

I tumori in fase di crescita avanzata, infiltranti e/o metastatizzanti, rappresentano una delle principali sfide della medicina moderna.

Oltre ai classici approcci chemioterapici sono stati progressivamente sviluppati nuovi protocolli basati sull'uso di farmaci innovativi a bersaglio molecolare.

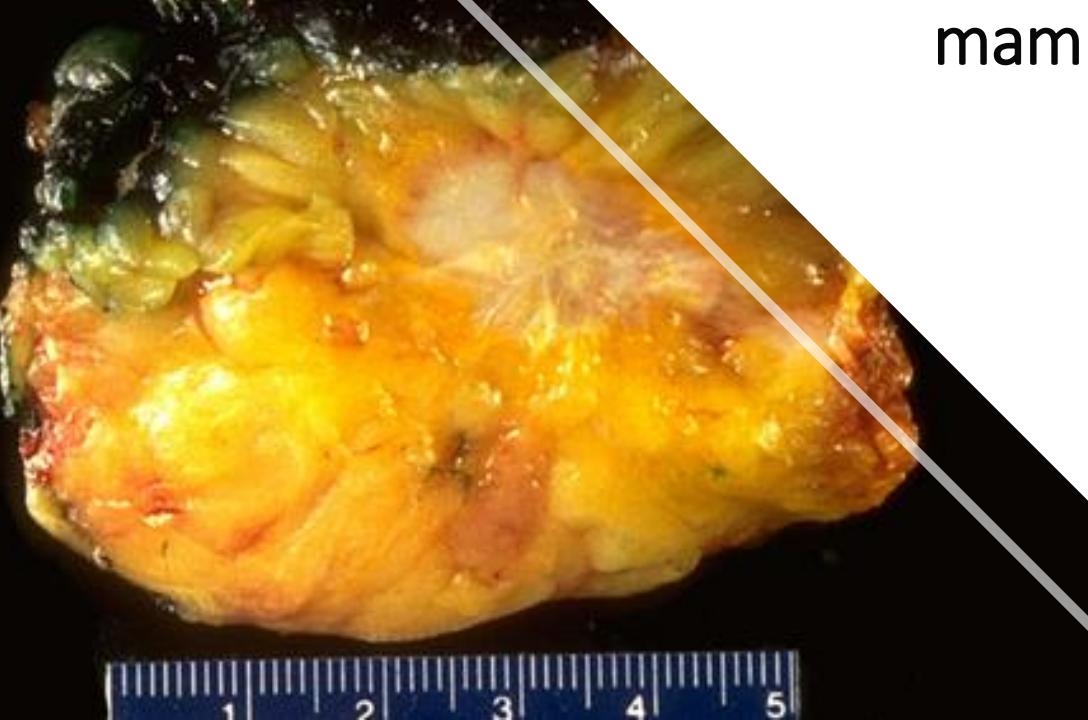
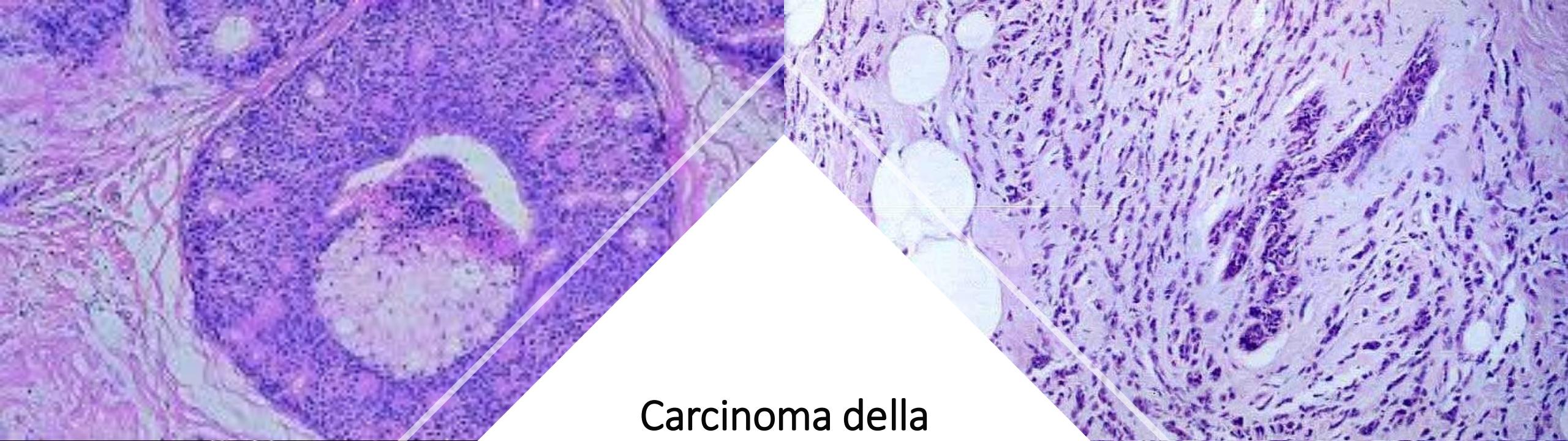
Studio delle mutazioni geniche:

- Non Small-Cell Lung Cancer (NSCLC),
- carcinoma del colon-retto
- tumore stromale gastrointestinale (GIST)
- melanoma in stadio avanzato.
- carcinoma mammella

Modulo di Diagnostica molecolare su tessuto

6 novembre 2025 – Argomenti della lezione

Applicazione della diagnostica molecolare nei tumori della mammella



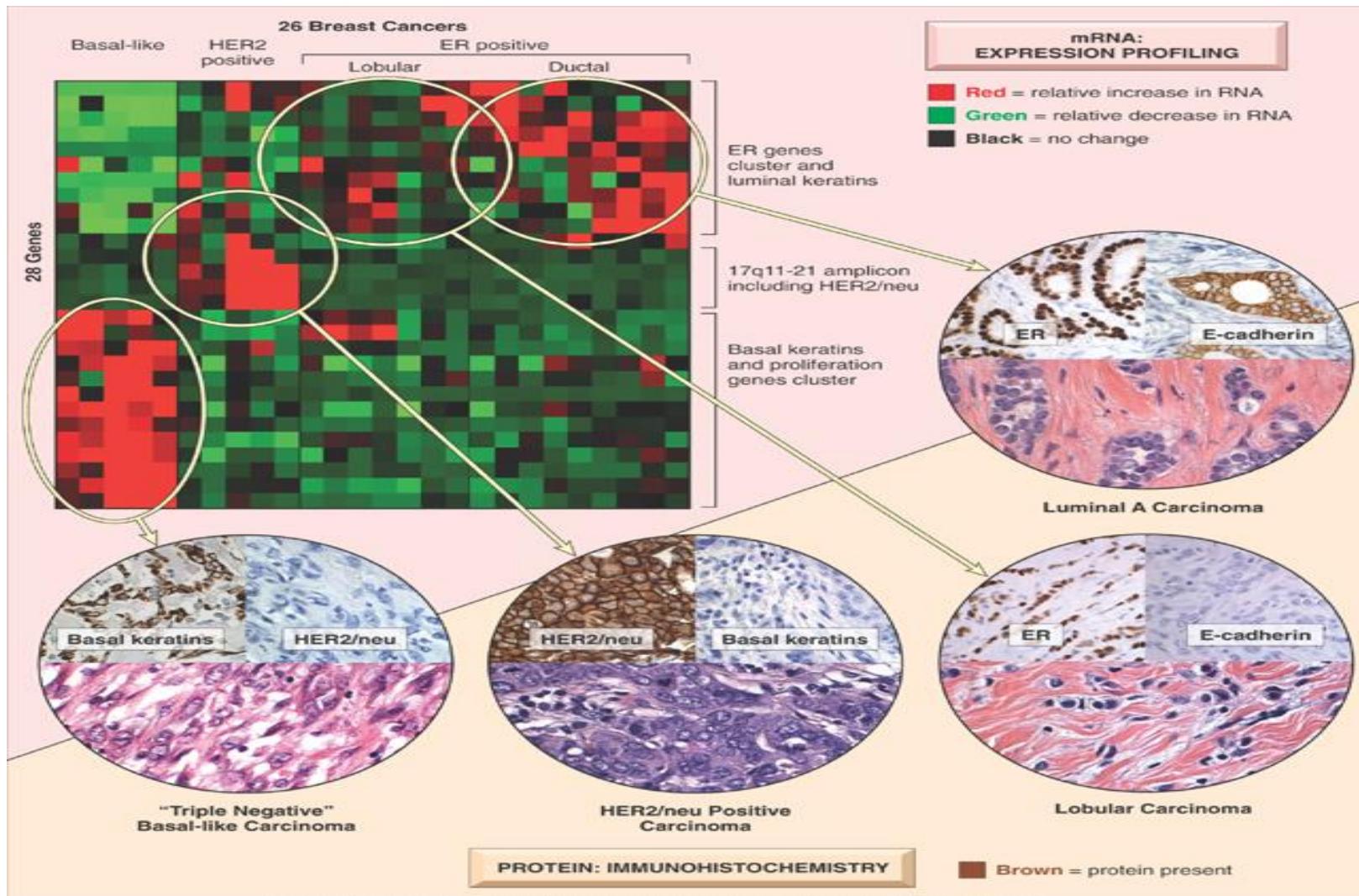
Carcinoma della mammella

Il carcinoma della mammella è una malattia eterogenea e pazienti con tumori apparentemente simili per caratteristiche clinicopatologiche possono presentare un decorso clinico diverso.

In seguito alle indagini di analisi di espressione genica mediante metodica di “microarray” che hanno identificato una “intrinsic gene list” di 496 geni, sono stati individuati **quattro sottotipi di carcinomi invasivi**:

- **“Luminali A”**: neoplasie con marcata espressione dei recettori ormonali;
- **“Luminali B”**: neoplasie che, pur esprimendo i recettori ormonali, hanno un rischio di recidiva elevato, a causa dell'elevato indice proliferativo correlato ad alta espressione dei geni di proliferazione;
- **“HER2”**: caratterizzati dalla presenza di espressione di HER2;
- **“Basal like”**: neoplasie caratterizzate dall'assenza di espressione dei recettori ormonali e di HER2 e da una aumentata espressione delle citocheratine basali (ad esempio CK5/6 e CK14).

