UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

HER2/NEU E CARCINOMA DELLA MAMMELLA: STUDIO COMPARATIVO DEI RISULTATI UTILIZZANDO DUE PIATTAFORME IMMUNOISTOCHIMICHE DI ULTIMA GENERAZIONE

Relatore: Chiar.ma
Prof.ssa Marina Scarpelli

Tesi di Laurea di:
Marco Domenichelli

Correlatore:
Dott.ssa Donatella Diotallevi

A.A. 2019/2020

A mia sorella Chiara,

ai miei nipoti Martina, Francesco, Levante:

siete la mia felicità.

INDICE

INTRODUZIONE 3

1.**PARTE GENERALE** 5

1.1 ANATOMIA ED ISTOLOGIA DELLA MAMMELLA 5

1.2 CANCRO DELLA MAMMELLA 5

1.2.1 Epidemiologia e fattori di rischio 5

1.2.2 Classificazione istologica WHO 2019 8

1.2.3 Stadiazione TNM 12

1.2.4 Biomarcatori 14

1.2.5 Linee guida ASCO/CAP per la refertazione dei biomarcatori 16

1.2.6 Refertazione immunoistochimica 19

1.3 PRINCIPI DI FISSAZIONE E PROCESSAZIONE 20

1.3.1 La Formalina 21

1.3.2 Fissazione chimica in Immunoistochimica 22

1.4 PRINCIPI GENERALI DI IMMUNOISTOCHIMICA 23

2. **MATERIALI E METODI** 27

2.1 SELEZIONE DEI CASI 27

2.2 PROTOCOLLO DI COLORAZIONE HER2/NEU DAKO AUTOSTAINER 29

2.2.1 Ulteriori informazioni tecniche su DAKO AUTOSTAINER 31

2.3 PROTOCOLLO DI COLORAZIONE HER2/NEU ROCHE VENTANA 31

2.3.1 Ulteriori informazioni tecniche su ROCHE VENTANA 32

2.3.2 Differenze tecniche tra i due immunocoloratori 34

2.4 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI 35

3. **RISULTATI** 36

4. **DISCUSSIONE** 44

5. **CONCLUSIONI** 46

6. **BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA** 47

INTRODUZIONE

Il carcinoma mammario è la neoplasia più diagnosticata nelle donne. Come riportato dai dati AIRTUM, nel nostro paese lo scorso anno sono stati diagnosticati oltre 53.000 casi di tumore della mammella con un trend in leggero aumento rispetto all'anno precedente. Per contro si è registrata, negli anni, una riduzione significativa della mortalità. Attualmente, la sopravvivenza a 5 anni delle donne con carcinoma della mammella è intorno all'87% e a 10 anni dell'80% circa. [3]

Le evidenze scientifiche dimostrano come la diagnosi precoce sia l'azione più efficace nella lotta contro il tumore della mammella e che i migliori risultati si ottengano quando le pazienti vengono inserite in percorsi diagnostico-terapeutici-assistenziali (PDTA) che prevedono un gruppo multidisciplinare di esperti con esperienza specifica in campo senologico [11].

L'Anatomia Patologica ha il compito principale di fornire l'inquadramento diagnostico e molecolare del carcinoma della mammella. La classificazione è basata su quella pubblicata dalla Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) che è stata aggiornata nel 2019 [32]. La classificazione molecolare è parte integrante del processo diagnostico ed è basata sulla definizione su tessuto dello stato dei recettori ormonali (estrogeno e progesterone), dell'attività proliferativa e dello stato di HER2/neu. In base alla espressione di Estrogeni e Progesterone, attività proliferativa e amplificazione di HER2 vengono definiti 4 sottotipi: Luminale A, Luminale B, HER2 amplificato e Tipo Basale con diversa prognosi e con differenti opzioni terapeutiche [9].

HER2 è un recettore tirosin-chinasico con intrinseca attività tirosinchinasica [13]. Numerosi studi hanno evidenziato che la amplificazione o overespressione di *erb*-B2 distrugge i normali meccanismi di controllo cellulare e permette l'insorgenza di cellule tumorali aggressive [31].

HER 2 è amplificato o overespresso nel 15-20% dei carcinomi infiltranti della mammella[14]. Pazienti con carcinomi HER2 amplificati hanno in media sopravvivenze più brevi rispetto alle pazienti senza amplificazione e hanno una maggiore probabilità di metastasi ma, per queste, sono a disposizione farmaci specifici.

