



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN ONCOLOGIA**

**XXXI CICLO**

**SIGNIFICATO PROGNOSTICO DEI  
SOTTOTIPI MOLECOLARI E GENE  
PROFILING DEL TUMORE DELLA  
MAMMELLA: MODIFICAZIONI  
DELL'ATTEGGIAMENTO TERAPEUTICO**

**Direttore Prof. Bruno Annibale**

**Relatore:**

*Prof. Francesco D'Angelo*

**Dottoranda:**

*Dr.ssa Camilla Romano*

**Correlatore:**

*Prof. Augusto Lombardi*

**SIGNIFICATO PROGNOSTICO DEI SOTTOTIPI  
MOLECOLARI E GENE PROFILING DEL TUMORE DELLA  
MAMMELLA: MODIFICAZIONI DELL'ATTEGGIAMENTO  
TERAPEUTICO**

Introduzione	3
Scopo della ricerca	9
Materiali e Metodi	9
Risultati	15
Discussione e Conclusioni	34
Bibliografia	40

## **Introduzione**

Nel nostro Paese il carcinoma mammario rappresenta la neoplasia più frequente nel sesso femminile per ogni classe di età, rappresentando circa il 29% di tutte le diagnosi oncologiche.

Si stima che ogni anno vengano diagnosticati oltre 47.000 nuovi casi di tumore della mammella, di cui il 2% è riscontrato nel sesso maschile. I più alti livelli di incidenza si concentrano nella quarta-sesta decade di vita.

In base ai tassi di incidenza età-specifici, è possibile stimare il rischio cumulativo di sviluppare un tumore mammario nel corso della vita pari ad un caso su otto donne <sup>1-2</sup>.

Il carcinoma mammario mostra livelli di sopravvivenza elevati che si collocano intorno all'89% a 5 anni dalla diagnosi, con l'incremento maggiore registrato nelle donne più giovani. La diagnosi precoce e l'applicazione di più efficaci protocolli terapeutici medico-chirurgici hanno contribuito in maniera cumulativa al miglioramento della sopravvivenza, mentre i tassi di sopravvivenza relativamente più bassi nelle donne di età inferiore ai 40 anni danno conferma della natura più aggressiva delle forme ad esordio giovanile.

Nonostante la considerevole mole di informazioni accumulate nel corso degli ultimi due decenni, il meccanismo eziologico alla base del carcinoma mammario non può essere ancora univocamente definito <sup>3</sup>.

In generale, la valutazione dell'estensione della malattia neoplastica si basa su parametri classificativi che permettono di stabilirne la stadiazione, rilevante nella programmazione della strategia terapeutica. I criteri più frequentemente adottati a

questo scopo sono quelli elaborati nel sistema TNM (Tumor; Nodes; Metastasis Staging System). La combinazione dei diversi parametri T, N e M permette di elaborare la classificazione della neoplasia mammaria secondo quattro stadi (I-IV) di gravità crescente, con progressivo decremento nei rispettivi tassi di sopravvivenza.

Nella gestione del carcinoma mammario precoce un altro parametro imprescindibile è senza dubbio il grado istologico. A partire dal 1991 è stata convalidata la rilevanza, in termini prognostici, del sistema di Nottingham (o metodo di Scarff-Bloom-Richardson modificato da Elston-Ellis), riconosciuto dai principali organismi internazionali (WHO, AJCC, UK RCPATH) come sistema di grading istologico raccomandato. Il grado istologico della neoplasia si basa sull'entità della differenziazione, valutata dal patologo attraverso l'osservazione di caratteristiche morfologiche quali: il grado di formazione di strutture tubulari, il pleomorfismo nucleare e la conta mitotica. Il grado istologico rappresenta un importante parametro, predittore del comportamento biologico di una specifica neoplasia, soprattutto in caso di carcinomi precoci di piccole dimensioni e può fornire importanti indicazioni nei casi in cui sia messo in discussione il possibile beneficio di un trattamento chemioterapico (es. carcinomi ER+ /N0 o ER+/N1). Le neoplasie di basso grado presentano una prognosi favorevole, mentre tumori moderatamente differenziati, pur dimostrando un decorso relativamente favorevole nei primi anni dalla diagnosi, a lungo termine si associano a ripresa di malattia. L'elevato rischio di recidiva precoce e la ridotta sopravvivenza che caratterizza le forme scarsamente differenziate, orienta la strategia terapeutica verso un trattamento sistemico obbligato. Seppur limitato dalla scarsa riproducibilità, data dalla soggettività della lettura da parte del patologo, il NGS è in grado di fornire a basso costo importanti informazioni sulla biologia del tumore, garantendo un adeguato livello di accuratezza <sup>4</sup>.

Nel carcinoma della mammella, in questa revisione della classificazione oltre al il grading istologico, si raccomanda inoltre la raccolta di informazioni relative a fattori prognostici quali stato dei recettori ormonali (ER e PgR) e lo stato di HER2, fattori che di recente sono stati inseriti come variabili nell'assegnazione dello stadio di malattia (AJCC 2017) <sup>5-6</sup>.

L'analisi del profilo biomolecolare nasce nel 2000, quando Charles Perou pubblica su Nature "Molecular Portraits of Human Breast Tumors" e pone le basi per un nuovo sistema tassonomico basato sull'analisi del profilo di espressione genica dei tessuti mammari neoplastici, utilizzando la tecnica dei microarray basata sull'ibridizzazione inversa <sup>7</sup>.

Vengono dunque identificati 2 tipi cellulari epiteliali nel tessuto ghiandolare mammario: cellule basali (mioepiteliali) e cellule luminali.

Questi due tipi possono essere agevolmente distinti anche tramite l'IHC attraverso l'identificazione delle CK specifiche (CK5/6 per le cellule basali e CK8/18 per gli elementi luminali epiteliali) <sup>8</sup>

I diversi pattern di espressione molecolare e la selezione di un subset di 496 geni ("intrinsic gene subset") sono associati ad una significativa variazione inter-tumorale in termini di espressione ed a una relativa uniformità intra-tumorale. Il dendrogramma ottenuto da questa analisi presenta due diramazioni principali, corrispondenti alla suddivisione dei campioni in tumori ER+ ed ER-; i tumori inclusi nel primo raggruppamento hanno dimostrato elevati livelli di espressione dei geni che caratterizzano le cellule luminali, mentre tra i tumori che non esprimono ER o si caratterizzano per bassi livelli di espressione dei recettori ormonali possono essere incluse le neoplasie a fenotipo basale ed HER2 <sup>9</sup>.

Sono stati dunque identificati 4 sottogruppi caratterizzati da uno specifico profilo biomolecolare, riconducibile ai diversi elementi cellulari che costituiscono il tessuto mammario: ER+/luminal-like, basal-like, Erb-B2+ e normal-breast, quest'ultimo caratterizzato da un pattern di espressione genica tipico delle cellule basali o adipose, con, al contrario, bassi livelli di espressione dei geni tipici degli elementi luminali <sup>10-11</sup>.

Sebbene l'analisi dell'espressione genica attraverso il sistema dei microarray rappresenti il "gold standard" per stabilire la classificazione molecolare del carcinoma mammario, la sua applicazione nella pratica clinica risulta fortemente limitata dai costi elevati, la complessità della tecnica ed i requisiti rigorosi circa le caratteristiche dei tessuti da analizzare <sup>12</sup>. Dunque, allo scopo di adottare i criteri

molecolari con maggior flessibilità, è stata proposta una classificazione molecolare basata su marcatori immunoistochimici, che fosse riproducibile, di semplice attuazione e clinicamente significativa, al pari delle categorie definite mediante il gene expression profiling. Una prima suddivisione può essere operata valutando l'espressione dei marcatori citocheratinici, che definiscono l'identità basale o luminale di una neoplasia mammaria: CK5/6+, CK14+ e CK17+ per i carcinomi di tipo basale e CK8+, CK18+ per le forme luminali. Altri marker immunoistochimici che possono essere agevolmente utilizzati come surrogati delle entità elaborate attraverso il gene profiling, seppur con una sensibilità ridotta (76% circa), sono: l'espressione dei recettori ormonali ER, PgR ed HER2 <sup>13</sup>.

Altro parametro fondamentale è rappresentato dall'indice proliferativo cellulare, la cui importanza è stata messa in risalto soprattutto dalla recente introduzione dei test genomici, in grado di definire lo stato proliferativo del tumore attraverso l'analisi simultanea di uno specifico cluster di geni, che includono anche il locus codificante per la proteina Ki-67. Questo antigene è stato identificato, nei primi anni '80 dai ricercatori dell'università di Kiel, utilizzando un anticorpo monoclonale murino diretto contro un epitopo nucleare ottenuto da una linea cellulare derivata da linfoma di Hodgkin.

L'espressione di Ki-67 varia nel corso del ciclo cellulare e le cellule presentano l'antigene nelle fasi G1, S, G2 ma non nella fase di riposo G0

La misurazione dell'indice proliferativo si ottiene analizzando con metodica immunoistochimica sezioni incluse in paraffina, utilizzando l'anticorpo monoclonale MIB-1. Lo score che si ottiene è basato sulla rilevazione della positività nucleare delle cellule tumorali alla reazione immunoistochimica, stimato come percentuale di cellule positive per HPF. I livelli di Ki-67 sono estremamente bassi nel tessuto mammario sano (<3%) e le cellule ER+ non esprimono questo antigene; questa mutua esclusione tra espressione dei recettori ormonali ed indice proliferativo non sussiste però nel tessuto neoplastico <sup>14</sup>.

La significatività, in termini prognostici, dei surrogati immunoistochimici è confermata dall'evidente discrepanza rilevata nei tassi di sopravvivenza tra le neoplasie ER-positive ed ER-negative. I diversi sottotipi presentano un

comportamento biologico differente con specifici pattern di mortalità, con caratteristiche indipendenti dagli parametri clinico-patologici che influenzano la prognosi.

E' accertata invece la bivalenza prognostica e predittiva di fattori quali lo stato di espressione dei recettori ormonali e l'amplificazione di c-erbB-2 (HER2/neu). La compresenza di recettori per estrogeni e progesterone assume infatti un valore sia prognostico che predittivo nell'analisi di un carcinoma mammario invasivo.

Il proto-oncogene c-erbB-2 (HER2/neu) è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 17 e codifica per una glicoproteina transmembranaria, p185HER2, dotata di intrinseca attività tirosin-chinasica, con il 50% di omologia all'EGFR. Risulta amplificato in circa il 30% delle neoplasie mammarie, associandosi ad un profilo biologico aggressivo, un alto tasso di recidiva ed un incremento della mortalità soprattutto nelle pazienti che presentano coinvolgimento linfonodale.

La recidiva nel carcinoma mammario correla strettamente con la mortalità causa-specifica. E' stato evidenziato un differente pattern di recidiva in relazione ai diversi sottotipi molecolari: i carcinomi ER- sono associati ad un più elevato rischio di recidiva entro 5 anni dalla diagnosi, mentre le forme ER+ presentano un progressivo aumento del rischio di recidiva nel corso dei primi 10 anni dal riscontro della malattia. Lo stato linfonodale assume una notevole valenza prognostica in caso di carcinoma in stadio avanzato e si associa con un peggioramento degli indici di sopravvivenza libera da malattia e sopravvivenza globale.

Diversi studi hanno analizzato retrospettivamente il pattern di recidiva e l'outcome in pazienti affette da carcinoma mammario precoce senza coinvolgimento linfonodale, ed hanno messo in luce il differente comportamento biologico manifestato dai diversi sottotipi molecolari. Circa un terzo delle pazienti affette da carcinoma mammario in fase precoce presentano una recidiva di malattia dopo la diagnosi iniziale. I pattern di recidiva locale del carcinoma mammario sono influenzati dai fattori prognostici classici quali lo stato linfonodale, il grading istologico, lo stato recettoriale ormonale e l'espressione del recettore per lo human epidermal growth factor 2. Inoltre la ripresa di malattia varia considerevolmente nel corso del tempo ed è influenzata dalle modalità di trattamento adiuvante.

Nonostante la riconosciuta variabilità, la maggior parte delle recidive si manifesta nei primi 5 anni dalla diagnosi. Comunque, nel sottogruppo di pazienti con carcinoma positivo per i recettori ormonali, la recidiva si verifica ben oltre i 10 anni dalla diagnosi, mentre nelle pazienti con carcinoma mammario negativo per i recettori ormonali è precoce.

Nei casi selezionati l'aggiunta di chemioterapia adiuvante al trattamento chirurgico del carcinoma mammario precoce migliora il tasso di sopravvivenza globale del 10% circa <sup>15</sup>.

Come già accennato, non tutte le neoplasie rispondono allo stesso modo alle terapie sistemiche.

Alcuni studi retrospettivi hanno riportato un tasso di prescrizione della CHT adiuvante per Ca mammario del 57,8% con un tasso di complicanze legate ad una grave tossicità (neutropenie, sanguinamenti, neoplasie secondarie, cardiopatie, neuropatie..) nell'1-2% dei pazienti. L'analisi finale dei risultati di questo studio ha mostrato che il trattamento poteva essere evitato nel 25% dei casi <sup>16</sup>.

Per questo motivo negli ultimi anni c'è stato un grande interesse nello sviluppo di profili di espressione genica volti ad identificare i pazienti che non necessitano di essere sottoposti a CHT adiuvante <sup>17-18</sup>.