La classificazione molecolare del carcinoma della mammella



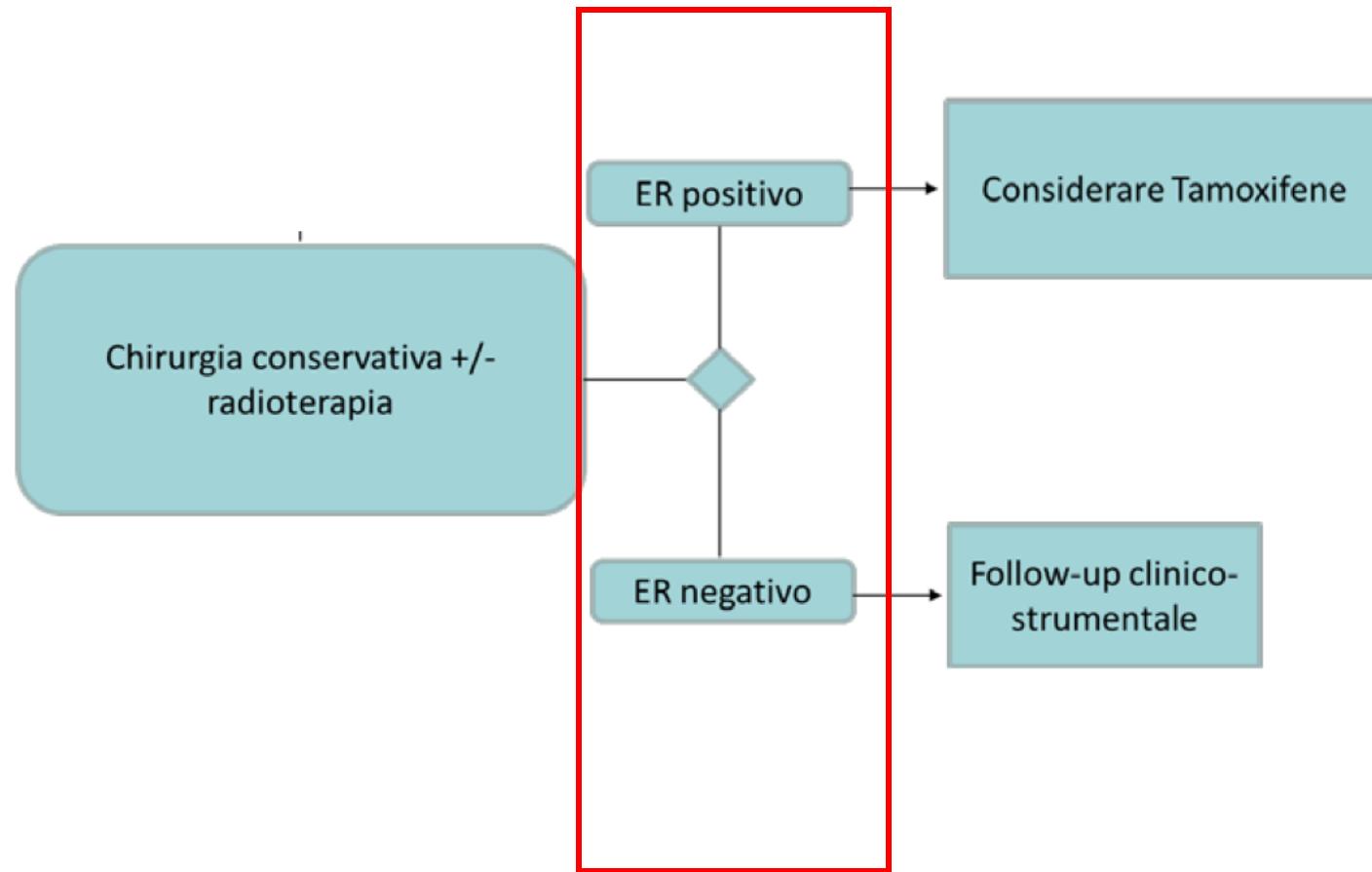
SOTTOTIPO	DEFINIZIONE SURROGATA	CARATTERISTICHE
Simil-luminale A	Simil-luminale A	<ul style="list-style-type: none"> • ER-positivo • HER2-negativo • Bassi livelli di Ki67 • Alti livelli di PgR • Profilo molecolare di tipo “basso rischio” (se disponibile)
Simil-luminale B	Simil-luminale B (HER2-negativo)	<ul style="list-style-type: none"> • ER-positivo • HER2-negativo • Alti livelli di Ki67 o bassi livelli di PgR • Profilo molecolare di tipo ad “alto rischio” (se disponibile)
	Simil-luminale B (HER2-positivo)	<ul style="list-style-type: none"> • ER-positivo • HER2-positivo • Qualsiasi livello di Ki67 • Qualsiasi livello di PgR
Sovraesprimente HER2	HER2-positivo (non luminale)	<ul style="list-style-type: none"> • HER2-positivo • Assenza di ER e PgR
Basal-like	Triplo-negativo (duttale)	<ul style="list-style-type: none"> • HER2-negativo • ER e PgR-negativo

Tali sottogruppi si sono dimostrati anche prognosticamente importanti:

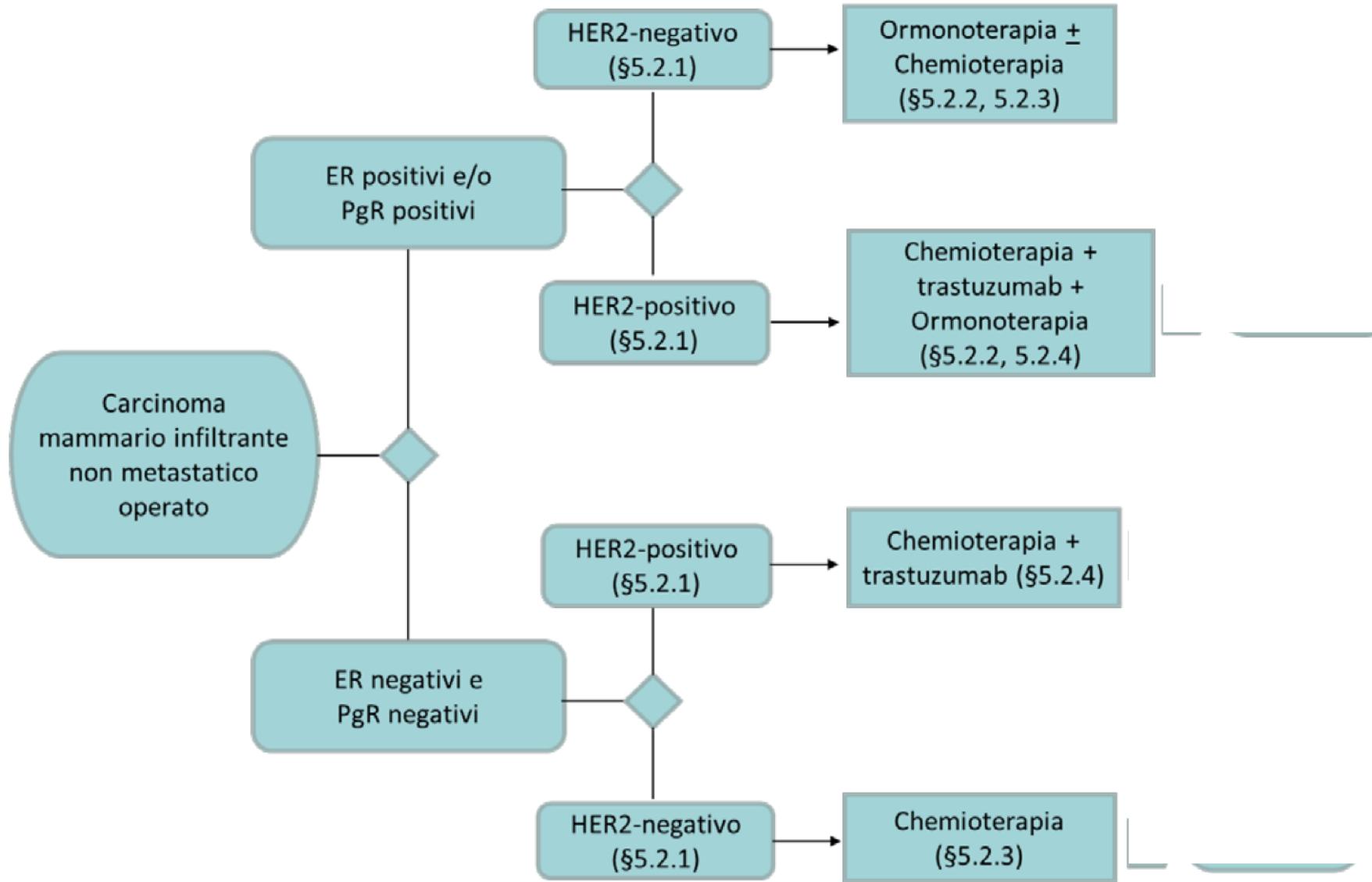
Luminali A carcinomi a prognosi favorevole, migliore rispetto ai **Luminali B**,

Carcinomi **HER2 positivi** e **Basal-like** la prognosi peggiore rispetto a tutti i sottogruppi

