molecolare della malattia (Liu X. et al., 2022). T-DM1 (Trastuzumab Emtansine) e T-DXd (trastuzumab deruxtecan) sono farmaci più recenti, nati dall'innovazione tecnologica e fanno parte della famiglia degli anticorpi farmaco-coniugati (ADC). Gli ADC sono farmaci composti da tre elementi fondamentali:

1. Un anticorpo monoclonale, specifico per un antigene espresso sulla superficie delle cellule tumorali.
2. Un *linker*, che collega l'anticorpo alla molecola citotossica.
3. Un farmaco attivo, solitamente ad alta potenza citotossica.

Una delle caratteristiche più innovative di questi farmaci è effetto *bystander*, per cui, una volta rilasciata, la sostanza attiva può diffondersi e colpire anche le cellule tumorali vicine (von Arx C. et al., 2023, Cortès J. et al., 2022, Schettini F. et al., 2025).

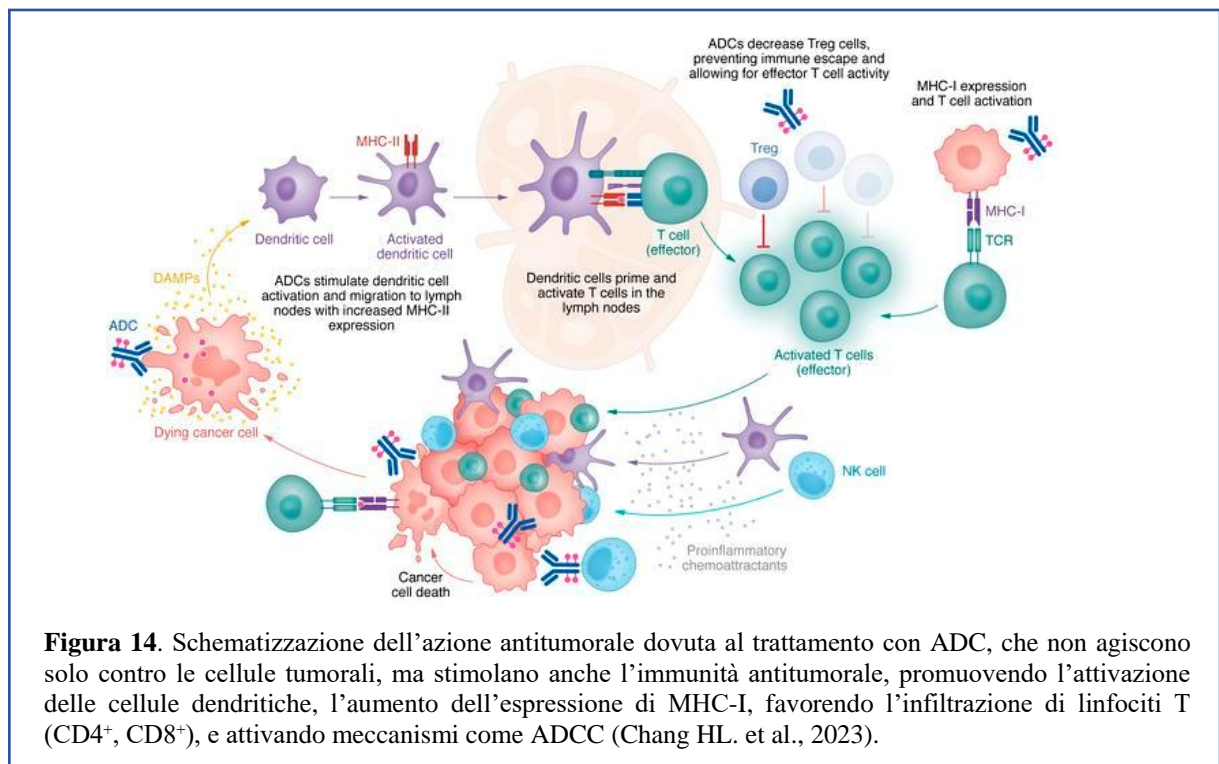
Inizialmente, l'efficacia di T-DXd è stata valutata e approvata nei pazienti con tumore mammario metastatico HER2-positivo, confrontandolo con T-DM1, primo anticorpo coniugato prodotto.

Lo studio registrativo di fase III *DESTINY-Breast03* ha valutato l'efficacia di T-DXd rispetto a T-DM1 in pazienti con carcinoma mammario avanzato HER2-positivo precedentemente trattate. T-DXd ha dimostrato un miglioramento statisticamente significativo della sopravvivenza libera da progressione (PFS) rispetto a T-DM1, determinando un cambiamento rilevante nel paradigma terapeutico di riferimento per questo *setting* (**Figura 13**) (Cortès J. et al., 2022).



**Figura 13.** Grafico con curve Kaplan-Meier rappresentative della sopravvivenza libera da progressione (PFS), nello studio *DESTINY-Breast03* (Cortés J. et al., 2022).

Sulla base delle evidenze disponibili, è corretto affermare che gli ADC possono contribuire a riattivare l'immunosorveglianza (**Figura 14**), indirettamente, attraverso meccanismi come: *l'immunogenic cell death* (morte cellulare immunogenica) che rilascia segnali pro-infiammatori e antigeni tumorali, l'attivazione del microambiente immunitario (cellule dendritiche, linfociti T e *Natural Killer*), la generazione di risposte immunitarie durature come le cellule T memoria (Chang HL. et al., 2023).



**Figura 14.** Schematizzazione dell'azione antitumorale dovuta al trattamento con ADC, che non agiscono solo contro le cellule tumorali, ma stimolano anche l'immunità antitumorale, promuovendo l'attivazione delle cellule dendritiche, l'aumento dell'espressione di MHC-I, favorendo l'infiltrazione di linfociti T (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>), e attivando meccanismi come ADCC (Chang HL. et al., 2023).

### 1.3.2. Significato di espressione HER2-low, HER2-very low

Il carcinoma mammario HER2-*low* rappresenta circa il 32%–65% di tutti i tumori della mammella HER2-negativi. Nel 2020-2021, diversi autori avevano ipotizzato la possibilità di estendere le terapie anti-HER2 anche ai tumori classificati come HER2-*low*, ovvero con espressione bassa di HER2 ma non sufficiente per rientrare nella categoria HER2-positiva secondo i criteri tradizionali (Modi S. et al., 2022, Tarantino P. et al., 2020, Miglietta F. et al., 2021). Questa ipotesi è stata successivamente confermata dallo studio clinico *DESTINY-Breast04*, pubblicato nel 2022 su *The New England Journal of Medicine*, che ha dimostrato l'efficacia di T-DXd nel trattamento del carcinoma mammario metastatico HER2-*low*, rendendo di fatto questo tipo di tumori un sottotipo a sé stante e aprendo la strada a nuove strategie terapeutiche specifiche.

In questo contesto sono stati condotti numerosi studi volti ad approfondire il ruolo degli ADC nel *setting* HER2-*low*, tra i quali la revisione condotta da von Arx C. et al., nel 2023. Lo studio mostra risultati promettenti in termini di efficacia e sicurezza di T-DXd nei tumori HER2-*low* e in neoplasie solide differenti dal carcinoma mammario (von Arx C. et al., 2023, Schettini F. et al., 2025, Cortès J. et al., 2024).

Per quanto riguarda l'HER2-*ultralow* (espressione minore del 10%), studi clinici, come *DESTINY-Breast06*, hanno dimostrato che anche questi tumori potrebbero beneficiare del trattamento con T-DXd in *setting* metastatico, aprendo la strada a un'ulteriore estensione degli ADC anti-HER2 in questa popolazione (Takada K. et al., 2025).

## SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo principale di questo progetto di tesi è la caratterizzazione molecolare e genomica del carcinoma mammario *HER2-low* in pazienti positive al recettore degli estrogeni (ER+), al fine di raffinare le strategie terapeutiche e personalizzare il trattamento ed in particolare valutare se i carcinomi mammari recettori ormonali positivi (ER+) *HER2-low* e *HER2-0* rappresentano entità cliniche e biologiche distinte, e se l'espressione di *HER2* correla con una peggiore prognosi. Si inserisce in uno studio multicentrico finanziato dal MIUR (Ministero dell'Università e della Ricerca) in un Bando PRIN 2022 - Progetto NextGIM, finalizzato alla caratterizzazione genomica, immunologica e prognostico-predittiva delle pazienti con carcinomi mammari ER+ e *HER2-low/HER2-0*. Come già descritto, tale sottogruppo è caratterizzato da una notevole eterogeneità biologica, che influenza la prognosi e la risposta ai trattamenti adiuvanti: mentre la maggioranza delle pazienti mostra una prognosi favorevole e potrebbe beneficiare di un depotenziamento terapeutico, circa il 15-30% sviluppa recidive nonostante le terapie disponibili, evidenziando la necessità di nuove strategie terapeutiche. L'analisi ha riguardato pazienti con tumore della mammella classificato alla diagnosi come *HER2* negativo e arruolate in tre trials clinici randomizzati del Gruppo Italiano Mammella (GIM), in particolare gli studi GIM-2 GIM-4 GIM-10. Le pazienti incluse in questo progetto presentavano un profilo *HER2*-negativo definito come score IHC 0, 1+ o 2+ non amplificato. Recenti evidenze cliniche hanno dimostrato una significativa attività terapeutica di ADCs diretti contro *HER2*, quali Trastuzumab Deruxtecan, anche in pazienti tradizionalmente classificate come *HER2*-negative. Alla luce di tali risultati, la bassa espressione di *HER2* ha acquisito rilevanza come potenziale biomarcatore predittivo di risposta agli ADCs anti-*HER2*.

Il presente lavoro si propone di caratterizzare più accuratamente il fenotipo tumorale dei carcinomi *HER2* negativi, valutando l'esistenza di sottotipi biologicamente distinti, in particolare *HER2-low* (score IHC 1+ e 2+ non amplificato dal test FISH) e *HER2-ultralow* (score IHC 0, ma espressione minima di *HER2*, positività incompleta e debole in <10% delle cellule tumorali). La piattaforma *nCounter*® (NanoString Technologies), mediante il pannello *nCounter*® *Breast Cancer 360*, è stata utilizzata per la caratterizzazione dell'espressione genica di un set predefinito di geni associati al carcinoma mammario. L'analisi è stata condotta su RNA estratto da campioni di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE), utilizzando kit commerciali dedicati all'isolamento dell'RNA.

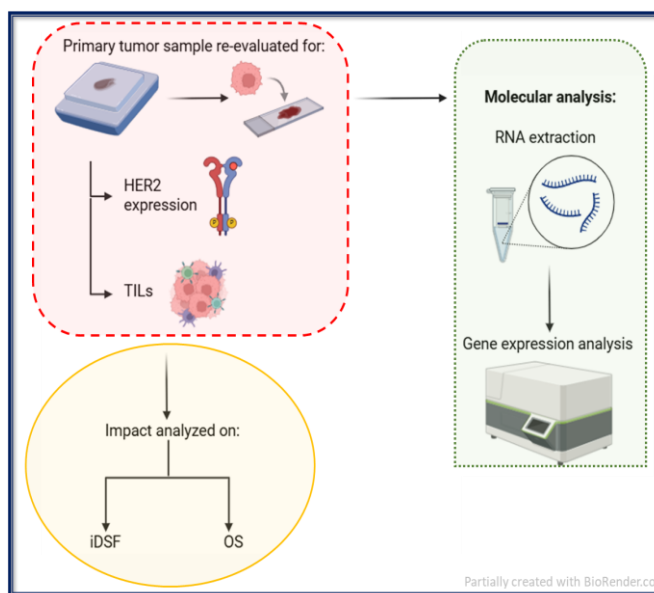
## MATERIALI E METODI

### 3.1. Caratterizzazione del tumore mammario HER2-low

L'analisi del profilo di espressione genica, la rivalutazione di HER2 e la determinazione della presenza di TILs sono state condotte su blocchetti FFPE (*formalin-fixed, paraffin-embedded*) di archivio delle pazienti arruolate presso i diversi centri partecipanti.

I blocchetti considerati idonei per l'analisi molecolare alla valutazione del patologo (quantità di tessuto tumorale infiltrante superiore al 50%) sono stati sottoposti ad estrazione e valutazione quali-quantitativa dell'RNA; i campioni adeguati sono stati successivamente analizzati con il pannello *nCounter*® BC360 su piattaforma Nanostring.

In **Figura 15** è schematizzato il *workflow* sperimentale.



**Figura 15.** Disegno sperimentale

### 3.2. Criteri di inclusione ed esclusione

Sono stati inclusi nello studio campioni provenienti da pazienti precedentemente arruolate presso i centri partecipanti in studi clinici randomizzati condotti nel setting adiuvante del Consorzio GIM, in particolare:

1. Lo studio **GIM2** ha randomizzato 2.003 pazienti con carcinoma mammario con coinvolgimento linfonodale, in pre- e post-menopausa, a ricevere chemioterapia adiuvante a *dose-dense* oppure a intervalli standard (Del Mastro L. et al., 2015).

2. Lo studio **GIM4-LEAD** ha randomizzato 2.096 pazienti in post-menopausa con carcinoma mammario, che avevano ricevuto 2–3 anni di tamoxifene adiuvante, a ricevere letrozolo adiuvante per 5 anni oppure per 2–3 anni (Del Mastro L. et al., 2021)
3. Lo studio **GIM10-CONSENT** ha randomizzato 1.000 pazienti in post-menopausa con carcinoma mammario a ricevere terapia adiuvante chemio-endocrina in modalità concomitante oppure sequenziale.

Erano eleggibili per il progetto tutte le pazienti arruolate negli studi **GIM2, GIM4 e GIM10** presso ciascuna unità di ricerca e con diagnosi di carcinoma mammario ER+/HER2-negativo o ER+/HER2-indeterminato al referto anatomopatologico iniziale. Questi i criteri di inclusione:

1. Diagnosi di carcinoma mammario invasivo in fase precoce.
2. Carcinoma mammario HER2-negativo definito come: espressione di HER2 pari a 0 o 1+ all'immunoistochimica (IHC), oppure espressione di HER2 pari a 2+ all'IHC in assenza di amplificazione del gene ERBB2 rilevata mediante ibridazione in situ fluorescente (FISH).
3. Carcinoma mammario con recettori estrogenici positivi (ER-positivo) definito come: espressione del recettore per gli estrogeni  $\geq 1\%$  valutata mediante IHC a livello locale.
4. Consenso informato firmato.

Sono stati esclusi dallo studio i campioni caratterizzati da:

1. Espressione di HER2 pari a 3+ alla valutazione IHC.
2. Espressione di HER2 pari a 2+ con amplificazione genica confermata mediante FISH.

### **3.3. Preparazione, caratterizzazione immunoistochimica e valutazione dell'adeguatezza delle sezioni di tumore per analisi molecolari**

- Sezione, rivalutazione di HER2 e valutazione dei TILs

I blocchetti di tessuto FFPE sono stati sezionati presso la UO Anatomia Patologia dei centri di appartenenza, mediante microtomo. Le sezioni ottenute sono state utilizzate per diverse analisi, tra cui:

- Selezione dei blocchetti: presso il Policlinico San Martino inizialmente è stata effettuata la valutazione su sezioni colorate con ematossilina–eosina dei blocchetti, ove possibile sull'incluso su cui erano state eseguite le valutazioni dei biomarcatori (ER, PgR e HER2) alla diagnosi, al fine di selezionare i campioni con una percentuale di tessuto tumorale infiltrante superiore al 50%.
- La rivalutazione dello stato di HER2 si è resa necessaria per aggiornare lo stato di HER2, incluso il sottotipo HER2-*low*, in quanto il tessuto primitivo delle

pazienti arruolate, trattandosi di uno studio retrospettivo che include campioni di archivio fino all'anno 2002, era stato originariamente classificato secondo indicazioni e linee guida differenti rispetto all'aggiornamento ASCO/CAP 2018 (Wolff AC. et al., 2018). Inoltre, nel corso del progetto, nuovi dati clinici e di consenso — in particolare provenienti dallo studio *DESTINY-Breast06* e dal consenso della *European Society for Medical Oncology* sul carcinoma mammario *HER2-low* — hanno evidenziato la potenziale rilevanza di distinguere i tumori *HER2 0-null* da quelli *HER2-ultralow* all'interno della più ampia categoria *HER2-0*. Vengono classificati come *HER2-ultralow* i tumori che presentano colorazione di membrana molto debole, incompleta e appena percettibile in  $\leq 10\%$  delle cellule tumorali. Considerata la novità di questo concetto e la limitata letteratura disponibile, il progetto ha incorporato questa classificazione rivista. La rivalutazione è stata effettuata da patologi di riferimento utilizzando l'anticorpo primario monoclonale Ventana 4B5 (Roche), e interpretata secondo le linee guida attuali per lo *scoring* dell'espressione di *HER2*.

- Valutazione dei linfociti infiltranti tumore (TILs): questa è stata eseguita da patologi di riferimento secondo le linee guida internazionali *dell'International Immuno Oncology Biomarker Working Group* (Salgado R et al., 2015, Dieci MV. et al., 2018). I TILs sono stati quantificati e riportati come variabile continua, espressa come percentuale della componente stromale occupata da cellule immunitarie mononucleate, escludendo aree necrotiche e tessuto normale.

### **3.4. Estrazione dell'RNA da FFPE**

L'estrazione dell'RNA totale da 2 sezioni di tessuto da 10  $\mu\text{m}$  di carcinoma mammario FFPE è stata eseguita utilizzando *l'RNAeasy-FFPE Kit* (Qiagen). La procedura di estrazione è stata condotta secondo il protocollo fornito dal produttore:

- Deparaffinazione

Le sezioni di tessuto, raccolte in *ependorf DNA LoBind*, sono state sottoposte a deparaffinazione mediante trattamento con 1 mL di xilene, seguita da vortex e centrifugazione per 2 minuti a massima velocità. Il surnatante è stato rimosso e il pellet risospeso in 1 mL di etanolo assoluto, quindi sottoposto a vortex e centrifugazione per 2 minuti a massima velocità. Dopo la rimozione del surnatante, i campioni sono stati incubati con tappo aperto per 10 minuti a 37 °C, al fine di favorire l'evaporazione dei solventi residui.

- Digestione proteica

Al pellet sono stati aggiunti 150 µL di *Buffer PKD*, dopo vortex e breve centrifugata sono stati aggiunti 10 µL di Proteinasi K. Successivamente i campioni sono stati sottoposti a breve vortex e incubati in agitazione a 600 rpm prima a 56 °C per 15 minuti, poi a 80 °C per 30 minuti, al fine di favorire la rimozione dei *cross-link* indotti dalla formalina.

I campioni sono stati poi raffreddati in ghiaccio per 3 minuti e centrifugati per 15 minuti a 20 °C e 20.000 g.

- Isolamento e purificazione dell'RNA

Il surnatante è stato trasferito in una nuova *eppendorf DNA LoBind* da 2 mL, incubato con DNasi mix composta da 16 µL di *Booster Buffer* e 10 µL di DNasi per 15 minuti a 20 °C, al fine di rimuovere eventuali contaminazioni di DNA genomico.

Sono stati aggiunti 320 µL di *Buffer RBC*, sottoposti a vortex, poi 720 µL di etanolo assoluto è stato integrato mixando col puntale la soluzione ottenuta. Il campione è stato caricato progressivamente (650 µL per volta) su colonne a membrana di silice e centrifugato per 30 secondi a 8.000 g eliminando *il flow-through* dopo ciascun passaggio.

La fase di lavaggio ha incluso due passaggi con 500 µL di *Buffer RPE*, ciascuno seguito da centrifugazione per 30 secondi a 8.000 g. Dopo l'ultimo lavaggio è stata effettuata una centrifugazione di 2 minuti a 8.000 g. Le colonne sono state infine centrifugate con tappo aperto per 5 minuti a 13.000 rpm, al fine di eliminare residui di solventi.

- Eluizione

Le colonnine sono state posizionate in *eppendrof DNA LoBind* da 1,5 mL e l'RNA è stato eluito in 22 µL di *RNase-free water* tramite centrifugazione a 13.000 rpm per 4 minuti. Una seconda eluizione in 20 µL, tenuta separata dalla prima, è stata eseguita per verificare il completo recupero RNA dalla membrana. Il materiale estratto è stato conservato a -80°C. Un'aliquota di 4-5 µL, utilizzata per i controlli quali-quantitativi, è stata conservata a +4 °C per un massimo di 24 ore.

### **3.5. Valutazione di quantità e qualità dell'RNA**

La concentrazione e la purezza dell'RNA estratto sono state valutate mediante spettrofotometria utilizzando lo strumento *NanoDrop® ND-1000* (Thermo Fisher Scientific). Per ciascuna misurazione, 1 µL di campione è stato depositato direttamente sulla superficie di rilevamento ottico (*pedestal*).

Dopo la chiusura del braccio ottico, è stata misurata l'assorbanza e lo strumento ha fornito automaticamente i valori di concentrazione (ng/μL) e i rapporti di purezza A260/A280 e A260/A230, utilizzati come indicatori della presenza di contaminanti proteici o di residui di reagenti di estrazione. Valori compresi tra 1,6 e 2,1 sono stati considerati indicativi di una qualità adeguata dell'RNA per il proseguimento delle analisi.

Sulla base dei valori di concentrazione ottenuti mediante *NanoDrop*®, i campioni sono stati analizzati mediante il sistema *Agilent Technologies TapeStation 2200* (Agilent Technologies). In particolare, è stato utilizzato il kit per RNA Standard, idoneo per campioni con concentrazione compresa tra 25 e 500 ng/μL.

Per la preparazione, 1 μL di RNA è stato aggiunto a 5 μL di *RNA Sample Buffer*, sottoposto a vortex per 1 minuto a 2.000 rpm usando IKA MS3 vortexer (Agilent Technologies) e centrifugato brevemente.

Per denaturare i campioni, la mix è stata quindi incubata a 72 °C per 3 minuti e successivamente raffreddata in ghiaccio per 2 minuti.

Dopo una breve centrifugazione, i campioni sono stati caricati sulla *TapeStation* insieme alla cartuccia di analisi, necessaria per la gestione automatizzata del test. La separazione elettroforetica automatizzata ha generato elettroferogrammi e fornito, per ciascun campione, il valore di *RNA Integrity Number* (RIN). Il RIN è un indice numerico compreso tra 1 (RNA completamente degradato) e 10 (RNA integro). Considerata la natura del materiale FFPE, lo stato e la lunga durata di conservazione, valori di RIN intorno a 2 sono stati considerati adeguati alle successive analisi trascrittomiche.

Successivamente la concentrazione di RNA determinata mediante analisi spettrofotometrica è stata normalizzata tenendo conto della distribuzione dimensionale dei frammenti ottenuta da analisi *TapeStation*, in particolare è stato impostato come valore soglia la percentuale di frammenti di lunghezza  $\geq 301$  paia di basi, definita a priori come criterio operativo per discriminare i frammenti considerati utilizzabili.