La definizione dello stato di HER2 su sezioni istologiche di carcinomi mammari viene effettuata utilizzando un test immunoistochimico che permette di classificare ciascun caso in tre categorie: negativo, positivo o dubbio. Per i casi dubbi è indicata una metodica molecolare di secondo livello. La tecnica di verifica più comunemente usata e riconosciuta

dalle linee guida internazionali è l'Ibridazione in Situ Fluorescente (Fluorescent in Situ Hybridization - FISH) [18].

I risultati dei test immunoistochimici e molecolari su tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina dipendono da diversi fattori: tipo di campione, fase preanalitica di trattamento dello stesso, metodica utilizzata e standardizzazione della refertazione. Tutte queste variabili devono essere prese in carico dal laboratorio che le esegue e i risultati ottenuti devono essere periodicamente sottoposti a controlli di qualità interni ed esterni.

I Tecnici di Laboratorio Biomedico del laboratorio di immunoistochimica dell'Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona devono mantenere gli standard richiesti e riprogrammare le attività periodicamente a seguito, ad esempio, di modificazioni nella disponibilità di kit diagnostici e cambiamenti di piattaforme legati alle procedure di assegnazione delle gare.

A partire dalla fine del 2019 è stata introdotta nel laboratorio dell'Anatomia Patologica una nuova piattaforma immunoistochimica finalizzata principalmente alla determinazione dello stato di HER2/neu.

La tesi si prefigge lo scopo di mettere a confronto i risultati della determinazione dello stato di HER2 in una serie di carcinomi della mammella utilizzando due diverse piattaforme immunoistochimiche.

In particolare, vengono descritte e analizzate le problematiche legate alla standardizzazione delle metodiche, alla selezione dei controlli e alla interpretazione dei risultati.

.

1. PARTE GENERALE

1.1 ANATOMIA E ISTOLOGIA DELLA MAMMELLA

Negli esseri umani, le ghiandole mammarie sono collocate nella parete toracica, più precisamente a livello dei quadranti superiori. Le ghiandole contengono circa sei/dieci sistemi duttali principali: nel dettaglio, è formata da una serie di dotti ramificati che si estendono dal dotto lattifero maggiore ai duttuli terminali (chiamati anche con il termine "acini"), i quali sono raggruppati insieme per formare i lobuli [(1)].
Essi sono rivestiti da due tipi di cellule: le *cellule mioepiteliali* contrattili, le quali contengono miofilamenti, danno vita ad una caratteristica struttura a rete a diretto contatto con la membrana basale [(2)]. La loro funzione è quella di agevolare la fuoriuscita del latte durante la fase di allattamento e fornire sostegno ai lobuli. È possibile visualizzare queste cellule mediante la colorazione immunoistochimica: sono infatti p63 e CK5/6 positive.
Le cellule, a loro volta, sono rivestite dalle cellule *epiteliali luminali*: la loro funzione, a differenza di quelle mioepiteliali, è quella di produrre il latte.

1.2 CANCRO DELLA MAMMELLA

1.2.1 Epidemiologia e fattori di rischio

Secondo i dati AURTUM, il cancro della mammella occupa tra le donne il primo posto in termini di frequenza, rappresentando il 29% di tutte le nuove diagnosi tumorali. Non soltanto è il tumore più frequente, ma è anche il più frequente in ogni classe di età:

- Tra le donne di età inferiore a 49 anni è il 40% di tutti i cancri diagnosticati
- Tra quelle con età compresa tra i 50 e i 69 anni il 35%
- E il 22% tra le donne ultrasettantenni

L'esame dei tassi di incidenza per età mostra come il tumore della mammella sia molto raro nelle prime due decadi di vita con un rischio che si aggira circa a 1/40, ma già dalla terza c'è il rischio di 1/20 e, nelle donne anziane, 1/25, mantenendosi stabile anche nelle età successive [(3)].

Vi sono delle nette differenze circa l'incidenza in rapporto all'area geografica, con livelli maggiori nelle aree centro-settentrionali e inferiori nel meridione. La relativa protezione delle donne residenti nell'Italia Meridionale nei confronti del tumore della mammella è presumibilmente da attribuirsi ad una diversa distribuzione dei fattori di rischio che sono in gran parte legati alla vita riproduttiva.

Tutti quei fattori di rischio, identificati mediante studi epidemiologici, e che giocano un ruolo sostanziale nell'insorgenza del cancro, sono stati uniti nel modello Breast Cancer Assessment Tool (BCRAT): lo scopo di tale è di calcolare il rischio che una donna possa contrarre il tumore nei successivi cinque anni di vita.