CARCINOMA DUTTALE IN SITU – TERAPIA

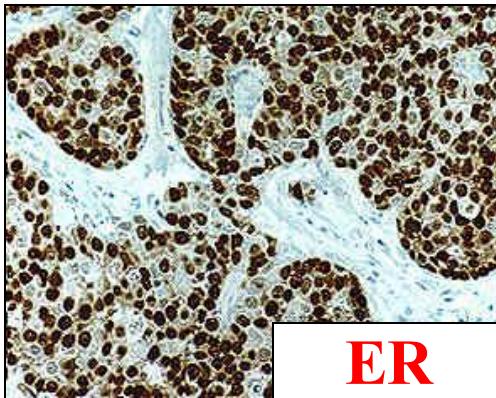


CARCINOMA INFILTRANTE NON METASTATICO – TERAPIA

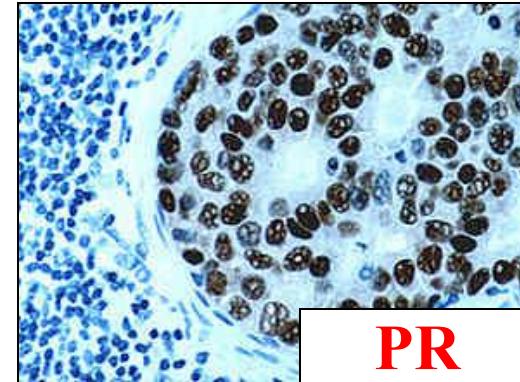


Fattori prognostico-predittivi

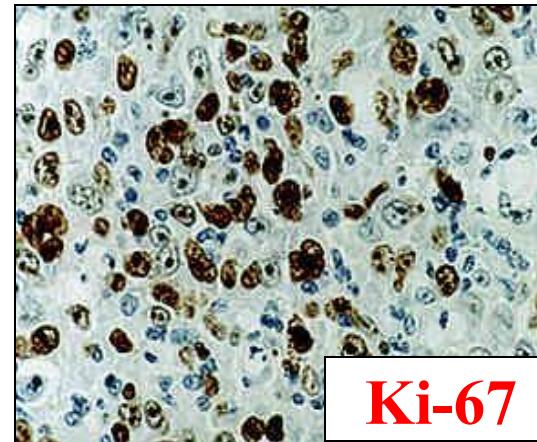
- Istotipo
- Grado
- Stadio
- Estrogeni
- Progesterone
- Ki-67
- HER2



ER



PR

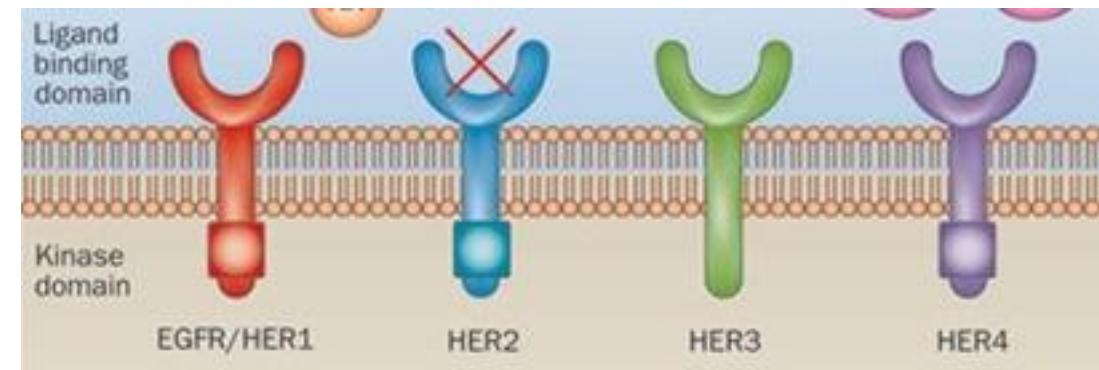
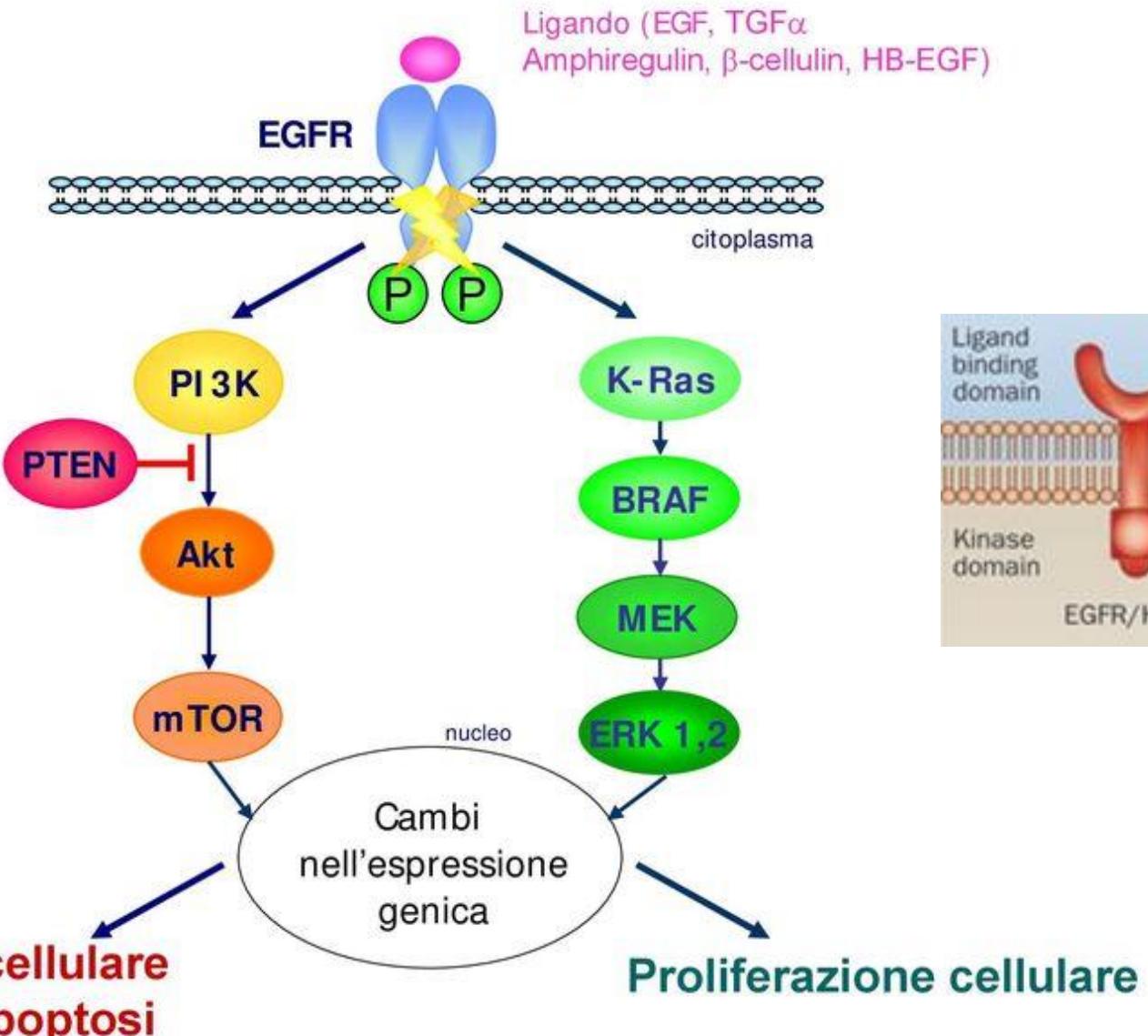


Ki-67

HER2

EGFR e segnali a valle

- E' un Recettore Tirosin-Kinasico appartenente alla famiglia dei recettori HER (ErbB)



Iperespressione/Amplificazione di HER-2

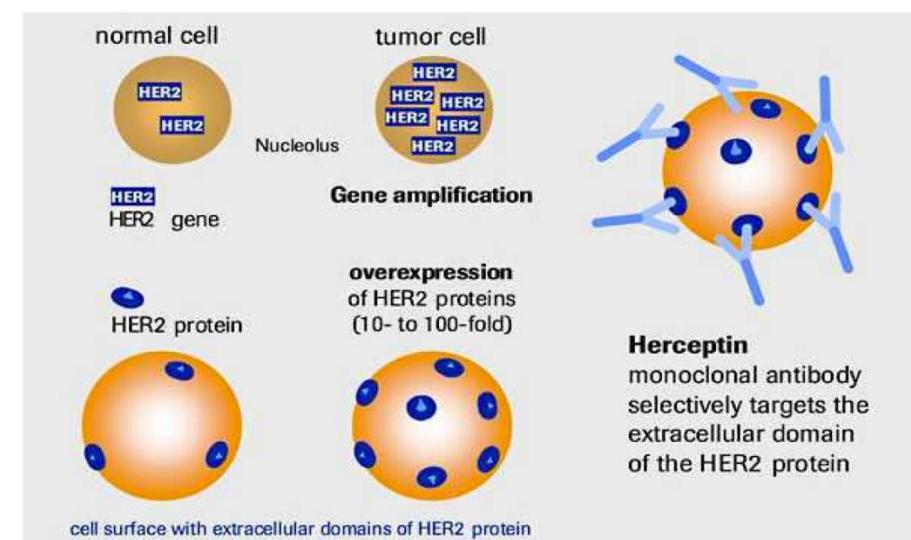
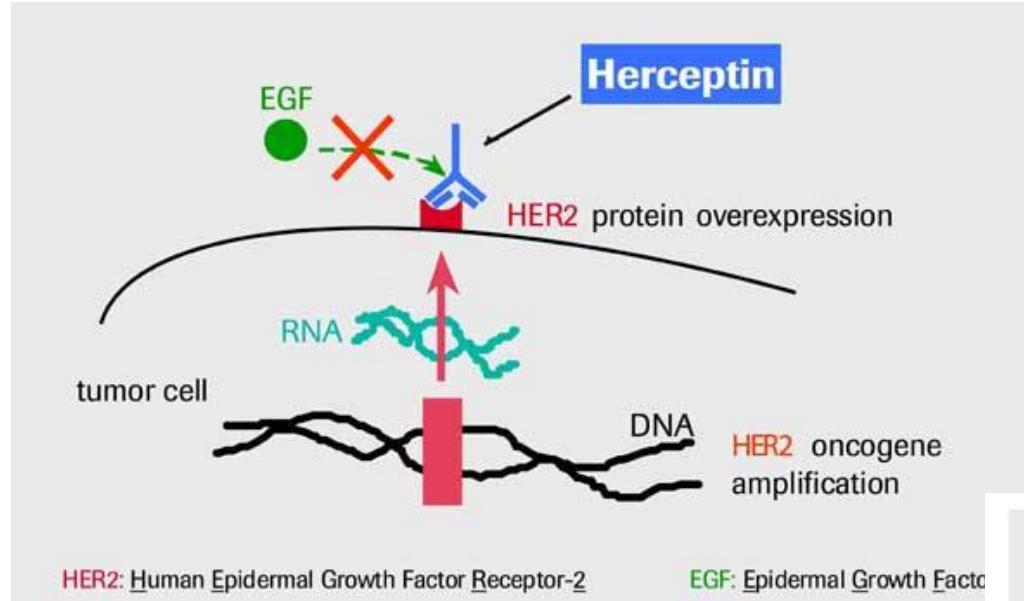
- HER-2 risulta iperpresso nel 20-30% dei casi di carcinoma mammario
- L'iperespressione di HER-2 è dovuta nel 95% circa dei casi all'amplificazione del gene