### **3.6. Profilazione trascrittomiche**

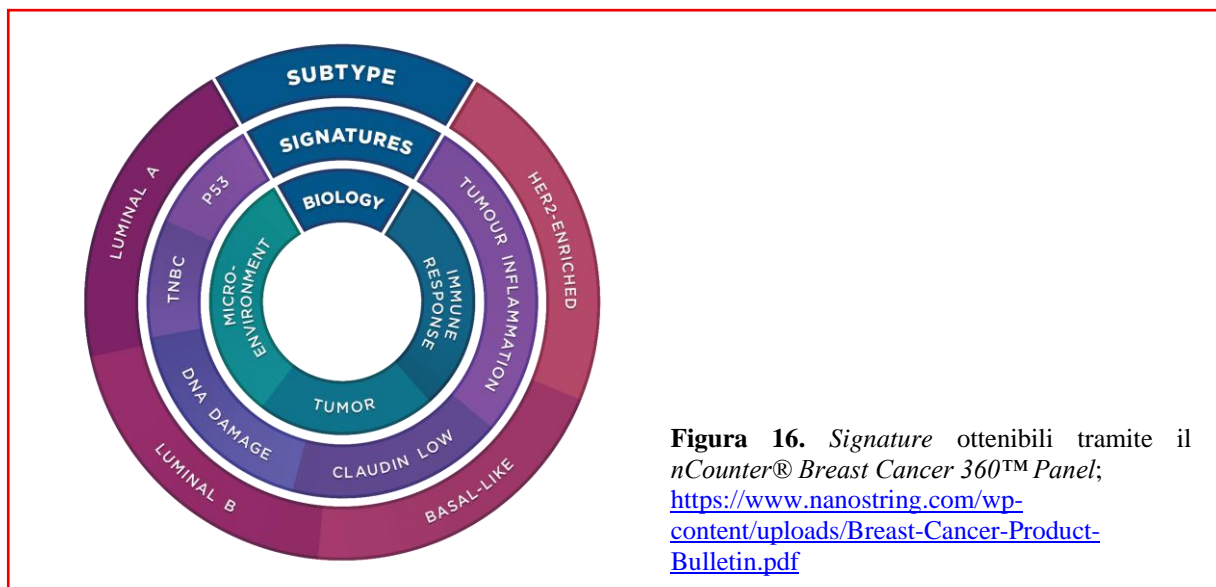
L'analisi di espressione genica è stata eseguita mediante la piattaforma *NanoString nCounter*® (Bruker Corporation), tecnologia che consente la quantificazione diretta delle molecole di RNA senza necessità di retrotrascrizione o amplificazione enzimatica. Il pannello utilizzato, *nCounter*® *Breast Cancer 360*™, offre una visione completa a 360 gradi dell'espressione genica nel tumore mammario, del microambiente tumorale e della risposta immunitaria.

La tecnologia consente la valutazione simultanea dell'espressione di 776 geni selezionati, organizzati in 48 firme biologiche funzionalmente rilevanti.

Tra le firme incluse nel pannello sono presenti firme analiticamente validate, quali:

- PAM50 utilizzata per la classificazione molecolare dei sottotipi intrinseci di carcinoma mammario.
- *Tumor Inflammation Signature* (TIS) indicativa dello stato infiammatorio e dell'attivazione della risposta immunitaria nel microambiente tumorale.

Le 48 firme sono a loro volta raggruppate in 13 categorie biologiche che rappresentano diversi aspetti della biologia del tumore: la proliferazione cellulare; la regolazione del ciclo cellulare; la segnalazione ormonale, l'angiogenesi; l'invasività tumorale; la risposta immunitaria e lo stato infiammatorio o (**Figura 16**).



Nel pannello comprendente 776 geni, 18 sono classificati come geni *housekeeping* (**Tabella 2**) e utilizzati per la normalizzazione biologica dei dati, consentendo di correggere le variazioni legate alla quantità e alla qualità dell'RNA in ingresso e di verificare l'idoneità del campione all'analisi. Il pannello include inoltre 6 controlli positivi e 8 controlli negativi, impiegati per monitorare la corretta esecuzione delle diverse fasi tecniche del protocollo.

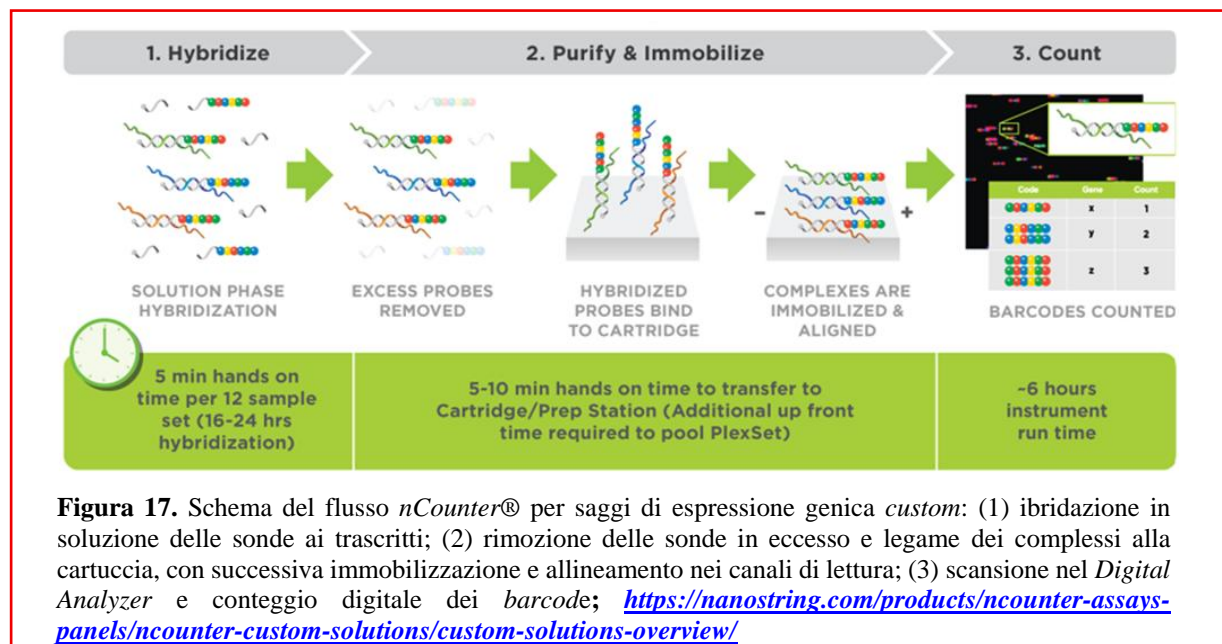
I controlli positivi sono costituiti da sonde sintetiche non complementari a sequenze umane, aggiunte a concentrazioni note comprese in un intervallo lineare da 128 fM a 0.125 fM, e consentono di valutare l'efficienza delle fasi di ibridazione, immobilizzazione dei complessi sulla cartuccia e acquisizione del segnale. Deviazioni significative dai valori attesi indicano un potenziale fallimento tecnico della corsa analitico.

I controlli negativi, invece, sono costituiti da sonde prive di complementarità con il materiale biologico e permettono di stimare il livello di rumore di fondo; un aumento del segnale associato a tali controlli è indicativo di ibridazione aspecifica o di contaminazione.

**Tabella 2.** Lista dei geni *housekeeping* del pannello *nCounter® Breast Cancer 360™*.

Lista geni Housekeeping		
ABCF1	OAZ1	SF3A1
ACTB	POLR2A	STK11IP
G6PD	PSMC4	TBC1D10B
GUSB	PUM1	TBP
MRPL19	RPLP0	TFRC
NRDE2	SDHA	UBB

L'intero processo analitico si articola in tre fasi principali (**Figura 17**):



Al fine di ottenere 300 ng di RNA costituito da frammenti di lunghezza  $\geq 301$  paia di basi (bp), la concentrazione misurata mediante *Nanodrop®* è stata normalizzata sulla base della percentuale di frammenti  $\geq 301$  bp determinata tramite analisi su *TapeStation*.

La concentrazione finale, destinata alle successive analisi trascrittomiche, doveva essere contenuta in un totale di 5  $\mu$ l (input iniziale come da specifiche per l'analisi su piattaforma *nCounter®*).

Qualora la concentrazione iniziale risultasse superiore a quella richiesta, i campioni sono stati diluiti con acqua *RNAse-free*; nei casi in cui la concentrazione iniziale fosse inferiore, ma il volume disponibile sufficiente, il campione è stato concentrato mediante evaporazione del solvente in *SpeedVac* e successivamente risospeso in acqua *RNAse-free*.

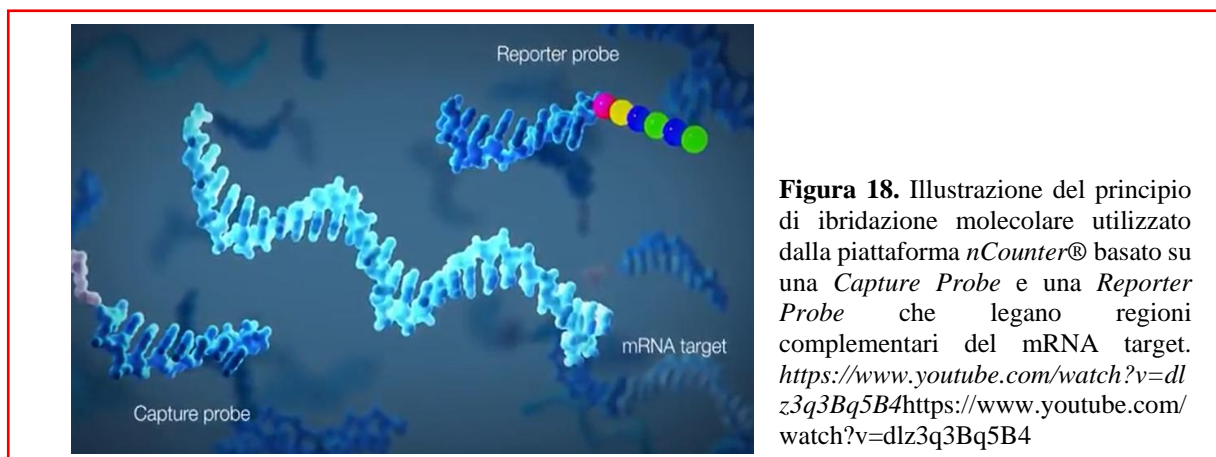
In considerazione della natura estremamente degradata dell'RNA estratto, per alcuni campioni è stata caricata una concentrazione di RNA inferiore, ma sempre superiore a 100 ng normalizzati come sopra.

### 1. Ibridazione

Per ciascun campione è stata preparata una *Hybridization Master Mix* mescolando 70  $\mu\text{L}$  di *Hybridization Buffer* con 42  $\mu\text{L}$  di *Reporter Probe*. Da questa mix, 8  $\mu\text{L}$  sono stati distribuiti in ciascun pozzetto della *strip*, ai quali sono stati aggiunti 5  $\mu\text{L}$  del campione e 2  $\mu\text{L}$  di *Capture Probe*. La *strip* è stata sigillata, miscelata delicatamente per garantire l'omogeneità, e incubata in termociclatore *Mastercycler Nexus* (Eppendorf) a 65 °C per 20 ore.

Le sonde utilizzate sono:

- Sonda di cattura (*Capture Probe*): complementare a una regione del gene target e marcata con biotina, permettendo l'immobilizzazione del complesso su una superficie solida all'interno della cartuccia, legandosi alla streptavidina.
- Sonda reporter (*Reporter Probe*): complementare a un'altra regione del gene target e contenente un codice a barre fluorescente univoco, che consente l'identificazione e la quantificazione simultanea di ciascun trascritto del pannello BC360 (**Figura 18**).



Poiché il presente studio comprende esperimenti condotti nell'arco di tre anni, utilizzando lotti di reagenti differenti, eseguiti in centri diversi dislocati sul territorio nazionale e caratterizzati dall'impiego di differenti lotti del pannello BC360 oltre che differenti condizioni sperimentali e strumenti di analisi, si è resa necessaria l'adozione di standard di controllo al fine di

normalizzare i dati per le analisi successive, in particolare quella effettuata in *outsourcing* dalla Bruker. A tal fine sono stati utilizzati due differenti standard di controllo: il *Panel Standard* e il *Referance Sample*.

Il *Panel Standard* consiste in un pool di oligonucleotidi di DNA sintetico corrispondenti alle sequenze target delle sonde BC360, che viene analizzata su ogni cartuccia dell'esperimento per la normalizzazione dei geni non-PAM50. Per la sua preparazione, 4,5  $\mu\text{L}$  di campione sono stati diluiti con 33  $\mu\text{L}$  di acqua *RNAse-free*; successivamente, 5  $\mu\text{L}$  della soluzione diluita sono stati caricati in una corsia dedicata, in sostituzione di un campione biologico, per ciascun lotto di reagenti.

Il *Referance Sample* è costituito da un campione di RNA di riferimento contenente le sequenze target delle sonde PAM50, utilizzata per la normalizzazione dei geni PAM50. Per ciascun lotto di reagenti, il *Referance Sample* è stato caricato tal quale, utilizzando un volume di 5  $\mu\text{L}$ , in una corsia dedicata in sostituzione di un campione biologico.

## 2. Caricamento e immobilizzazione

Al termine dell'ibridazione, la mix di reazione è stata caricata sulla *Prep Station* utilizzando il protocollo *High Sensitivity*, che aumenta il legame di tutte le molecole al vetrino di circa due volte ed è raccomandato per ottenere una risoluzione più elevata. Il protocollo prevede l'impiego di materiali di consumo dedicati, quali cartucce, piastre contenenti i reagenti per la purificazione, puntali e guaine (**Figura 19**). La cartuccia è stata inserita assicurandosi che gli elettrodi entrassero perfettamente in posizione (**Figura 20**).

All'interno della cartuccia, le sonde di cattura immobilizzano i complessi sonda-RNA-sonda all'interno dei canali di lettura microfluidici, consentendo un allineamento ordinato delle molecole (**Figura 21**). Questo posizionamento è fondamentale per garantire una corretta rilevazione ottica nella fase successiva.





**Figura 20.** Cartuccia inserita in modo da avere elettrodi in posizione corretta. Materiale informativo

[https://nanosting.com/wp-content/uploads/MAN-C0035\\_nCounter\\_Analysis\\_System\\_MAX\\_FLEX.pdf](https://nanosting.com/wp-content/uploads/MAN-C0035_nCounter_Analysis_System_MAX_FLEX.pdf)



**Figura 21. A.** Le *capture probes* consentono il legame del complesso sonda-campione con la superficie della cartuccia. **B.** Il legame garantisce l'immobilizzazione e l'allineamento del campione ibridato per la lettura dell'analizzatore. Materiale informativo:

[https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-7834-2\\_5](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-7834-2_5)

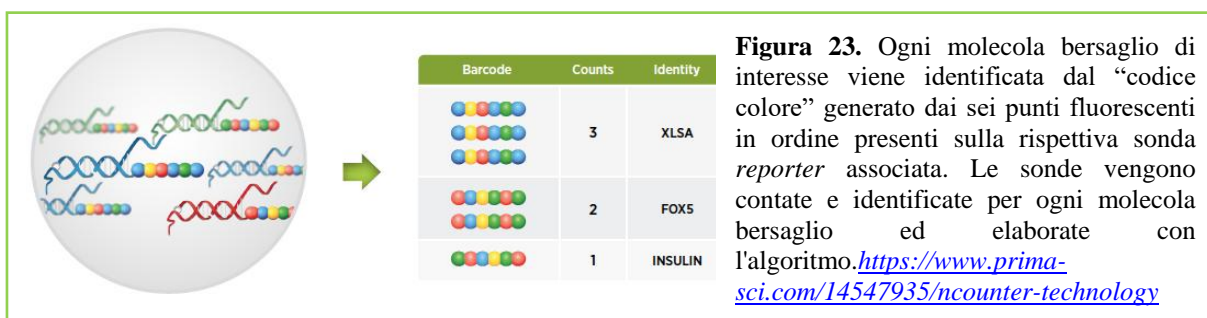
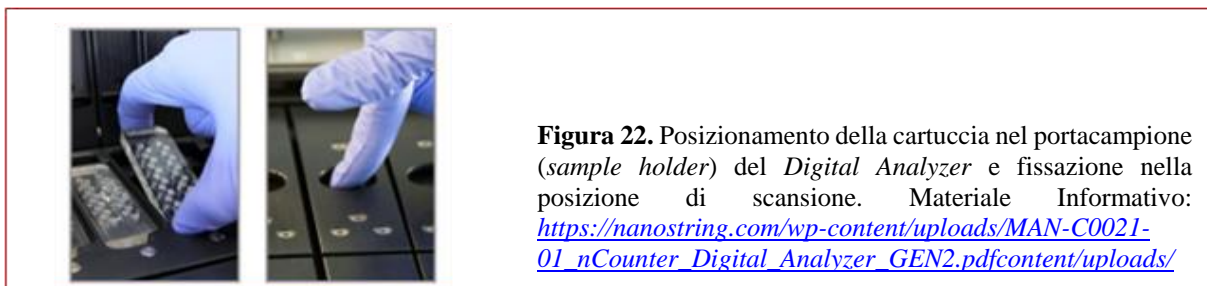
### 3. nCounter® Pro Digital Analyzer

Al termine della corsa, le cartucce sono state sigillate tramite l'applicazione di un film trasparente sopra i pozzetti e caricate nel *Digital Analyzer* (**Figura 22**), dove i complessi sonda-RNA-sonda vengono rilevati otticamente in modo automatizzato. Ogni molecola bersaglio di interesse è identificata dal “codice colore” generato dai sei marcatori fluorescenti presenti in sequenza sulla sonda *reporter* corrispondente. Le sonde vengono contate e identificate per ciascuna molecola bersaglio ed elaborate tramite un algoritmo dedicato (**Figura 23**).

Il file RLF (*Reporter List File*), contenente le informazioni sui reporter fluorescenti e sui codici colore associati alle molecole bersaglio, è stato trasferito all'analizzatore tramite la chiavetta USB fornita dalla ditta al momento dell'acquisto del pannello.

Ogni singola corsia scansionata è suddivisa in diverse centinaia di sezioni di *imaging*, chiamate FOV (*Field of View*). Il sistema acquisisce le immagini di ciascun FOV separatamente e ne somma i conteggi di codice a barre per ottenere i dati grezzi finali per ogni target. Durante l'analisi, è stato impostato come FOV il valore massimo corrispondente a 555, in modo da garantire la massima sensibilità e gamma dinamica nella rilevazione.

Al termine dell'analisi, i dati sono stati scaricati direttamente come file RCC sulla stessa chiavetta USB citata in precedenza.



### 3.7. Analisi dei dati

#### 1. Controllo qualitativo preliminare del dato tramite *nSolver software*

Dopo l'acquisizione dei dati mediante piattaforma *NanoString nCounter*®, i file grezzi generati dallo strumento (formato RCC) sono stati inizialmente analizzati in laboratorio utilizzando il software *nSolver* (NanoString Technologies) al fine di effettuare un primo controllo preliminare della qualità dell'analisi e verificare l'idoneità dei dati per le successive analisi bioinformatiche. Durante questa fase sono stati considerati i principali parametri di qualità:

- *Imaging QC*: indica il numero di FOV (*Fields of View*) effettivamente acquisiti dall'analizzatore. Questo parametro è considerato adeguato quando la percentuale del rapporto tra le FOV contate e quelle attese è  $\geq 75\%$ . Valori inferiori possono indicare problemi nella fase di *imaging* e possono essere influenzati da una superficie della cartuccia non perfettamente pulita (ad esempio presenza di polvere o impronte) o da un posizionamento non corretto della cartuccia all'interno dell'analizzatore.
- *Binding Density (BD)*: rappresenta il numero di *reporter* rilevati dallo strumento per unità di superficie ( $\mu\text{m}^2$ ) in ciascuna corsia ed è un indicatore del grado di occupazione della superficie di lettura. Questo parametro consente di valutare se l'acquisizione dei dati sia avvenuta in condizioni ottimali o se sia stata compromessa da fenomeni di saturazione dell'immagine dovuti alla sovrapposizione dei codici. Valori compresi tra 0,1 e 2,25 sono considerati ottimali, in quanto garantiscono un'adeguata separazione dei

*reporter* e una quantificazione accurata dei segnali. La BD può essere influenzata dalla quantità di materiale di *input*, dalla dimensione del *CodeSet* (un *CodeSet* più ampio aumenta la probabilità di valori elevati di BD) e dal livello di espressione genica dei target analizzati.

- Linearità dei controlli positivi: i controlli positivi valutano l'efficienza della reazione di ibridazione e la linearità del saggio. La linearità viene misurata tramite  $R^2$ , calcolato con regressione tra le concentrazioni note e i conteggi  $\log_2$  trasformati. Un  $R^2 \geq 0,95$  indica prestazioni ottimali. Questo parametro può essere influenzato da rare interazioni sonda-campione o da bassa efficienza del saggio; in quest'ultimo caso, i conteggi molto bassi compromettono la linearità e rendono i dati non affidabili.
- Limite di rilevazione (LOD QC): è un parametro che valuta la capacità del saggio di rilevare quantità molto basse di trascritti, usando come riferimento la sonda di controllo positivo a 0,5 fM e serve a verificare se il sistema è sufficientemente sensibile per distinguere segnali reali dal *background*. Per essere accettabile deve superare di almeno due deviazioni standard la media dei controlli negativi. È influenzato da: *background* elevato, dovuto a miscelazione prematura, tempi eccessivi, ibridazioni crociate dei controlli negativi; o conteggi positivi bassi causati da ibridazione inefficiente, temperatura sub-ottimale del termociclatore o impurità nel campione.

Qualora uno, più o tutti i parametri di controllo qualità risultino fuori range, il campione viene contrassegnato con una bandierina (*flag*). In base al numero e all'entità delle deviazioni, spetta all'operatore valutare se la lettura sia comunque adeguata o se sia necessario ripetere o escludere l'analisi.

## 2. Analisi dei dati (Bruker-Digital Analysis Software)

L'analisi finale su tutti i campioni è stata affidata in *outsourcing* dalla ditta Bruker che ha utilizzato il *software* DAS (*Digital Analysis Software*), piattaforma dedicata all'elaborazione e all'interpretazione dei dati di espressione genica ottenuti con tecnologia *NanoString nCounter*®.

Il *workflow* analitico, comprende diverse fasi:

Importazione dei dati grezzi: i file RCC generati dallo strumento vengono importati nel *software* DAS, che consente il controllo iniziale della qualità dei dati.

- Controllo di qualità: durante questa fase vengono valutati i parametri di *performance* del saggio, inclusi: controlli positivi e negativi, efficienza dell'ibridazione, qualità complessiva del campione (*Imaging QC*, *Binding Density*, *Positive Control Linearity*,

LOD QC). I campioni che non soddisfano i criteri di qualità vengono esclusi dalle analisi successive.

- Normalizzazione dei dati: finalizzata a correggere eventuali differenze tecniche tra cartucce. La normalizzazione in BC360 prevede l'utilizzo di geni *housekeeping*, *Panel Standard* e *Referance Sample*, secondo la *pipeline* prevista dal pannello.