Tra questi fattori di rischio si annovera sicuramente **l'età**: al suo aumentare vi è un rischio maggiore di sviluppare una forma di cancro al seno. L'età media al momento della diagnosi è di 61 per le donne bianche, 56 per le ispaniche e 46 per le afroamericane. Questa correlazione potrebbe dipendere sia dai continui stimoli ormonali a cui viene sottoposto l'epitelio mammario, che dalle modificazioni epigenetiche che subisce il DNA, determinando un'alterazione degli oncogeni e degli oncosoppressori.

Altri fattori di rischio sono:

Storia familiare. Avere un parente di primo grado (sorella, mamma o figlia) con un tumore al seno aumenta il rischio di ammalarsi. Se ad avere il tumore al seno sono due o più familiari, il rischio aumenta ancora. Uno studio condotto su 113 mila donne nel Regno Unito ha dimostrato che i familiari di una donna con il tumore al seno, hanno un rischio 1.75 volte superiore di sviluppare il cancro, piuttosto che una donna che non ha familiari ammalati. In alcune famiglie l'aumento del rischio è il risultato di una singola mutazione in un gene ad alta penetranza, come BRCA1 e BRCA2.

Con il termine penetranza si sta ad indicare la percentuale di portatori che sviluppa un carcinoma della mammella: per queste forme varia dal 30 al 90%. Caratteristica di queste lesioni sono la scarsa differenziazione, la struttura midollare (con abbondante infiltrato linfocitario), la non espressione di recettori ormonali e mancata iper-espressione del recettore HER2.

Frequenti sono le mutazioni a carico del gene ATM, del gene PALB2, del gene p53, del gene PTEN e del gene STK11/MSH2.
È importante ricordare che le donne che si ammalano e hanno una storia familiare di tumore al seno sono solo il 15%.

La comparsa precoce del ciclo mestruale. Le donne che hanno avuto il ciclo prima dei 12 anni hanno un rischio lievemente maggiore (20%) di sviluppare il tumore al seno rispetto alla media. Il perché va ricercato in una esposizione prolungata agli estrogeni e al progesterone prodotti dall'organismo femminile [(4)].

La menopausa tardiva. Anche entrare in menopausa dopo i 55 anni sembra aumentare lievemente il rischio di tumore al seno per lo stesso motivo: la prolungata esposizione agli ormoni prodotti dal corpo.

Età del primo parto a termine. Avere una gravidanza a 20 anni, o prima, dimezza il rischio di sviluppare un cancro della mammella rispetto a coloro che sono nullipare o che hanno avuto una gravidanza dopo i 35 anni. Il gruppo SIGO (Società Italiana Ginecologi ed Ostetrici) ha teorizzato che la gravidanza determina una differenziazione terminale delle cellule epiteliali evitando che si possano trasformare in pool di cellule tumorali.
Inoltre, è possibile che il cambiamento dello stroma, il quale determina la crescita dei lobuli, consenta il passaggio da carcinoma in situ ad invasivo.

Densità della mammella. Per "seno denso" alla mammografia si intende un seno che presenta più tessuto ghiandolare e fibroso e meno tessuto grasso. Coloro che hanno un seno particolarmente denso, il rischio di carcinoma mammario è maggiore rispetto alle donne il cui seno ha una densità media.

La radioterapia al torace. Le donne che da bambine o nell'adolescenza sono state sottoposte a radioterapia del torace per un tumore hanno un rischio maggiore di sviluppare il cancro al seno. Questo rischio dipende dall'età in cui è stato eseguito il trattamento. Per esempio, coloro che all'età di 20 anni si sono sottoposte a radioterapia per il linfoma di Hodgkin, hanno un rischio del 20-30% di sviluppare un carcinoma della

mammella.

Esposizione agli estrogeni. Quando la donna viene sottoposta ad una terapia ormonale il rischio che insorga il cancro è di 1.2-1.77 volte superiore.
Le cellule vengono sottoposte a possibili danni del DNA generalmente causati dai metaboliti (cioè i prodotti ultimi) degli estrogeni, generando radicali liberi [4].

Sovrappeso, obesità e sindrome metabolica. Essere in sovrappeso od obese dopo la menopausa, e in particolare presentare obesità addominale (con girovita maggiore di 88 cm), è uno dei principali fattori di rischio per il cancro al seno. Il tessuto adiposo produce estrogeni che possono favorire il tumore al seno.