Particolare interesse è stato rivolto a quei pz definiti “*borderline*”, in cui caratteristiche quali stato linfonodale neg / coinv 1-3 linfonodi o indice di proliferazione intermedio non permettono di configurare indicazioni certe alla CHT.

La firma molecolare delineata dall'espressione dei geni specifici permette infatti di predire la prognosi e guidare le strategie terapeutiche <sup>19-20</sup>.



## ***Scopo della ricerca***

La nostra analisi mira a valutare il pattern di recidiva che caratterizza i diversi sottotipi molecolari, in una popolazione di pazienti affette da carcinoma mammario invasivo in stadio precoce, e testare la validità della tipizzazione molecolare comparandola con il gene profiling (mammaprint), in termini prognostici e predittivi, su un'ampia casistica monoistituzionale di pazienti affette da carcinoma mammario invasivo in stadio precoce, allo scopo di:

- Valutare un eventuale over/ down treatment correlato ad un up/down staging della tipizzazione molecolare
- Programmare strategie terapeutiche (mediche e chirurgiche) strettamente personalizzate avvalendosi dell'uniformità, in termini di diagnosi istopatologica, caratterizzazione molecolare e strategia terapeutica multidisciplinare.

## ***Materiali e Metodi***

Sono stati analizzate 1598 pazienti consecutive sottoposte a chirurgia mammaria per carcinoma infiltrante e Biopsia del Linfonodo Sentinella (BLS) presso l'Unità di Chirurgia Senologica dell'Ospedale Sant'Andrea di Roma dall'ottobre 2004 al Giugno 2018 e sono stati analizzati i pattern di recidiva associati a ciascun sottotipo molecolare (IHC).

Tra queste, da Febbraio 2008 a Dicembre 2009 sono state arruolate per l'esecuzione del mammaprint 140 pazienti.

I risultati del gene profiling sono stati dunque correlati con i risultati dell'immunoistochimica per valutare la concordanza tra le due metodiche.

In caso di positività istologica per metastasi del Linfonodo Sentinella, le pazienti sono state sottoposte a Linfoadenectomia Ascellare Completa (CALND) immediata

(se positivo il FrozenSection(FS) intraoperatorio) o differita in media di due settimane (se negativo il FS e poi positivo l'esame istologico definitivo).

Tale protocollo è stato recentemente messo in discussione dal rilievo dell'assenza di beneficio della radicalizzazione ascellare in termini di sopravvivenza e Disease Free Survival (Giuliano et al.). Comunque su questa serie, la stragrande maggioranza delle pazienti è stata sottoposta a CALND in caso di LS metastatico e solo in 30 casi su 267 (11%), per rifiuto della paziente a sottoporsi a nuovo intervento chirurgico, o per valutazione clinica contingente (paziente anziana ad alto rischio, bassa aggressività della lesione) non è stata effettuato il clearing ascellare.

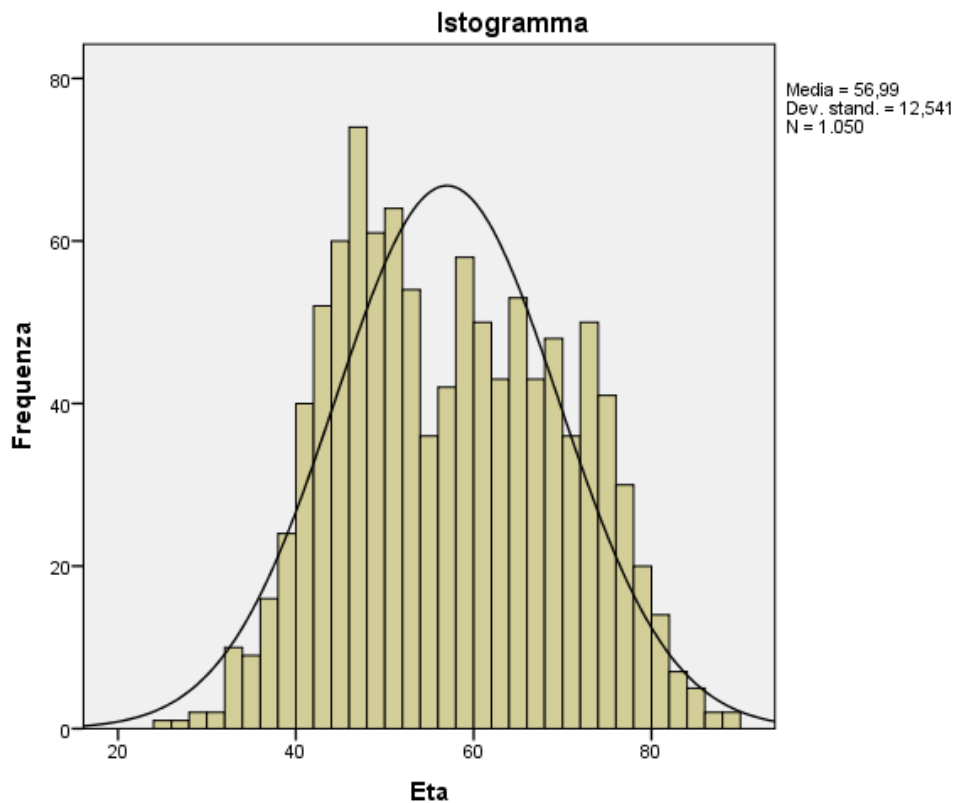
Le informazioni sono state estratte da un data base prospettico di progettazione e realizzazione originale (Access©). L'analisi statistica è stata condotta tramite il pacchetto SPSS IBM©.

Sono state escluse dall'analisi le 180 pazienti con carcinoma intraduttale, anch'esse registrate nel database.

Tutte le pazienti, ovviamente, essendo state sottoposte alla procedura di BLS erano clinicamente N0 e presentavano lesioni palpabili e non. In quest'ultimo caso, corrispondente al 37% delle pazienti, la resezione mammaria è stata effettuata tramite centraggio radioguidato (ROLL), ecoguidato o stereotassico.

Le mastectomie, vuoi per lesioni multicentriche, vuoi per sfavorevole rapporto dimensioni del tumore/volume mammario, ammontano al 12% della casistica.

La distribuzione per età nel campione è descritta nella Fig. 1.



**Fig. 1** – Distribuzione età

Il range è molto ampio (25 ÷ 89 aa) con una media di 57 aa, ma una moda spostata a 47. Le pazienti con età inferiore ai 40 aa sono il 10%, quelle sotto i 50 il 35% e le “anziane” over 65 ammontano a circa il 30%.

Come ampiamente descritto è stata registrata una leggera prevalenza di lesioni della mammella sinistra (54% vs 46%)

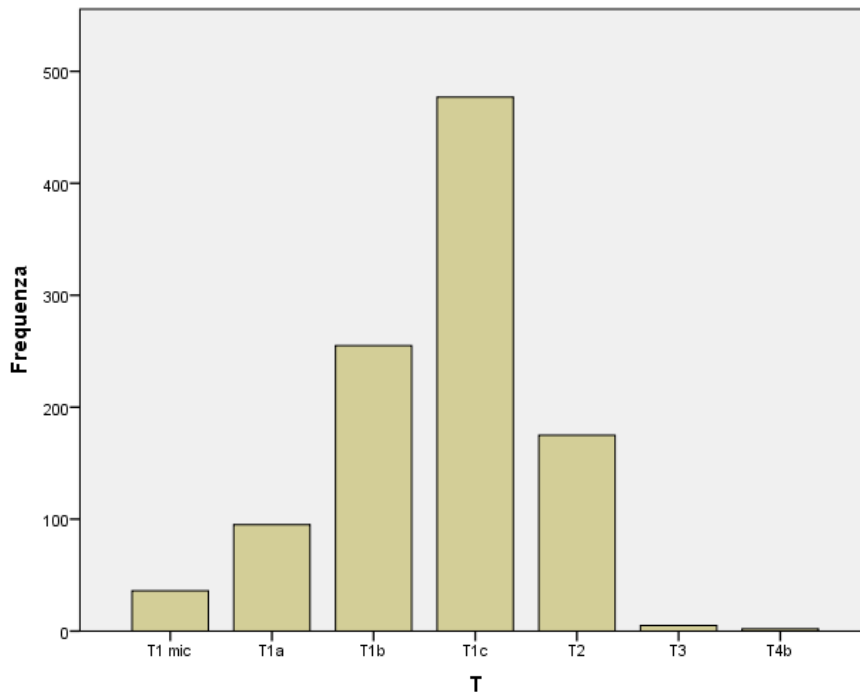
Altre caratteristiche descrittive dei tumori operati sono riassunte nella tabella 1.

Age yy,(mean, min, max $\pm$ stddev)	58.2 (26÷89)	$\pm$ 12.5
Operation		
Quadrantectomy	1377	86.2%
Mastectomy	221	13.8%
Tumor size mm (mean, min, max $\pm$ stddev)	15.2 (1÷80)	$\pm$ 9.7
Histological type		
Ductal	1326	83%
Other	272	17%
Estrogen Receptor Status		
ER pos	1419	88,8%
ER neg	179	11.2%
HER2 status		
Pos	130	8.1%
Neg	1468	91.9%
Lymph Node Status		
SLN pos	404	25.3%
SLN neg	1194	74.7%
Lympho-vascular invasion		
L1	154	9.6%
L0	1444	90.4%

**Tab. 1** – Caratteristiche descrittive delle lesioni

La percentuale di interessamento del Linfonodo Sentinella e/o degli altri linfonodi ascellari è compatibile con lo stato di tumori precoci clinicamente N0, come detto sopra. La distribuzione delle classi di Grading e dei tipi istologici è in linea con la letteratura internazionale. Più bassa invece la frequenza di invasione linfovaskolare, dato che risente probabilmente dei criteri adottati dai nostri patologi nella valutazione, criteri che prevedono nei casi dubbi la conferma con apposite colorazioni immunoistochimiche (podoplanina).

Infine, la distribuzione del *Tumor Size* secondo il TNM, come illustrato in Fig. 2



**Fig. 2** –Distribuzione secondo il pTNM

La classe più rappresentata è il T1c per una media del diametro istologico delle lesioni di 15 mm ( $\pm 9$  mm). Non trascurabili i T2 (lesioni comprese tra 2 e 5 cm), pochi casi i T3/T4b. Quest'ultima classe rappresentata da un caso con isole tumorali nel derma, considerate come infiltrazione cutanea.

L'attribuzione al sottotipo molecolare è stata fatta seguendo i criteri della Consensus di St. Gallen 2013 (Goldhirsch et al.) usando surrogati immunohistochimici, secondo la seguente tabella:

Luminal A like	ER pos	PgRpos	Ki-67<14%	HER2 neg
Luminal B like	ER pos	PgRpos or neg	Ki-67 $\geq$ 14%	HER2 neg
Triple negative	ER neg	PgR neg	indifferente	HER2 neg
HER2 classico	ER neg	PgR neg	indifferente	HER2 pos
HER2 recettori pos.	ER pos	PgR pos or neg	indifferente	HER2 pos

**Tab.2** – Definizione dei sottotipi molecolari

Il follow up è stato condotto in collaborazione con l'Unità di Oncologia dell'Ospedale Sant'Andrea secondo le linee guida FoNcAM: semestrale fino al quinto anno, poi annuale. E' consistito nella accurata valutazione clinica della paziente tramite anamnesi ed esame obiettivo, locale e generale. Gli unici accertamenti richiesti direttamente sono stati di imaging (Rx mammografia e/o ecotomografia a seconda della situazione clinica), demandando ulteriori approfondimenti strumentali (Rx, RM, TC, PET, Scintigrafie), laboratoristici o cito/istologici a seconda dei sintomi lamentati dalla paziente o dei rilievi obiettivi.

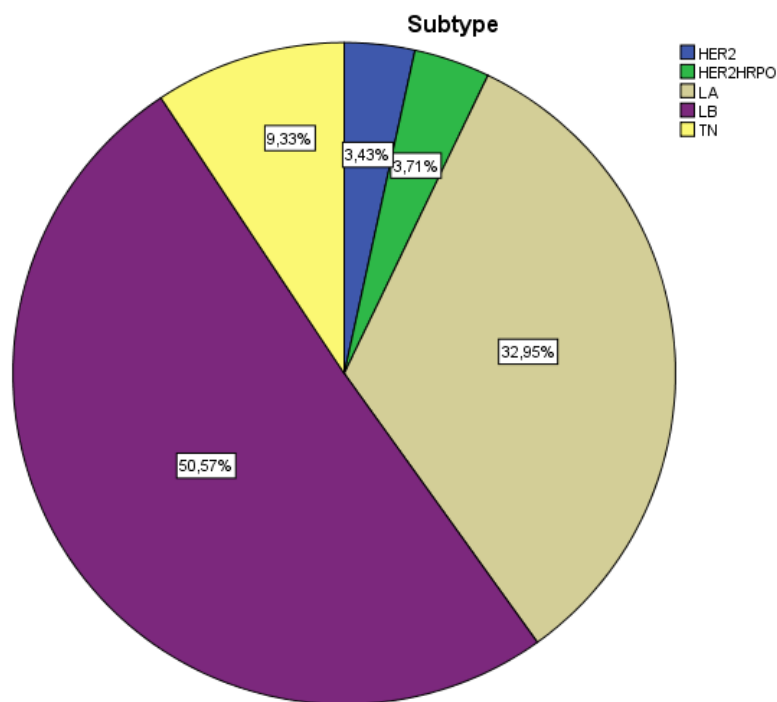
### **Mammaprint**

MammaPrint® è un test in vitro basato sulla tecnologia microarray. Esso prevede l'estrazione dell'RNA da campioni di tessuto di tumore mammario processato in modo da consentire l'analisi del profilo di espressione di 70 geni critici implicati nei pathway molecolari coinvolti nella cascata di induzione del tumore metastatico della mammella. Il campione di tumore è stato raccolto ed inviato in un liquido che stabilizza l'RNA (il congelamento del tessuto non è richiesto) presso il laboratorio centralizzato dell'Agendia (Olanda), il quale ha elaborato il campione di RNA estratto e fornito i risultati. Come risultato definitivo è stato attribuito un rischio individuale di metastasi: "alto rischio" (corrispondente a un rischio del 29% a 10 anni, senza nessun trattamento) o "basso rischio" (corrispondente a un rischio del 10% a 10 anni, senza nessun trattamento).