In dettaglio: l'espressione di geni non-TIS e non-PAM50 è stata normalizzata calcolando il rapporto tra il valore di espressione del gene e la media geometrica di tutti gli *housekeeping* presenti nel pannello. L'espressione di geni appartenenti alla firma TIS (*Tumor Inflammation Signature*) è stata normalizzata calcolando il rapporto tra il valore di espressione del gene e la media geometrica di soli geni *housekeeping* specialmente associati alla firma TIS (*ABCF1, NRDE2, G6PD, OAZ1, POLR2A, SDHA, STK11IP, TBC1D10B, TBP, UBB*). L'espressione di geni appartenenti alla firma PAM50 è stata normalizzata calcolando il rapporto tra il valore di espressione del gene e la media geometrica di soli geni *housekeeping* associati alla firma PAM50 (*TFRC, ACTB, MRPL19, PSMC4, PUM1, RPLP0, SF3A1, GUSB*). Per i geni non appartenenti a PAM50 *signature*, i dati sono stati ulteriormente normalizzati utilizzando il *Panel Standard*, calcolando il rapporto tra il valore normalizzato e il valore corrispondente del *Panel Standard* analizzato sulla stessa cartuccia; in assenza di questo, sono stati usati i valori ottenuti da una corsa appartenente allo stesso lotto di *codeset*.

Per i geni appartenenti alla firma PAM50, i dati sono stati ulteriormente normalizzati utilizzando il *Reference Sample*, cioè campione di riferimento appartenente allo stesso lotto. Infine, i dati così normalizzati sono stati sottoposti a trasformazione logaritmica in base 2.

- Analisi di espressione differenziale DAS: permette di confrontare due o più gruppi sperimentali per identificare geni diversamente espressi, applicando test statistici appropriati e correzioni per confronti multipli.
- Analisi avanzate: identificazione di firme geniche, sottotipi molecolari (es. PAM50), analisi del microambiente tumorale e della risposta immunitaria, analisi di sopravvivenza (OS, PFS), visualizzazione dei dati tramite *heatmap* e grafici di espressione.
- Esportazione dei risultati: i risultati possono essere esportati in formato tabellare e grafico per ulteriori analisi statistiche o per la reportistica.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1. Arruolamento delle pazienti

Per studiare il carcinoma mammario ER+/HER2-*low* ed ER+/HER2-0 in diversi contesti e in base a differenti strategie terapeutiche, nello studio retrospettivo multicentrico NextGIM, sono stati raccolti campioni tumorali provenienti da tre studi clinici randomizzati di fase III del GIM *Investigator Group*, GIM2, GIM4 e GIM10.

Sono state arruolate 320 pazienti le cui caratteristiche cliniche e biologiche al *baseline* sono riportate in tabella 3. In questa coorte l'età mediana era di 59 anni (IQR 51-66). La maggior parte dei pazienti presentava carcinomi T1 (185; 57,8%) e una malattia linfonodi positivi (205; 64,1%) (**Tabella 3**).

**Tabella 3.** A) Caratteristiche cliniche e regimi terapeutici; B) Caratteristiche anatomo-patologiche dei tumori.

#### A

Caratteristiche Cliniche e Terapia	Popolazione Totale N (%) n=320
Età mediana all'arruolamento (IQR)	59 (51 to 66)
<b>GIM study</b>	
GIM2	115 (35.9)
GIM4	132 (41.3)
GIM10	69 (21.6)
Unknown	4 (1.3)
<b>Stato Menopausale</b>	
Pre-menopausa	55 (17.2)
Post-menopausa	247 (77.2)
Unknown	18 (5.6)
<b>Chemioterapia</b>	
Si	248 (77.5)
No	60 (18.8)
Unknown	12 (3.8)
<b>Tipo di Terapia Endocrina</b>	
Tamoxifen	21 (6.6)
Tamoxifen + LHRHa	15 (4.7)
Solo AI	87 (27.2)
Tamoxifen e AI (± LHRHa)	163 (50.9)
Unknown	34 (10.6)

#### B

Caratteristiche Tumorali	Popolazione Totale N (%) n=320
<b>Tumor grade</b>	
G1	22 (6.9)
G2	193 (60.3)
G3	90 (28.1)
Unknown	15 (4.7)
<b>Tumor size</b>	
T1	185 (57.8)
T2	104 (32.5)
T3-T4	26 (8.1)
Unknown	5 (1.6)
<b>Nodal Status</b>	
N0	101 (31.6)
N1	144 (45.0)
N2	45 (14.1)
N3	16 (5.0)
Unknown	14 (4.4)
<b>ER value</b>	
1-10	6 (1.9)
11-50	30 (9.4)
51-80	68 (21.3)
81-100	204 (63.8)
Unknown	12 (3.8)
<b>Stato di HER2 alla Diagnosi</b>	
HER2 negativo con unknown IHC score	108 (33.8)
HER2 0	106 (33.1)
HER2 1+	64 (20.0)
HER2 2+	42 (13.1)

## 4.2. Selezione dei campioni biologici

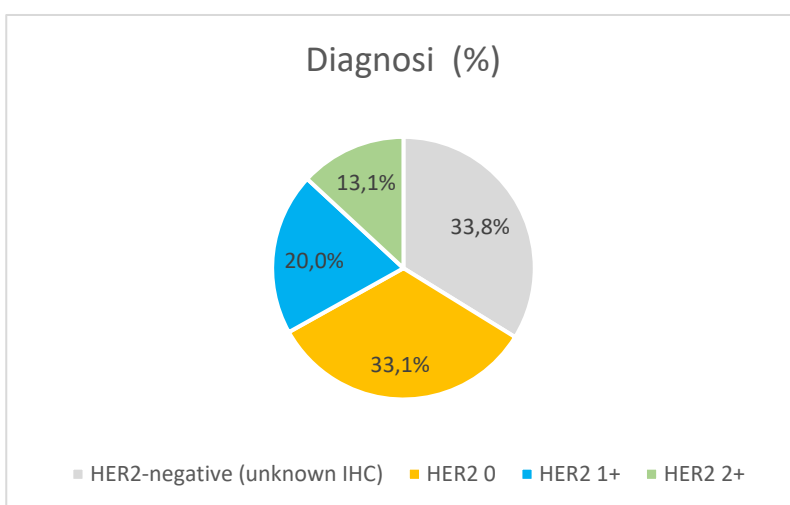
A fronte di 320 pazienti selezionate dai centri partecipanti, una quota di campioni è stata esclusa dall'analisi a causa di una quantità di materiale biologico insufficiente o di qualità non idonea: tale analisi comprendeva infatti anche la verifica della cellularità tumorale, requisito necessario per confermare l'idoneità alle analisi molecolari pianificate. Pertanto, 289 campioni sono stati rivalutati per HER2 e 286 sono stati profilati con il pannello BC360, mentre la valutazione dei TILs è stata effettuata in 284 casi. Presso il San Martino sono stati selezionati ed analizzati un totale di 187 campioni.

## 4.3. Rivalutazione dello stato di HER2

Considerando il totale di 320 casi disponibili alla diagnosi, 108 tumori (33.8%) sono stati classificati come HER2-negativi con score IHC sconosciuto, 106 (33.1%) come HER2-0, 64 (20%) come HER2 1+ e 42 (13,1%) come HER2 2+ senza amplificazione FISH (**Tabella 4**, **Figura 24**).

**Tabella 4.** Valori di espressione di HER2 alla diagnosi.

VALUTAZIONE ALLA DIAGNOSI	Popolazione (N)	(%)
<b>HER2-negativo (<i>unknown</i> IHC)</b>	108	33,8%
<b>HER2 0</b>	106	33,1%
<b>HER2 1+</b>	64	20,0%
<b>HER2 2+</b>	42	13,3%



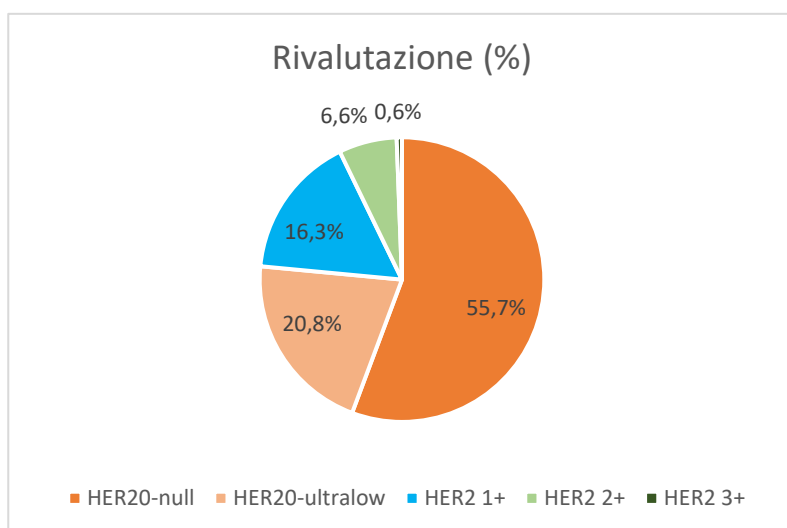
**Figura 24.** Distribuzione degli *score* immunostochimici (IHC) di HER2 alla diagnosi nelle pazienti in studio. Il grafico a torta rappresenta le percentuali delle diverse categorie di espressione di HER2.

È stato possibile rivalutare mediante immunisto chimica 289 campioni tumorali.

In particolare, 161 (55,7%) sono stati classificati come HER2 0-null, 60 (20,8%) come HER2-*ultralow*, 47 (16,3%) come HER2 1+, 19 (6,6%) come HER2 2+ e 2 (0,6%) come HER2 3+.

**Tabella 5.** Valori di espressione di HER2 rivalutati.

<b>RIVALUTAZIONE</b>	<b>Popolazione (N)</b>	<b>(%)</b>
<b>HER2 0-null</b>	161	55,7%
<b>HER2-<i>ultralow</i></b>	60	20,8%
<b>HER2 1+</b>	47	16,3%
<b>HER2 2+</b>	19	6,6%
<b>HER2 3+</b>	2	0,6%



**Figura 25.** Distribuzione degli *score* immunisto chimici (IHC) di HER2 alla rivalutazione nelle pazienti in studio.

Il grafico a torta rappresenta le percentuali delle diverse categorie di espressione di HER2.

Inoltre, è stato osservato che lo stato HER2 (0-null, -ultralow, 1+, 2+) è risultato significativamente associato a diversi parametri clinico-patologici (grado e dimensione del tumore), oltre che dallo studio in cui le pazienti erano state arruolate inizialmente (**Tabella 6**).

**Tabella 6.** Parametri clinico-patologici e associazione con lo stato di HER2 (0-null, 1+, 2+): Sono messi in evidenza i parametri correlati con il valore di espressione.

	<b>HER2 0 - null</b> N (%) n=161	<b>HER2- ultralow</b> N (%) n=60	<b>HER2 1+</b> N (%) n=47	<b>HER2 2+</b> N (%) n=19	<b>P value</b>
<b>Anno di Chirurgia</b>					0.072
2001-2010	127 (78.9)	41 (68.3)	29 (61.7)	13 (68.4)	
2011-2026	30 (18.6)	17 (28.3)	16 (34.0)	6 (31.6)	
Unknown	4 (2.5)	2 (3.3)	2 (4.3)	0 (0.0)	
<b>Età mediana all'arruolamento (IQR)</b>	59 (51 to 67)	61 (53 to 67)	60 (51 to 66)	61 (53 to 70)	0.774
<b>GIM study</b>					0.040
GIM2	56 (34.8)	23 (38.3)	18 (38.3)	9 (47.4)	
GIM4	74 (46.0)	20 (33.3)	12 (25.5)	3 (15.8)	
GIM10	30 (18.6)	17 (28.3)	16 (34.0)	5 (26.3)	
Unknown	1 (0.6)	0 (0.0)	1 (2.1)	2 (10.5)	
Unknown	25 (15.5)	13 (21.7)	10 (21.3)	6 (31.6)	
<b>Tumor grade</b>					0.022
G1	11 (6.8)	5 (8.3)	2 (4.3)	0 (0.0)	
G2	105 (65.2)	33 (55.0)	26 (55.3)	7 (36.8)	
G3	37 (23.0)	18 (30.0)	19 (40.4)	12 (63.2)	
Unknown	8 (5.0)	4 (6.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	
<b>Tumor size</b>					0.004
T1	102 (63.4)	36 (60.0)	22 (46.8)	4 (21.1)	
T2	45 (28.0)	21 (35.0)	19 (40.4)	12 (63.2)	
T3-T4	12 (7.5)	2 (3.3)	6 (12.8)	3 (15.8)	
Unknown	2 (1.2)	1 (1.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	
<b>Nodal status</b>					0.081
N0	51 (31.7)	21 (35.0)	12 (25.5)	2 (10.5)	
N1	73 (45.3)	28 (46.7)	21 (44.7)	10 (52.6)	
N2	22 (13.7)	7 (11.7)	10 (21.3)	3 (15.8)	
N3	8 (5.0)	2 (3.3)	1 (2.1)	4 (21.1)	
Unknown	7 (4.4)	2 (3.3)	3 (6.4)	0 (0.0)	

Per esplorare i potenziali effetti del tempo di conservazione degli inclusi sulla classificazione HER2, è stata inoltre analizzata la distribuzione dello *score* rivalutato di HER2 in base all'anno di raccolta del campione. I risultati sono riassunti in **Tabella 7**:

**Tabella 7.** Distribuzione dell'espressione di HER2 alla rivalutazione in base al tempo (chirurgia) e allo studio in cui erano stati raccolti i campioni.

	<b>HER2 0 - null</b> N (%) n=161	<b>HER2-ultralow</b> N (%) n=60	<b>HER2 1+</b> N (%) n=47	<b>HER2 2+</b> N (%) n=19	<b>P value</b>
<b>Anno di chirurgia</b>					0.072
2001-2010	127 (78.9)	41 (68.3)	29 (61.7)	13 (68.4)	
2011-2019	30 (18.6)	17 (28.3)	16 (34.0)	6 (31.6)	
Unknown	4 (2.5)	2 (3.3)	2 (4.3)	0 (0.0)	
<b>GIM study</b>					0.040
GIM2	56 (34.8)	23 (38.3)	18 (38.3)	9 (47.4)	
GIM4	74 (46.0)	20 (33.3)	12 (25.5)	3 (15.8)	
GIM10	30 (18.6)	17 (28.3)	16 (34.0)	5 (26.3)	
Unknown	1 (0.6)	0 (0.0)	1 (2.1)	2 (10.5)	

L'analisi ha mostrato che i tumori HER2 0-null erano significativamente più frequenti nei campioni provenienti dagli studi GIM più datati ( $p = 0,040$ ).

Questo dato suggerisce che i campioni provenienti da studi più vecchi — caratterizzati da intervalli di conservazione più lunghi — hanno una maggiore probabilità di essere classificati come HER2-null.

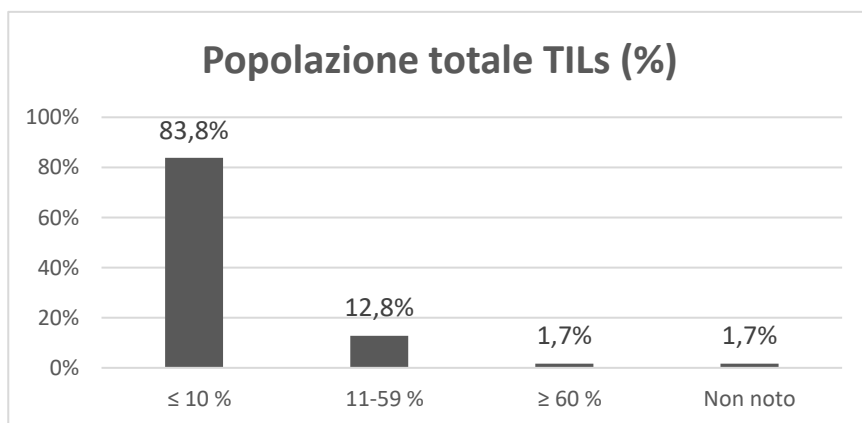
Ciò suggerisce che una conservazione prolungata possa influenzare l'antigenicità del tessuto e le prestazioni della valutazione immunohistochimica di HER2.

#### 4.4. Valutazione dei TILs

La valutazione dei TILs è stata possibile in 284 campioni e la distribuzione ha evidenziato una prevalenza di bassi livelli di infiltrazione linfocitaria, con la maggior parte dei casi caratterizzata da TILs  $\leq 10\%$ , 242 campioni (83,8%) o tra 11-59%, 37 campioni (12,8%), mentre alti valori di TILs sono poco rappresentati, in 5 campioni (1,7%) (**Tabella 8, Figura 26**).

**Tabella 8.** Valutazione dei TILs sul totale della popolazione.

NextGIM rivalutazione dei TILs	Popolazione (N)	(%)
$\leq 10\%$	242	83,8%
11-59%	37	12,8%
$\geq 60\%$	5	1,7%
Unknown	5	1,7%

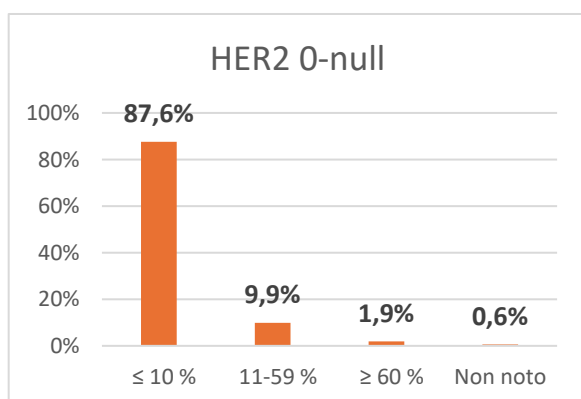


**Figura 26.** Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale dei valori di TILs nella popolazione totale, suddivisa per classi di espressione (sull'asse x sono indicati i valori percentuali dei TILs rispetto a tutte le cellule nucleate).

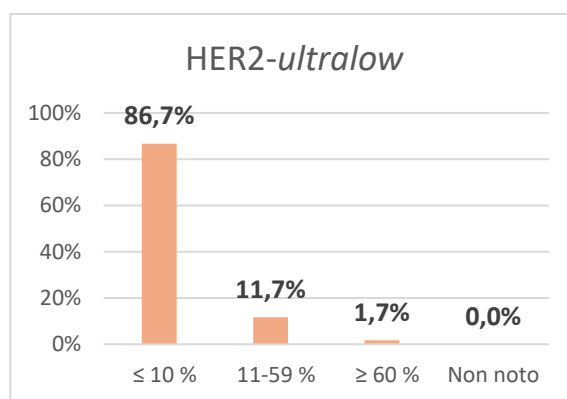
Per quanto riguarda la presenza di TILs nei diversi sottotipi di HER2, valori  $\leq 10\%$  sono stati osservati nel 87,6% dei carcinomi mammari HER2 0-null, nel 86,7% dei casi HER2-*ultralow*, nel 72,3% dei tumori HER2 1+ e nel 73,7% dei tumori HER2 2+ (Tabella 9, Figura 27, Figura 28, Figura 29, Figura 30).

**Tabella 9.** Presenza di TILs in relazione alla classificazione di HER2.

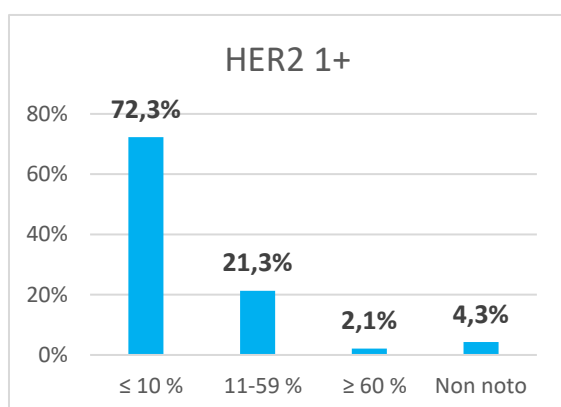
	HER2 0- null	HER2- <i>ultralow</i>	HER2 1+	HER2 2+	<i>P- value</i>
	N=161	N=60	N=47	N=19	
<b>NextGIM score TILs</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<0.001
$\leq 10\%$	141 (87.6)	52 (86.7)	34 (72.3)	14 (73.7)	
11-59 %	16 (9.9)	7 (11.7)	10 (21.3)	3 (15.8)	
$\geq 60\%$	3 (1.9)	1 (1.7)	1 (2.1)	0 (0.0)	
<b>Unknown</b>	1 (0.6)	0 (0.0)	2 (4.3)	2 (10.5)	



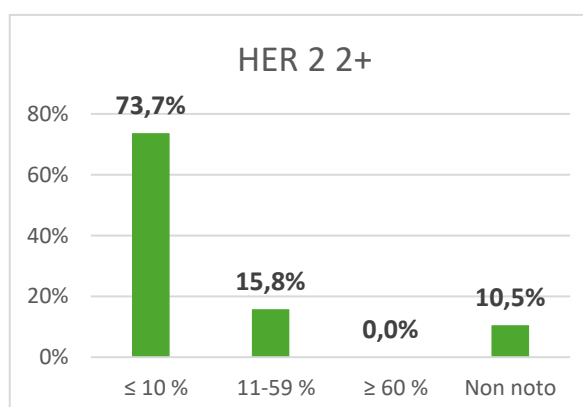
**Figura 27.** Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale dei valori di TILs nei tumori HER2 0-null.



**Figura 28.** Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale dei valori di TILs nei tumori HER2-*ultralow*.



**Figura 29.** Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale dei valori di TILs nei tumori HER2 1+.



**Figura 30.** Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale dei valori di TILs nei tumori HER2 2+.

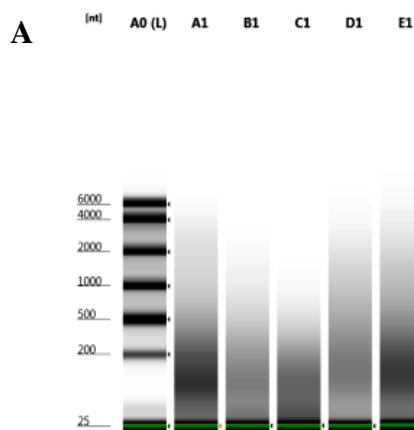
## 4.5. Controllo quantità e qualità dell'RNA estratto

L'estrazione dell'RNA da tessuto FFPE è stata inizialmente effettuata con *High Pure FFPE RNA Isolation Kit* (Roche Diagnostics), successivamente non più disponibile in commercio. Al fine di garantire la continuità dello studio, sono state confrontate due metodiche di estrazione alternative: *RNAeasy-FFPE Kit* (Qiagen) e *Maxwel RCS FFPE Kit* (Promega).

Sulla base della valutazione di efficacia e rendimento (quantità e qualità del materiale estratto), è stato scelto il *RNAeasy-FFPE Kit* (Qiagen) per tutte le estrazioni successive.