L'alimentazione. L'incidenza di tumore al seno è più bassa nei paesi in cui si assumono pochi grassi, in particolare quelli saturi. È stata riportata anche una correlazione tra il tumore al seno e carni animali rosse, soprattutto quelle lavorate come i salumi. Le conseguenze che il cibo ad alto contenuto di fito-estrogeni ha sull'insorgenza del carcinoma sono in studio da diversi anni: queste sono sostanze presenti nelle piante che, dal punto di vista chimico, hanno una struttura simile agli estrogeni. Si pensa abbiano un ruolo protettivo nei confronti del tumore.
Inoltre, coloro che assumono caffè sono maggiormente protetti dal tumore della mammella [4].

1.2.2 Classificazione WHO 2019

La classificazione attualmente in uso è la V edizione pubblicata dalla Organizzazione Mondiale della sanità (WHO) nel 2019 [32] e rappresenta l'aggiornamento della precedente classificazione del 2012 (IV edizione).

Tabella 1: Classificazione istologica WHO 2019 del tumore della mammella.

Non invasive lobular neoplasia - … - Lobular carcinoma in situ (classic, florid, Pleomorphic)
Ductal carcinoma in situ (DCIS) - DCIS of low nuclear grade - DCIS of intermediate nuclear grade - DCIS of high nuclear grade - Invasive breast carcinoma - Invasive breast carcinoma of no special type (including medullary pattern, invasive carcinoma with neuroendocrine differentiation, carcinoma with osteoclast-like stromal giant cells, pleomorphic pattern, choriocarcinomatous pattern, melanocytic pattern, oncocytic pattern, lipid-rich pattern, glycogen-rich clear cell pattern, sebaceous pattern) - Microinvasive carcinoma - Invasive lobular carcinoma - Tubular carcinoma - Cribriform carcinoma - Mucinous carcinoma - Mucinous cystadenocarcinoma - Invasive micropapillary carcinoma - Carcinoma with apocrine differentiation - Metaplastic carcinoma (low-grade adenosquamous carcinoma, high-grade adenosquamous carcinoma, fibromatosis-like metaplastic carcinoma, spindle cell carcinoma, squamous cell carcinoma, metaplastic carcinoma with heterologous mesenchymal differentiation, mixed metaplastic carcinomas) - Acinic cell carcinoma - Adenoid cystic carcinoma - Secretory carcinoma - Mucoepidermoid carcinoma - Polymorphous adenocarcinoma - Tall cell carcinoma with reversed polarity
Neuroendocrine neoplasms - Neuroendocrine tumor (Grade1, Grade 2) - Neuroendocrine carcinoma

Papillary neoplasms - … - Papillary ductal carcinoma in situ - Encapsulated papillary carcinoma - Solid papillary carcinoma (in situ and invasive) - Invasive papillary carcinoma
Epithelial-myoepithelial neoplasms - … - Malignant adenomyoepithelioma - Epithelial-myoepithelial carcinoma
Tumors of the male breast - … - In situ carcinoma - Invasive carcinoma

Nell'ambito dei carcinomi infiltranti, come nella precedente edizione, viene mantenuto il concetto che tutti i tumori che non possono essere classificati in una specifica categoria appartengono al grande gruppo dei 'tipi non speciali' o NST (No Special Type).

Questo tipo di carcinoma, in assoluto il più frequente nella pratica clinica (70-80% dei casi), è noto anche come carcinoma duttale infiltrante o carcinoma duttale infiltrante NOS, perché con questo nome era stato identificato nelle precedenti edizioni.

Fra i tipi speciali di carcinoma della mammella quello più frequente in assoluto è il carcinoma lobulare infiltrante.

La definizione dei diversi istotipi è basata fondamentalmente sull'aspetto microscopico che prende in considerazione aspetti architetturali, quali formazione di dotti o di papille o di micropapille, criteri citologici e criteri relativi alla produzione di muco o di stroma. Nelle forme meglio differenziate il carcinoma NST cresce formando dotti che ricordano quelli della mammella normale (per questo motivo era identificato come duttale), mentre il carcinoma lobulare cresce formando file di cellule singole che dissociano lo stroma e si dispongono in maniera concentrica intorno alle strutture preesistenti. Questo tipo particolare di crescita è legato al fatto che la maggior parte dei carcinomi lobulari infiltranti presenta una perdita di E-caderina che può essere evidenziata con una tecnica immunoistochimica. La E-caderina è una molecola di adesione regolata dal calcio espressa nella maggior parte dei tessuti umani. È associata a formazione di ghiandole, stratificazione e polarizzazione epiteliale.