MammaPrint viene proposto come test più accurato, rispetto ai criteri raccomandati dalle linee guida e ai calcolatori automatizzati, nella stima del rischio individuale di metastasi e per una migliore identificazione dei pazienti a basso ed alto rischio. Tra i benefici attesi il produttore enfatizza la riduzione del numero di pazienti sottoposte a chemioterapia adiuvante non necessaria - e dei relativi eventi avversi - poiché erroneamente assegnate al gruppo di pazienti ad alto rischio <sup>21-35</sup>.

## ***Risultati***

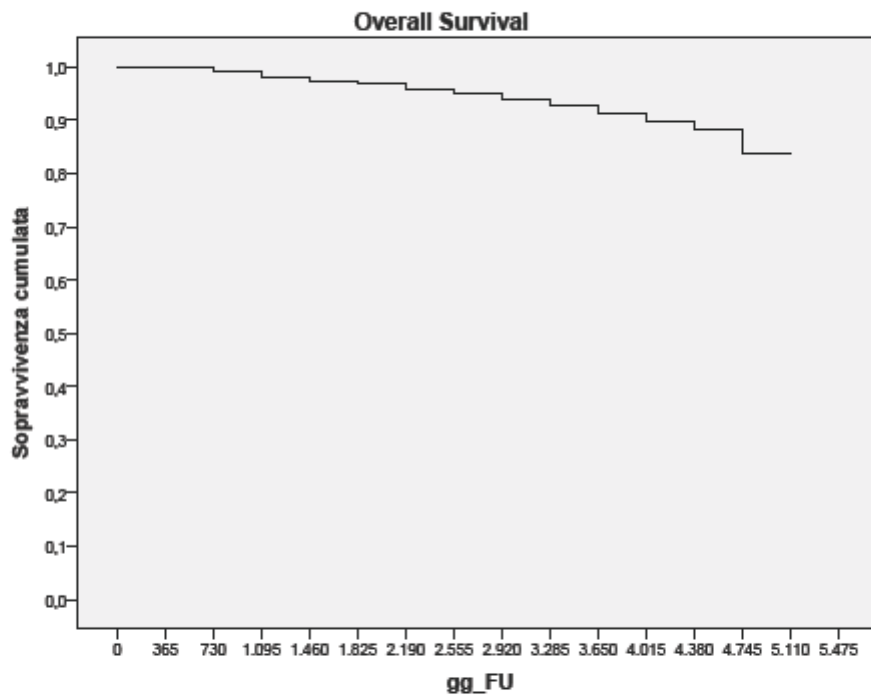
La distribuzione per sottotipi molecolari nella casistica sopra descritta di 1598 pazienti è illustrata nelle Figura seguente.



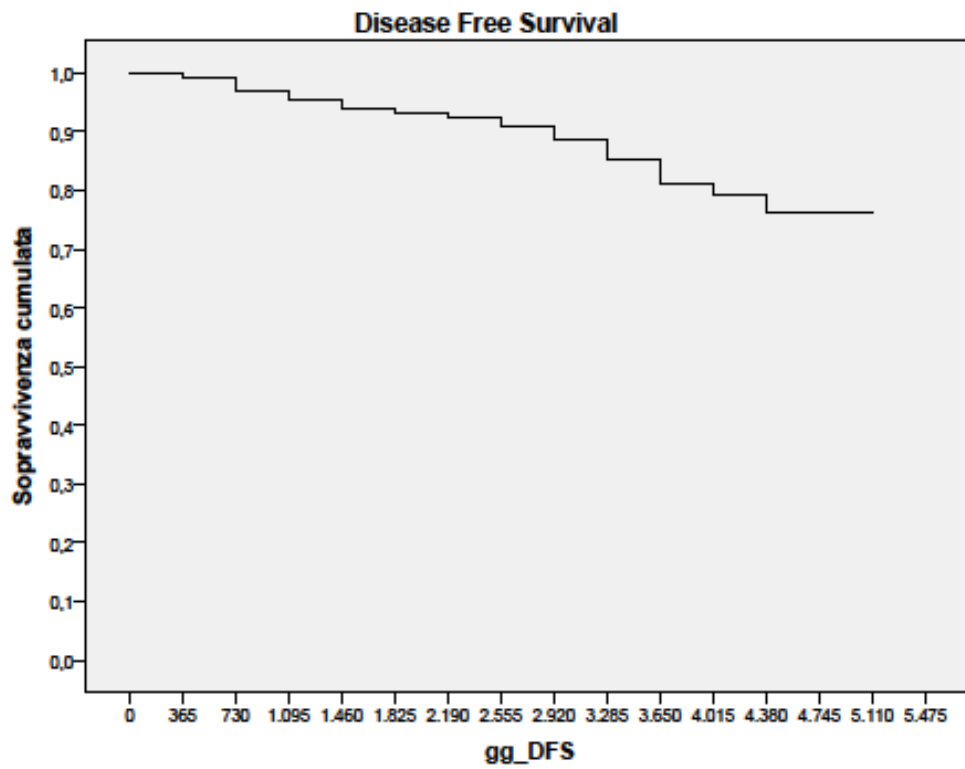
**Fig. 3** - Distribuzione per sottotipi molecolari

La sopravvivenza globale (OverallSurvival) a 5 anni è stata del 96%, con una flessione all'89% a 10 anni (Figura 4)

I decessi registrati sono stati 30, di cui 20 dovuti alla patologia neoplastica ed 10 ad altre cause. Così la sopravvivenza specifica si è attestata ad un confortante 96% a 10 anni (Figura 5).

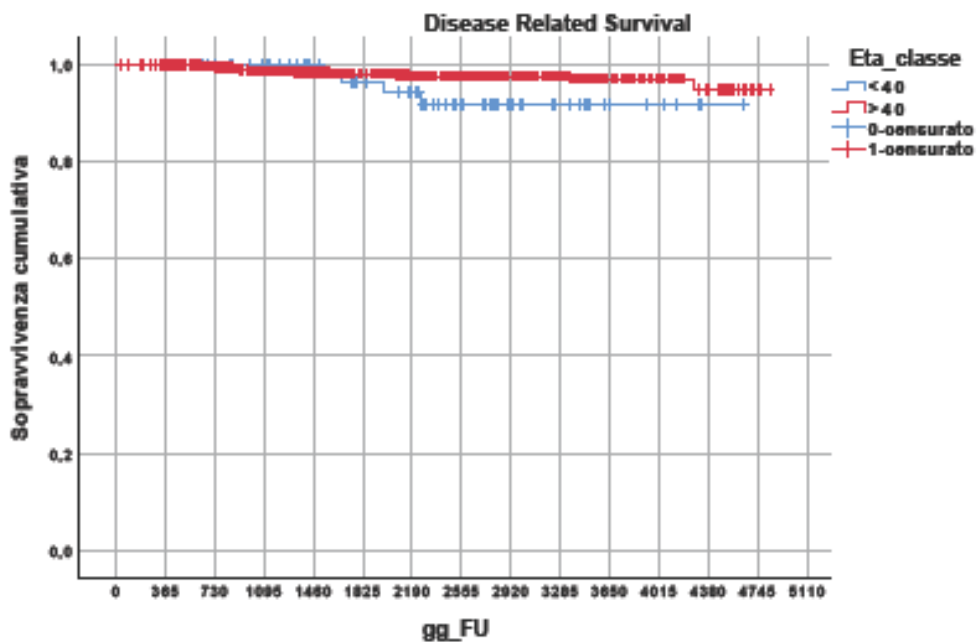


**Fig. 4** – OverallSurvival



**Fig.5** – Sopravvivenza specifica per malattia

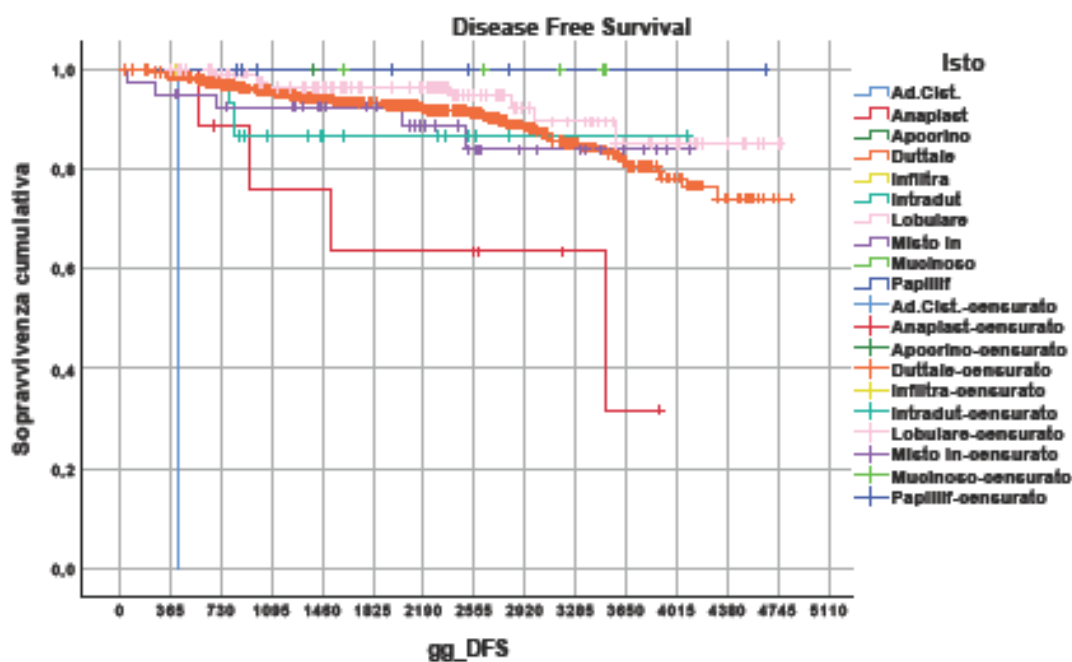




**Fig. 6** – Sopravvivenza specifica per classi di età

La stratificazione della sopravvivenza in funzione delle fasce (Fig.6) di età permette di valutare il significato prognostico della variabile esaminata: appare evidente la maggior aggressività clinica delle forme neoplastiche insorte prima dei 40 anni, a fronte di una prognosi sicuramente più favorevole per le pazienti che hanno sviluppato il carcinoma mammario in età più avanzata.

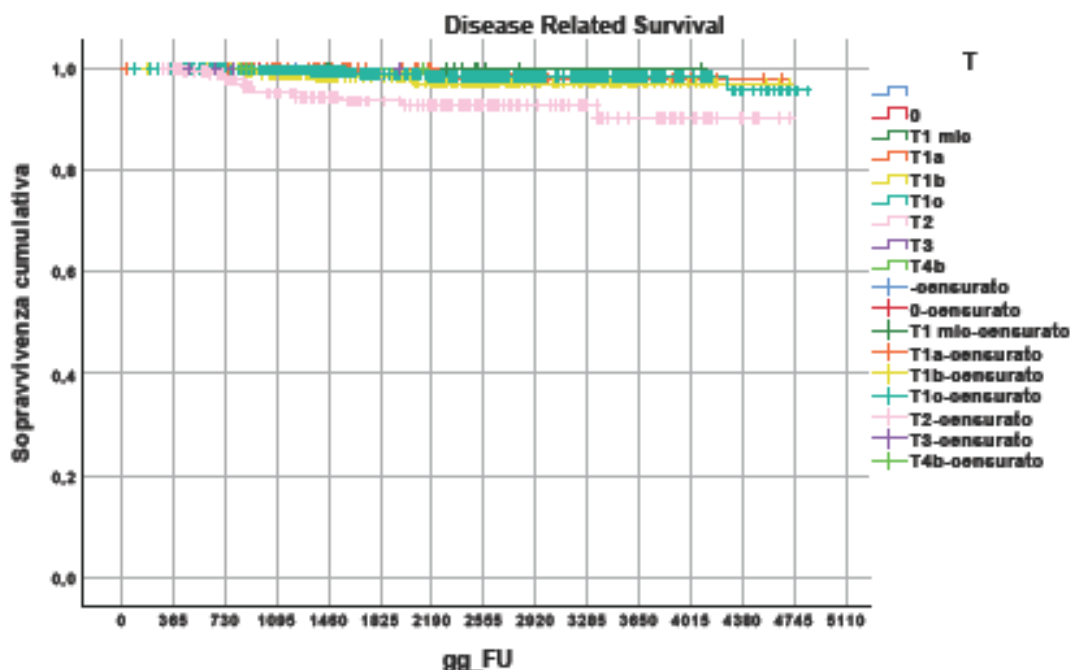
La prognosi, più che all'istotipo, è legata alla differenziazione, nozione che viene confermata dall'analisi della casistica. Il log rank test ( $p < 0,01$ ) evidenzia maggiori riprese di malattia nelle forme anaplastiche ed una tendenza a maggior intervallo libero di malattia nelle forme lobulari differenziate (Figura 7).