Iperespressione/Amplificazione di Her-2/neu

Rilevanza clinica

- L'amplificazione è un fattore prognostico negativo in termini di OS e DFS; è marcatore di recidiva precoce
- Correla positivamente con la risposta alla terapia antiblastica (taxani e antracicline) e negativamente con quella ormonale (tamoxifene)
- L'iperespressione/amplificazione condizionano la somministrazione e la risposta terapeutica dell'anticorpo monoclonale anti-Her2 (es. Trastuzumab)

Herceptin (TrastuzumAb) (anti-HER MAbs)



Valutazione dello stato di HER-2/Neu

IHC

HercepTest *

A085

Dako

Pathway *

CB11

Ventana

* FDA approved

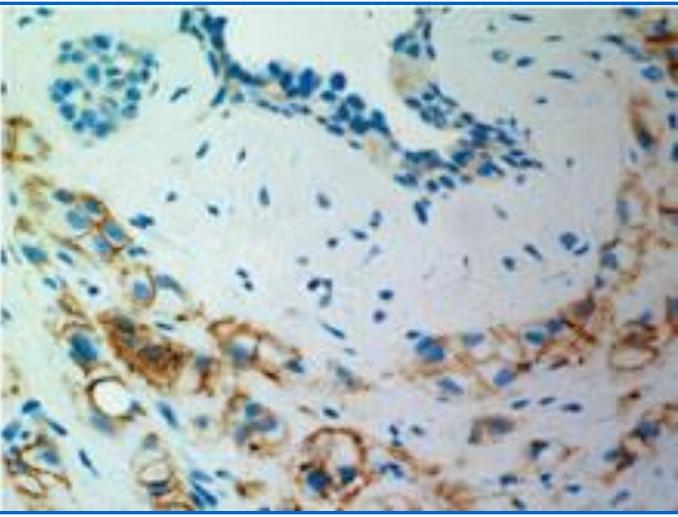
*ASCO/CAP 2006;
GU 01-08-2006 n.177

HER2/IHC

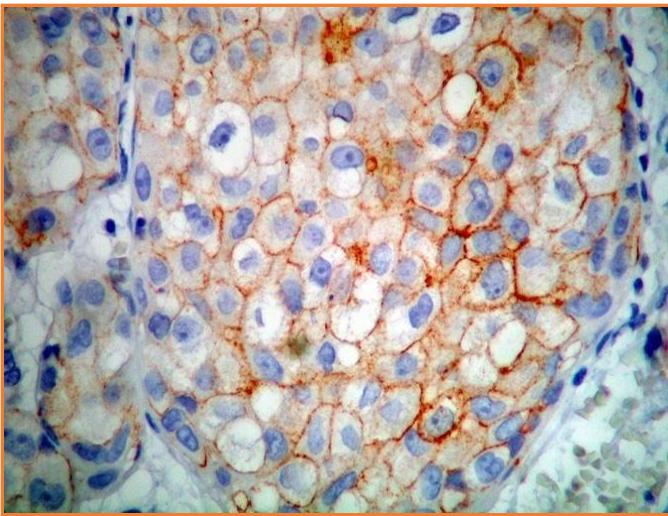
valutazione

- ▶ Score 0 negativo
 - ▶ No pos; pos membrana <30%
- ▶ Score 1+ negativo
 - ▶ Appena percettibile pos membrana >30%, incompleta
- ▶ Score 2+ dubbio
 - ▶ debole.-moderata pos membrana >30%, completa
- ▶ Score 3+ positivo
 - ▶ Intensa pos membrana >30%, completa

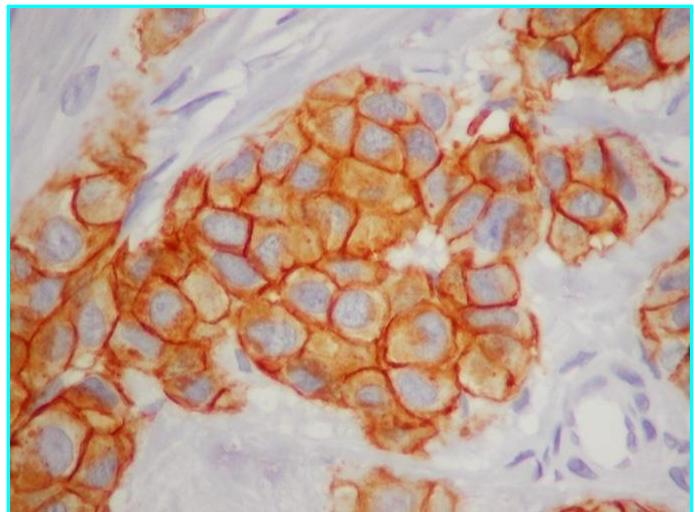
*Hercept test Ditta Dako



1+ colorazione di
membrana debole e
discontinua



2+ colorazione di membrana
continua da debole a moderata
(caso dubbio)



+3 colorazione di
membrana continua ed
intensa

Valutazione dello stato di HER-2/Neu

- Testati mediante IHC
- Intensa positività per HER-2 (IHC 3+)
 - in più del 30% delle cellule neoplastiche terapia con Herceptin
- IHC 2+ rivalutati FISH

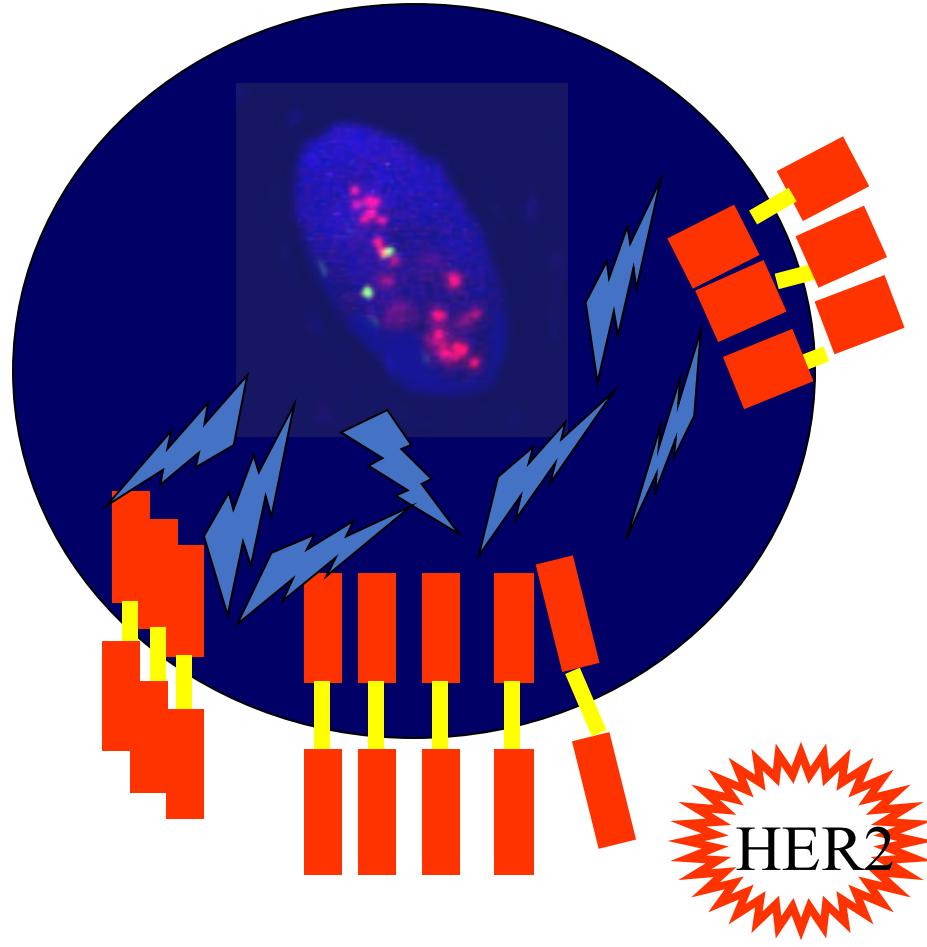
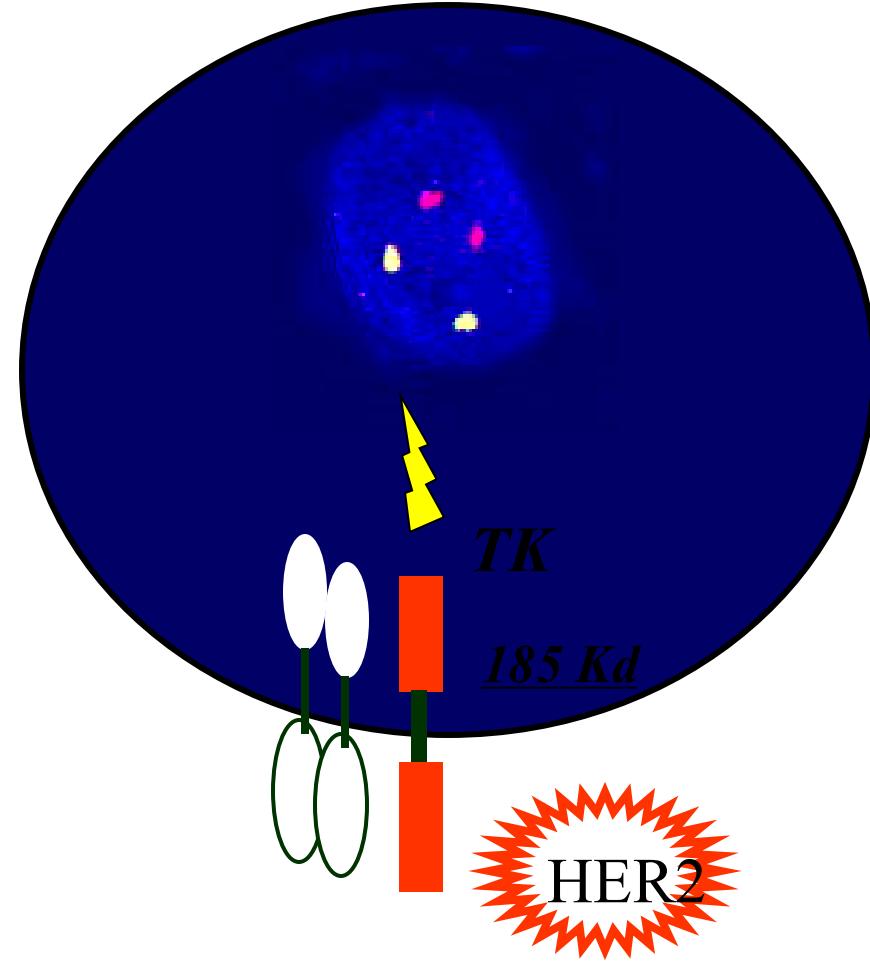
La valutazione FISH HER-2