Perdita selettiva di E-caderina può causare dedifferenziazione e invasività nei carcinomi umani [5].

Le immagini seguenti sono esempi tipici di carcinomi duttali e lobulari:

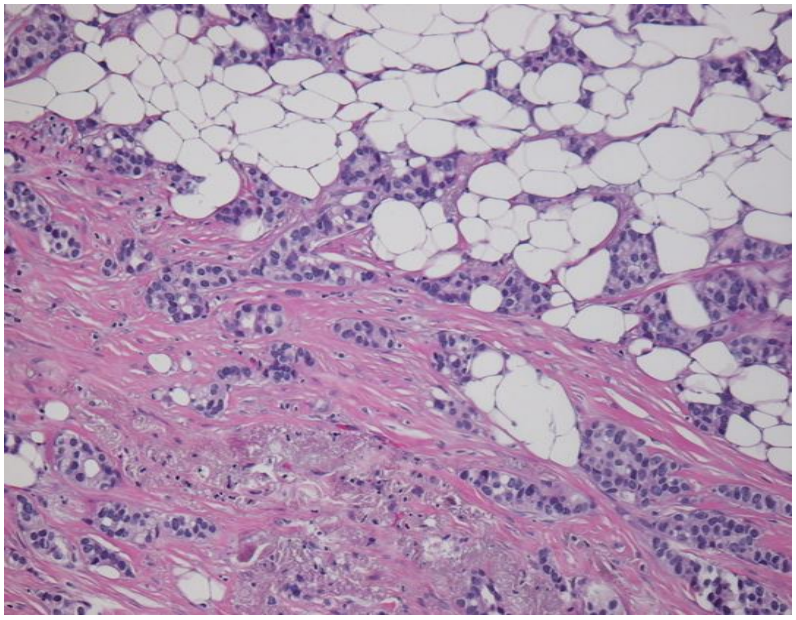


Immagine 1: carcinoma duttale infiltrante. La neoplasia infiltra il tessuto adiposo formando dotti alcuni dei quali dotati di lumi. Ingrandimento 20X.

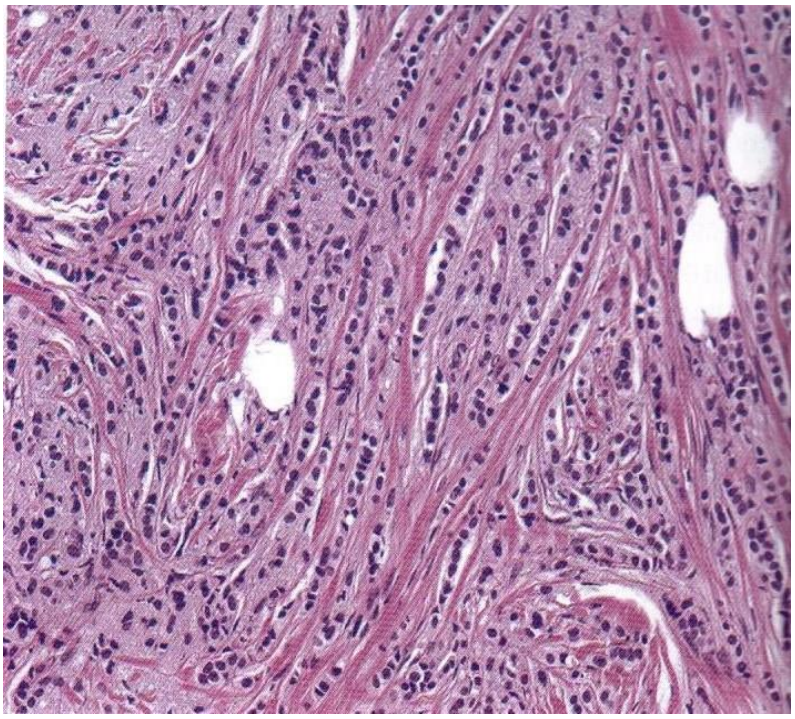


Immagine 2: carcinoma lobulare infiltrante. La neoplasia cresce in modo diffuso. Le cellule hanno nuclei regolari e crescono in modo discoesivo. Ingrandimento 20X.