La concentrazione e la purezza dell'RNA sono state inizialmente valutate mediante spettrofotometria *Nanodrop*. La concentrazione di RNA estratto ha mostrato una mediana pari a 323,9 ng/μL, con un range di concentrazioni compreso tra 92,5 e 1714,5 ng/μL. Successivamente la qualità e l'integrità dei frammenti di RNA sono state analizzate mediante *TapeStation* (Agilent Technologies). In particolare, sono stati valutati: la percentuale di frammenti con una lunghezza maggiore di 301 bp, utilizzata per la normalizzazione, e i valori di *RNA Integrity Number* (RIN), con valori intorno a 2 considerati adeguati. (**Figura 31, Figura 32**).

A titolo rappresentativo, in Figura 31 si riporta l'analisi tramite *TapeStation* di alcuni campioni; in dettaglio il campione corso nella corsia E1 può essere preso ad esempio come campione di buona qualità nella casistica analizzata: ha mostrato un RIN pari a 2,2 e una concentrazione di RNA di 80 ng/μL. Per questo campione l'analisi della distribuzione dimensionale dei frammenti ha evidenziato che il 36,22% dei frammenti di RNA estratto presenta una lunghezza superiore a 301 bp.



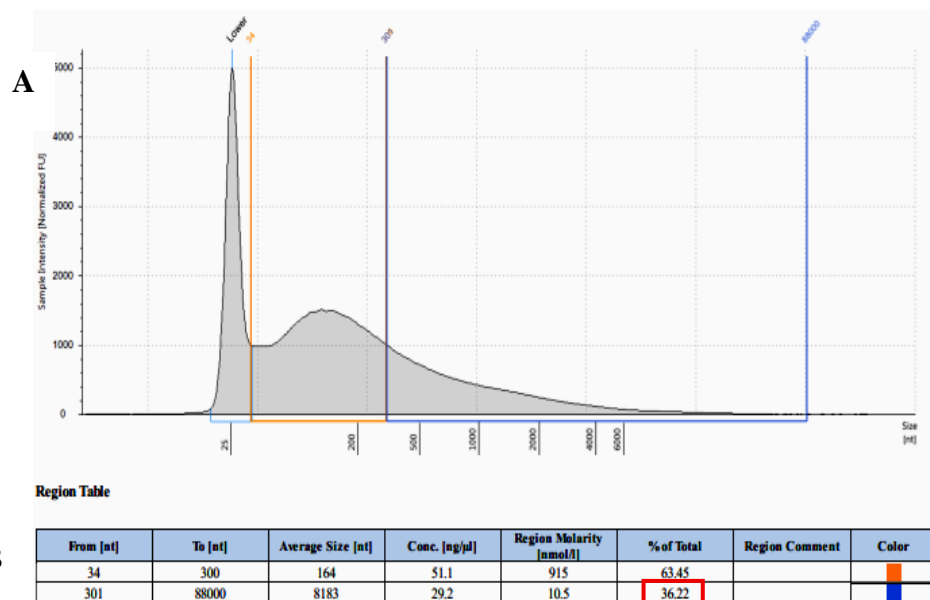
**Figura 31.** Analisi della qualità del RNA estratto da campioni FFPE, mediante sistema *TapeStation* (Agilent Technologies):  
**A:** Profilo elettroforetico dei campioni analizzati; la posizione A0 è relativa all' *Electronic Ladder* utilizzato come riferimento dimensionale; le altre corsie corrispondono a diversi campioni; l'analisi riporta per ciascun campione il relativo RIN.

RIN <sup>e</sup>	RIN <sup>e</sup>	RIN <sup>e</sup>	RIN <sup>e</sup>	RIN <sup>e</sup>
2.3	1.8	1.6	2.1	2.2

**B:** Tabella riassuntiva dei RIN e delle concentrazioni di RNA estratto. Il campione **E1** è evidenziato come esempio rappresentativo.

**B**

Well	RIN <sup>e</sup>	28S/18S (Area)	Conc. [ng/μl]
A0	-	-	84.9
A1	2.3	-	82.7
B1	1.8	-	42.8
C1	1.6	-	43.3
D1	2.1	-	56.7
E1	2.2	-	80.6



**Figura 32.** **A:** Elettroferogramma del campione **E1**. **B:** Valori ottenuti della concentrazione e della percentuale dei frammenti di RNA  $\geq 301$  bp.

La maggior parte dei campioni analizzati soddisfacevano tali criteri, ma sono stati utilizzati per le analisi molecolari anche campioni al di fuori di questi parametri stringenti, ad esempio campioni che presentavano RIN più bassi, come plausibile per RNA estratti da tessuti fissati e di archivio.

## 4.6. Normalizzazione dei campioni e controllo qualità

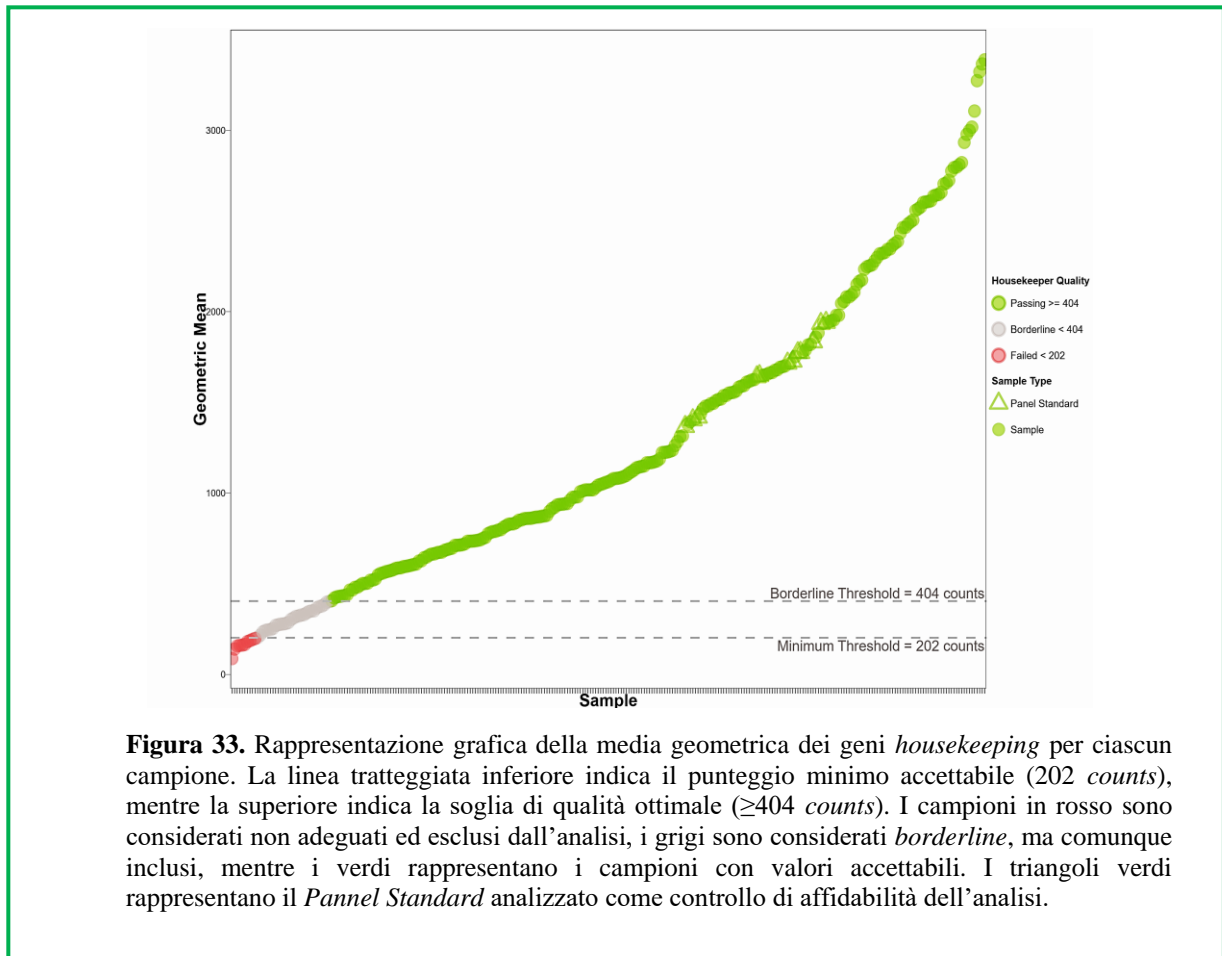
Dopo il controllo qualità, la concentrazione dell'RNA è stata normalizzata al fine di ottenere 300 ng di RNA in un volume definito di 5  $\mu$ L per ciascun campione, garantendo l'uniformità nella preparazione per le successive analisi. In pochi casi, per i quali la quantità non era sufficiente sulla base di questi criteri, è stato utilizzato, in accordo con gli specialisti della Nanostring, un input di 100-150 ng di RNA.

In laboratorio è stato possibile fare una prima valutazione della qualità delle analisi effettuate su piattaforma Nanostring, mediante il software *nSolver*, che ha consentito di verificarne l'idoneità e la qualità ai fini dell'analisi statistica successiva; in base a questo primo controllo di qualità, alcune analisi sono state ripetute o sulla stessa aliquota di RNA estratto inizialmente o ripetendo l'estrazione ove ci fosse ancora materiale FFPE sufficiente. Pertanto, su un totale di 286 campioni estratti e analizzati sulla piattaforma Nanostring, 283 sono stati sottoposti all'analisi statistica.

## 4.7. Valutazione di qualità dei campioni e affidabilità delle misurazioni molecolari

Considerata la dimensione del *set* di campioni — a nostra conoscenza, una delle più ampie raccolte disponibili di casi *HER2-low* — e la quantità delle informazioni potenzialmente ricavabili dai dati sperimentali, l'analisi è stata esternalizzata a Diatech/Bruker. L'analisi DAS (*Digital Analysis Software*) effettuata, fornisce un *report* strutturato con *score* delle firme biologiche, tabelle di qualità e dati normalizzati.

L'analisi ha previsto una prima fase di controllo qualità dei campioni che è stata effettuata mediante la valutazione dei geni *housekeeping*, la cui espressione è attesa stabile tra i campioni. La **Figura 33** mostra la media geometrica di tali geni per ciascun campione: valori molto bassi indicano scarsa efficienza della reazione o un basso *input* di RNA, e hanno determinato l'esclusione del campione dalle analisi. Un valore della media geometrica maggiore o uguale a 404 è indicativo di qualità ottimale, mentre il limite minimo di accettabilità è stato fissato a 202.



Tutti i campioni inclusi sono stati inoltre sottoposti a controlli di qualità strumentali, comprendenti *QC imaging*, *Binding Density*, *Positive Control Linearity* e *Limit of Detection* (LOD QC), come descritto nei Materiali e Metodi.

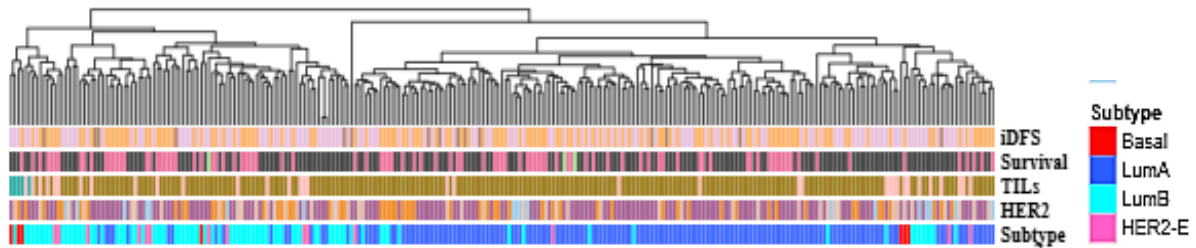
Tra i 283 campioni inviati all'analisi, 269 hanno superato le procedure di controllo qualità dell'analisi DAS e sono stati pertanto inclusi nella caratterizzazione genomica.

## 4.8. Caratterizzazione genomica dei tumori mammari ER+/HER2-low e ER+/HER2-0

### 4.8.1. Analisi Complessiva: Correlazione con il Grado di HER2 e presenza dei TILs

Nel complesso, l'analisi su 269 campioni, ha evidenziato due principali *cluster* trascrittomici, che riflettono ampie differenze biologiche all'interno della coorte. Nell'analisi della *heatmap* di espressione genica globale ("*All Genes*") (**Figura 34**) è possibile osservare una chiara separazione dei campioni in *cluster* distinti corrispondenti ai principali sottotipi molecolari.

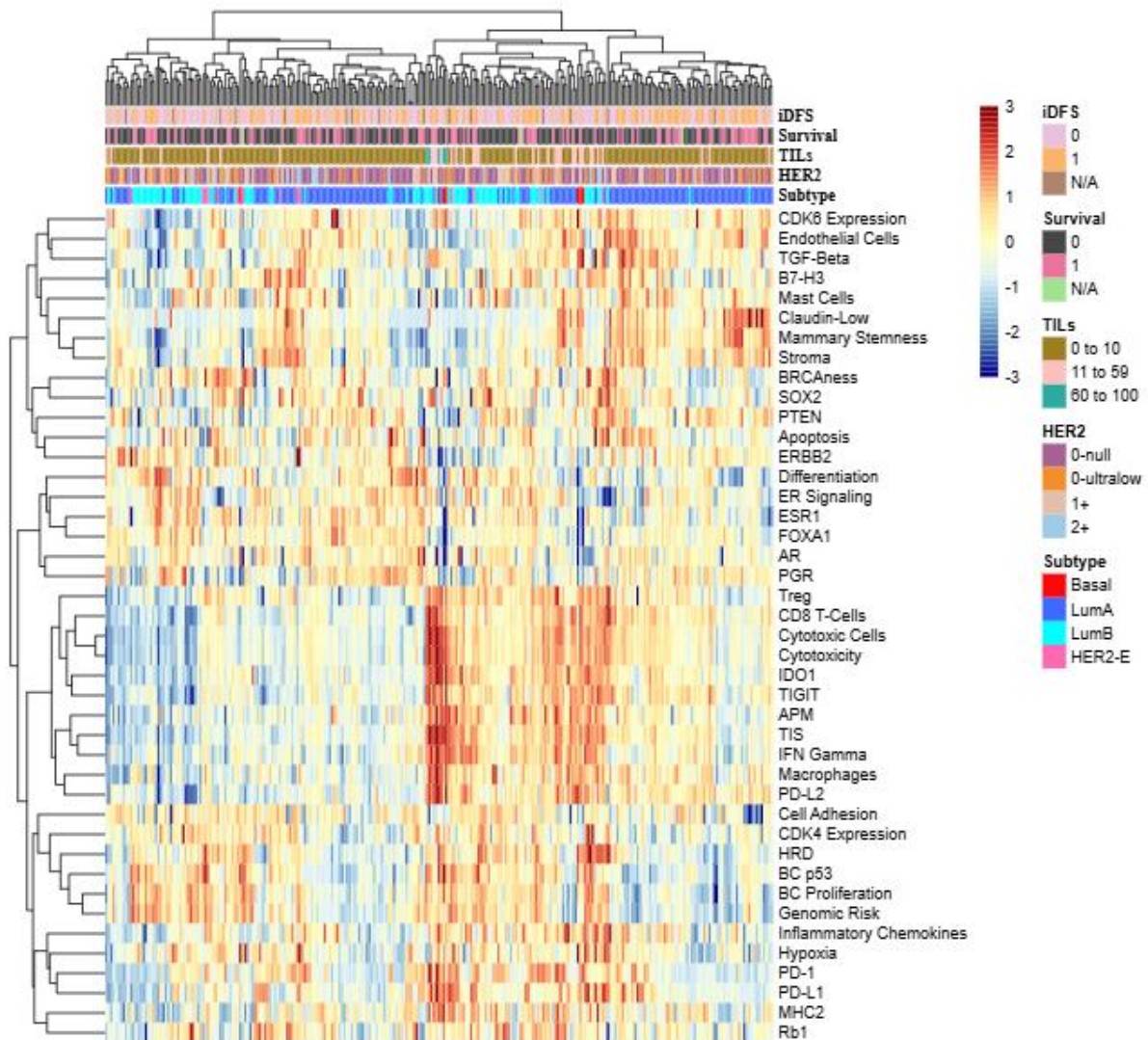
In particolare, i tumori luminali A (indicati in azzurro) tendono a raggrupparsi in un *cluster* separato rispetto ai luminali B (indicati in blu), suggerendo differenze nei profili di espressione genica tra queste due sottopopolazioni tumorali.



**Figura 34.** Heatmap dei livelli di espressione genica rilevanti per la caratterizzazione dei sottotipi tumorali.

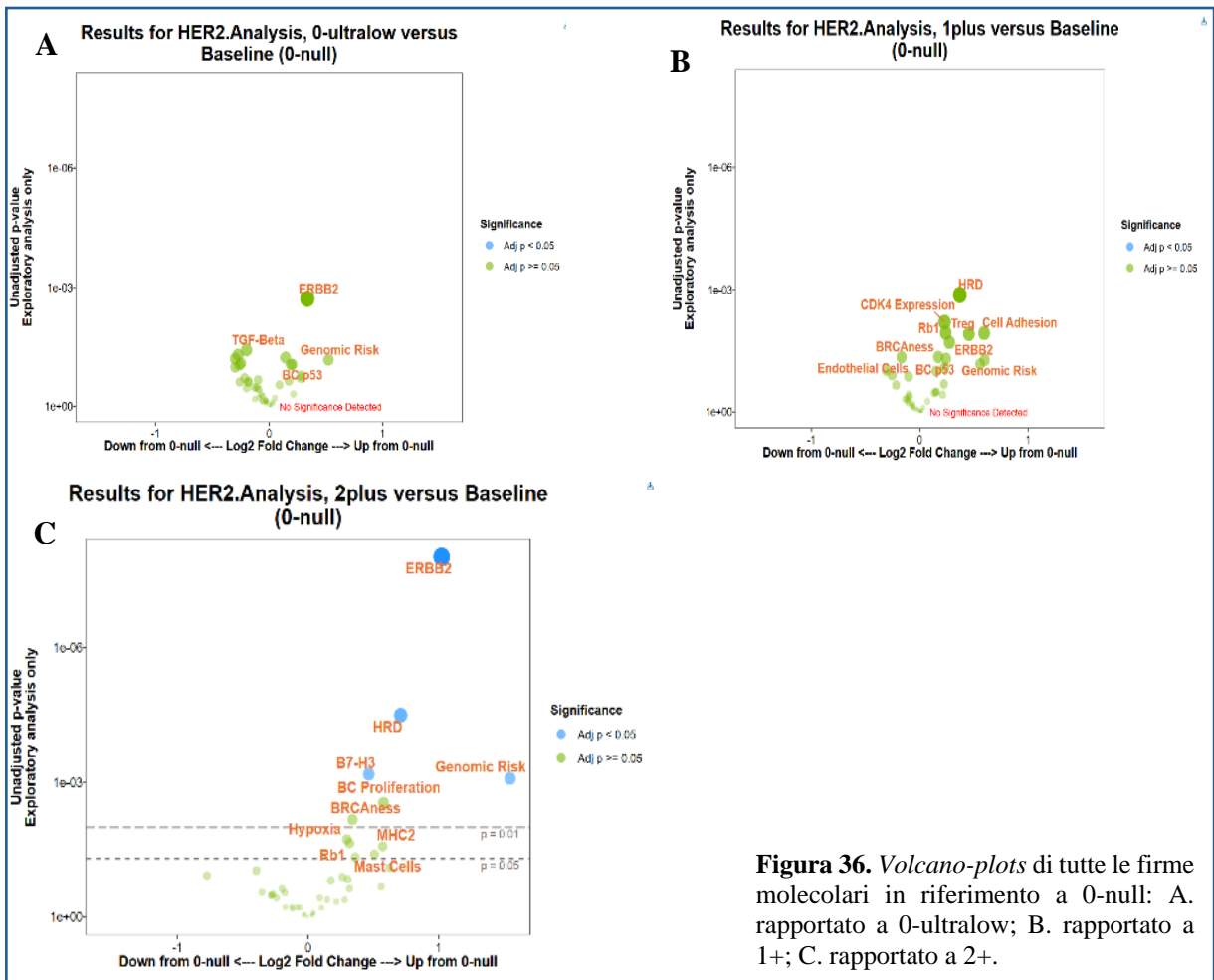
La *heatmap* “*All Signatures*”, riportata in **Figura 35**, mostra invece le singole firme molecolari nelle righe e la corrispondente distribuzione delle categorie di campioni in base all’espressione di HER2, alla presenza di TILs e ai sottotipi molecolari. L’analisi include marcatori associati allo stato di HER2, ai TILs e alle principali categorie molecolari (luminali A, luminali B, HER2-*enriched* e *Basal-like*), oltre a firme correlate agli *endpoint* clinici quali *invasive Disease-Free Survival* e *Overall Survival*, consentendo di confrontare i profili trascrittomici tra i diversi campioni.

Dall’analisi emerge che non è presente un *clustering* specifico basato esclusivamente sull’espressione di HER2 o sulla presenza di TILs. Tuttavia, in questo *dataset*, i campioni con TILs >60% tendono a raggrupparsi tra loro, suggerendo una possibile associazione tra elevata infiltrazione linfocitaria e specifici *pattern* trascrittomici.