**Fig. 7** – Intervallo libero da malattia per istotipo

Logicamente, e classicamente, la previsione di risultato a distanza in termini di sopravvivenza e periodo libero di malattia in campo oncologico, è sempre stata fatta sulla base di considerazioni che riguardavano il momento in cui intercettavamo clinicamente il decorso biologico della malattia: la famosa “stadiazione”.

Per il tumore mammario rimane valido l’assunto che più è piccola la lesione trattata e migliore è la prognosi, rendendo quindi strategico l’impegno profuso dalle istituzioni nello screening per la diagnosi precoce. Possiamo confermarlo sulla nostra casistica (Figura 8).



**Fig. 8** – Sopravvivenza specifica per T (classe TNM)

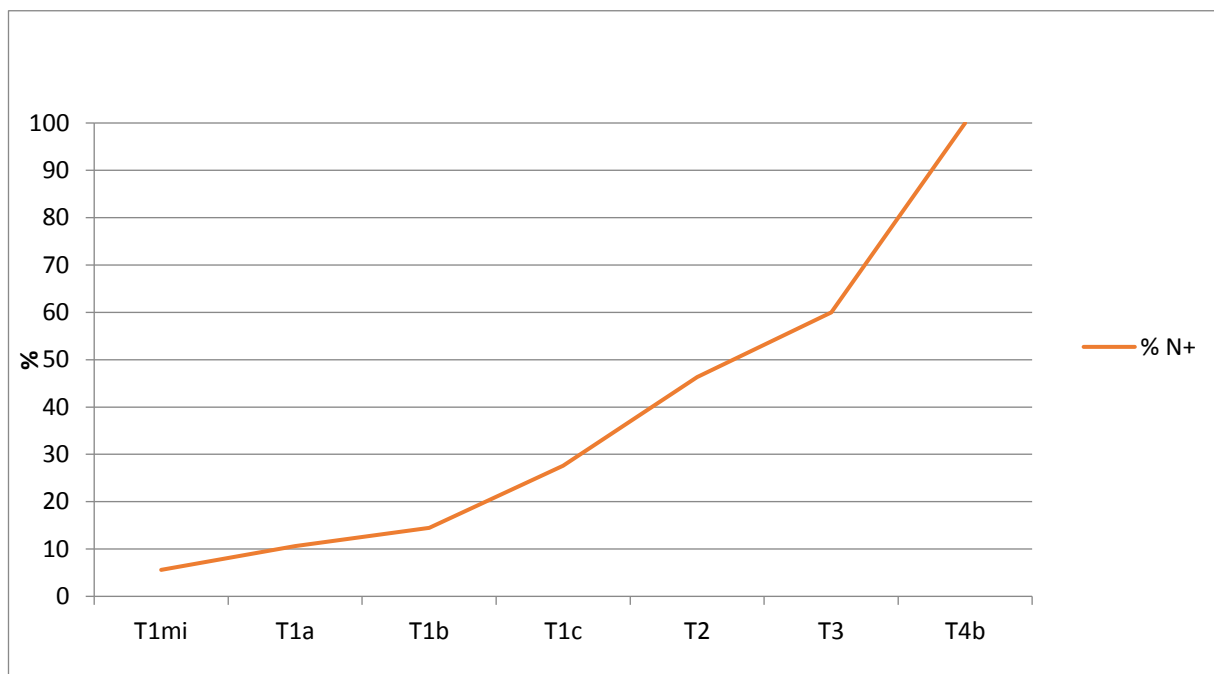
All'analisi di Kaplan Meier il Log Rank Test evidenzia un  $p < 0,05$ , il che significa che, come previsto, le pazienti affette da tumori con diametro istologico  $> 2\text{cm}$  (pT2) muoiono di più della loro patologia rispetto a quelle con tumori più piccoli (sopravvivenza a 10 anni 91% vs 98%).

Ancora, ad un certo punto della sua storia naturale, il carcinoma mammario può metastatizzare per via linfatica e, da malattia locale, diviene malattia regionale. La stazione linfatica interessata per eccellenza è quella ascellare e tutte le procedure chirurgiche in tale sede, vuoi la CALND che la BLS, mirano appunto alla stadiazione che è notoriamente correlata alla prognosi e fornisce elementi che impattano sulla strategia terapeutica.

Anche in questo caso il fattore tempo sembra logicamente coinvolto: più la lesione primitiva è grande e più probabile è il coinvolgimento ascellare e peggiore la prognosi.

C'è una forte correlazione tra T e stato linfonodale passando la probabilità di trovare metastasi linfonodali ascellari dal 3 al 50% a seconda del tumor size ( $\chi^2 < 0,001$ ).

In Figura 9 la progressione N per T risulta assai evidente.



**Fig. 9** – Percentuale di N+ secondo il T size.

Non c'è lavoro recente nella letteratura internazionale, riguardante il management dell'ascella che non dichiari: “lo stato linfonodale resta il principale fattore prognostico nel tumore della mammella”. Questo *statement* viene confermato nella nostra casistica.

Le curve di sopravvivenza specifica cominciano a divergere dal secondo anno dall'intervento delineando una mortalità significativamente maggiore nelle pazienti con almeno un linfonodo ascellare positivo (Log Rang test  $p= 0,005$ ). La combinazione del T size con l'impegno linfonodale ascellare sono due fattori fondamentali nell'assegnazione dello Stadio (Figura 10) che mette in evidenza l'effetto moltiplicatore del *tumoralburden* sulla sopravvivenza.

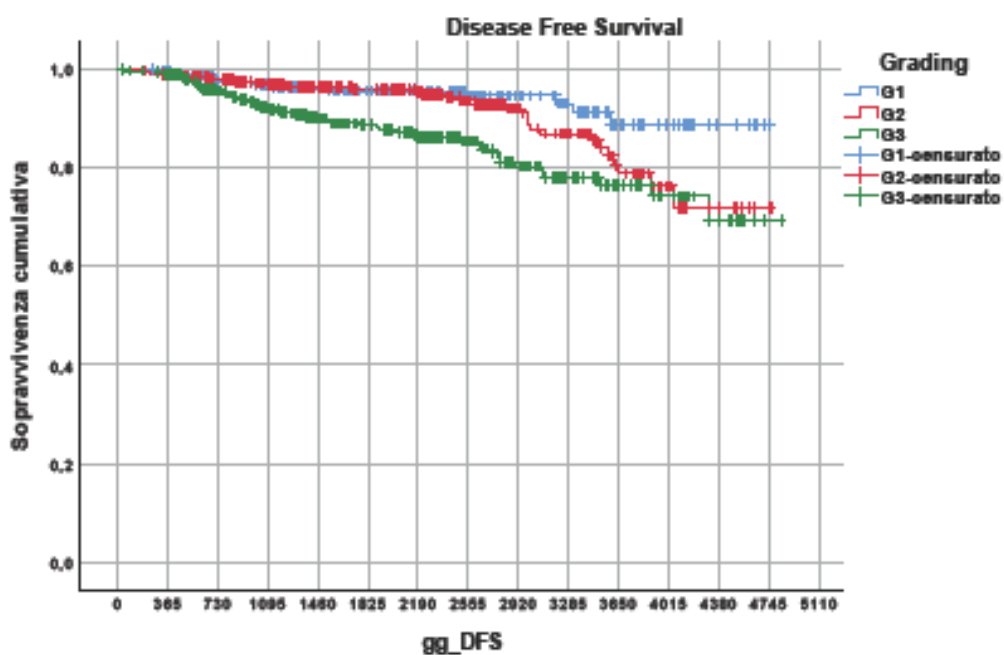
TNM Groups	Anatomic Staging Groups	Pathologic Prognostic Staging Groups
T1 N0 M0	IA	IA IB
T1 N1 M0	IIA	IA IB 2A
T3 N0 M0	IIB	IA IB IIA IIB IIIA
T3 N2 M0	IIIA	IA IB IIA IIB IIIA

**Fig. 10** – Stadiazione del tumore mammario AJCC 2017

Nella nostra casistica, il gruppo di pazienti con tumori > 2 cm e più di 3 linfonodi positivi in ascella (Stadio IIIA) presenta una mortalità specifica del 50% già a 6 anni contro il 15% dello Stadio IIB ed il 2-3% degli Stadi più precoci ( $p < 0,000$ ). E' però riscontro frequente ottenere risultati assai diversi in termini di controllo di malattia su pazienti con pari stadio e da molti anni ormai l'attenzione dei ricercatori si è soffermata su fattori intrinseci al tumore, indipendentemente dallo stadio: i fattori biologici.

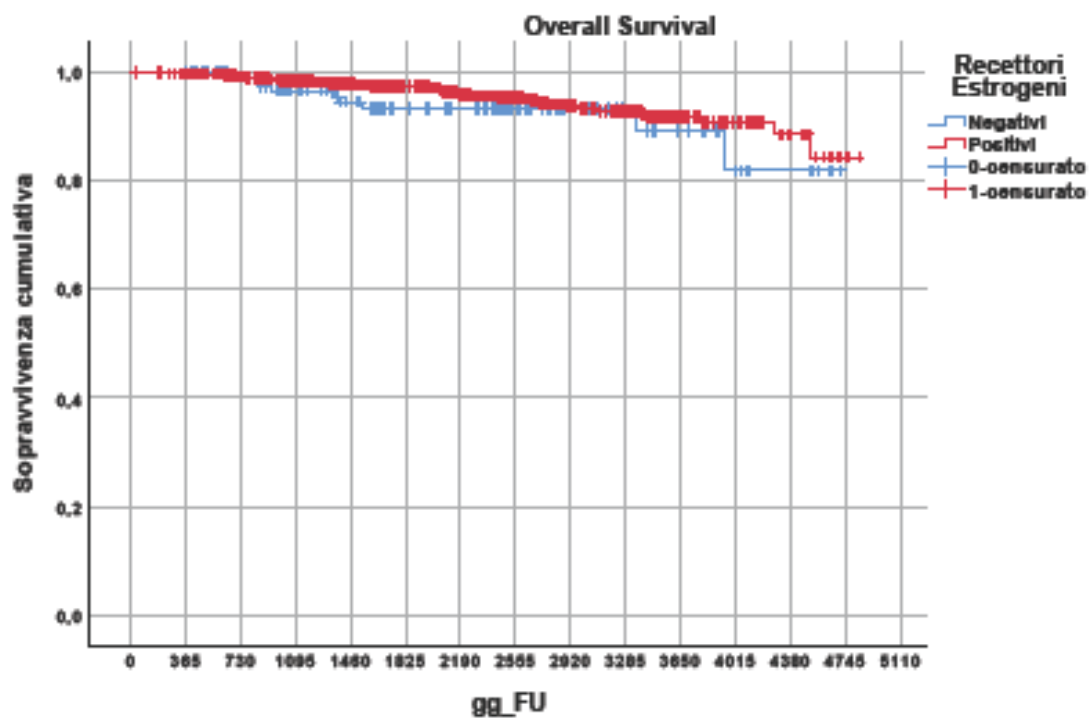
Storicamente il primo aspetto valutato è stato morfologico: il Grading, cioè il grado di differenziazione istologico del tumore.

I tumori più indifferenziati sono un marcatore prognostico negativo ( $p = 0,003$ ); le curve cominciano a divergere a partire dal secondo anno dall'intervento. Ed anche in termini di ripresa di malattia, vuoi recidiva locale, vuoi regionale (linfonodi ascellari) o metastasi a distanza, il valore di G appare ben correlato all'aggressività della malattia neoplastica (Fig. 11).