80% dei casi ICH 2+
non sono amplificati

Falsi positivi

Quando si richiede la valutazione FISH HER-2/Neu

- IHC 2+ (sempre)*
- IHC 3+ (100% di positività)
- Controlli di qualità IHC su 3+ e negativi
(come controllo interno del laboratorio)



FISH

- conta (100X) dei segnali relativi a HER-2 e CEP 17 in 60 nuclei neoplastici ben preservati e non sovrapposti
- rapporto tra la somma dei segnali relativi alle due sonde

Ogni caso viene caratterizzato riportando il numero medio di segnali genici di Her2, il numero medio di segnali centromericci del cromosoma 17, il rapporto tra Her2/CEP17

Criteri di definizione dell'amplificazione genica di Her2

Positivo per l'amplificazione: il rapporto tra i segnali relativi al gene Her2 e quelli relativi al centromero del cromosoma 17 (CEP17) è maggior o uguale a due

Negativo per l'amplificazione: il rapporto tra i segnali relativi al gene Her2 e quelli relativi al centromero del cromosoma 17 (CEP17) è minore di due

Valutazione FISH

Amplificazione: Her-2/C17 > 2,2

Borderline: Her-2/C17 1,8-2,2

Non amplificato: Her-2/C17 < 1,8

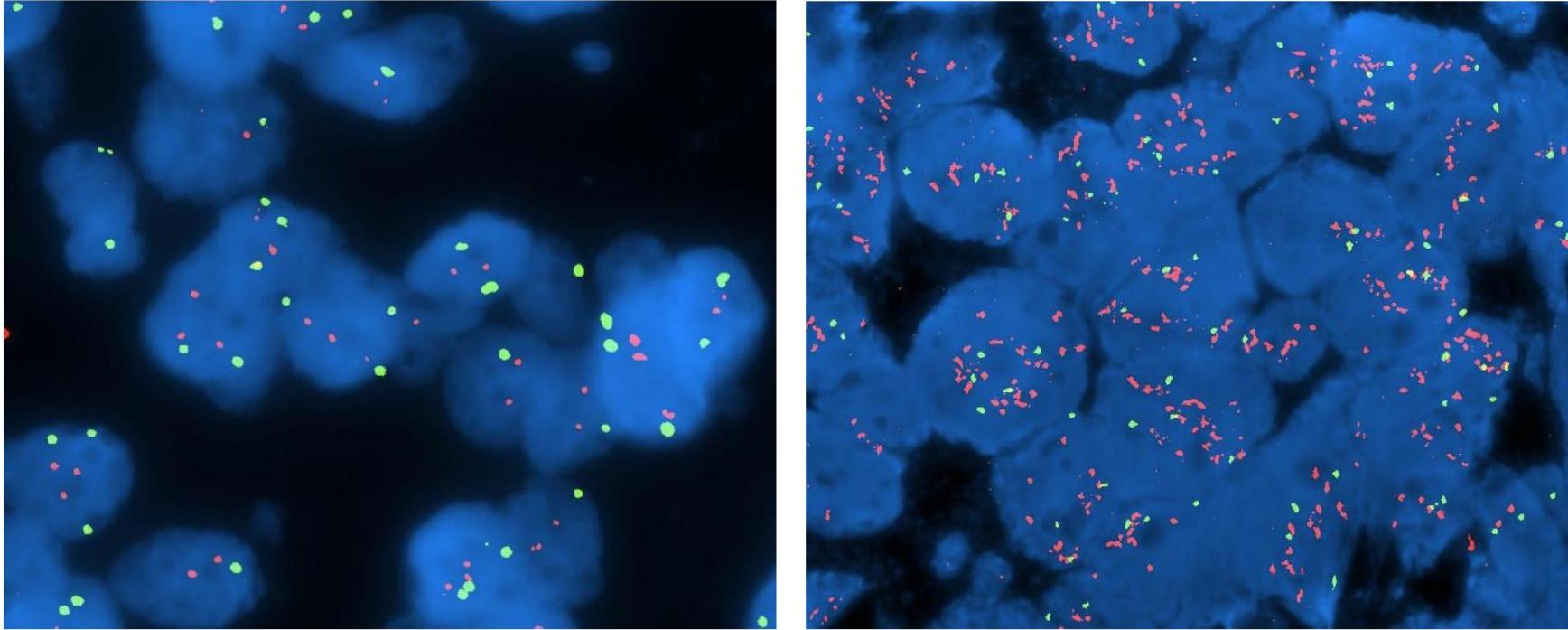
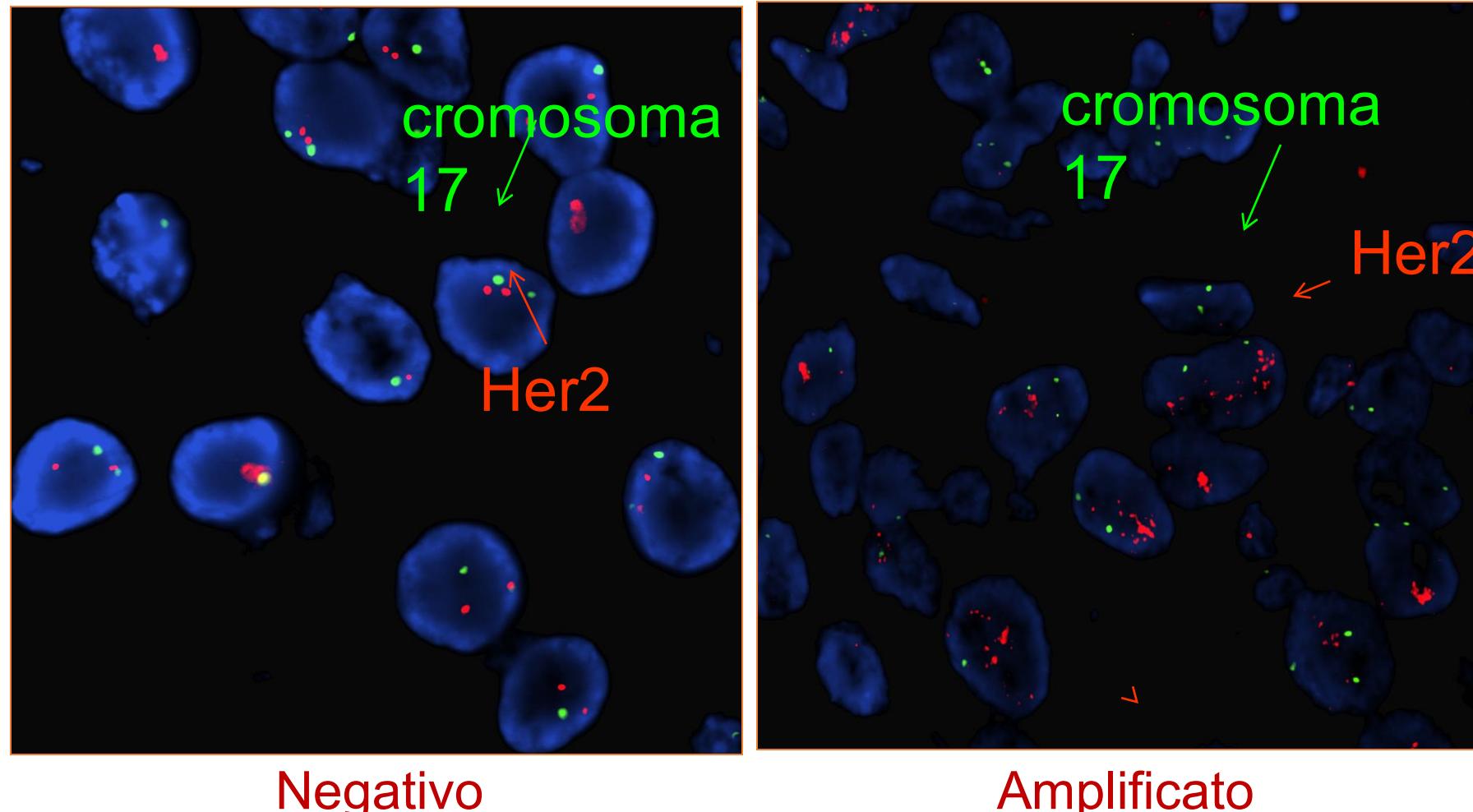


Figura 3 rispettivamente un caso con FISH negativa (ratio <2) ed un caso con FISH positiva (ratio>2)

La sonda utilizzata per la valutazione dell'amplificazione di Her2 :
ON HER2/CEP17 dual colour probe (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, The Netherlands),

è caratterizzata dall'emissione in spectrum orange (segnali genici) e spectrum green (segnali centromericci).