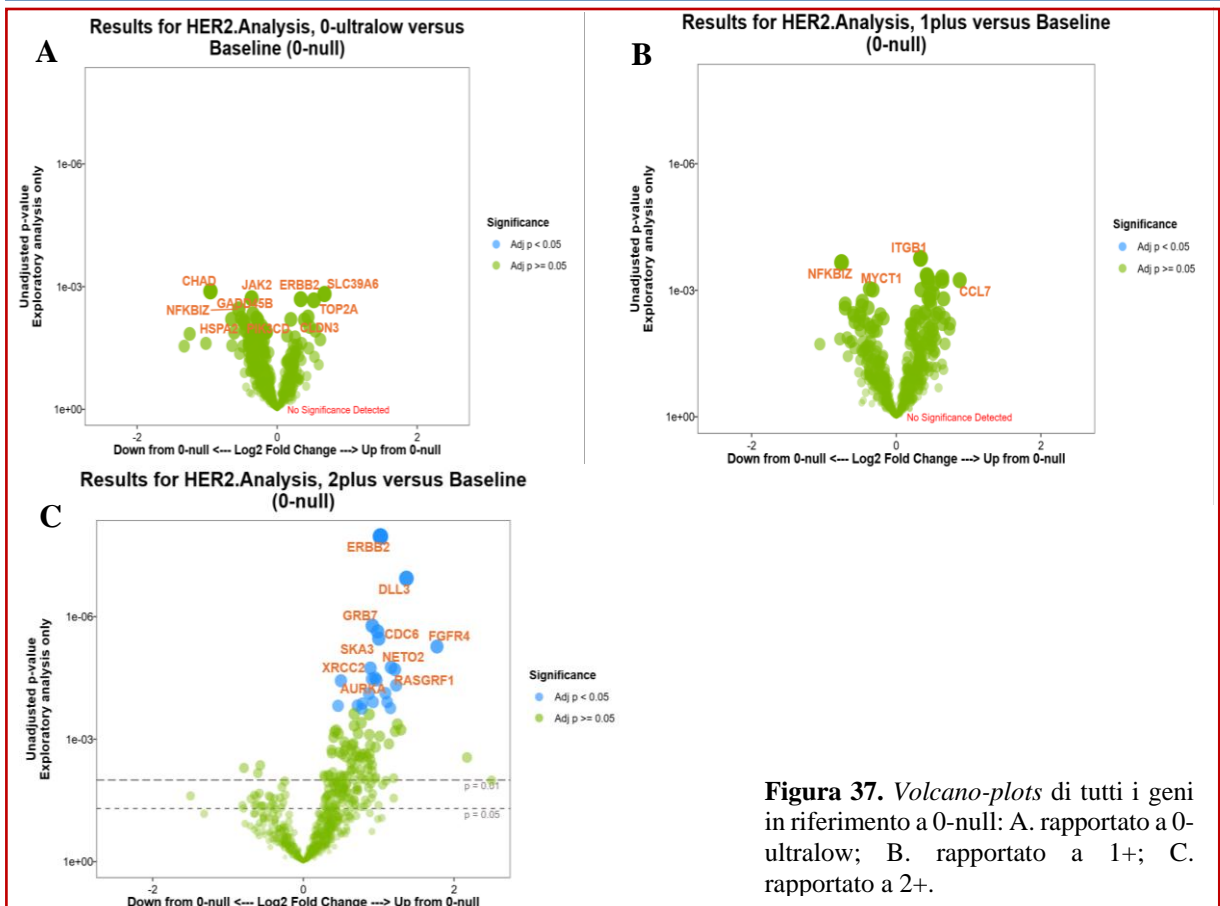


**Figura 35.** *Heatmap* di espressione genica delle firme biologiche organizzati tramite *clustering* gerarchico. Ogni colonna rappresenta un campione tumorale, mentre ogni riga corrisponde a una firma molecolare o a un *pathway* biologico. La scala cromatica indica livelli relativi di espressione (blu = bassa, rosso = alta). Nella parte superiore sono riportate annotazioni clinico-patologiche e molecolari, tra cui iDFS, OS, livelli di TILs, stato HER2 e sottotipo tumorale. Per quanto riguarda gli endpoint clinici: iDFS è codificato come 0 = non evento, 1 = evento; OS è codificato come 0 = viva, 1 = morta.

Un'analisi approfondita dei tumori ER-positivi/HER2-negativi, stratificati in base allo *score* IHC di HER2 (0-null, *-ultralow*, 1+, 2+), ha evidenziato tendenze verso un'espressione differenziale in diversi geni e firme molecolari. Differenze statisticamente significative sono emerse principalmente nei tumori HER2 2+ quando confrontati con i casi HER2-null, come può evincere dai *volcano plots* (**Figura 36**, **Figura 37**).



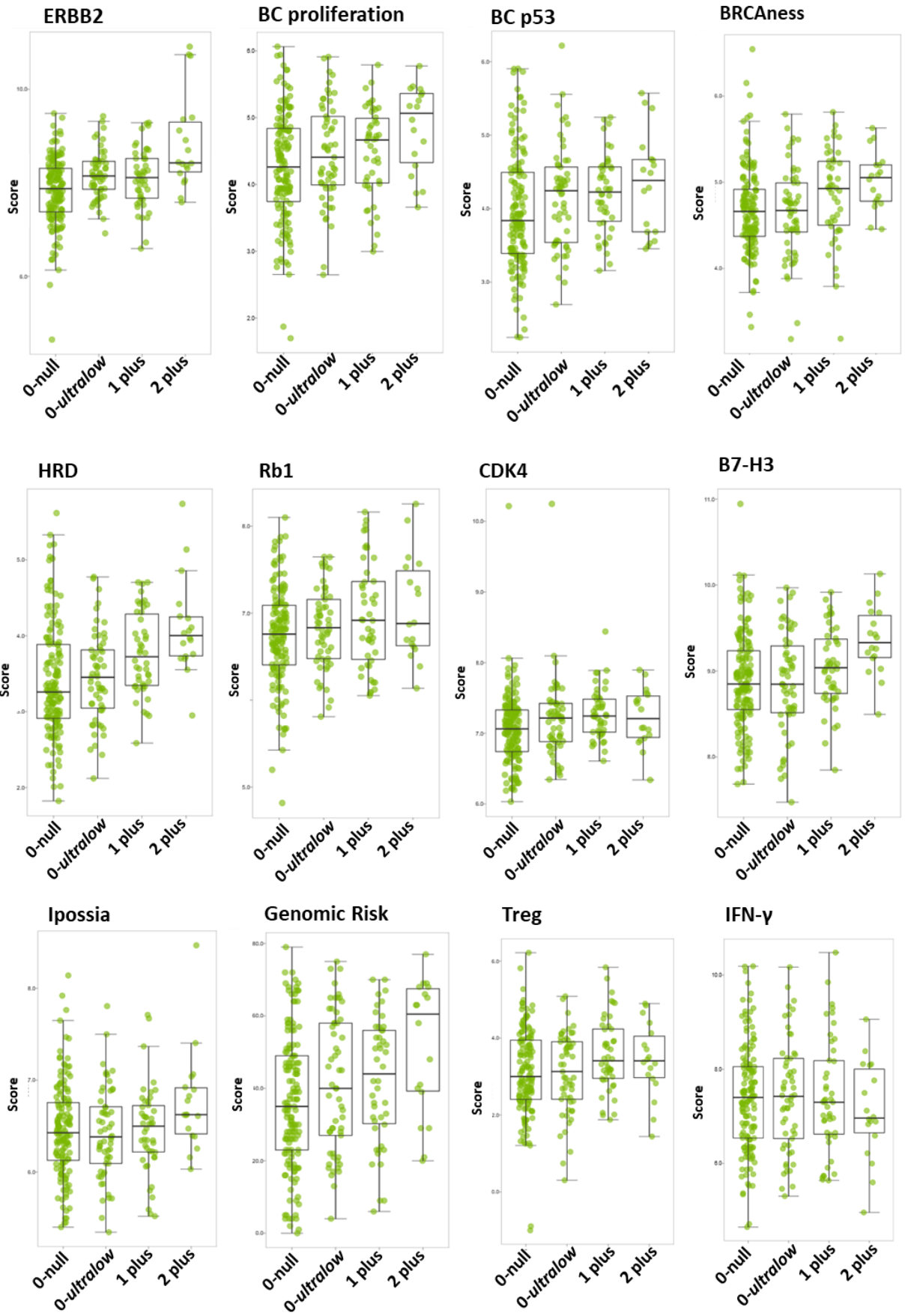
**Figura 36.** Volcano-plots di tutte le firme molecolari in riferimento a 0-null: A. rapportato a 0-ultralow; B. rapportato a 1+; C. rapportato a 2+.



**Figura 37.** Volcano-plots di tutti i geni in riferimento a 0-null: A. rapportato a 0-ultralow; B. rapportato a 1+; C. rapportato a 2+.

Come atteso, i livelli di trascritto *ERBB2* aumentano progressivamente attraverso le diverse categorie di HER2. Rispetto ai tumori HER2-null, i tumori HER2 1+ e HER2 2+ mostrano una significativa e più elevata espressione di geni e firme molecolari correlate a p53, BRCAness, HRD (*Homologous Recombination Deficiency*), RB1, CDK4, alla proliferazione cellulare (*MKI67*) e alle *signature* di Treg (*FOXP3*), che suggeriscono la presenza di un microambiente tumorale immunosoppressivo. In particolare, si osserva un progressivo incremento della HRD, indicativo di una graduale compromissione dei meccanismi di riparazione del DNA mediante ricombinazione omologa, suggerendo quindi un aumento dell'instabilità genomica nei casi caratterizzati da maggiore espressione di HER2. Inoltre, i tumori HER2 2+ risultano arricchiti di firme relative all'ipossia e al rischio genomico; si è inoltre riscontrato un aumento di B7-H3 (**Figura 38**).

Tra le 48 firme e domini biologici generati dal profilo di espressione genica, la presente analisi si è concentrata sui sottotipi molecolari (PAM50), sul *Risk Of Recurrence score* e sulla *Tumor Inflammation Signature* (TIS).



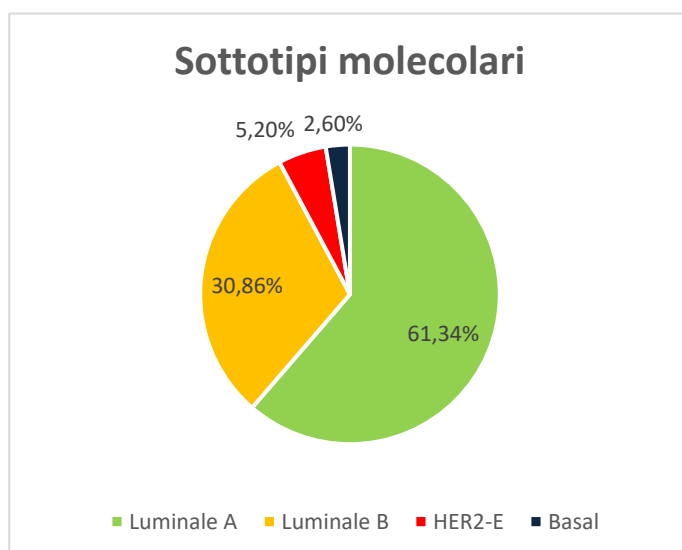
**Figura 38.** *Box-plot* che rappresentano *score* relativi ad alterazioni molecolari al tumore significativamente differenti tra i gruppi HER2 0-null, HER2-ultralow, HER2-low.

#### 4.8.2. Classificazione dei sottotipi molecolari

Considerando l'intera popolazione, la distribuzione dei sottotipi ha mostrato una chiara predominanza dei tumori luminali A (61,3%), seguiti dai luminali B (30,9%), mentre i sottotipi *HER2-enriched* (5,2%) e *Basal-like* (2,6%) sono risultati meno rappresentati (**Tabella 10**, **Figura 39**).

**Tabella 10.** Distribuzione dei sottotipi molecolari nella coorte in studio.

Sottotipi molecolari	Popolazione N	(%)
<b>Luminale A</b>	165	61,34%
<b>Luminale B</b>	83	30,86%
<b>HER2-enriched</b>	14	5,20%
<b>Basal-like</b>	7	2,60%

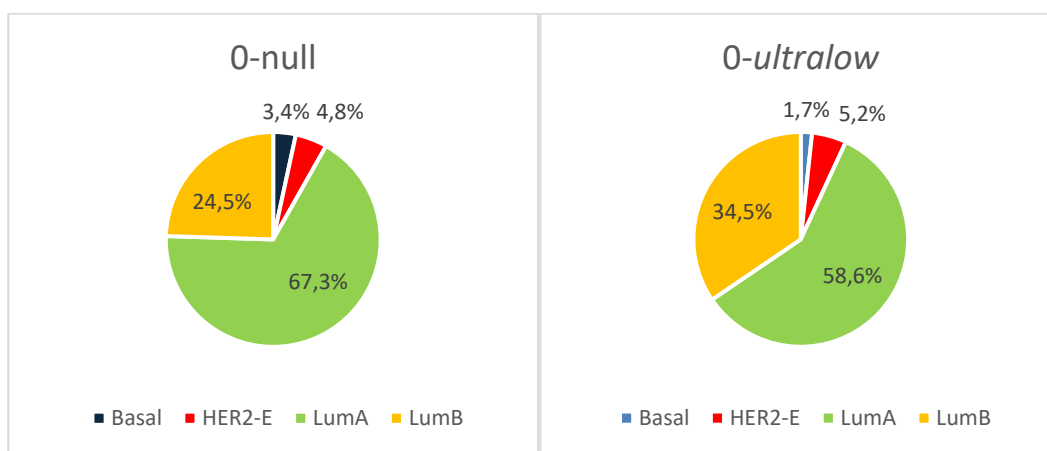


**Figura 39.** Distribuzione dei sottotipi molecolari della casistica in studio

Un'ulteriore valutazione dei sottotipi PAM50 nelle diverse categorie HER2 IHC (0-null, 0-*ultralow*, 1+, 2+) ha evidenziato *pattern* di distribuzione distinti all'interno di ciascun gruppo. Questa analisi stratificata fornisce una visione più granulare dell'eterogeneità biologica lungo lo spettro HER2, come riassunto nella tabella seguente:

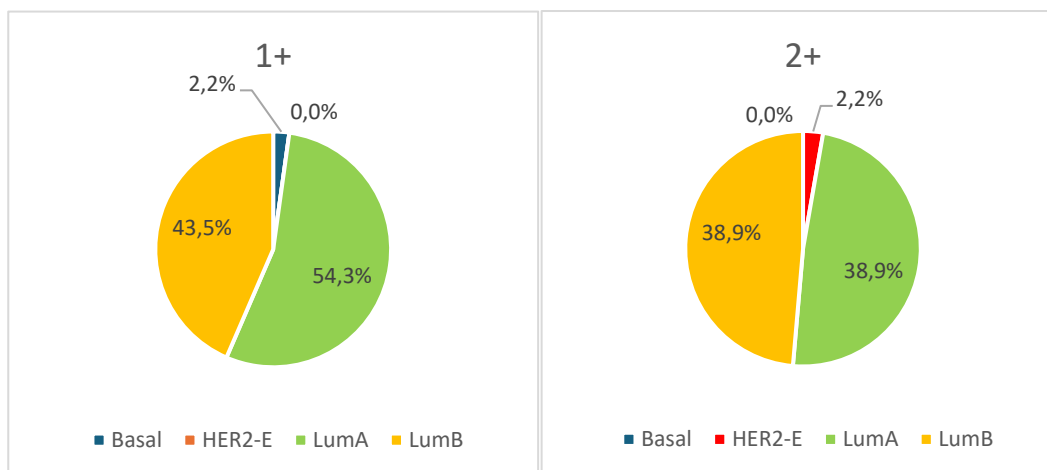
**Tabella 11.** Distribuzione dei sottotipi molecolari, divisi in base allo STATUS di HER2.

	<b>HER2 0-null</b>	<b>HER2-ultralow</b>	<b>HER2 1+</b>	<b>HER2 2+</b>	<b>Totale</b>
<b>Sottotipi molecolari</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
<i>Basal-like</i>	5 (3.4)	1 (1.7)	1 (2.2)	0 (0.0)	7 (2.6)
<b>HER2-Enriched</b>	7 (4.8)	3 (5.2)	0 (0.0)	4 (2.2)	14 (5.2)
<b>Luminale A</b>	99 (67.3)	34 (58.6)	25 (54.3)	7 (38.9)	165 (61.3)
<b>Luminale B</b>	36 (24.5)	20 (34.5)	20 (43.5)	7 (38.9)	83 (30.9)
<b>Totale</b>	147 (100)	58 (100)	46 (100)	18 (100)	269 (100)



**Figura 40.** Distribuzione (espressa in percentuale) dei diversi sottotipi molecolari nei tumori HER2 0-null.

**Figura 41.** Distribuzione (espressa in percentuale) dei diversi sottotipi molecolari nei tumori HER2 0-ultralow.



**Figura 42.** Distribuzione (espressa in percentuale) dei diversi sottotipi molecolari nei tumori HER2 1+.

**Figura 43.** Distribuzione (espressa in percentuale) dei diversi sottotipi molecolari nei tumori HER2 2+.

### 4.8.3. Rischio di Recidiva

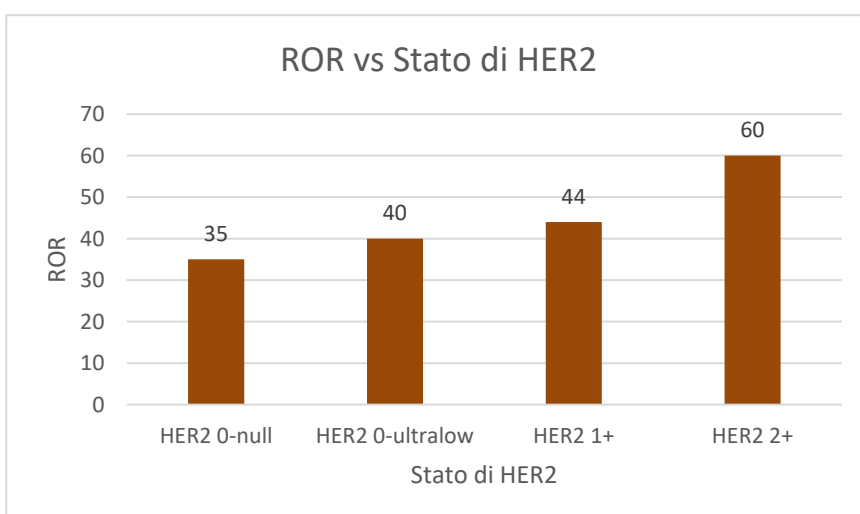
Il Rischio di Recidiva (*Risk Of Recurrence ROR*) è stato stimato utilizzando l'algoritmo implementato nella *pipeline NanoString Breast Cancer 360™*, che confronta ciascun campione con i centroidi, ovvero i profili medi di riferimento dei sottotipi definiti dal test PAM50, integrando tale componente genomica con un punteggio di proliferazione basato sull'espressione dei geni associati alla crescita cellulare.

Il punteggio continuo risultante, espresso su una scala da 0 a 100, è stato classificato in categorie di rischio basso (<12), intermedio (12–53) e alto (>53), in accordo con le soglie precedentemente applicate e validate nei tumori ER positivi/HER2 negativi, incluso lo studio sottomodulare GEICAM/9906 che confrontava EndoPredict con i punteggi ROR basati su PAM50 (Martin M. et al., 2016).

Nella nostra coorte, i valori di ROR hanno mostrato un aumento progressivo attraverso le categorie IHC di HER2, con punteggi mediani di 35 (IQR 23–49) nei tumori HER2-null, 40 (IQR 27–58) nei casi HER2-*ultralow*, 44 (IQR 30–56) nei tumori HER2 1+, e 60 (IQR 39–68) nei tumori HER2 2+ (**Tabella 12, Figura 44**). Tale dato conferma il valore prognostico negativo dell'espressione di HER2.

**Tabella 12.** Distribuzione percentuale del ROR suddiviso per sottotipi in base all'espressione di HER2.

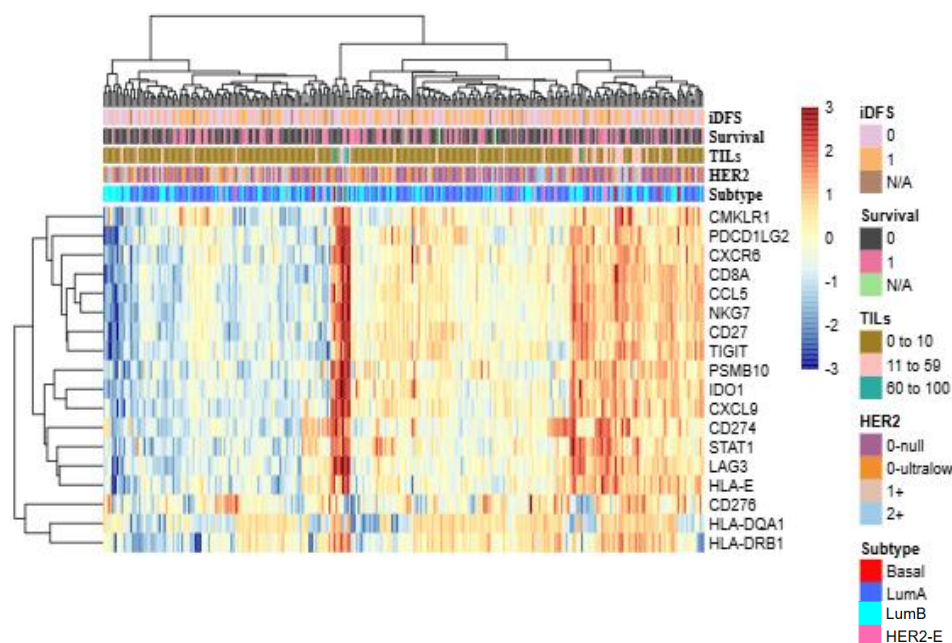
	HER2 0-null	HER2- <i>ultralow</i>	HER2 1+	HER2 2+	Totale
ROR	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Basso	14 (9.5)	1 (1.7)	3 (6.5)	0 (0.0)	18 (6.7)
Intermedio	105 (71.4)	37 (63.8)	28 (60.9)	8 (44.4)	178 (66.2)
Alto	28 (19.1)	20 (34.5)	15 (32.6)	10 (55.6)	73 (27.1)
Totale	147 (100)	58 (100)	46 (100)	18 (10)	269 (100)



**Figura 44.** Distribuzione del ROR in relazione allo stato di HER2.

#### 4.8.4. Firma di Infiammazione Tumorale e Attività immunitaria anti-tumorale (TIS)

L'analisi del microambiente immunitario tumorale mediante la *Tumor Inflammation Signature* (TIS) ha identificato quattro *cluster* distinti con diversi livelli di attività infiammatoria.



**Figura 45.** Livello di espressione dei singoli geni appartenenti alla TIS *signature* rilevanti per la caratterizzazione dei sottotipi tumorali. Si osservano: due *cluster* (“*hot*”), uno per i tumori con TILs elevati (60–100%) in cui vi è maggior espressione dei geni immuno-correlati, associato principalmente ai tumori *Basal-like* e un secondo, con espressione sempre elevata, ma meno marcata e più variabile, ad alcuni tumori luminale A; un *cluster* “*cold*” caratterizzato da bassa espressione genica, osservato prevalentemente in tumori con scarso infiltrato immunitario e in alcuni casi nel sottotipo luminale B e un *cluster* ad espressione intermedia osservata in alcuni tumori *HER2-low* indicante maggior eterogeneità trascrizionale.

Nel complesso, non è emerso una chiara suddivisione basata sulla classificazione immunostochimica di HER2, inclusi i casi HER2 0-null e *ultralow*. Al contrario, i sottotipi *HER2-low* hanno mostrato una variazione intermedia nell’attività immunitaria: i tumori HER2 2+ sembravano presentare un fenotipo relativamente immuno-escluso o “freddo”, mentre i tumori HER2 1+ mostravano un coinvolgimento immunitario intermedio.

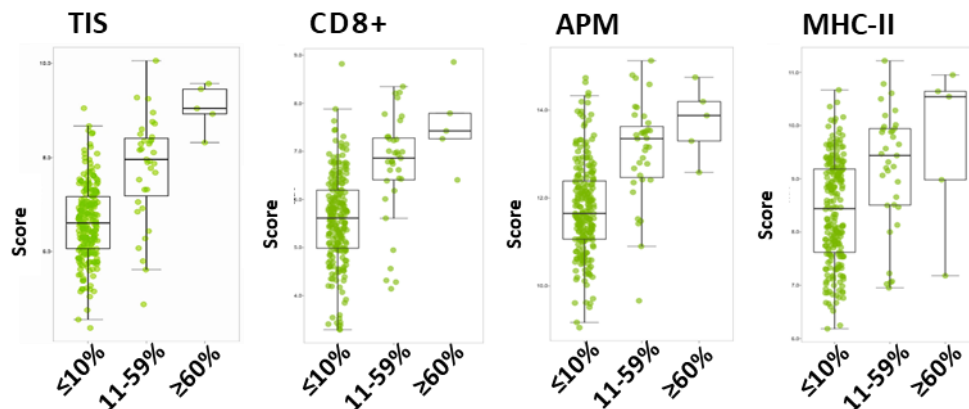
Questi risultati evidenziano l’eterogeneità dell’assetto immunitario tra i diversi sottotipi molecolari e suggeriscono una possibile suscettibilità all’immunoterapia.