**Fig. 11** – Intervallo libero da malattia per classe di Grading

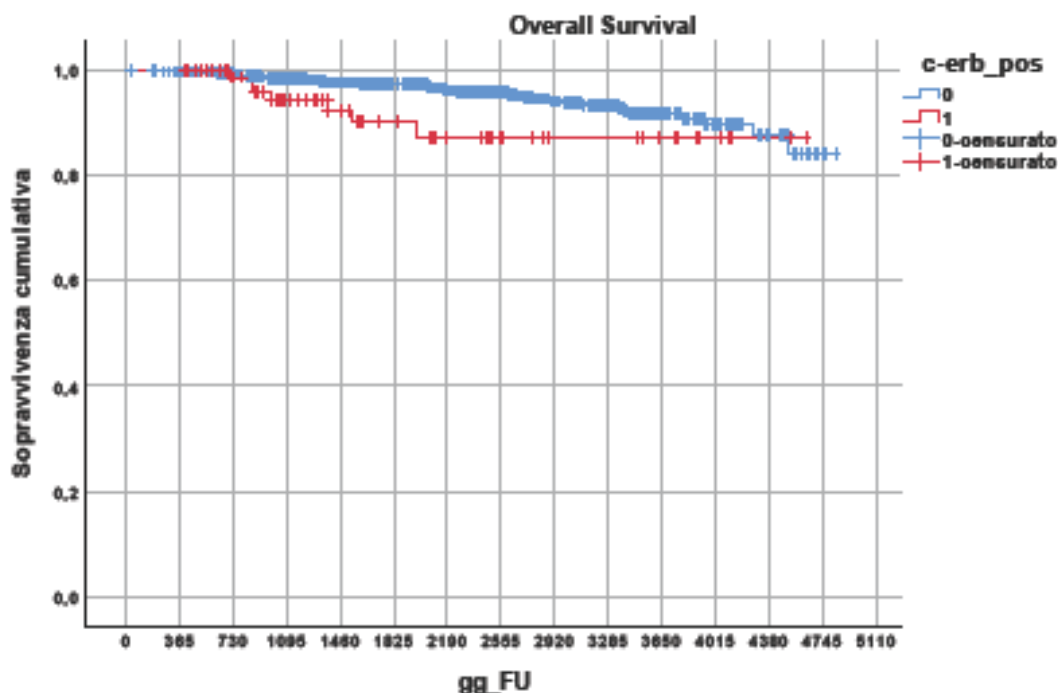
Il secondo aspetto biologico del tumore riguarda lo stato recettoriale che più propriamente possiamo definire un fattore “predittivo” piuttosto che “prognostico”, in quanto ben collegato alla previsione di remissione di malattia ma in rapporto alla possibilità di intraprendere una terapia specifica antiormonale. I casi con espressione dei recettori per gli estrogeni, se stabiliamo un cut off del 10%, ammontano a circa l’80%. Queste pazienti sono state tutte sottoposte a terapia quinquennale con tamoxifene e/o inibitori dell’aromatasi. Le pazienti con recettori espressi hanno prognosi migliore ( $p=0,002$ ) come evidenziato in Figura 12.



**Fig. 12** – Sopravvivenza specifica per stato recettoriale

Più recentemente è entrata nell'uso clinico la valutazione dello stato dei recettori del fattore di crescita epidermico 2 (HER2), la cui espressione, seppur considerata prognosticamente sfavorevole, permette altresì la somministrazione di un anticorpo monoclonale (trastuzumab).

Anche questa variabile, ormai presente di routine nei referti istologici delle pazienti operate o sottoposte ad agobiopsia, si è dimostrata nella presente serie di pazienti fortemente correlata alla sopravvivenza ( $p=0,001$ ) (Fig. 13).



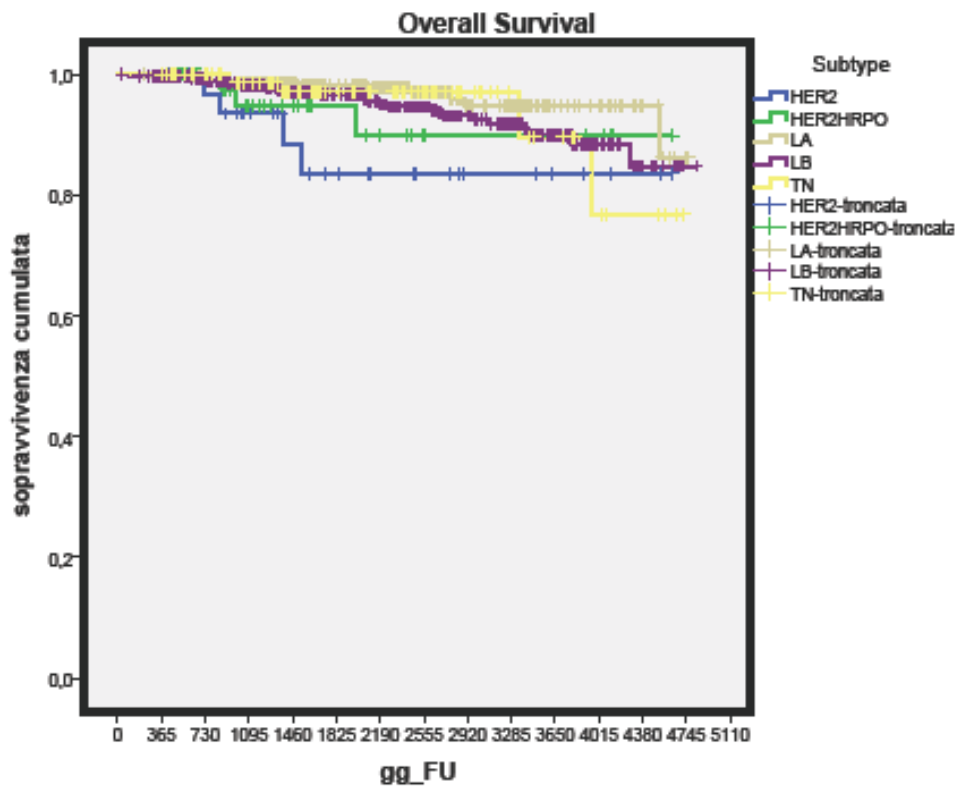
**Fig. 13** – Sopravvivenza specifica per stato HER2

Ancora più recente e non chiaro è invece il valore dell'indice di proliferazione (Ki-67), espresso in percentuale ed anch'esso presente di routine nelle risposte istologiche. L'espressione di questa proteina necessaria alla proliferazione cellulare concorre alla determinazione del sottotipo molecolare (v. supraTab. 3).

E' affermato in letteratura che le forme senza recettori ormonali espressi e con espressione del c-erb abbiano prognosi peggiore, perciò chiaro il fatto che ci sia correlazione inversa con lo stato linfonodale (altra variabile strettamente correlata alla prognosi).

Abbiamo quindi usato questa caratteristica per stratificare le pazienti ed il risultato in termini prognostici è illustrato nella Figura 14.



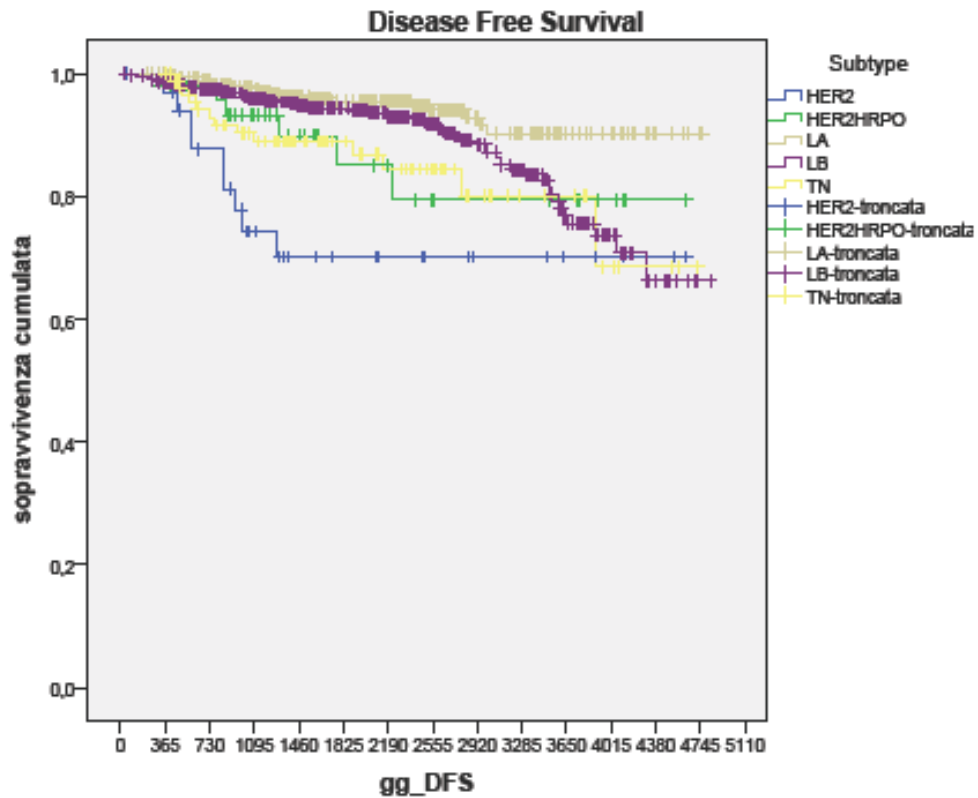


**Fig. 14** – Sopravvivenza specifica per Sottotipo molecolare

Come la stadiazione combinava l'effetto del T e dell'N, così questa classificazione combina gli effetti dei vari marcatori biologici che la determinano. Si osserva la maggiore aggressività delle lesioni che esprimono HER2 e la precocità dei decessi in questo caso. I Triple Negative, nella nostra casistica, hanno comportamento equivalente ad i Luminal A e B con prognosi sicuramente migliore ( $p < 0,000$ ).

Ed anche in termini di ripresa di malattia *toutcourt* (recidive locali, ripresa linfonodale ascellare omolaterale, metastasi a distanza, primitivi controlaterali), le curve parlano chiaro, dimostrando soprattutto la maggiore aggressività della forma HER2 classica con una precocità del ripresentarsi della neoplasia ( $p < 0,01$ ). (Fig. 19)

In questo caso il sottotipo TN si comporta in maniera intermedia, soprattutto dimostrandosi un marcatore di ripresa precoce.



**Fig. 15** – Intervallo libero da malattia per Sottotipo Molecolare

Mentre la stadiazione (T, multicentricità ed N) incide sulle scelte chirurgiche (chirurgia conservativa vs mastectomia, BLS vs CALND), finora gli aspetti biologici (G, stato recettoriale, Chi67, c-erb) che determinano il sottotipo molecolare influiscono solo sulle terapie sistemiche (OT, CHT, target Therapy).

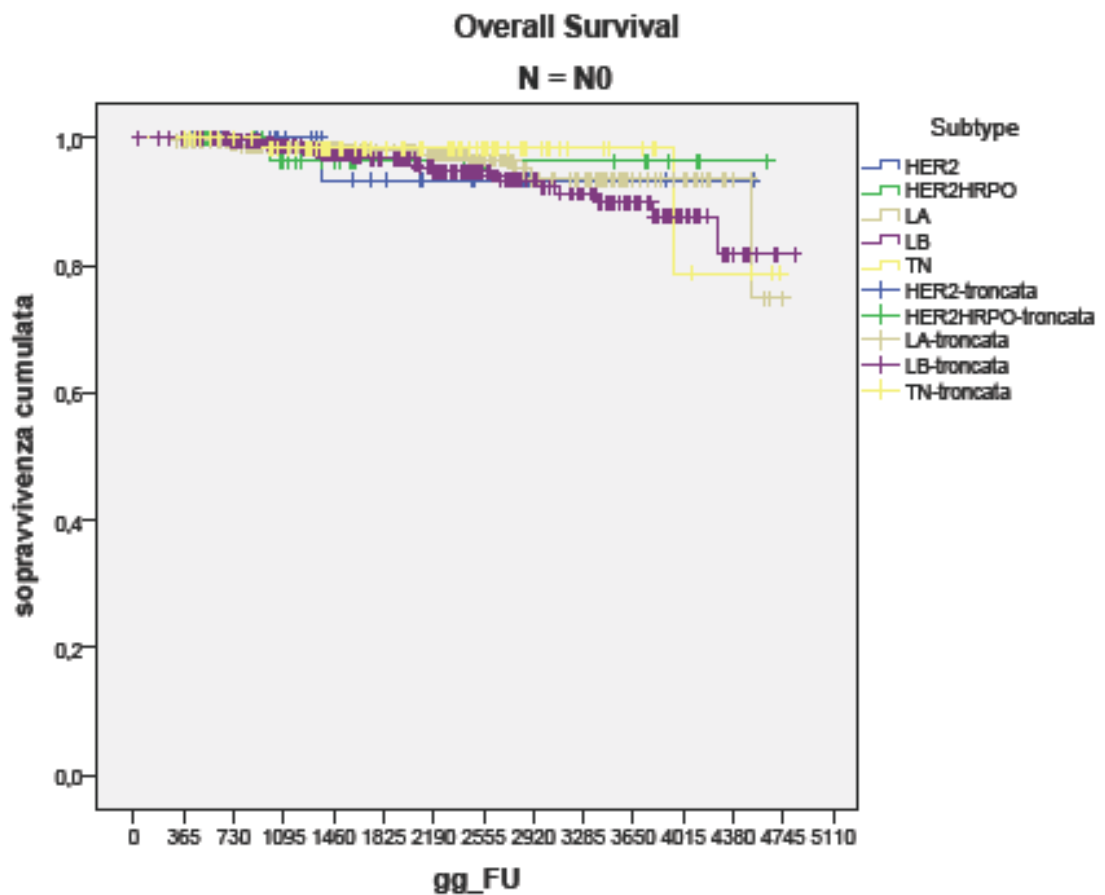
Alcuni Autori cominciano a chiedersi se ad una maggiore aggressività biologica debba corrispondere un atteggiamento più aggressivo da parte del chirurgo oncologo per un maggior controllo loco-regionale di malattia.

Ora, è vero che al fenotipo HER2 corrisponde un maggior rischio di recidiva locale, statisticamente significativo ( $p < 0,05$ ), ma ciò è correlato alla maggior frequenza in questo gruppo di lesioni multicentriche e con Estesa Componente Intraduttale, senza dimenticare comunque che anche le terapie sistemiche hanno impatto sulla recidività locale.