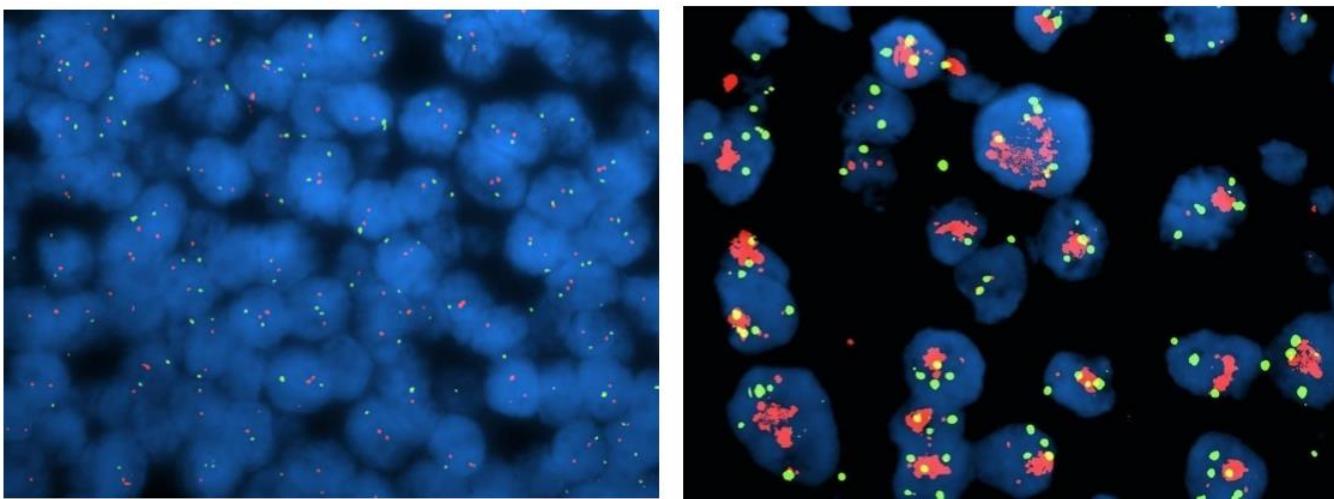


Figura 12 FISH Her2 rispettivamente non amplificata (sx) e amplificata (dx)

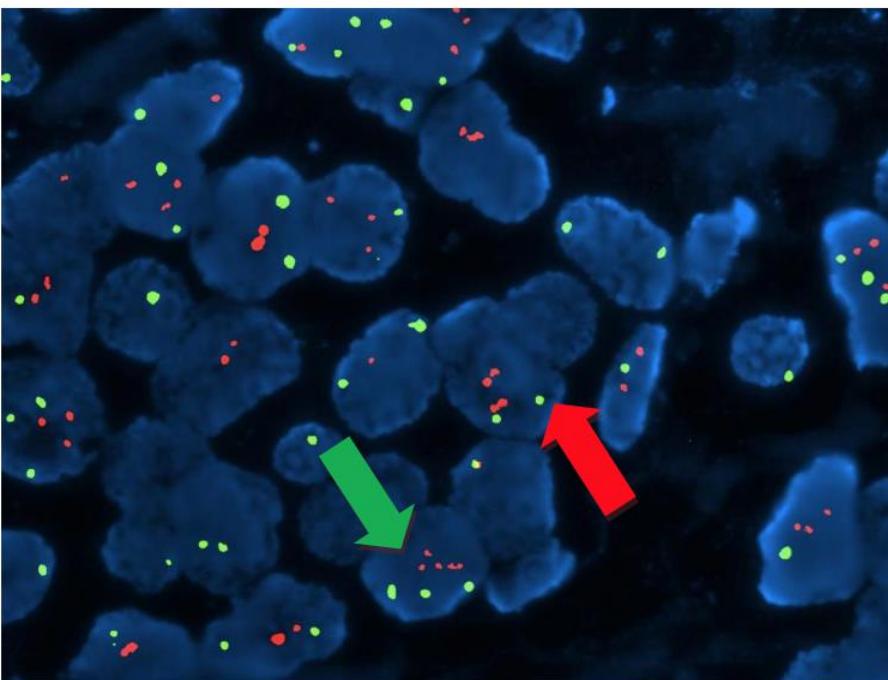


Figura 13 FISH Her2: caso eterogeneo (le frecce indicano i nuclei amplificati in un contesto complessivo di assenza di amplificazione)

Rivelazione del segnale relativo all'espressione proteica.

Indagine SISH

La SISH è una metodica quasi completamente automatizzata che permette la visualizzazione quantitativa delle copie del gene HER2 **mediante ibridazione in situ con argento.**

I vetrini vengono privati della paraffina e sottoposti a trattamento con proteasi per permettere alle sonde di penetrare nelle cellule.

Le sonde, marcate con DNP (2,4 dinitrofenolo), si legano a specifiche sequenze target di DNA.

Il probe, è visualizzato mediante l'utilizzo:

1. di un anticorpo primario anti-DNP di coniglio
2. anticorpo secondario anti-coniglio di capra coniugato a perossidasi di rafano (HRP) utilizzato come substrato cromogenico.

La reazione di ibridazione in situ con argento è indotta dall'aggiunta in sequenza di argento acetato, idrochinone e perossido di idrogeno.

In questa reazione gli ioni argento (Ag^+) sono ridotti dall'idrochinone in atomi di argento metallico.

Il precipitato di argento si deposita nei nuclei e una singola copia del gene HER2 (17q11.2-q2), o il centromero del cromosoma 17, viene visualizzata come punto nero.

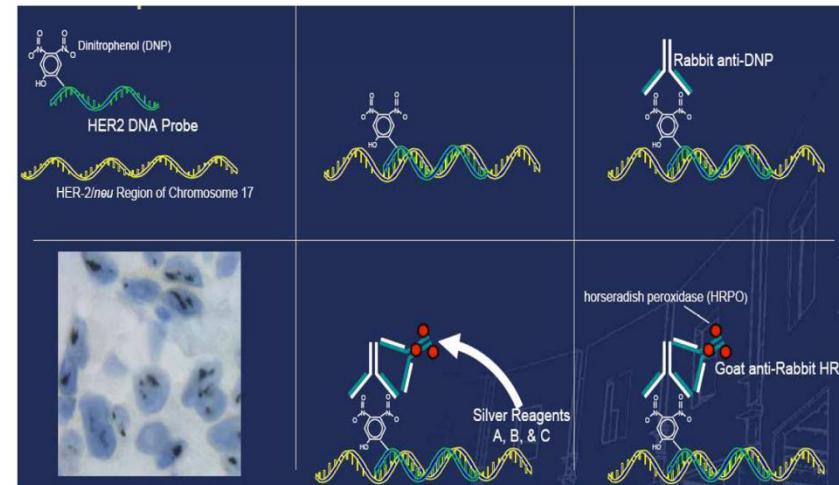


Figura 25: L'HRP catalizza la riduzione dello ione argento ad argento metallico e permette la visualizzazione del gene Her2 o del centromero del cromosoma 17.

Il campione viene successivamente contocolorato e disidratato per l'interpretazione al microscopio ottico.

La procedura consente di visualizzare su un campione di tessuto lo stato del gene HER2 della neoplasia e contemporaneamente, su un altro campione di tessuto, lo stato del cromosoma 17.

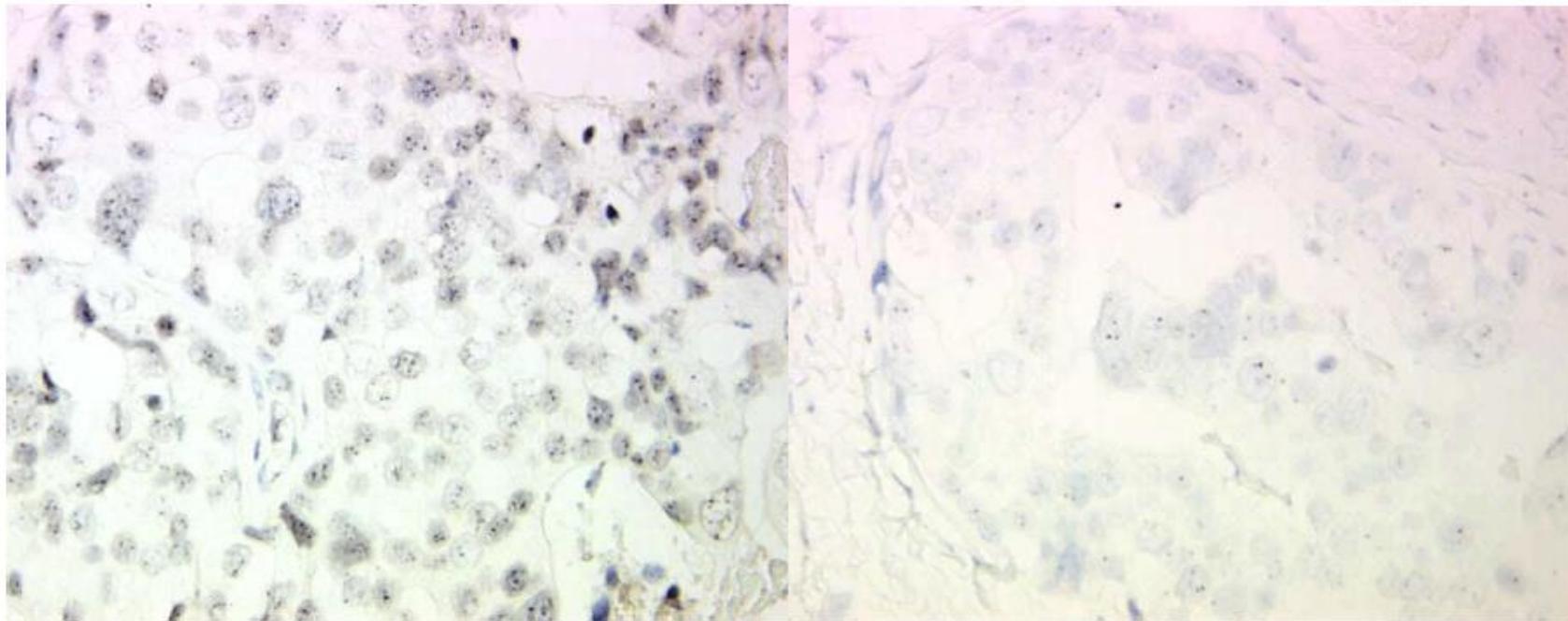


Figura 33: gene HER2 e CEN17 (metodica SISH)

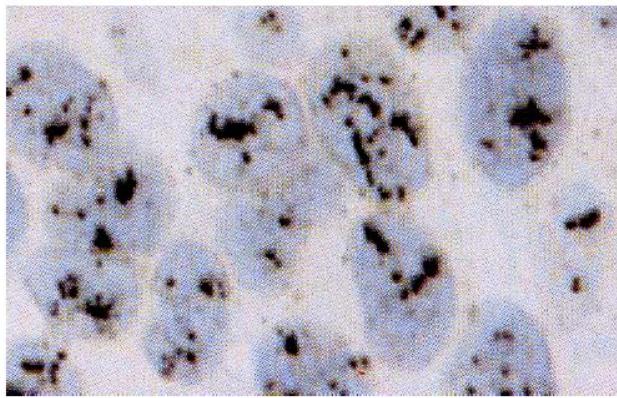


Figura 26: INFORM™ HER2 DNA Probe della linea cellulare BT474

(Interpretative guide for Ventana INFORM™ HER2 DNA Probe Staining of Breast
Carcinoma)