Considerando i sottotipi molecolari specifici, i tumori *basal-like* sono risultati caratterizzati da un marcato coinvolgimento immunitario, coerente con la loro classificazione come tumori immunologicamente “*hot*”: è noto, infatti, che presentano alti livelli di TILs come confermato anche in questa coorte. Questo microambiente immunogenico riflette probabilmente il loro elevato carico mutazionale e la instabilità genomica, che generano neo-antigeni in grado di attivare il riconoscimento da parte del sistema immunitario.

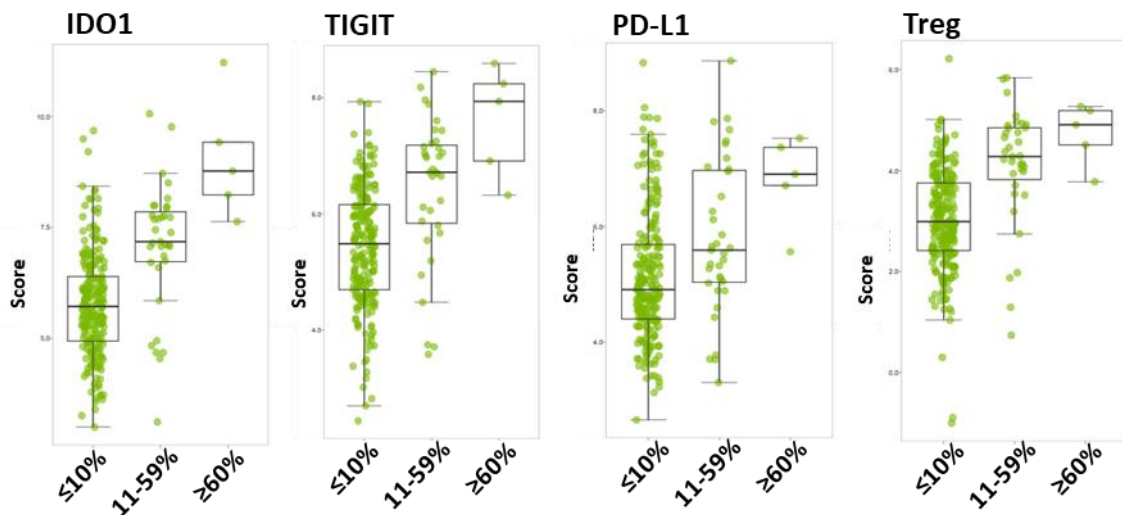
#### 4.8.5. Valutazione del microambiente immunitario

L'espressione genica relativa alla TIS, (**Figura 45**) evidenzia una distribuzione coerente delle firme immuno-correlate nei diversi *cluster* di infiltrazione.

Analizzando le ulteriori *signatures* ricavabili dall'analisi trascrittomica, è possibile osservare un profilo trascrizionale coerente con un microambiente immunologicamente attivo e infiammato: in particolare, marcatori associati alla citotossicità dei linfociti **CD8+** e nell'attivazione delle cellule immunitarie. La presenza delle cellule T citotossiche attiva la risposta di **IFN- $\gamma$**  con aumento delle componenti del complesso di processamento e presentazione dell'antigene (**APM** e **MHC-II**) (**Figura 46**). Si può ipotizzare che per contrastare questa risposta altamente infiammatoria, il microambiente tumorale attiva una *up*-regolazione compensatoria di *checkpoint* immunitari, inducendo una maggiore espressione di PD-L1 sulle cellule tumorali stromali. In questo modo si attivano meccanismi di *immuno-escape* accompagnati da un'aumentata espressione di **IDO1** (*Indoleamine 2,3-dioxygenase*: enzima intracellulare coinvolto nel metabolismo del triptofano, che porta all'accumulo di metaboliti immunosoppressivi) e **TIGIT** (*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*: recettore espresso su Treg) (**Figura 47**).

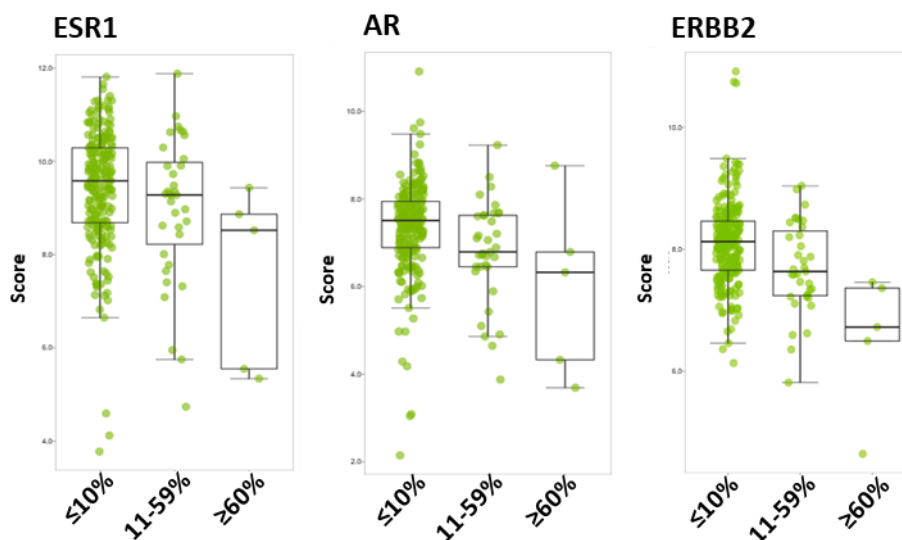


**Figura 46.** Box-plot che rappresentano i diversi *score* di espressione di specifiche *signature* in base alla presenza dei TILs: 0-10%, 11-56% e 60-100%.



**Figura 47.** Box-plot che rappresentano i diversi score di espressione di specifiche *signature* in base alla presenza dei TILs: 0-10%, 11-56% e 60-100%.

I tumori con TILs 0–10% mostrano una maggiore espressione di geni luminali e ormono-correlati (*ESR1*, *PGR*, *AR*, *FOXA1*), di *ERBB2* e di firme stromali, coerente con un microambiente *immune-cold*, dominato dagli ormoni, con limitata attivazione immunitaria adattativa. (Figura 48). L’attivazione dei *pathway* estrogenico, favorisce l’attivazione di Treg, polarizza i macrofagi verso M2 e inibisce CD8 e NK, aumentando PD-L1.



**Figura 48.** Box-plot che rappresentano i diversi score di espressione di specifiche *signature* in base alla presenza dei TILs: 0-10%, 11-56% e 60-100%.

#### 4.8.6. Altre signatures

Non è stata osservata una correlazione specifica con l'espressione di HER2, ma i dati hanno mostrato un'elevata eterogeneità, in particolare per la firma ER, la firma TP53, la firma HRD e il rischio genomico.

Concentrandosi sui TILs, non è emersa una chiara correlazione con le firme ER o HRD, mentre percentuali elevate di TILs tendevano ad associarsi a una maggiore attività della firma TP53 e a un aumento del rischio genomico.

Considerando i sottotipi molecolari, non sono state osservate correlazioni forti con la firma ER, ad eccezione dei tumori *basal-like*. Nei tumori luminali A, sia i livelli di HRD sia le firme di instabilità genomica risultano sostanzialmente ridotti, in linea con la loro maggiore stabilità genomica e con un fenotipo molecolare meno aggressivo.

Infine, la firma TP53 risultava altamente attiva nei tumori *basal-like*, come atteso, e mostrava un'attività intermedia nei tumori luminali B rispetto ai luminali A.

### 4.9. Analisi di sopravvivenza e integrazione con dati traslazionali

I dati di *follow-up* clinico dei trial GIM2, GIM4 e GIM10 sono stati aggiornati e armonizzati. Sono state condotte analisi di sopravvivenza, modelli multivariati e studi di correlazione utilizzando R e STATA, presso la UO Epidemiologia Clinica.

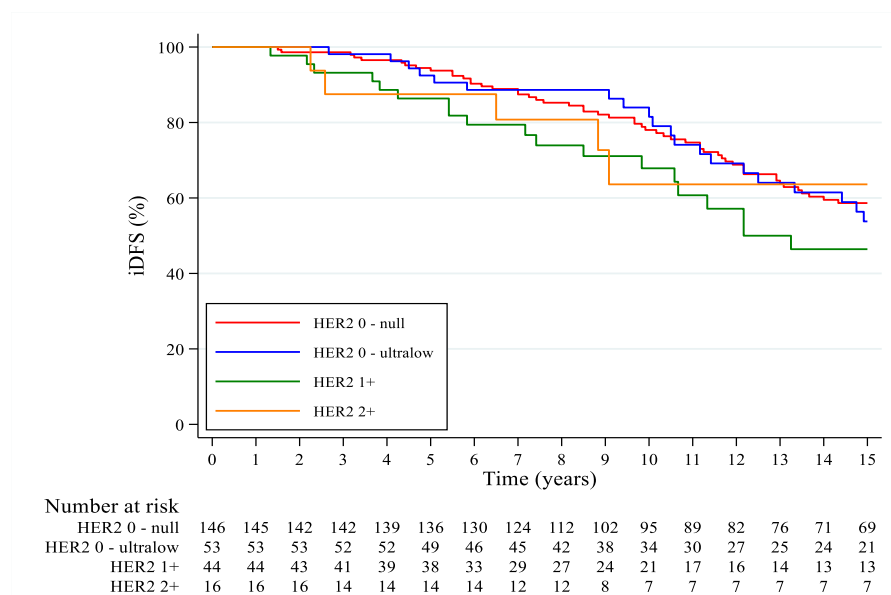
Il numero di eventi osservati era coerente con quelli attesi, permettendo una valutazione adeguata della rilevanza prognostica e predittiva delle categorie HER2-*low*, HER2-*ultralow* e HER2 0-null. Tra i 289 pazienti con rivalutazione di HER2, 259 erano valutabili per iDFS e 267 per OS.

Il *follow-up* clinico è stato aggiornato in tutti e tre i *trial*, con un *follow-up* mediano di 20,5 anni. La distribuzione di recidive a distanza, eventi loco-regionali, secondi tumori primari e decessi senza eventi iDFS precedenti è risultata comparabile tra i tumori HER2 0-null, HER2-*ultralow*, HER2 1+ e HER2 2+.

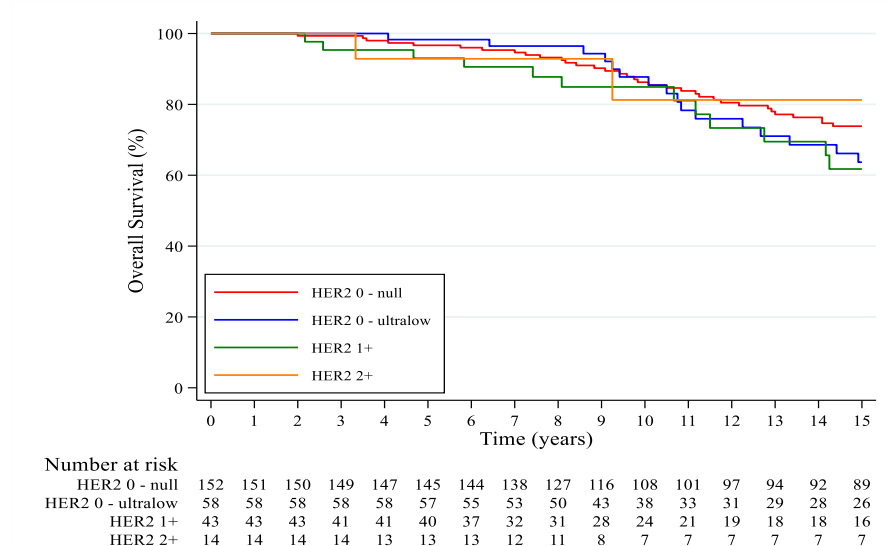
Le analisi di Kaplan–Meier non hanno mostrato differenze significative nella sopravvivenza libera da malattia invasiva (iDFS, *log rank*  $p=0,441$ ) né nella sopravvivenza globale (OS, *log rank*  $p=0,697$ ) tra le quattro categorie di HER2, con la mediana della sopravvivenza non raggiunta nella maggior parte dei sottogruppi (**Figura 49**, **Figura 50**).

È importante sottolineare che non sono emerse differenze in sopravvivenza nemmeno raggruppando semplicemente i tumori in HER2-0 versus HER2-*low*, senza ulteriori sotto-

classificazioni, confermando che l'espressione di HER2 all'interno dell'intervallo HER2 negativo non stratifica gli esiti a lungo termine nel carcinoma mammario ER positivo.



**Figura 49.** Curve di Kaplan-Meier relative all'iDFS in relazione allo stato di HER2.



**Figura 50.** Curve di Kaplan-Meier relative all' OS in relazione allo stato di HER2.

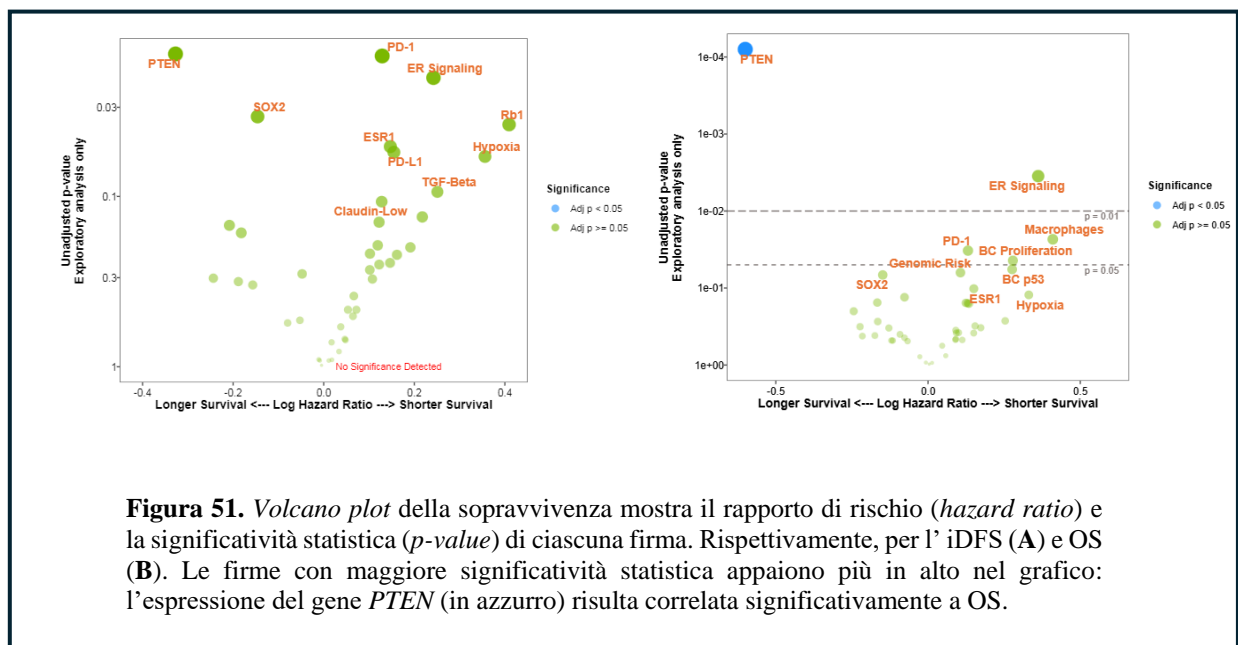
Sono stati inoltre valutati gli effetti dei trattamenti all'interno dei sottogruppi HER2. Nei tumori HER2 0-null, la chemioterapia *dose-dense* è risultata associata a migliori esiti rispetto ai regimi a intervallo standard. Nei tumori HER2-*ultralow*, HER2 1+ e HER2 2+, il numero di casi era troppo limitato per trarre conclusioni statisticamente significative.

Nel *trial* GIM4, la terapia endocrina estesa ha mostrato un maggiore beneficio nei tumori HER2 0-null rispetto al trattamento di durata standard, mentre la limitata numerosità dei campioni nelle altre categorie HER2 ha impedito un'interpretazione definitiva. Nel *trial* GIM10, la somministrazione concomitante di chemioterapia ed endocrinoterapia non ha mostrato alcun

vantaggio rispetto all'approccio sequenziale, che ha mantenuto la tendenza più favorevole nonostante il numero ridotto di eventi.

Considerando l'integrazione dei dati di profilazione genomica con la sopravvivenza, diverse *signature* NanoString hanno mostrato un'associazione con iDFS nei modelli non aggiustati, tra cui ER, PD-1, RB1, SOX2 e PTEN. Dopo l'aggiustamento per variabili clinico-patologiche, queste associazioni non erano più significative.

Considerando invece l'OS, l'espressione del gene *PTEN* è stata l'unica a mostrare un'associazione significativa, che è rimasta evidente anche nel modello aggiustato (**Figura 51 A e B**). Infine, non si sono notate differenze significative in iDFS e OS in base al sottotipo molecolare.



## 4.10. Discussione

I risultati ottenuti nel progetto, indicano come l'espressione di HER2 all'interno dell'intervallo "HER2-negativo" non identifichi sottogruppi chiaramente distinti biologicamente o clinicamente, gettando le basi per studi futuri mirati a perfezionare la comprensione biologica della malattia HER2-negativa.

Dal punto di vista molecolare l'analisi ha permesso di determinare che rispetto ai tumori HER2 0-null, i tumori HER2-*low* mostrano una maggiore espressione di firme associate a instabilità genomica. Queste includono alterazioni dei meccanismi di riparazione del DNA, tra cui HRD, BRCAness, p53, RB1 e CDK4. L'incremento progressivo della firma HRD indica una compromissione graduale dei sistemi di riparazione mediante ricombinazione omologa,

confermata dall'arricchimento di *pathway* biologici legati a ipossia e rischio genomico, maggiormente espressi nei tumori HER2 2+. In quest'ottica i dati generati in questo progetto supportano i dati di letteratura. Diversi studi trascrittomici suggeriscono che i tumori HER2-*low* possano presentare caratteristiche molecolari distinte rispetto ai tumori HER2-0, incluse differenze nelle vie correlate alla proliferazione e nelle interazioni tra tumore e microambiente tumorale (Tarantino P. et al., 2020, Schettini F. et al., 2021, Denkert C. et al., 2021). Tuttavia, le evidenze riguardanti una maggiore instabilità genomica, le firme HRD/BRCAness o specifiche alterazioni nelle vie del ciclo cellulare, rimangono limitate e non ancora dimostrate in modo coerente tra gli studi (Schettini F. et al., 2021). La maggiore espressione della firma Treg osservata nei nostri dati risulta inoltre coerente con un microambiente più immunosoppresso (Fridman WH. et al., 2017). I tumori HER2 2+ sono spesso descritti come biologicamente intermedi e possono presentare un rischio genomico più elevato e caratteristiche associate al danno del DNA, rendendo plausibile l'arricchimento osservato nelle firme di HRD e di rischio genomico (Schettini F. et al., 2021, Prat A. et al., 2015). Inoltre, l'aumentata espressione di B7-H3 (*CD276*) è compatibile con meccanismi di evasione immunitaria e ed è stata associata a fenotipi tumorali più aggressivi (Miller CD. et al., 2024). L'analisi dei sottotipi molecolari PAM50 ha evidenziato una netta prevalenza dei sottotipi luminali A e B, confermando come i tumori HER2-*low* presentino prevalentemente un profilo biologico *luminal-like*. L'analisi del rischio di recidiva è coerente con l'arricchimento di firme associate al danno del DNA e al rischio genomico osservato nei tumori con maggiore espressione di HER2 all'interno dello spettro HER2-negativo/*low*.

I dati hanno indicato inoltre che il microambiente tumorale di questi tumori appare immunologicamente *cold*, caratterizzato da bassi livelli di infiltrazione linfocitaria, confermati sia dall'analisi immunohistochimica dei tessuti FFPE, sia dalle analisi trascrittomiche che hanno evidenziato una ridotta attivazione di firme e geni associati alla risposta immunitaria. Nei tumori con bassi livelli di TILs è stata inoltre osservata una maggiore espressione del recettore androgenico (AR) e delle firme di segnalazione estrogenica, suggerendo che i tumori con fenotipo immunologico *cold* siano maggiormente dipendenti dai segnali endocrini.

Nel complesso, i dati NanoString mettono in evidenza la sostanziale eterogeneità biologica all'interno dello spettro HER2-*low*, supportando la visione emergente secondo cui la malattia HER2-*low* rappresenta un sottogruppo molecolarmente eterogeneo piuttosto che un'entità uniforme (Tarantino P. et al., 2020, Denkert C. et al., 2021, Schettini F. et al., 2021).

Nonostante le differenze biologiche osservate, l'analisi di sopravvivenza non ha evidenziato differenze significative in termini di iDFS o OS correlate allo stato di HER2. Indipendentemente

dall'espressione di HER2, tuttavia, un risultato rilevante riguarda la perdita del gene *PTEN* che è risultata significativamente correlata con la sopravvivenza globale.

Un ulteriore aspetto metodologico emerso dai risultati ottenuti riguarda l'importanza di utilizzare tessuti recenti per la rivalutazione immunohistochimica. Nella coorte in studio è stata osservata una maggiore prevalenza di tumori HER2-null tra i campioni antecedenti al 2011. Questo fenomeno è verosimilmente attribuibile alla progressiva perdita di antigenicità nei campioni FFPE conservati a lungo e può determinare una sottostima dell'espressione di HER2. Questi dati sono in linea con i dati di letteratura: come evidenziato da Gillo F et al., 2019, le condizioni di fissazione originarie e il tempo prolungato di conservazione possono indurre la degradazione degli epitopi proteici di HER2, determinando una riduzione del segnale immunohistochimico, traducendosi in falsi negativi o nella riclassificazione di casi precedentemente positivi verso uno *score* HER2-0. In ottica clinica, questo aspetto sottolinea l'importanza di rivalutare lo stato di HER2 su un campione recente o tramite re-biopsia, soprattutto quando la rivalutazione è necessaria per guidare le scelte terapeutiche e l'accesso a terapie target come gli ADC.

## CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Il progetto NextGIM ha generato un *set* di dati clinico-patologici e traslazionali di elevata qualità e costituisce una delle più ampie casistiche disponibili per la caratterizzazione molecolare dei tumori HER2 0-null, HER2-*ultralow*, HER2-*low* in un sottogruppo ben definito di carcinoma mammario, ovvero i tumori ormono-recettori positivi (ER+). In questo senso ha dato un importante contributo alla comprensione della loro eterogeneità biologica e delle loro implicazioni cliniche. Inoltre, dal punto di vista clinico, ha consentito analisi a lungo termine dei risultati e l'esplorazione dell'effetto dei trattamenti su questo sottogruppo di pazienti.