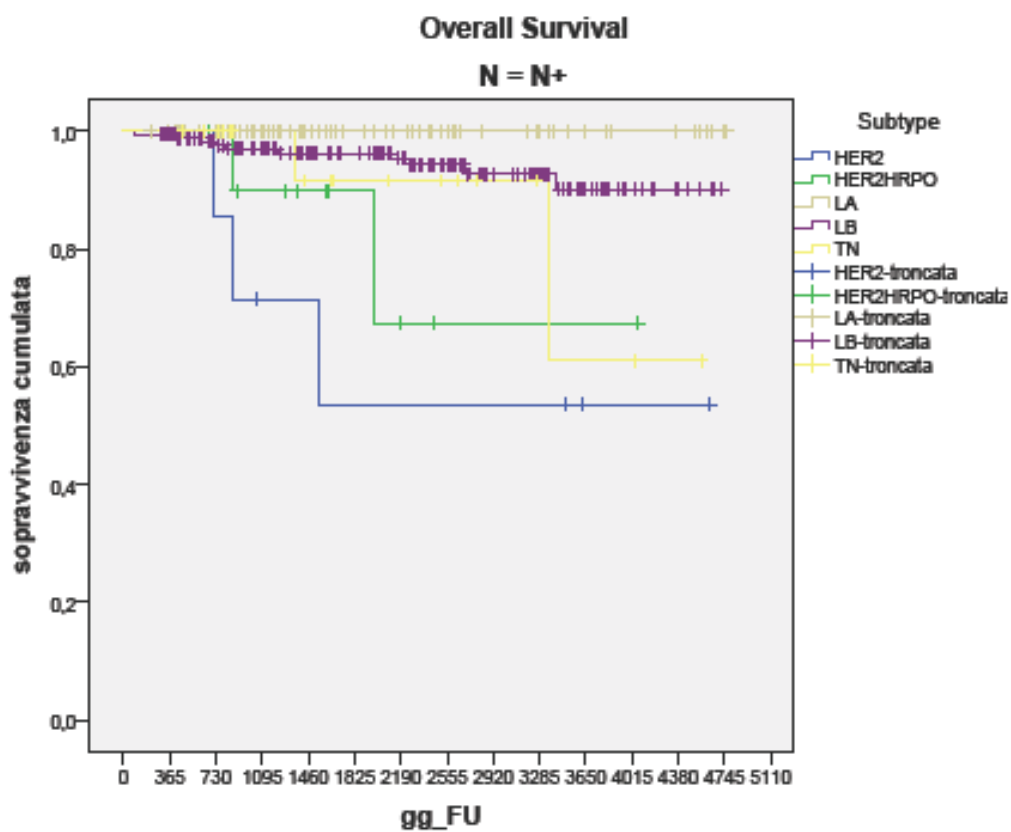
In sostanza, al momento, ed in accordo con la letteratura internazionale, non abbiamo conferma che ad una maggiore aggressività chirurgica corrisponda un migliore outcome.

La valutazione combinata tra stadiazione e caratteristiche biologiche può essere fatta analizzando per sottogruppi N relati la sopravvivenza per Sottotipo molecolare (Figure 21 e 22).

Risulta evidente l'effetto moltiplicativo di un tumore già di per se biologicamente più aggressivo associato ad una stadi azione mediamente più avanzata (coinvolgimento metastatico di almeno un linfonodo ascellare) ( $p < 0,01$ ).

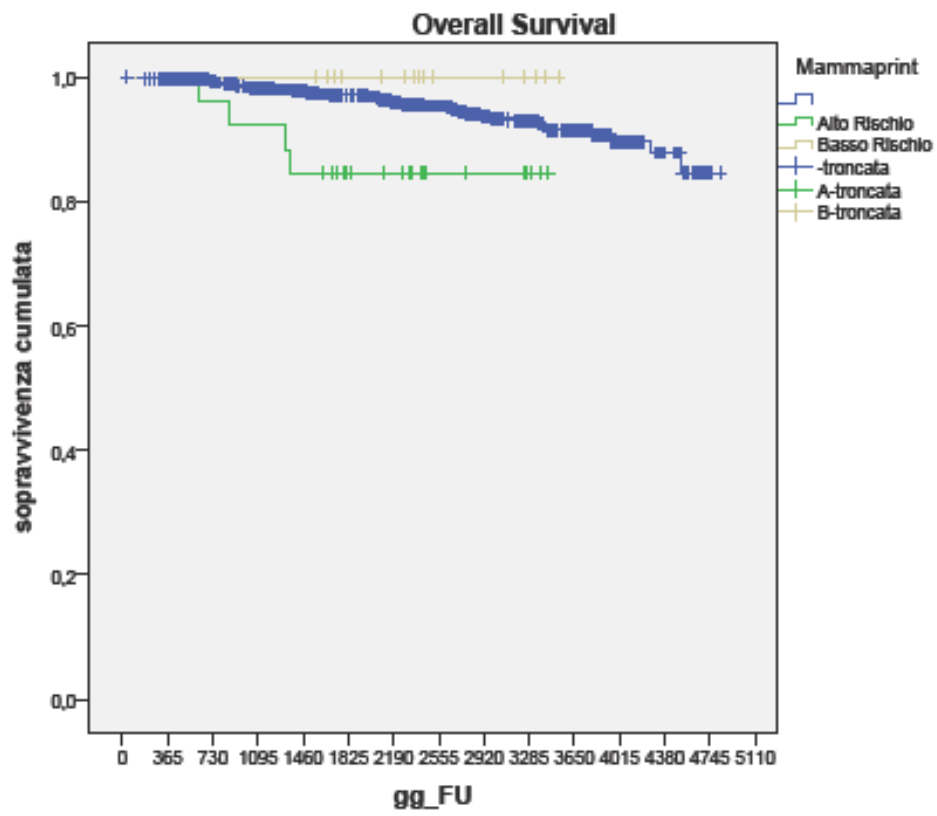


**Fig. 16** – Sopravvivenza specifica per Sottotipo molecolare nelle pazienti N0



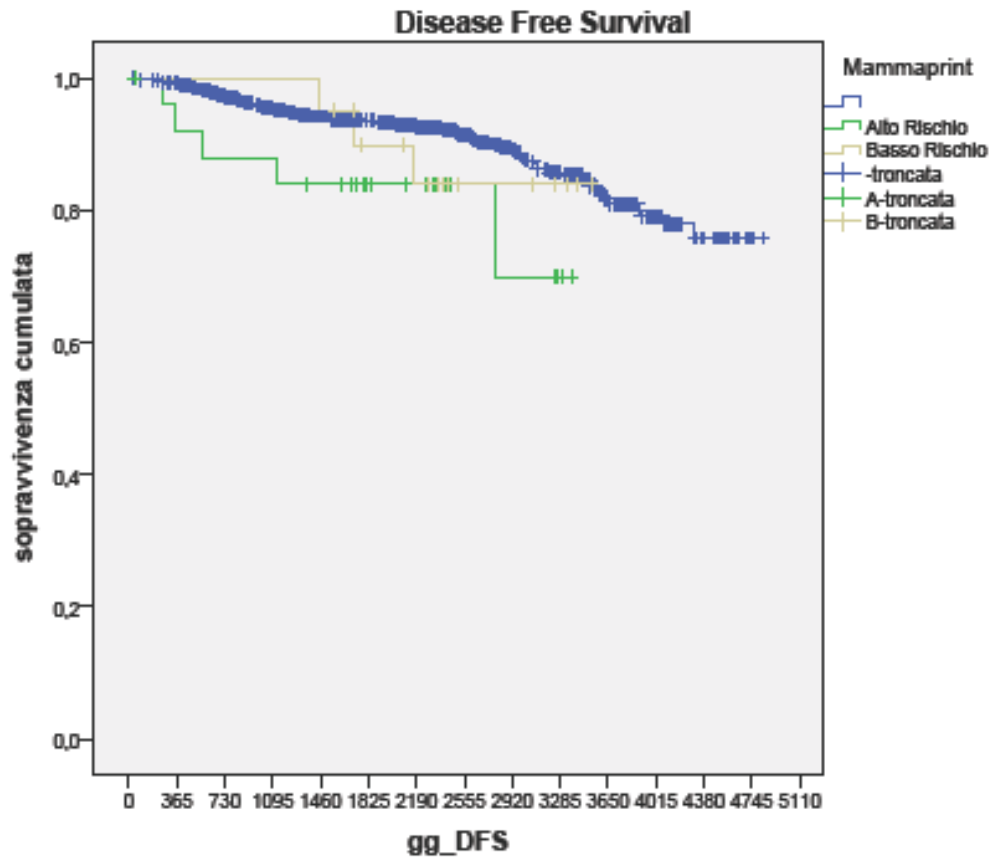
**Fig.17** - Sopravvivenza specifica per Sottotipo molecolare nelle pazienti N positive  
 In questa figura visualizziamo l'effetto moltiplicativo della presenza di metastasi linfonodali nei sottotipi molecolari più "aggressivi".

Adesso confrontiamo i diversi sottotipi molecolari, determinati con l'IHC con il Mammaprint.



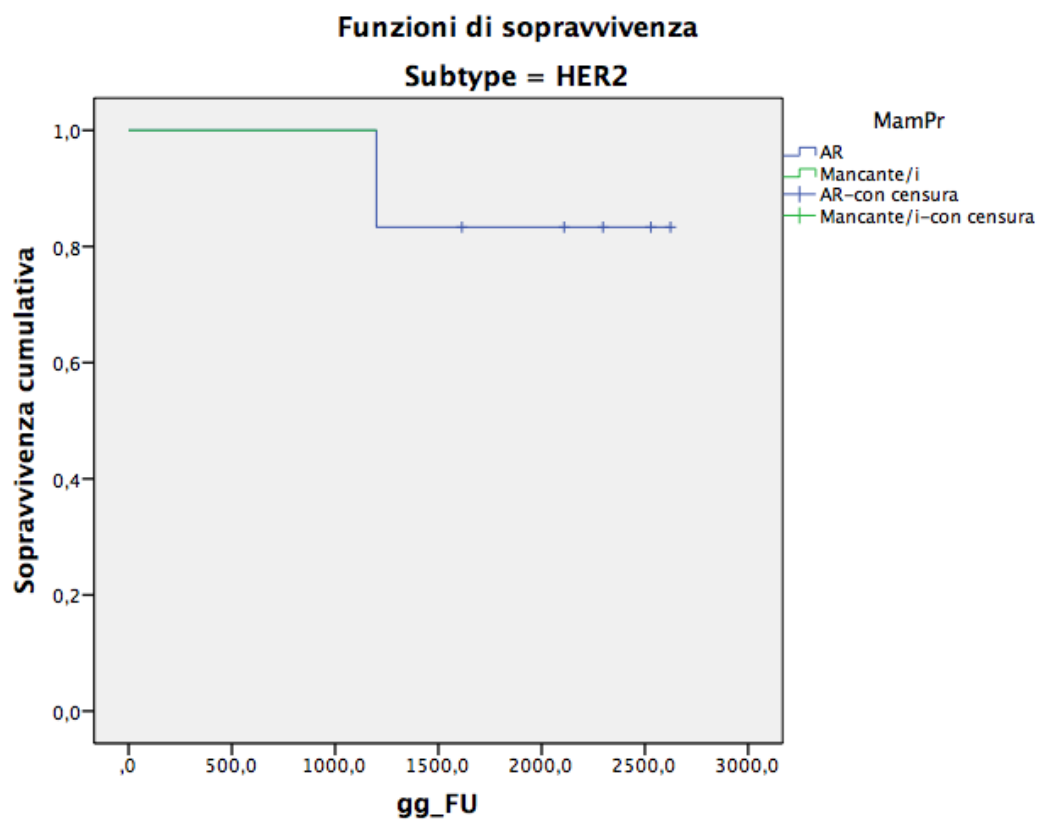
**Fig.18** - Test di uguaglianza delle distribuzioni di sopravvivenza per i diversi livelli di MamPr. *Overall Survival*

**Fig. 19** - Test di uguaglianza delle distribuzioni di sopravvivenza per i diversi livelli di MamPr. *Disease Free Survival*



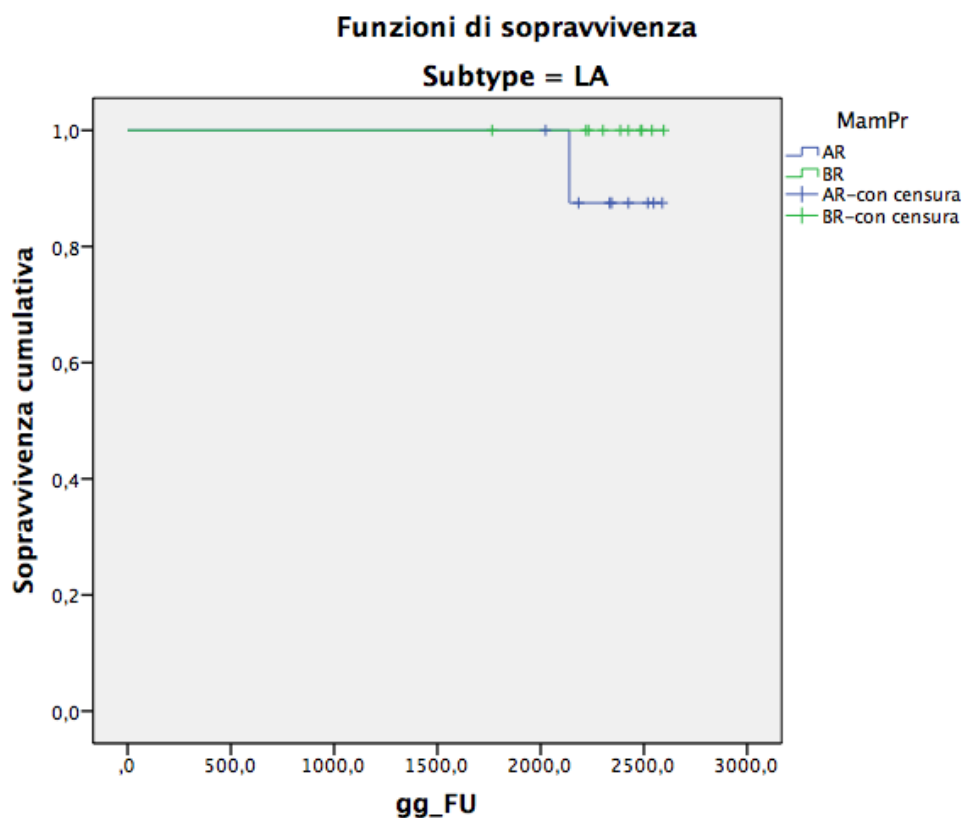
In questa figura appare evidente la differenza di prognosi nelle pazienti classificate ad AR ed a BR con il test genetico Mammaprint.