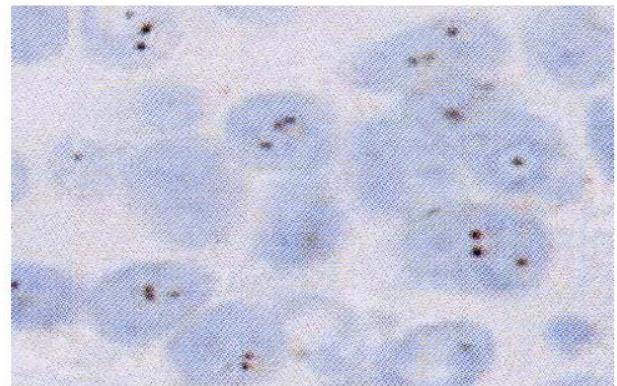


Figura 27: INFORM™ HER2 DNA Probe della linea cellulare ZR-75-1

(Interpretative guide for Ventana INFORM™ HER2 DNA Probe Staining of Breast
Carcinoma)

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Lo stato del gene HER2 è una funzione del rapporto tra il numero di copie del gene HER2 ed il numero di copie del cromosoma 17 per ogni cellula.

- Rapporto HER2/Chr17 inferiore a 1,8 campione negativo per amplificazione del gene;
- Rapporto HER2/Chr17 compreso tra 1,8 e 2,2 campione ambiguo per amplificazione del gene HER2;
- Rapporto HER2/Chr17 superiore a 2,2 campione positivo per amplificazione del gene HER2

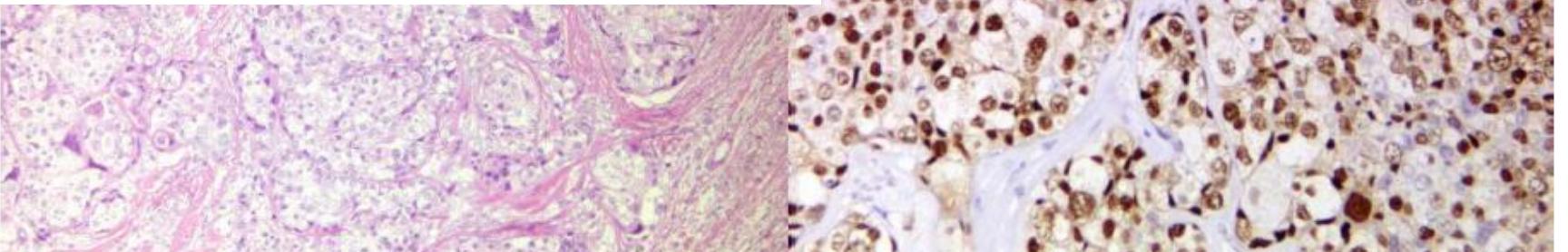
Rapporto medio HER2/Chr 17	Risultati
$HER2/Chr\ 17 < 1.8$	Negativo per amplificazione gene <i>HER2</i>
$1.8 \leq HER2/Chr17 \geq 2.2$	Equivoco per amplificazione gene <i>HER2</i>
$HER2/Chr17 > 2.2$	Positivo per amplificazione gene <i>HER2</i>

Tabella 3: Scoring SISH

Caso positivo: Donna di anni 69

Score FISH: >2.5- Score SISH: 2.4

KI67(Mib-1): 60%; ER: 70%; PR: 30%



Simil-luminale B (**HER2**-positivo)

- **ER**-positivo
- **HER2**-positivo
- Qualsiasi livello di **Ki67**
- Qualsiasi livello di **PgR**

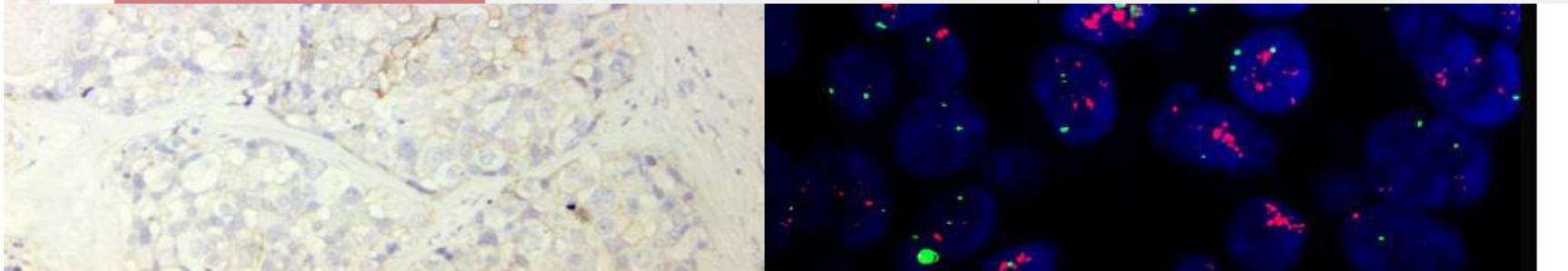
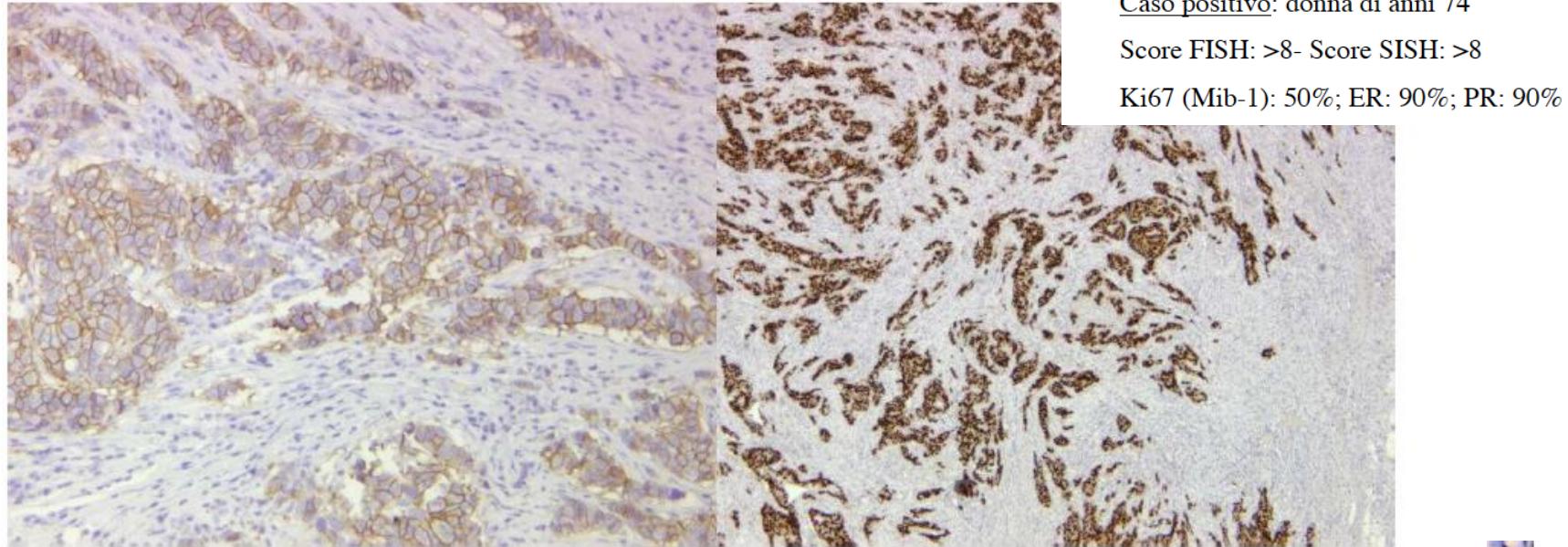


Figura 32: Hercept Test e FISH



Caso positivo: donna di anni 74
Score FISH: >8- Score SISH: >8
Ki67 (Mib-1): 50%; ER: 90%; PR: 90%