I risultati hanno mostrato che l'espressione di HER2 all'interno dell'intervallo HER2-negativo non identifica sottogruppi nettamente distinti dal punto di vista prognostico, ma differenti per profilo molecolare, che possono influenzare l'andamento della malattia e la risposta ai trattamenti.

Guardando al futuro, l'espansione delle tecniche di profilazione molecolare ad alta risoluzione (tra cui il sequenziamento dell'intero trascrittoma, la trascrittomica e la proteomica spaziale) sarà essenziale per individuare sottili gradienti biologici che potrebbero non emergere da pannelli mirati.

L'integrazione della patologia digitale e dell'analisi delle immagini basata su intelligenza artificiale (*scoring assistito dall'intelligenza artificiale* - Dong YH. et al., 2025) potrà inoltre migliorare ulteriormente la precisione dello *scoring* di HER2 e la caratterizzazione del microambiente tumorale.

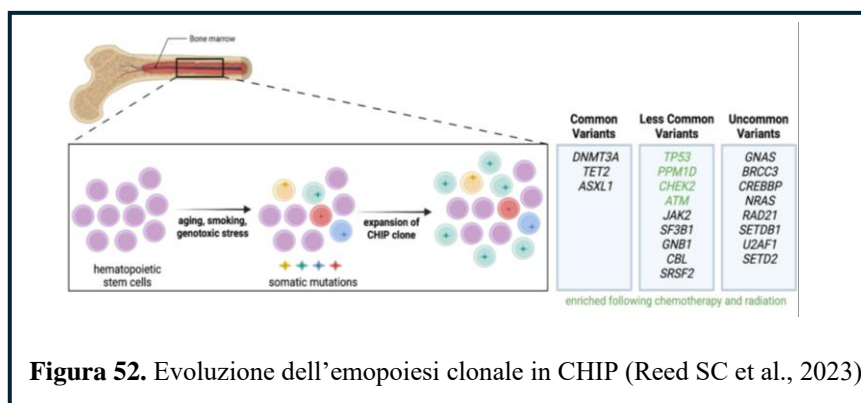
Complessivamente, il progetto stabilisce una piattaforma solida per la ricerca traslazionale e clinica futura sul carcinoma mammario HER2-negativo, con particolare focus sullo spazio emergente *-ultralow*, fornendo le basi metodologiche per la prossima generazione di strategie diagnostiche e terapeutiche.

# ALTRE ATTIVITA': valutazione dell'emopoiesi clonale nella tossicità all'immunoterapia

## 7.1. Introduzione

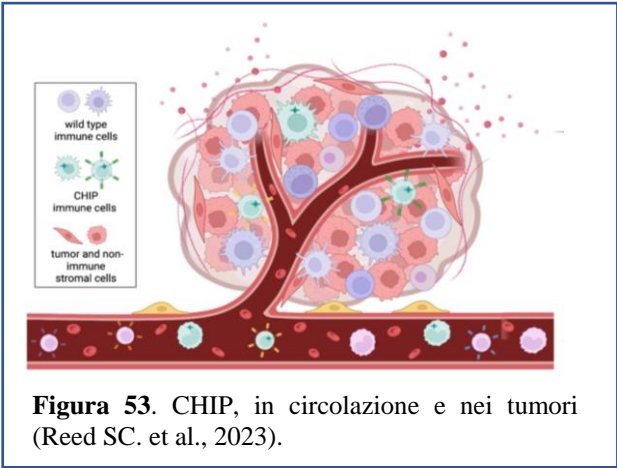
Durante l'internato di tesi, è stato possibile partecipare a uno studio pilota finanziato dal bando 5X1000 2022 del Policlinico San Martino, volto a indagare la correlazione tra l'emopoiesi clonale "Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential (CHIP)", ovvero mutazioni somatiche che si verificano in cellule staminali emopoietiche, e i trattamenti sistemici antitumorali, con particolare riferimento all'immunoterapia in relazione alla risposta alla terapia e a possibilità di insorgenza di tossicità correlata. Questa valutazione è stata condotta su pazienti con carcinoma mammario triplo negativo localmente avanzato, trattate nel *setting* neo-adiuvante, con chemioterapia oppure con chemioterapia associata all'immunoterapia.

L'emopoiesi è un processo fisiologico regolato da segnali intrinseci (programmi trascrizionali e modificazioni epigenetiche) ed estrinseci (citochine, fattori di crescita, nicchia midollare) (Nakamura-Ishizu A. et al., 2012). La nicchia midollare, composta da cellule stromali mesenchimali, osteoblasti ed endotelio vascolare, bilancia l'autorinnovamento, la quiescenza e il differenziamento cellulare attraverso *pathway* conservati come Notch, Wnt e SCF/c-Kit (Orkin SH. and Zon LI., 2008).



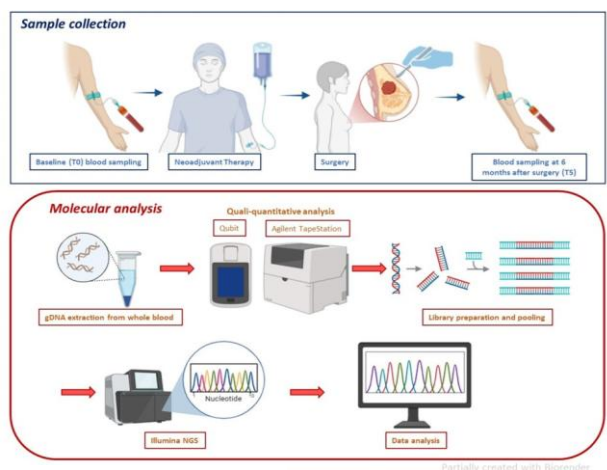
La CHIP consiste in popolazioni ematopoietiche con mutazioni somatiche in assenza di malattia ematologica clinica (**Figura 52**). La sua frequenza aumenta con l'età e in molti casi può rimanere silente, senza conseguenze cliniche evidenti, ma risulta associata a rischio cardiovascolare, di sviluppo di neoplasie mieloidi secondarie e possibile aumento della tossicità da terapie antineoplastiche (Warren JT. and Link DC., 2020, Reed SC. et al., 2023). Mutazioni comuni coinvolgono *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *TP53*, *SF3B1*, *PPM1D*, *SRSF2*, *U2AF1*, regolando epigenetica, riparazione del DNA e differenziamento. Inizialmente osservata in neoplasie ematologiche, la CHIP può anche influenzare l'ambiente tumorale tramite

meccanismi infiammatori, immunologici e angiogenici, con potenziale impatto sulla progressione del tumore solido (Arends CM. and Damm F., 2022, Nguyen YTM. et al., 2025; Hajishengallis G. and Chavakis T., 2026). L'immunoterapia mira a modulare le risposte immunitarie contro le cellule tumorali, superando i meccanismi di *escape*. Diversi studi, tra cui quello condotto da Kumar A. et al., nel 2024, hanno dimostrato l'efficacia dell'introduzione dell'immunoterapia come strategia terapeutica nel trattamento dei tumori solidi. Tuttavia, l'attivazione massiva del sistema immunitario aumenta i cicli di divisione cellulare, con conseguente maggiore rischio di errori nella replicazione del DNA (Reed SC. et al., 2023), potenzialmente favorendo l'espansione di CHIP. Studi recenti indicano che circa il 25–30% dei pazienti con tumori solidi presenta CHIP. A riguardo però non è ancora pienamente definita l'associazione, in particolare nel tumore della mammella, tra la presenza di CHIP e la tossicità delle terapie sistemiche, in particolare in termini di tossicità ematologica.



## 7.2. Materiali e Metodi

In questo studio l'analisi è stata condotta su sottopopolazione selezionata di pazienti con tumore mammario triplo negativo trattate nel *setting* neo-adiuvante con immuno-terapia in combinazione con chemioterapia e su un sottogruppo di controllo con caratteristiche clinico-patologiche simili trattate con sola chemioterapia presso il Policlinico San Martino all'interno dello Studio NEOGENE.



La presenza di emopoiesi clonale è stata valutata mediante sequenziamento di nuova generazione (NGS) utilizzando un pannello mieloide mirato su DNA estratto da sangue periferico, un approccio definito come *biopsia liquida*.

Il pannello comprende l'analisi di geni comunemente coinvolti nei disordini ematologici, inclusi *DNMT3A*, *TET2* e *ASXL1*.

**Tabella 13.** I geni evidenziati in arancione sono quindi quelli per cui il pannello garantisce sequenziamento completo di tutte le regioni codificanti.

<https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/pillar-oncoreveal-myeloid-panel-data-sheet-m-gl-02028/pillar-oncoreveal-myeloid-panel-data-sheet-m-gl-02028.PDF>

#### oncoReveal™ Myeloid Panel (58 genes)

ABL1	BRAF	CEBPA	ETV6	HRAS	KDM6A	NPM1	PTEN	SMC1A	TP53
ANKRD26	CALR	CSF3R	EZH2	IDH1	KIT	NRAS	PTPN11	SMC3	U2AF1
ASXL1	CBL	CUX1	FLT3	IDH2	KMT2A	PDGFRA	RAD21	SRSF2	WT1
ATRX	CBLB	DDX41	GATA1	IKZF1	KRAS	PFH6	RUNX1	STAG1	ZRSR2
BCOR	CBLC	DNMT3A	GATA2	JAK2	MPL	PIGA	SETBP1	STAG2	
BCORL1	CDKN2A	ETNK1	GNAS	JAK3	NF1	PPM1D	SF3B1	TET2	

Genes highlighted in orange indicate full CDS coverage

Il disegno sperimentale ha previsto un'analisi longitudinale della CHIP attraverso due tempistiche: *baseline*, prima del trattamento e 6 mesi post-intervento chirurgico.

- Il DNA genomico (gDNA) è stato isolato dai leucociti circolanti su sangue periferico utilizzando il *QIAamp Blood Mini Kit* (Qiagen). In fase di ottimizzazione sono stati confrontati due volumi di campione (200 µL e 400 µL), con migliori risultati ottenuti usando 200 µL. Le librerie genomiche sono state generate mediante *Indexing-PCR*, purificate con biglie magnetiche e valutate per quantità (Qubit™ 2.0) e integrità (*Tape HSDNA1000*, Agilent Technologies). Successivamente normalizzate e raggruppate in due *pool* da 12 librerie ciascuno.
- I *pool* sono stati sequenziati utilizzando l'*OncoReveal™ Myeloid Panel*, un pannello NGS mirato a 58 geni coinvolti nelle neoplasie mieloidi, sulla piattaforma *Illumina NextSeq™ 500/550* in collaborazione con l'UO Patologia Molecolare.

### 7.3. Risultati

Il gruppo in studio ha compreso pazienti trattate con chemioterapia in associazione a immunoterapia (N=12), mentre per il gruppo di controllo sono state selezionate pazienti trattate con chemioterapia standard (N=20). L'appaiamento (*matching*) 1:1 è stato effettuato selezionando 12 pazienti per ciascun braccio (N totale = 24). I criteri di appaiamento hanno incluso variabili clinico-patologiche critiche: stadiazione TNM, età, risposta patologica al trattamento.

L'estrazione del DNA e il sequenziamento sono stati effettuati con successo su tutti i 48 campioni inclusi nello studio (pre e post trattamento per tutte le pazienti).

L'analisi preliminare dei dati è stata condotta, in collaborazione con l'Unità di Oncologia Cellulare del San Martino, su 24 campioni pre e post terapia di 12 pazienti: 6 casi che hanno ricevuto chemioterapia combinata con immunoterapia appaiati a 6 controlli, trattati con chemioterapia standard. Tale analisi ha evidenziato che tutti i campioni analizzati presentano un numero non nullo di mutazioni. In particolare, il sequenziamento degli ampliconi e la successiva analisi mutazionale hanno mostrato la presenza di mutazioni potenzialmente patogeniche già nella fase pre-terapia, con una tendenza all'incremento dopo il trattamento. È stato osservato un numero medio di  $5,5 \pm 1,3$  mutazioni per campione prima del trattamento e di  $9,0 \pm 1,5$  dopo il trattamento, corrispondente a un incremento intra-paziente medio di  $3,5 \pm 1,75$  mutazioni.

Le analisi dei dati molecolari sull'intera casistica e la correlazione con i dati clinici, in particolare con l'insorgenza di tossicità immuno-correlata, al momento della stesura di questa tesi sono tuttora in corso.

---

# BIBLIOGRAFIA

## Articoli scientifici

1. Anderson MW, Schrijver I. Next generation DNA sequencing and the future of genomic medicine. *Genes (Basel)*. 2010 May 25;1(1):38-69. doi: [10.3390/genes1010038](https://doi.org/10.3390/genes1010038). PMID: 24710010; PMCID: PMC3960862
2. Arends CM, Damm F. Klonale Hämatopoese und solide Neoplasien [Clonal hematopoiesis and solid neoplasms]. *Inn Med (Heidelb)*. 2022 Nov;63(11):1133-1140. German. doi: [10.1007/s00108-022-01404-x](https://doi.org/10.1007/s00108-022-01404-x). Epub 2022 Sep 23. PMID: 36149440.
3. 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, Ponzone 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](https://doi.org/10.1186/s13073-022-01104-z). PMID: 36038884; PMCID: PMC9426037.
4. Bodewes FTH, van Asselt AA, Dorrius MD, Greuter MJW, de Bock GH. Mammographic breast density and the risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Breast*. 2022 Dec;66:62-68. doi: [10.1016/j.breast.2022.09.007](https://doi.org/10.1016/j.breast.2022.09.007). Epub 2022 Sep 26. PMID: 36183671; PMCID: PMC9530665.
5. Bonadonna G, Brusamolino E, Valagussa P, Rossi A, Brugnatelli L, Brambilla C, De Lena M, Tancini G, Bajetta E, Musumeci R, Veronesi U. Combination chemotherapy as an adjuvant treatment in operable breast cancer. *N Engl J Med*. 1976 Feb 19;294(8):405-10. doi: [10.1056/NEJM197602192940801](https://doi.org/10.1056/NEJM197602192940801). PMID: 1246307.
6. Boyd NF, Guo H, Martin LJ, Sun L, Stone J, Fishell E, Jong RA, Hislop G, Chiarelli A, Minkin S, Yaffe MJ. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med*. 2007 Jan 18;356(3):227-36. doi: [10.1056/NEJMoa062790](https://doi.org/10.1056/NEJMoa062790). PMID: 17229950.
7. Cardoso F, Paluch-Shimon S, Senkus E, Curigliano G, Aapro MS, André F, Barrios CH, Bergh J, Bhattacharyya GS, Biganzoli L, Boyle F, Cardoso MJ, Carey LA, Cortés J, El Saghir NS, Elzayat M, Eniu A, Fallowfield L, Francis PA, Gelmon K, Gligorov J, Haidinger R, Harbeck N, Hu X, Kaufman B, Kaur R, Kiely BE, Kim SB, Lin NU, Mertz SA, Neciosup S, Offersen BV, Ohno S, Pagani O, Prat A, Penault-Llorca F, Rugo HS, Sledge GW, Thomssen C, Vorobiof DA, Wiseman T, Xu B, Norton L, Costa A, Winer EP. 5th ESO-ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 5). *Ann Oncol*. 2020 Dec;31(12):1623-1649. doi: [10.1016/j.annonc.2020.09.010](https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.09.010). Epub 2020 Sep 23. PMID: 32979513; PMCID: PMC7510449.
8. Chang HL, Schwettmann B, McArthur HL, Chan IS. Antibody-drug conjugates in breast cancer: overcoming resistance and boosting immune response. *J Clin Invest*. 2023 Sep

15;133(18):e172156. doi: [10.1172/JCI172156](https://doi.org/10.1172/JCI172156). PMID: 37712425; PMCID: PMC10503805.

9. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet*. 2001 Oct 27;358(9291):1389-99. doi: [10.1016/S0140-6736\(01\)06524-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06524-2). PMID: 11705483.
10. Cortés J, Kim SB, Chung WP, Im SA, Park YH, Hegg R, Kim MH, Tseng LM, Petry V, Chung CF, Iwata H, Hamilton E, Curigliano G, Xu B, Huang CS, Kim JH, Chiu JWY, Pedrini JL, Lee C, Liu Y, Cathcart J, Bako E, Verma S, Hurvitz SA; DESTINY-Breast03 Trial Investigators. Trastuzumab Deruxtecan versus Trastuzumab Emtansine for Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2022 Mar 24;386(12):1143-1154. doi: [10.1056/NEJMoa2115022](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2115022). PMID: 35320644.
11. Del Mastro L, De Placido S, Bruzzi P, De Laurentiis M, Boni C, Cavazzini G, Durando A, Turletti A, Nisticò C, Valle E, Garrone O, Puglisi F, Montemurro F, Barni S, Ardizzoni A, Gamucci T, Colantuoni G, Giuliano M, Gravina A, Papaldo P, Bighin C, Bisagni G, Forestieri V, Cognetti F; Gruppo Italiano Mammella (GIM) investigators. Fluorouracil and dose-dense chemotherapy in adjuvant treatment of patients with early-stage breast cancer: an open-label, 2 × 2 factorial, randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2015 May 9;385(9980):1863-72. doi: [10.1016/S0140-6736\(14\)62048-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62048-1). Epub 2015 Mar 2. PMID: 25740286.
12. Del Mastro L, Mansutti M, Bisagni G, Ponzzone R, Durando A, Amaducci L, Campadelli E, Cognetti F, Frassoldati A, Michelotti A, Mura S, Urracci Y, Sanna G, Gori S, De Placido S, Garrone O, Fabi A, Barone C, Tamberi S, Bighin C, Puglisi F, Moretti G, Arpino G, Ballestrero A, Poggio F, Lambertini M, Montemurro F, Bruzzi P; Gruppo Italiano Mammella investigators. Extended therapy with letrozole as adjuvant treatment of postmenopausal patients with early-stage breast cancer: a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2021 Oct;22(10):1458-1467. doi: [10.1016/S1470-2045\(21\)00352-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00352-1). Epub 2021 Sep 17. PMID: 34543613.
13. Denkert C, Seither F, Schneeweiss A, Link T, Blohmer JU, Just M, Wimberger P, Forberger A, Tesch H, Jackisch C, Schmatloch S, Reinisch M, Solomayer EF, Schmitt WD, Hanusch C, Fasching PA, Lübke K, Solbach C, Huober J, Rhiem K, Marmé F, Reimer T, Schmidt M, Sinn BV, Janni W, Stickeler E, Michel L, Stötzer O, Hahnen E, Furlanetto J, Seiler S, Nekljudova V, Untch M, Loibl S. Clinical and molecular characteristics of HER2-low-positive breast cancer: pooled analysis of individual patient data from four prospective, neoadjuvant clinical trials. *Lancet Oncol*. 2021 Aug;22(8):1151-1161. doi: [10.1016/S1470-2045\(21\)00301-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00301-6). Epub 2021 Jul 9. PMID: 34252375.
14. Dieci MV, Radošević-Robin N, Fineberg S, van den Eynden G, Ternes N, Penault-Llorca F, Pruneri G, D'Alfonso TM, Demaria S, Castaneda C, Sanchez J, Badve S, Michiels S, Bossuyt V, Rojo F, Singh B, Nielsen T, Viale G, Kim SR, Hewitt S, Wienert S, Loibl S, Rimm D, Symmans F, Denkert C, Adams S, Loi S, Salgado R; International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer.

- Semin Cancer Biol. 2018 Oct;52(Pt 2):16-25. doi: [10.1016/j.semcancer.2017.10.003](https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.10.003). Epub 2017 Oct 9. PMID: 29024776.
15. Dong YH, Xu YT, Jiang XZ, Xu L, Yu RJ, Wang R, Zhang QF. HER2-low and ultralow expression of invasive breast carcinoma: clinicopathological features and immunohistochemical consistency analysis. NPJ Breast Cancer. 2025 Dec 9;12(1):9. doi: [10.1038/s41523-025-00872-2](https://doi.org/10.1038/s41523-025-00872-2). PMID: 41366209; PMCID: PMC12796190.
  16. Escala-Garcia M, Morra A, Canisius S, Chang-Claude J, Kar S, Zheng W, Bojesen SE, Easton D, Pharoah PDP, Schmidt MK. Breast cancer risk factors and their effects on survival: a Mendelian randomisation study. BMC Med. 2020 Nov 17;18(1):327. doi: [10.1186/s12916-020-01797-2](https://doi.org/10.1186/s12916-020-01797-2). PMID: 33198768; PMCID: PMC7670589.
  17. Fisher B, Brown A, Mamounas E, Wieand S, Robidoux A, Margolese RG, Cruz AB Jr, Fisher ER, Wickerham DL, Wolmark N, DeCillis A, Hoehn JL, Lees AW, Dimitrov NV. Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. J Clin Oncol. 1997 Jul;15(7):2483-93. doi: [10.1200/JCO.1997.15.7.2483](https://doi.org/10.1200/JCO.1997.15.7.2483). PMID: 9215816.
  18. Fridman WH, Zitvogel L, Sautès-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. Nat Rev Clin Oncol. 2017 Dec;14(12):717-734. doi: [10.1038/nrclinonc.2017.101](https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.101). Epub 2017 Jul 25. PMID: 28741618.
  19. Gegechkori N, Haines L, Lin JJ. Long-Term and Latent Side Effects of Specific Cancer Types. Med Clin North Am. 2017 Nov;101(6):1053-1073. doi: [10.1016/j.mcna.2017.06.003](https://doi.org/10.1016/j.mcna.2017.06.003). Epub 2017 Aug 2. PMID: 28992854; PMCID: PMC5777532.
  20. Grillo F, Bruzzone M, Pigozzi S, Prosapio S, Migliora P, Fiocca R, Mastracci L. Immunohistochemistry on old archival paraffin blocks: is there an expiry date? J Clin Pathol. 2017 Nov;70(11):988-993. doi: [10.1136/jclinpath-2017-204387](https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204387). Epub 2017 Jun 8. PMID: 28596153.
  21. Hajishengallis G, Chavakis T. Inflammation and clonal haematopoiesis interplay and their impact on human disease. Nat Rev Mol Cell Biol. 2026 Jan 6:10.1038/s41580-025-00936-y. doi: [10.1038/s41580-025-00936-y](https://doi.org/10.1038/s41580-025-00936-y). Epub ahead of print. PMID: 41491423; PMCID: PMC12795708.
  22. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, Ruddy K, Tsang J, Cardoso F. Breast cancer. Nat Rev Dis Primers. 2019 Sep 23;5(1):66. doi: [10.1038/s41572-019-0111-2](https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2). PMID: 31548545.
  23. Jin J, Liu T, Cai M, Zhao M, Guo D, Lv H, Wang L, Wang B, Wang H, Tao Z, Yang W, Hu X. Clinical and genomic characteristics of HER2-ultralow breast cancer and implications for T-DXd therapy. Precis Clin Med. 2025 Oct 23;8(4):pbaf026. doi: [10.1093/pcmedi/pbaf026](https://doi.org/10.1093/pcmedi/pbaf026). PMID: 41262325; PMCID: PMC12624259.
  24. Kang S, Kim SB. HER2-Low Breast Cancer: Now and in the Future. Cancer Res Treat. 2024 Jul;56(3):700-720. doi: [10.4143/crt.2023.1138](https://doi.org/10.4143/crt.2023.1138). Epub 2024 Jan 30. PMID: 38291745; PMCID: PMC11261208.