Anche in termini di ripresa di malattia, il gruppo a basso rischio risulta avere un minor numero di casi.



**Fig.20** – Sopravvivenza dei gruppi AR e BR nel sottotipo Her2

Tutte le pazienti classificate come Her2 sono risultate ad “Alto Rischio” confermando la validità della tecnica immunohistochimica (IHC).



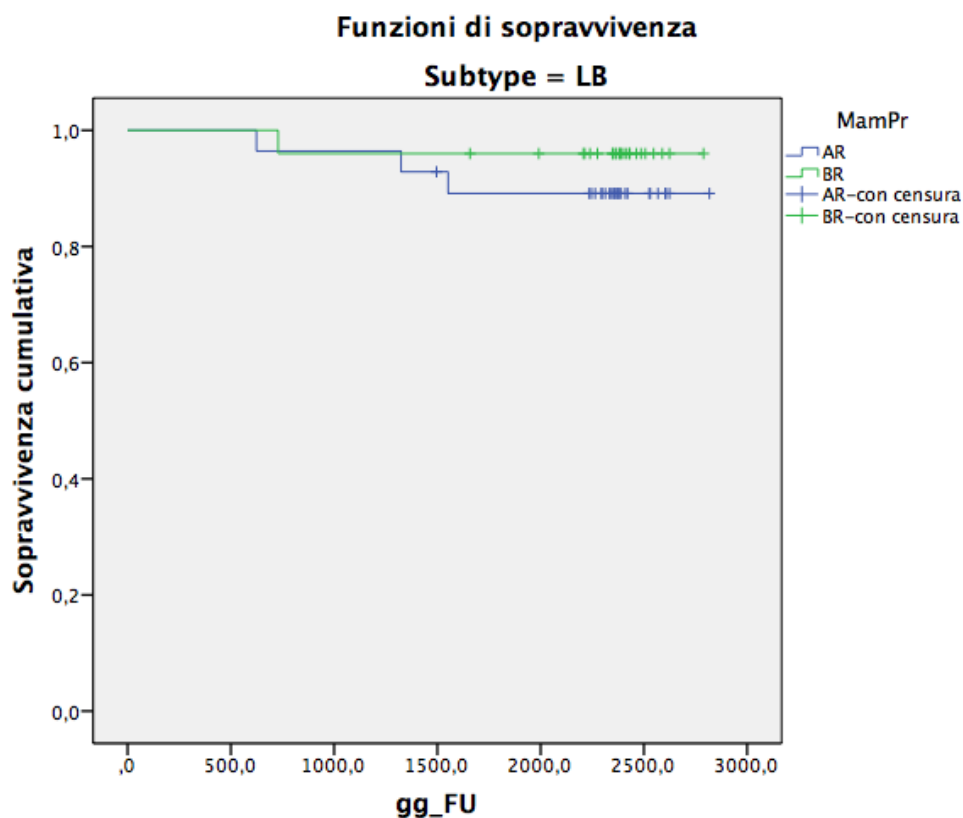
**Fig.21** – Sopravvivenza dei gruppi AR e BR nel sottotipo LA

In questo caso appare evidente la discordanza tra i due gruppi (Alto Rischio e Basso Rischio) all'interno dello stesso sottotipo molecolare.

Possiamo ipotizzare che parte delle pazienti classificate con l'immunoistochimica (IHC) come Luminal A e quindi candidate unicamente ad ormonoterapia (ed eventualmente a radioterapia, a seconda dell'intervento) siano state sottostadiate e di conseguenza sotto-trattate. Infatti secondo le indicazioni, le pazienti appartenenti al gruppo AR avrebbero dovuto essere trattate anche con CHT.

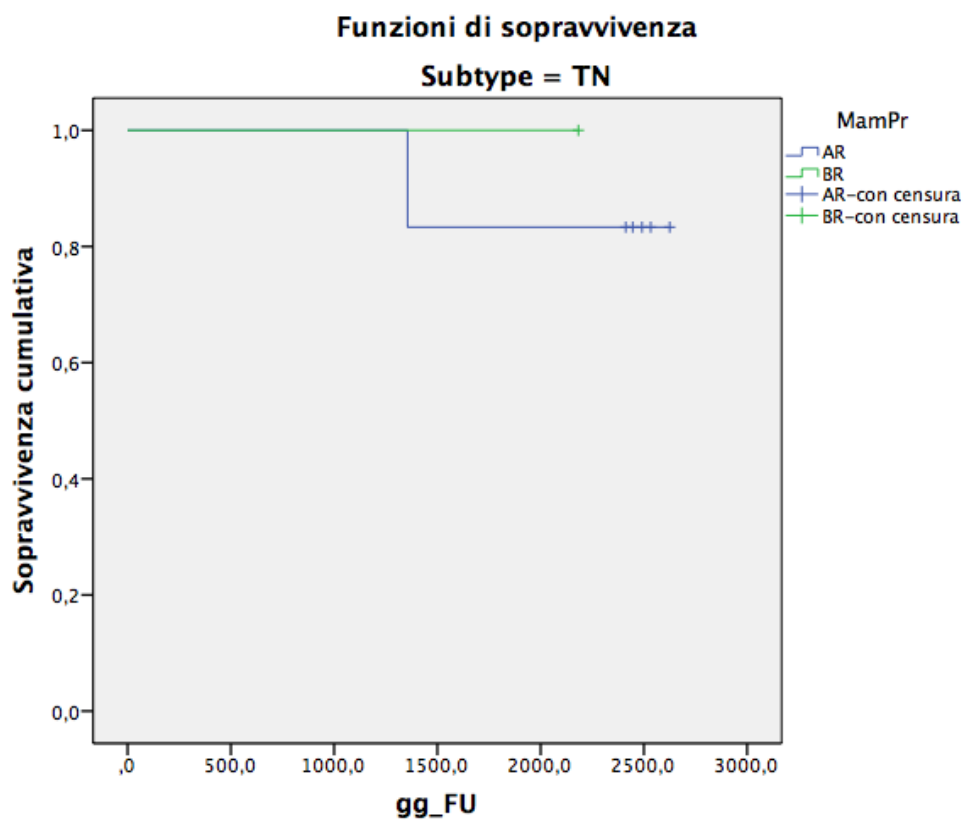
Le due curve dunque cominciano a divergere subito dopo i 5 anni con una importante ripresa di malattia nelle pazienti classificate ad Alto Rischio.





**Fig.22** – Sopravvivenza nei gruppi AR e BR nel sottotipo LB

Al contrario nel sottotipo molecolare Luminal B, in cui di norma le pazienti vengono sottoposte a trattamenti adiuvanti di OT e CHT (più eventuale RT in base al tipo di intervento chirurgico), possiamo ipotizzare che alcune pazienti siano state sovra stadiate e quindi avrebbero potuto risparmiare il trattamento chemioterapico. La differenza di prognosi tra i gruppi AR e BR appare evidente anche in questo caso.



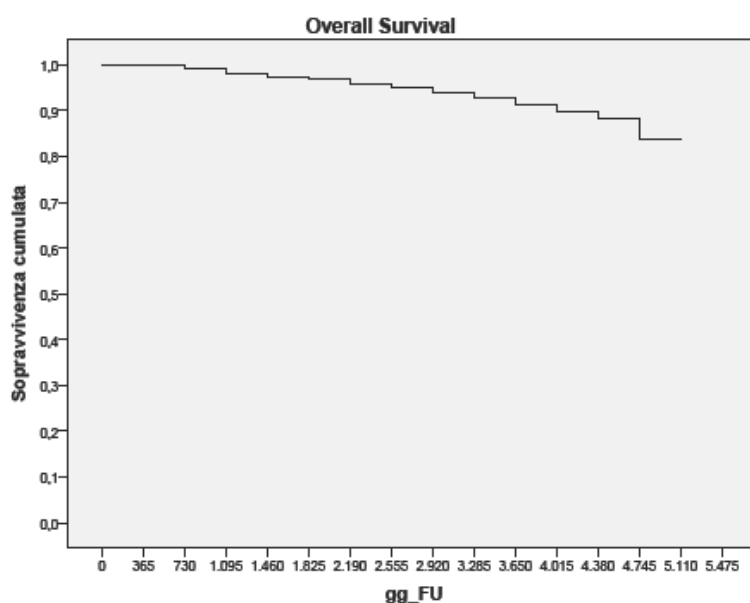
**Fig.23** - Sopravvivenza nei gruppi AR e BR nel sottotipo TN

Anche nel sottotipo Triple Negative appare evidente la discordanza tra il sottogruppo AR e BR in termini prognostici.

## *Discussione e Conclusioni*

Lo studio conferma come il tumore della mammella, seppur caratterizzato da un'ottima prognosi, presenti comunque un elevato di ripresa di malattia a 10 anni.

In particolare, confermiamo che il tumore precocemente diagnosticato della mammella vede a 10 aa l'89% delle pazienti viventi, che, nonostante ciò, presentano a tale distanza dall'intervento un tasso globale di ripresa di malattia non trascurabile: il 22%, rilievo assolutamente in linea con i dati presenti in letteratura (Fig. 24)



**Fig. 24** – Overall Survival

Inoltre, possiamo confermare una sostanziale sovrapposizione, per quanto riguarda il comportamento clinico della neoplasia, tra alcuni sottotipi molecolari definiti con i surrogati IHC e quelli definiti mediante l'analisi dei pattern di espressione genica.

I Luminal A hanno dimostrato un basso indice di ripresa, mentre le pazienti con tumori che iperesprimono HER2, soprattutto in assenza di recettori per estrogeni e progestinici, hanno prognosi nettamente peggiore.

E' da sottolineare che la presente casistica è, in toto, riconducibile ad un periodo successivo all'introduzione dell'anticorpo monoclonale in associazione ai taxani per la terapia dei tumori HER2 positivi, quindi risulta molto omogenea rispetto a questa variabile. A questo proposito, la letteratura è unanime nell'evidenziare l'impatto della target therapy sulla sopravvivenza nei tumori HER2 positivi, ma evidentemente, nella presente casistica, ciò non è sufficiente per rendere equivalente il rischio tra tumori positivi e negativi rispetto a questo indice.

Meno omogeneo è invece il trattamento dei Luminal B che, in tempi più recenti, proprio sulla base del loro comportamento sul lungo periodo, sono stati trattati dagli oncologi con CHT adiuvante seguita dalla OT standard. Come osservato anche in letteratura, il pattern di recidiva dei carcinomi ER+ si caratterizza per una lunga latenza rispetto alle neoplasie negative per i recettori ormonali, che presentano una precoce ripresa di malattia; questa evidenza correla senza dubbio con il basso potenziale proliferativo delle forme luminali, correlato ad una limitata aggressività biologica. Da segnalare il comportamento borderline del sottotipo Luminal B che, nonostante le caratteristiche molecolari ne definiscano l'origine luminale, dimostra un comportamento biologico assimilabile alle neoplasie ER-negative, con rischio di recidiva a lungo termine (dopo i 5 anni dalla diagnosi).

Confermiamo sperimentalmente quanto già descritto in passato dal Gruppo di Milano e dal MSKCC di New York: i tumori ER-positivi globalmente, a parità di T, tendono a metastatizzare più frequentemente ai linfonodi ascellari. E recenti osservazioni, elaborate in riferimento alla valutazione del rischio di metastatizzazione ai linfonodi ascellari in caso di carcinomi N0 (Meretoja et al.), ci dicono che probabilmente anche la positività dello stato HER2 (nettamente peggiore per prognosi) sembra protettivo rispetto lo spreading linfonodale.

E' quindi estremamente complesso incrociare tutte le sottoclassi possibili e correlare le interazioni sulla prognosi: sono richiesti casistiche molto numerose.

Continuando su questi concetti, anche i risultati della nostra analisi evidenziano, in riferimento alle neoplasie triple negative un tasso di metastatizzazione linfonodale significativamente piú basso rispetto agli altri sottotipi, sia a breve che a lungo termine. Qui bisogna ribadire che il trattamento adiuvante sistemico (e le neoplasie TN sono state tutte sottoposte a regime CHT con taxani) annulla la potenziale variabilit  in termini di recidiva, sia locale che linfonodale, osservabile tra i differenti sottotipi molecolari in assenza di trattamento chemioterapico. In effetti, questa volta non in perfetta linea con la letteratura internazionale, la prognosi delle forme TN si   dimostrata a quasi 10 aa equivalente a quella delle forme luminali seppur con un maggior tasso di ripresa di malattia, soprattutto in termini di recidiva locale. Probabilmente questo comportamento dipende dalla maggiore multifocalit  istologica delle forme TN, come segnalato da alcuni Autori. Come corollario di queste osservazioni (maggiore recidivit  ma pressoch  uguale sopravvivenza) possiamo affermare che, senza dubbio, intercettare con un corretto follow up la ripresa di malattia ha impatto sulla sopravvivenza.