Figura 40: Hercept Test ed immunoistochimica sul recettore estrogenico

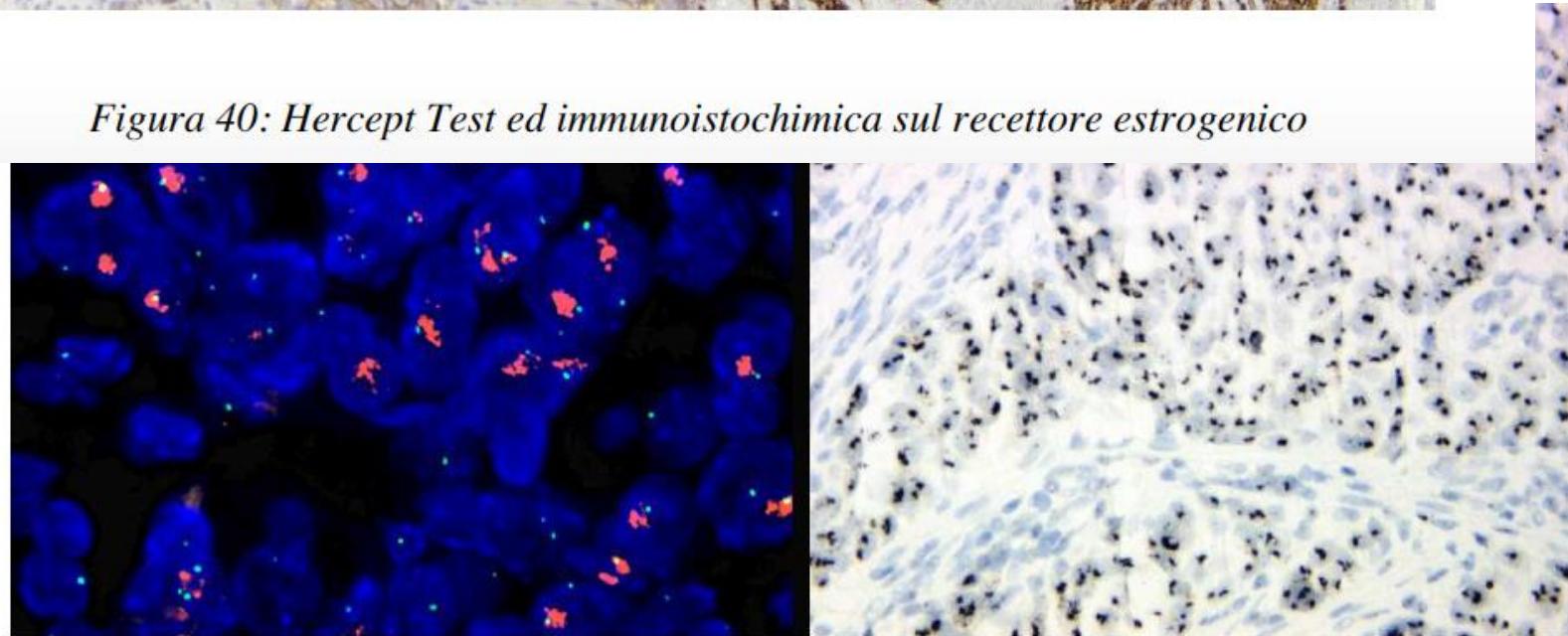
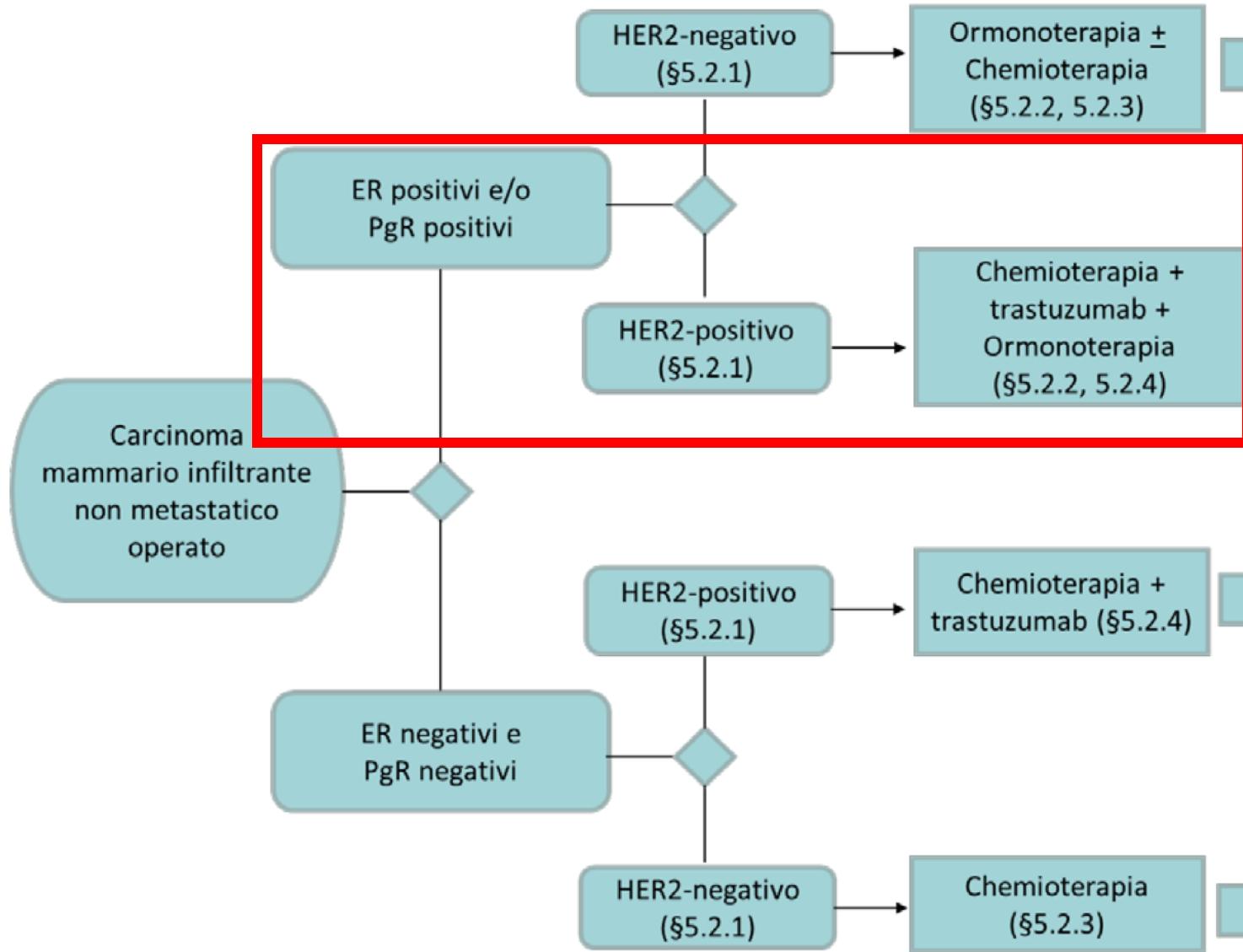


Figura 39: FISH e SISH sul gene HER2

CARCINOMA INFILTRANTE NON METASTATICO – TERAPIA



I tumori in fase di crescita avanzata, infiltranti e/o metastatizzanti, rappresentano una delle principali sfide della medicina moderna. Oltre ai classici approcci chemioterapici sono stati progressivamente sviluppati nuovi protocolli basati sull'uso di farmaci innovativi a bersaglio molecolare.

Studio delle mutazioni geniche:

- Non Small-Cell Lung Cancer (NSCLC),
- carcinoma del colon-retto
- tumore stromale gastrointestinale (GIST)
- melanoma in stadio avanzato.
- **Carcinoma mammella**

Esami predittivi di risposta alla terapia

1. Esami predittivi di risposta alla terapia su **Tessuto Tumorale**
2. Esami predittivi di risposta alla terapia su **Biopsia Liquida**
3. Esami di **Farmacogenetica**
4. Analisi dell'**Instabilità dei Microsatelliti (MSI)**

Test genetici

1. Analisi di **BRCA1 e 2**
2. **Test genetici** per la predisposizione al cancro

Test genetici

La Genetica Clinica Oncologica (GCO) si occupa dello studio dei geni responsabili di alcune forme non rare di tumori ereditari quali il tumore ereditario del colon-retto non associato a poliposi (o sindrome di Lynch) ed il tumore ereditario della mammella e dell'ovaio. A oggi, le alterazioni genetiche associate ad un aumentato rischio ereditario di tumore sono: *BRCA1* e *BRCA2* per le neoplasie della mammella e dell'ovaio e *MHL1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *APC* e *MUTYH* per i tumori ereditari del colon-retto. Recentemente è stata definita una rara forma di cancro gastrico diffuso ereditario, legata a mutazioni germlinali del gene *CDH1* che conferiscono un aumentato rischio di sviluppare non solo questo particolare tipo di carcinoma gastrico ma anche, nelle donne, il carcinoma lobulare della mammella.

Analisi di *BRCA1* e *2*

BRCA1 e *BRCA2*, due geni oncosoppressori, codificano per proteine coinvolte nella riparazione e nella ricombinazione del DNA, nel controllo del ciclo cellulare e nella trascrizione. Le mutazioni nei geni *BRCA1* e *BRCA2* possono essere ereditate secondo un modello autosomico dominante, oppure insorgere *de novo* e sono associate ad un aumentato rischio di sviluppare tumore della mammella o dell'ovaio.

Recenti studi hanno riportato che le mutazioni ereditarie dei geni *BRCA1* o *BRCA2* aumentano sensibilmente il rischio di tumori alla prostata, di tumori al colon, ma anche di tumori al pancreas, alle tube di Falloppio e di melanoma.

Analisi di *BRCA1-2* nel carcinoma della mammella

Per quanto riguarda il carcinoma mammario, l'analisi del BRCA1-2 viene eseguita principalmente con lo scopo di valutare l'eventuale **predisposizione ereditaria allo sviluppo di tumori**.

I/le pazienti (donne sane o donne e uomini già con una diagnosi di carcinoma mammario) che rispondano a determinati requisiti clinici e/o familiari, vengono indirizzati verso una consulenza genetica con lo scopo di stabilire se il/la paziente possa essere o meno candidabile al test *BRCA*.

I criteri per l'invio alla consulenza genetica oncologica, secondo le linee guida AIOM 2019 sono:

- **Storia personale di:**

- Carcinoma mammario maschile
- Donna con carcinoma mammario e carcinoma ovarico;
- Donna con carcinoma mammario < 36 anni
- Donna con carcinoma mammario triplo negativo < 60 anni;
- Donna con carcinoma mammario bilaterale < 50 anni;

- **Storia personale di carcinoma mammario < 50 anni e familiarità di primo grado per:**

- Carcinoma mammario < 50 anni;
- Carcinoma ovarico non mucinoso o borderline a qualsiasi età;
- Carcinoma mammario bilaterale;
- Carcinoma mammario maschile;

- **Storia personale di carcinoma mammario > 50 anni e familiarità per carcinoma mammario, ovarico in 2 o più parenti in primo grado* tra loro (di cui uno in primo grado con lei)**

- **Storia familiare di:**

Analisi di *BRCA1-2* nel carcinoma ovarico

Per quanto riguarda i carcinomi dell'ovaio, due sono le possibili applicazioni del test BRCA: come test di predisposizione ereditaria allo sviluppo di tumori e come test predittivo di efficacia alle terapie antitumorali.

1. Il **test per la predisposizione ereditaria allo sviluppo di tumori** è consigliato alla diagnosi a tutte le pazienti con carcinoma ovarico non mucinoso e non borderline, carcinoma delle tube di Falloppio o carcinoma peritoneale primitivo.

L'eventuale identificazione di una variante patogenetica germinale nei geni BRCA permette di intraprendere un percorso di consulenza oncogenetica nei familiari al fine di identificare i portatori ad alto rischio, cui proporre programmi mirati (sorveglianza clinico-strumentale) di diagnosi precoce dei tumori associati alle sindromi a trasmissione eredo-familiare BRCA-relate e strategie finalizzate alla riduzione del rischio (chirurgia preventiva).