25. Kumar A, Emdad L, Das SK, gegechkori PB. Recent advances and progress in immunotherapy of solid cancers. *Adv Cancer Res.* 2024;164:111-190. [doi: 10.1016/bs.acr.2024.05.004](https://doi.org/10.1016/bs.acr.2024.05.004). Epub 2024 May 31. PMID: 39306365.
26. Liu X, Fang Y, Li Y, Li Y, Qi L, Wang X. Pertuzumab combined with trastuzumab compared to trastuzumab in the treatment of HER2-positive breast cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Front Oncol.* 2022 Sep 28;12:894861. [doi: 10.3389/fonc.2022.894861](https://doi.org/10.3389/fonc.2022.894861). PMID: 36249045; PMCID: PMC9555237
27. Łukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers (Basel).* 2021 Aug 25;13(17):4287. [doi: 10.3390/cancers13174287](https://doi.org/10.3390/cancers13174287). PMID: 34503097; PMCID: PMC8428369.
28. Marchiò C, Criscitiello C, Scatena C, Santinelli A, Graziano P, Malapelle U, Cursano G, Venetis K, Fanelli GN, Pepe F, Berrino E, Angelis C, Perrone G, Curigliano G, Fusco N. Think "HER2" different: integrative diagnostic approaches for HER2-low breast cancer. *Pathologica.* 2023 Dec;115(6):292-301. [doi:10.32074/1591-951X-942](https://doi.org/10.32074/1591-951X-942). PMID: 38180137; PMCID: PMC10767801.
29. Martin M, Brase JC, Ruiz A, Prat A, Kronenwett R, Calvo L, Petry C, Bernard PS, Ruiz-Borrego M, Weber KE, Rodriguez CA, Alvarez IM, Segui MA, Perou CM, Casas M, Carrasco E, Caballero R, Rodriguez-Lescure A. Prognostic ability of EndoPredict compared to research-based versions of the PAM50 risk of recurrence (ROR) scores in node-positive, estrogen receptor-positive, and HER2-negative breast cancer. A GEICAM/9906 sub-study. *Breast Cancer Res Treat.* 2016 Feb;156(1):81-9. [doi: 10.1007/s10549-016-3725-z](https://doi.org/10.1007/s10549-016-3725-z). Epub 2016 Feb 24. PMID: 26909792; PMCID: PMC4788691.
30. Mavaddat N, Pharoah PD, Michailidou K, Tyrer J, Brook MN, Bolla MK, Wang Q, Dennis J, Dunning AM, Shah M, Luben R, Brown J, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Nielsen SF, Flyger H, Czene K, Darabi H, Eriksson M, Peto J, Dos-Santos-Silva I, Dudbridge F, Johnson N, Schmidt MK, Brooks A, Verhoef S, Rutgers EJ, Swerdlow A, Ashworth A, Orr N, Schoemaker MJ, Figueroa J, Chanock SJ, Brinton L, Lissowska J, Couch FJ, Olson JE, Vachon C, Pankratz VS, Lambrechts D, Wildiers H, Van Ongeval C, van Limbergen E, Kristensen V, Grenaker Alnæs G, Nord S, Borresen-Dale AL, Nevanlinna H, Muranen TA, Aittomäki K, Blomqvist C, Chang-Claude J, Rudolph A, Seibold P, Flesch-Janys D, Fasching PA, Haeberle L, Ekici AB, Beckmann MW, Burwinkel B, Marme F, Schneeweiss A, Sohn C, Trentham-Dietz A, Newcomb P, Titus L, Egan KM, Hunter DJ, Lindstrom S, Tamimi RM, Kraft P, Rahman N, Turnbull C, Renwick A, Seal S, Li J, Liu J, Humphreys K, Benitez J, Pilar Zamora M, Arias Perez JI, Menéndez P, Jakubowska A, Lubinski J, Jaworska-Bieniek K, Durda K, Bogdanova NV, Antonenkova NN, Dörk T, Anton-Culver H, Neuhausen SL, Ziogas A, Bernstein L, Devilee P, Tollenaar RA, Seynaeve C, van Asperen CJ, Cox A, Cross SS, Reed MW, Khusnutdinova E, Bermisheva M, Prokofyeva D, Takhirova Z, Meindl A, Schmutzler RK, Sutter C, Yang R, Schürmann P, Bremer M, Christiansen H, Park-Simon TW, Hillemanns P, Guénel P, Truong T, Menegaux F, Sanchez M, Radice P, Peterlongo P, Manoukian S, Pensotti V, Hopper JL, Tsimiklis H, Apicella C, Southey MC, Brauch H, Brüning T, Ko YD, Sigurdson AJ, Doody MM, Hamann U, Torres D, Ulmer HU, Försti

- A, Sawyer EJ, Tomlinson I, Kerin MJ, Miller N, Andrulis IL, Knight JA, Glendon G, Marie Mulligan A, Chenevix-Trench G, Balleine R, Giles GG, Milne RL, McLean C, Lindblom A, Margolin S, Haiman CA, Henderson BE, Schumacher F, Le Marchand L, Eilber U, Wang-Gohrke S, Hooning MJ, Hollestelle A, van den Ouweland AM, Koppert LB, Carpenter J, Clarke C, Scott R, Mannermaa A, Kataja V, Kosma VM, Hartikainen JM, Brenner H, Arndt V, Stegmaier C, Karina Dieffenbach A, Winqvist R, Pylkäs K, Jukkola-Vuorinen A, Grip M, Offit K, Vijai J, Robson M, Rau-Murthy R, Dwek M, Swann R, Annie Perkins K, Goldberg MS, Labrèche F, Dumont M, Eccles DM, Tapper WJ, Rafiq S, John EM, Whittemore AS, Slager S, Yannoukakos D, Toland AE, Yao S, Zheng W, Halverson SL, González-Neira A, Pita G, Rosario Alonso M, Álvarez N, Herrero D, Tessier DC, Vincent D, Bacot F, Luccarini C, Baynes C, Ahmed S, Maranian M, Healey CS, Simard J, Hall P, Easton DF, Garcia-Closas M. Prediction of breast cancer risk based on profiling with common genetic variants. *J Natl Cancer Inst.* 2015 Apr 8;107(5):djv036. doi: [10.1093/jnci/djv036](https://doi.org/10.1093/jnci/djv036). PMID: 25855707; PMCID: PMC4754625.
31. Miglietta F, Griguolo G, Bottosso M, Giarratano T, Lo Mele M, Fassan M, Cacciatore M, Genovesi E, De Bartolo D, Vernaci G, Amato O, Conte P, Guarneri V, Dieci MV. Evolution of HER2-low expression from primary to recurrent breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* 2021 Oct 12;7(1):137. doi: [10.1038/s41523-021-00343-4](https://doi.org/10.1038/s41523-021-00343-4). Erratum in: *NPJ Breast Cancer.* 2021 Nov 24;7(1):149. doi: [10.1038/s41523-021-00359-w](https://doi.org/10.1038/s41523-021-00359-w). PMID: 34642348; PMCID: PMC8511010.
  32. Miller CD, Lozada JR, Zorko NA, Elliott A, Makovec A, Radovich M, Heath EI, Agarwal N, Mckay RR, Garje R, Bastos BR, Hoon DSB, Orme JJ, Sartor O, VanderWalde A, Nabhan C, Sledge G, Shenderov E, Dehm SM, Lou E, Miller JS, Hwang JH, Antonarakis ES. Pan-Cancer Interrogation of B7-H3 (CD276) as an Actionable Therapeutic Target Across Human Malignancies. *Cancer Res Commun.* 2024 May 30;4(5):1369-1379. doi: [10.1158/2767-9764.CRC-23-0546](https://doi.org/10.1158/2767-9764.CRC-23-0546). PMID: 38709075; PMCID: PMC11138391.
  33. Modi S, Jacot W, Yamashita T, Sohn J, Vidal M, Tokunaga E, Tsurutani J, Ueno NT, Prat A, Chae YS, Lee KS, Niikura N, Park YH, Xu B, Wang X, Gil-Gil M, Li W, Pierga JY, Im SA, Moore HCF, Rugo HS, Yerushalmi R, Zagouri F, Gombos A, Kim SB, Liu Q, Luo T, Saura C, Schmid P, Sun T, Gambhire D, Yung L, Wang Y, Singh J, Vitazka P, Meinhardt G, Harbeck N, Cameron DA; DESTINY-Breast04 Trial Investigators. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2022 Jul 7;387(1):9-20. doi: [10.1056/NEJMoa2203690](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2203690). Epub 2022 Jun 5. PMID: 35665782; PMCID: PMC10561652.
  34. Molinelli C, Jacobs F, Marchiò C, Pitto F, Cosso M, Spinaci S, de Azambuja E, Schettini F, Agostinetto E, Lambertini M. HER2-Low Breast Cancer: Where Are We? *Breast Care (Basel).* 2022 Dec;17(6):533-545. doi: [10.1159/000527391](https://doi.org/10.1159/000527391). Epub 2022 Oct 6. PMID: 36590146; PMCID: PMC9801403.
  35. Mukherjee A, Bilecz AJ, Lengyel E. The adipocyte microenvironment and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2022 Sep;41(3):575-587. doi: [10.1007/s10555-022-10059-x](https://doi.org/10.1007/s10555-022-10059-x). Epub 2022 Aug 8. PMID: 35941408.
  36. Nakamura-Ishizu A, Okuno Y, Omatsu Y, Okabe K, Morimoto J, Uede T, Nagasawa T, Suda T, Kubota Y. Extracellular matrix protein tenascin-C is required in the bone

- marrow microenvironment primed for hematopoietic regeneration. *Blood*. 2012 Jun 7;119(23):5429-37. doi: [10.1182/blood-2011-11-393645](https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-393645). Epub 2012 May 2. PMID: 22553313; PMCID: PMC3418770.
37. Narod SA. BRCA mutations in the management of breast cancer: the state of the art. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 Dec;7(12):702-7. doi: [10.1038/nrclinonc.2010.166](https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.166). Epub 2010 Oct 19. PMID: 20956982
  38. Nelson HD, Zakher B, Cantor A, Fu R, Griffin J, O'Meara ES, Buist DS, Kerlikowske K, van Ravesteyn NT, Trentham-Dietz A, Mandelblatt JS, Miglioretti DL. Risk factors for breast cancer for women aged 40 to 49 years: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2012 May 1;156(9):635-48. doi: [10.7326/0003-4819-156-9-201205010-00006](https://doi.org/10.7326/0003-4819-156-9-201205010-00006). PMID: 22547473; PMCID: PMC3561467.
  39. Nguyen YTM, Fujisawa M, Ishikawa S, Sakata-Yanagimoto M. Clonal Hematopoiesis and Solid Cancers. *Cancer Sci*. 2025 Aug;116(8):2055-2063. doi: [10.1111/cas.70097](https://doi.org/10.1111/cas.70097). Epub 2025 May 19. PMID: 40384356; PMCID: PMC12317386.
  40. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):631-44. doi: [10.1016/j.cell.2008.01.025](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.025). PMID: 18295580; PMCID: PMC2628169.
  41. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 10;27(8):1160-7. doi: [10.1200/JCO.2008.18.1370](https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.1370). Epub 2009 Feb 9. PMID: 19204204; PMCID: PMC2667820.
  42. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52. doi: [10.1038/35021093](https://doi.org/10.1038/35021093). PMID: 10963602.
  43. Pizzamiglio S, Blanda A, Appierto V, Minicozzi P, Carnevale MG, De Santis MC, Re B, Cortesi L, Gasparini E, Arpino G, Giuliano M, Molinaro V, Iorio MV, De Cecco L, Bertolotti A, Brich S, Vingiani A, De Marco C, Pruneri G, Verderio P, Di Cosimo S. HER2-low breast cancer is immune-cold: insights into tumor-infiltrating immune cells and implications for immunotherapy. *NPJ Breast Cancer*. 2025 Dec 3;12(1):8. doi: [10.1038/s41523-025-00867-z](https://doi.org/10.1038/s41523-025-00867-z). PMID: 41330941; PMCID: PMC12796185.
  44. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, Díez M, Viladot M, Arance A, Muñoz M. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*. 2015 Nov;24 Suppl 2:S26-35. doi: [10.1016/j.breast.2015.07.008](https://doi.org/10.1016/j.breast.2015.07.008). Epub 2015 Aug 5. PMID: 26253814.
  45. Rakha EA, Tse GM, Quinn CM. An update on the pathological classification of breast cancer. *Histopathology*. 2023 Jan;82(1):5-16. doi: [10.1111/his.14786](https://doi.org/10.1111/his.14786). PMID: 36482272; PMCID: PMC10108289.

46. Reed SC, Croessmann S, Park BH. CHIP Happens: Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential and Its Relationship to Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2023 Apr 14;29(8):1403-1411. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-22-2598](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-2598). PMID: 36454121; PMCID: PMC10106364
47. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, Wienert S, Van den Eynden G, Baehner FL, Penault-Llorca F, Perez EA, Thompson EA, Symmans WF, Richardson AL, Brock J, Criscitiello C, Bailey H, Ignatiadis M, Floris G, Sparano J, Kos Z, Nielsen T, Rimm DL, Allison KH, Reis-Filho JS, Loibl S, Sotiriou C, Viale G, Badve S, Adams S, Willard-Gallo K, Loi S; International TILs Working Group 2014. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015 Feb;26(2):259-71. doi: [10.1093/annonc/mdu450](https://doi.org/10.1093/annonc/mdu450). Epub 2014 Sep 11. PMID: 25214542; PMCID: PMC6267863.
48. Schettini, F., Chic, N., Brasó-Maristany, F. *et al*. Clinical, pathological, and PAM50 gene expression features of HER2-low breast cancer. *npj Breast Cancer* 7, 1 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41523-020-00208-2>
49. Schettini F, Nucera S, Pascual T, Martínez-Sáez O, Sánchez-Bayona R, Conte B, Buono G, Lambertini M, Punie K, Cejalvo JM, Arpino G, Vigneri P, Generali D, Ciruelos E, Cortés J, Gennari A, Muñoz M, Vidal Losada MJ, Tolaney SM, Prat A, Villacampa G. Efficacy and safety of antibody-drug conjugates in pretreated HER2-low metastatic breast cancer: A systematic review and network meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2025 Jan;132:102865. doi: [10.1016/j.ctrv.2024.102865](https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2024.102865). Epub 2024 Dec 19. PMID: 39709655.
50. Sha R, Kong XM, Li XY, Wang YB. Global burden of breast cancer and attributable risk factors in 204 countries and territories, from 1990 to 2021: results from the Global Burden of Disease Study 2021. *Biomark Res*. 2024 Aug 26;12(1):87. doi: [10.1186/s40364-024-00631-8](https://doi.org/10.1186/s40364-024-00631-8). Erratum in: *Biomark Res*. 2025 Jan 11;13(1):9. doi: [10.1186/s40364-025-00729-7](https://doi.org/10.1186/s40364-025-00729-7). PMID: 39183342; PMCID: PMC11346191.
51. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869-74. doi: [10.1073/pnas.191367098](https://doi.org/10.1073/pnas.191367098). PMID: 11553815; PMCID: PMC58566.
52. Sørlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8418-23. doi: [10.1073/pnas.0932692100](https://doi.org/10.1073/pnas.0932692100). Epub 2003 Jun 26. PMID: 12829800; PMCID: PMC166244.
53. Steensma DP, Bolton KL. What to tell your patient with clonal hematopoiesis and why: insights from 2 specialized clinics. *Blood*. 2020 Oct 1;136(14):1623-1631. doi: [10.1182/blood.2019004291](https://doi.org/10.1182/blood.2019004291). PMID: 32736381; PMCID: PMC7530645.
54. Sui W, Ou M, Chen J, Wan Y, Peng H, Qi M, Huang H, Dai Y. Comparison of immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) assessment

for Her-2 status in breast cancer. *World J Surg Oncol*. 2009 Nov 9;7:83. doi: [10.1186/1477-7819-7-83](https://doi.org/10.1186/1477-7819-7-83). PMID: 19895711; PMCID: PMC2776594.

55. Takada K, Kashiwagi S, Nishikawa M, Kochi A, Watanabe C, Kinoshita H, Ogisawa K, Shibutani M, Morisaki T. Clinical characteristics and prognostic impact of HER2-ultralow breast cancer and tumor-infiltrating lymphocytes (TILs). *BMC Cancer*. 2025 Nov 28;25(1):1936. doi: [10.1186/s12885-025-15255-w](https://doi.org/10.1186/s12885-025-15255-w). PMID: 41316049; PMCID: PMC12751392.
56. Tarantino P, Hamilton E, Tolaney SM, Cortes J, Morganti S, Ferraro E, Marra A, Viale G, Trapani D, Cardoso F, Penault-Llorca F, Viale G, André F, Curigliano G. HER2-Low Breast Cancer: Pathological and Clinical Landscape. *J Clin Oncol*. 2020 Jun 10;38(17):1951-1962. doi: [10.1200/JCO.19.02488](https://doi.org/10.1200/JCO.19.02488). Epub 2020 Apr 24. PMID: 32330069.
57. von Arx C, De Placido P, Caltavitturo A, Di Rienzo R, Buonaiuto R, De Laurentiis M, Arpino G, Puglisi F, Giuliano M, Del Mastro L. The evolving therapeutic landscape of trastuzumab-drug conjugates: Future perspectives beyond HER2-positive breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2023 Feb;113:102500. doi: [10.1016/j.ctrv.2022.102500](https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2022.102500). Epub 2022 Dec 24. PMID: 36587473.
58. Xia LY, Cao XC, Yu Y. Survival outcomes in HER2-low versus HER2-zero breast cancer after neoadjuvant chemotherapy: a meta-analysis. *World J Surg Oncol*. 2024 Apr 20;22(1):106. doi: [10.1186/s12957-024-03382-w](https://doi.org/10.1186/s12957-024-03382-w). PMID: 38643188; PMCID: PMC11031865.
59. Yang M, Cui M, Sun Y, Liu S, Jiang W. Mechanisms, combination therapy, and biomarkers in cancer immunotherapy resistance. *Cell Commun Signal*. 2024 Jun 19;22(1):338. doi: [10.1186/s12964-024-01711-w](https://doi.org/10.1186/s12964-024-01711-w). PMID: 38898505; PMCID: PMC11186190.
60. Yeong SW, Lee SW, Ong SC. Cost of illness of breast cancer in low- and middle-income countries: a systematic review. *Health Econ Rev*. 2024 Jul 22;14(1):56. doi: [10.1186/s13561-024-00536-0](https://doi.org/10.1186/s13561-024-00536-0). PMID: 39034345; PMCID: PMC11264967.
61. Warren JT, Link DC. Clonal hematopoiesis and risk for hematologic malignancy. *Blood*. 2020 Oct 1;136(14):1599-1605. doi: [10.1182/blood.2019000991](https://doi.org/10.1182/blood.2019000991). PMID: 32736382; PMCID: PMC8209630.
62. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, Bilous M, Ellis IO, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, McShane LM, Dowsett M. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch Pathol Lab Med*. 2018 Nov;142(11):1364-1382. doi: [10.5858/arpa.2018-0902-SA](https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0902-SA). Epub 2018 May 30. PMID: 29846104.

### **Linee guida, manuali, report istituzionali**

1. AIOM – Associazione Italiana di Oncologia Medica. Linee guida neoplasie della mammella. Edizione 2024

2. AJCC Cancer Staging Manual. 8th Edition. Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al. (eds). Springer International Publishing; 2017

## Sitografia

1. <https://www.popsi.it/carcinoma-mammario-parte-studio-destiny-breast05-valutera-trastuzumab-deruxtecan-come-terapia-adiuvante/>
2. [https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975\\_2012/results\\_merged/sect\\_04\\_breast.pdf](https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2012/results_merged/sect_04_breast.pdf)
3. [https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2023/12/2023\\_AIOM\\_NDC-web.pdf](https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2023/12/2023_AIOM_NDC-web.pdf)
4. <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/mammogram/in-depth/dense-breast-tissue/art-20123968>
5. <https://blog.dana-farber.org/insight/2016/03/what-is-her2-positive-breast-cancer/>
6. <https://www.nanostring.com/wp-content/uploads/Breast-Cancer-Product-Bulletin.pdf>
7. <https://nanostring.com/products/ncounter-assays-panels/ncounter-custom-solutions/custom-solutions-overview/>
8. <https://www.youtube.com/watch?v=dlz3q3Bq5B4>
9. [https://nanostring.com/wp-content/uploads/MANC0035\\_nCounter\\_Analysis\\_System\\_MAX\\_FLEX.pdf](https://nanostring.com/wp-content/uploads/MANC0035_nCounter_Analysis_System_MAX_FLEX.pdf)
10. [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-7834-2\\_5](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-7834-2_5)
11. [https://nanostring.com/wp-content/uploads/MAN-C0021-01\\_nCounter\\_Digital\\_Analyzer\\_GEN2.pdf](https://nanostring.com/wp-content/uploads/MAN-C0021-01_nCounter_Digital_Analyzer_GEN2.pdf)
12. <https://www.prima-sci.com/14547935/ncounter-technology>

## **RINGRAZIAMENTI**

Desidero ringraziare la relatrice di questa tesi, Dott.ssa Barbara Cardinali, per avermi guidata durante l'intero periodo di internato con grande competenza, disponibilità e umanità. Ringrazio il Dott. Andrea Sciutto e la Dott.ssa Alice Stella, che, insieme alla Dott.ssa Cardinali, mi hanno accolta e seguita con pazienza, dandomi l'opportunità di lavorare, in modo produttivo ed efficace, in un ambiente sereno.

Ringrazio la relatrice interna, la Prof.ssa Gabriella Pietra, per la sua costante cura e professionalità.

Ringrazio la Prof.ssa Sonia Scarfi e il Dott. Marco Tagliamento per i preziosi e puntuali consigli durante la stesura della tesi.

Ringrazio la Dott.ssa Chiara Molinelli e il Dott. Marco Bruzzone per l'analisi clinica e il loro supporto nella compressione della discussione dei dati clinici del progetto NextGIM.

Ringrazio la Dott.ssa Monica Colombo e il Dott. Davide Ceresa per il contributo dato nell'analisi genomica dello studio sull'emopoiesi clonale.

Inoltre, desidero esprimere la mia sincera riconoscenza alla Prof.ssa Lucia Del Mastro, che mi ha permesso di svolgere l'internato di tesi presso la Clinica Oncologica Medica del San Martino.

Un sentito ringraziamento va alla mia famiglia per l'amore e la pazienza dimostrati, supportandomi ogni giorno, e, aiutandomi ad affrontare i periodi più difficili in cui conciliare studio e lavoro. Ringrazio gli amici che mi sono stati vicini.

Infine, desidero esprimere la mia gratitudine a tutti coloro che hanno contribuito al mio percorso accademico, supportandomi nella mia crescita personale e professionale.