E questo potrebbe essere un altro aspetto fondamentale della classificazione per sottotipo molecolare del tumore mammario. Oltre che personalizzare le cure (cosa che   gi  in atto), probabilmente bisogna personalizzare il follow-up, proprio in considerazione dei diversi comportamenti biologici.

Pi  "serrati" i controlli clinici nelle pazienti TN, soprattutto nei primi 2 anni, con un monitoraggio della paziente comunque prolungato anche alla scadenza dei "famigerati" 5 anni, soprattutto nelle pazienti Luminal B, con particolare riguardo allo studio del sistema scheletrico, bersaglio tipico alla distanza. A tal proposito, la presente casistica   troppo limitata per analizzare le sottoclassi anche in termini di sede tipica di localizzazione metastatica, ma la letteratura comincia a considerare anche queste peculiarit  e ci riproponiamo di approfondire questo aspetto aumentando il numero di casi e la lunghezza del periodo di follow-up.

Dunque, l'introduzione della classificazione molecolare nella pratica clinica permette di definire il comportamento biologico delle singole entità, che contribuiscono a sviluppare l'eterogeneità che caratterizza il carcinoma della mammella, ma ancora non abbiamo evidenza che a questa eterogeneità debba corrispondere un nostro diverso atteggiamento chirurgico (Morrow). Questa è un'altra sfida per il futuro: il concetto di *tailored surgery* che non consideri solo variabili stadiative ed il rapporto volume mammella/tumore, ma anche fattori biologici.

Altro problema riguarda la misurazione del Ki67: nonostante la teoria comunemente accettata che ad elevata espressione dei marker di proliferazione corrisponda una maggior probabilità di risposta al trattamento chemioterapico, in letteratura il potenziale predittivo dell'indice proliferativo è ancora oggetto di controversie.

Infatti la misurazione del Ki67 è una misurazione operatore-dipendente e lo score varia leggermente a seconda del campo di sezione esaminato (HPF) e quindi della conta percentuale di cellule in stato di proliferazione.

Tuttavia questo score viene utilizzato per differenziare le neoplasie in Luminal A (generalmente candidate a solo trattamento OT) e neoplasie Luminal B (generalmente candidate a trattamento CHT ed OT): tra le raccomandazioni pubblicate dal panel di esperti: la distinzione nel contesto delle neoplasie luminali tra sottotipo A e B dovrebbe basarsi sulla valutazione combinata dei marcatori ER, PgR e l'indice di proliferazione Ki-67, definendo Luminal A like le neoplasie ER+/PgR+ con basso indice proliferativo (<20%). Le neoplasie Luminal B possono essere ulteriormente differenziate in Luminal B-like HER-neg (ER+/HER2- e Ki-67>20%) e Luminal B-like HER-pos (ER+/HER2 overespresso o amplificato, qualunque valore di Ki-67 e qualunque percentuale di positività per PgR).

Di conseguenza, per valori elevati e per valori molto bassi di indice proliferativo Ki67 le leggere variazioni che si possono osservare variando il campo di osservazione risulterebbero ininfluenti in termini di trattamento adiuvante. Invece per tutti i valori prossimi al valore soglia (cut-off definito generalmente al 20%) sarebbe indispensabile una maggior accuratezza poiché piccole variazioni

potrebbero indirizzare o meno verso il trattamento chemioterapico. Questo over/down treatment è evidenziato nelle nostre figure dalla discrepanza di prognosi dei sottogruppi AR e BR all'interno dello stesso sottotipo molecolare.

Il nostro studio dimostra infatti che i Sottotipi molecolari del carcinoma mammario determinati con surrogati Immunoistochimici hanno comportamenti biologici differenti, che si riflettono in una prognosi diversa. Occorre lavorare sulla standardizzazione dei sottotipi, soprattutto per quanto riguarda l'inquadramento classificativo del sottotipo luminal B. La nostra casistica, seppur limitata dalla monoistituzionalità, può avvalersi di assoluta uniformità nelle metodiche laboratoristiche (indice proliferativo e valutazione dello status HER2). Come abbiamo già descritto, la classificazione immunoistochimica, che definisce i surrogati molecolari, utilizza un set ridotto di bio-marcatori ed è auspicabile che in futuro si possa superare questo limite in termini di accuratezza, introducendo anche nella pratica clinica l'analisi genica.

Concludendo, si chiede alla comunità scientifica un maggior sforzo "tassonomico" per parlare tutti la stessa lingua ed attribuire un tumore ad un univoco sottotipo molecolare IHC surrogato, nell'attesa che il gene profiling divenga routine clinica.

Proprio in questa direzione, allo scopo di fornire una classificazione sistematica, basata sulle caratteristiche molecolari di diverse patologie neoplastiche, nasce il progetto TCGA (The Cancer Genome Atlas) Research Network. Oltre al cancro della mammella l'analisi integrativa basata sulla variazione dell'espressione genica, la presenza di alterazioni epigenetiche e la quantificazione dei livelli di mRNA (RNA messaggero), è stata condotta indagando il profilo molecolare di adenocarcinomi colo-rettali, carcinomi del polmone a cellule squamose, carcinomi sierosi ovarici, carcinoma endometriale, glioblastoma multiforme, carcinomi a cellule renali e carcinoma uroteliale della vescica. Sono così identificati veri e

propri profili molecolari riconducibili ad uno specifico tipo cellulare di origine ed è stato osservato che il fenotipo basale possa presentare caratteristiche univoche, condivise da tumori diversi, prescindendo dal tessuto in cui si sviluppa la neoplasia.

Identificare la “firma molecolare” di una neoplasia permette di aumentare notevolmente l’accuratezza nel predirne l’outcome ed è auspicabile che l’adozione di questi criteri nella pratica clinica possa convergere verso la programmazione di strategie terapeutiche multidisciplinari, strettamente personalizzate, con un impatto positivo sull’evoluzione del carcinoma mammario <sup>36-43</sup>.

Negli ultimi 40 anni sono stati dimostrati gli ottimi risultati, in termini prognostici, garantiti dall’adozione di un approccio conservativo nel trattamento del cancro della mammella. E un’ulteriore transizione, sulla scorta dell’affermata validità del “trattamento minimo efficace” a fronte di una gestione basata sul “trattamento massimo tollerato”, potrebbe essere fondata proprio sulla caratterizzazione molecolare, fornendo le basi per un nuovo modello paradigmatico: the best bioprofiling for the most effective treatment, ossia l’individuazione di un preciso profilo molecolare, finalizzato alla scelta del trattamento più efficace.



## BIBLIOGRAFIA

1. Buzzoni C., Crocetti E., Ferretti S. Il tumore della mammella in Italia: una sintesi dei dati dei Registri Tumori. *Impact Working Group- ISPO 2013*
2. Paci E., Puliti D. Come cambia l'epidemiologia del tumore della mammella nell'epoca dello screening mammografico. *Impact Working Group- ISPO 2013*
3. Chlebowski R.T. Estrogen plus Progestin and Breast Cancer Incidence and Mortality in postmenopausal women. *Journal of American Medical Association* (2010) **304**:1684-1692
4. Linee guida NEOPLASIE DELLA MAMMELLA Aiom. Classificazione secondo il Sistema TNM (pagg 14-18); Edizioni 2017
5. Rakha E.A. et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Research* (2010) **12**:207
6. Yerushalmi R. et al. Ki-67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncology* (2010) **11**:174-183
7. **Perou C.M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. NATURE** (2000) **406**: 747-752
8. Cianfrocca M. et al. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *The Oncologist* (2004) **9**:606-616
9. Polyak K. Heterogeneity in breast cancer. *The Journal of Clinical Investigation* (2011) **121**:3786-3788
10. Bertos N.R. et al. Breast cancer-one term, many entities? *The Journal of Clinical Investigation* (2011) **121**:3789-3796
11. Malhotra G.K. et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancer. *Cancer Biology and Therapy* (2010) **10**:955-960

12. SØrlie T. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS* (2001) **98**:10869-10874
13. Tang P. et al. Molecular classification of breast carcinomas by immunohistochemical analysis-Are we ready? *Diagnostic Molecular Pathology* (2009) **18**:125-132
14. Cheang M.C.U. et al. Ki67 Index, HER2 status, and prognosis of patients with Luminal b breast cancer. *Journal of the national cancer Institute* (2009) **101**:736-750
15. Goldhirsch A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2013. *Annals of Oncology* (2013) **24**:2206-2223
16. Joerger M. et al. Chemotherapy regimens in early breast cancer: major controversies and future outlook. *Expert review on Anticancer Therapy* (2013) **13**: 165-78
17. Kittaneh M. et al. Molecular profiling for breast cancer: a comprehensive review. *Biomarkers in Cancer* (2013) **5**:61-70
18. Morrow M. Personalizing extent of breast cancer surgery according to molecular subtypes. *The Breast* (2013) **22**:S106-S109
19. Goldhirsch A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2013. *Annals of Oncology* (2013) **24**:2206-2223
20. Harbeck N. et al. Personalized treatment of early-stage breast cancer: present concepts and future directions. *Cancer Treatment Reviews* **36**:584-594

21. Cardoso F, et al. Clinical application of the 70-gene profile: the MINDACT trial. *J Clin Oncol*. 2008; 26:729:735
22. Piper MA, et al. Gene Expression Profiling of Breast Cancer to Select Women for Adjuvant Chemotherapy. Assessment Program. 2008; Volume 22, No. 13
23. Smartt P. A comparison of gene expression profiling tests for breast cancer. Christchurch: Health Services Assessment Collaboration (HSAC). 2010
24. . Cuadros M, Llanos A. [Validation and clinical application of MammaPrint(R) in patients with breast cancer]. *Med Clin (Barc )*. 2011;136:627-32
25. Buyse M, et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2006; 8: 1183-92
26. Bueno-de-Mesquita JM, et al. Use of 70-gene signature to predict prognosis of patients with node-negative breast cancer: a prospective community-based feasibility study (RASTER). *Lancet Oncol*. 2007; 8:1079-87
27. Mook S, et al. Daily clinical practice of fresh tumour tissue freezing and gene expression profiling; logistics pilot study preceding the MINDACT trial. *Eur J Cancer*. 2009; 45: 1201-8
28. . Ishitobi M, et al. Clinical Utility of the 70-gene MammaPrint Profile in a Japanese Population. *Jpn J Clin Oncol* 2010; 40:508-12
29. Kunz G. Use of a genomic test (MammaPrint) in daily clinical practice to assist in risk stratification of young breast cancer patients. *Arch Gynecol Obstet*. 2011;283:597-602

30. Retel VP, et al. Constructive Technology Assessment (CTA) as a tool in coverage with evidence development: the case of the 70-gene prognosis signature for breast cancer diagnostics. *Int .J Technol Assess Health Care*. 2009; 25: 73-83
31. Bueno-de-Mesquita JM, et al. Validation of 70-gene prognosis signature in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.Treat*. 2009; 117: 483-95
32. Knauer M, et al. The predictive value of the 70-gene signature for adjuvant chemotherapy in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 120: 655-61
33. Mook S, et al. The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study. *Breast Cancer Res Treat*. 2009a; 116: 295-302
34. Mook S, et al. The 70-gene prognosis signature predicts early metastasis in breast cancer patients between 55 and 70 years of age. *Ann Oncol*. 2010; 21: 717-722
35. Wittner BS, et al. Analysis of the MammaPrint breast cancer assay in a predominantly postmenopausal cohort. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 2988-93
36. McCart Reed AE et al. Recent advances in breast cancer research impacting clinical diagnostic practice. *J Pathol*. 2018 Nov 14. doi: 10.1002/path.5199
37. Vieira AF, Schmitt F An Update on Breast Cancer Multigene Prognostic Tests-Emergent Clinical Biomarkers.*Front Med (Lausanne)*. 2018 Sep 4;5:248

38. Bhutiani N et al. Multigene Signature Panels and Breast Cancer Therapy: Patterns of Use and Impact on Clinical Decision Making. *J Am Coll Surg.* 2018 Apr;226(4):406-412
39. Hall PS et al. Value of Information Analysis of Multiparameter Tests for Chemotherapy in Early Breast Cancer: The OPTIMA Prelim Trial. *Value Health.* 2017 Dec;20(10):1311-1318
40. Blok EJ et al. Systematic review of the clinical and economic value of gene expression profiles for invasive early breast cancer available in Europe. *Cancer Treat Rev.* 2018 Jan;62:74-90
41. Viale G et al. Immunohistochemical versus molecular (BluePrint and MammaPrint) subtyping of breast carcinoma. Outcome results from the EORTC 10041/BIG 3-04 MINDACT trial. *Breast Cancer Res Treat.* 2018 Jan;167(1):123-131
42. Baitchu Y, Apffelstaedt J. Application of gene profiling in selection of adjuvant therapy in breast cancer in a developing country. *S Afr J Surg.* 2017 Sep;55(3):71-72
43. Sparano JA et al. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2018 Jul 12;379(2):111-121