Una volta che il carcinoma infiltrante è stato classificato, il Patologo deve fornire ulteriori informazioni legate alla morfologia del tumore.
In particolare, per tutti i carcinomi mammari infiltranti, è prevista l'attribuzione di un grado (grading). Il sistema per il 'grading' dei tumori della mammella è noto come 'Sistema di Nottingham' o di 'Elston-Ellis' ed è basato sulla valutazione di tre variabili: formazione di tubuli, estensione del pleiomorfismo o atipia nucleare e conta delle mitosi per 10 campi a forte ingrandimento. Ad ogni variabile viene attribuito un punteggio che va da 1 a 3 e i valori ottenuti vengono sommati per produrre il grado finale [(6)].
Il referto anatomo patologico deve essere ulteriormente completato con la refertazione dei biomarcatori e con la stadiazione patologica secondo le linee guida internazionali.

1.2.3 La stadiazione TNM

La stadiazione patologica è parte integrante del referto anatomopatologico di tutti i carcinomi ed in particolare del carcinoma della mammella. La stadiazione TNM prende in considerazione le caratteristiche del tumore (T), dei linfonodi (L) e delle metastasi (M). Il più recente aggiornamento è del 2018 [(7)].
Per una accurata stadiazione patologica del parametro T è necessaria la misurazione macroscopica delle dimensioni del tumore, che viene di solito effettuata sul campione fissato. Devono essere inoltre riportate l'eventuale infiltrazione della cute e della parete toracica. I carcinomi infiltranti sono inseriti nelle categorie da T1 a T4.

Tabella 2: Stadiazione della neoplasia in base al parametro T.

T Category	*T Criteria*
TX	Primary tumor cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumor
Tis(DCIS)*	Ductal carcinoma *in situ*
Tis(Paget)	Paget disease of the nipple NOT associated with invasive carcinoma and/or carcinoma *in situ* (DCIS) in the underlying breast parenchyma. Carcinomas in the breast parenchyma associated with Paget disease are categorized based on the size and characteristics of the parenchymal disease, although the presence of Paget disease should still be noted.
T1	Tumor ≤ 20 mm in greatest dimension
T1mi	Tumor ≤ 1 mm in greatest dimension
T1a	Tumor > 1 mm but ≤ 5 mm in greatest dimension (round any measurement >1.0–1.9 mm to 2 mm).
T1b	Tumor > 5 mm but ≤ 10 mm in greatest dimension
T1c	Tumor > 10 mm but ≤ 20 mm in greatest dimension
T2	Tumor > 20 mm but ≤ 50 mm in greatest dimension
T3	Tumor > 50 mm in greatest dimension
T4	Tumor of any size with direct extension to the chest wall and/or to the skin (ulceration or macroscopic nodules); invasion of the dermis alone does not qualify as T4
T4a	Extension to the chest wall; invasion or adherence to pectoralis muscle in the absence of invasion of chest wall structures does not qualify as T4
T4b	Ulceration and/or ipsilateral macroscopic satellite nodules and/or edema (including peau d'orange) of the skin that does not meet the criteria for inflammatory carcinoma
T4c	Both T4a and T4b are present
T4d	Inflammatory carcinoma (see "Rules for Classification")

Il parametro N indica lo stato dei linfonodi. Nella maggior parte dei carcinomi della mammella diagnosticati in fase precoce viene effettuata la biopsia del linfonodo sentinella mentre lo svuotamento del cavo ascellare è riservato ai carcinomi avanzati e ai casi in cui il linfonodo sentinella sia risultato positivo. Il linfonodo sentinella è il primo linfonodo, identificabile con radiotracciante, che drena la linfa proveniente dal tumore. Può trattarsi di un solo linfonodo o di un gruppo di linfonodi.

Tabella 3: stadiazione della neoplasia in base al parametro M

M Category	*M Criteria*
cM0	No clinical or radiographic evidence of distant metastases*
cM0(i+)	No clinical or radiographic evidence of distant metastases in the presence of tumor cells or deposits no larger than 0.2 mm detected microscopically or by molecular techniques in circulating blood, bone marrow, or other nonregional nodal tissue in a patient without symptoms or signs of metastases
cM1	Distant metastases detected by clinical and radiographic means
pM1	Any histologically proven metastases in distant organs; or if in non-regional nodes, metastases greater than 0.2 mm

Il parametro M indica la presenza di metastasi a distanza e viene inserito nella stadiazione patologica solo quando, al momento dell'intervento viene inviato tessuto da una sospetta metastasi, e la presenza della stessa può essere valutata istologicamente.

1.2.4 Biomarcatori

Il carcinoma della mammella è una malattia eterogenea. Lo studio immunoistochimico di alcuni biomarcatori ha evidenziato che differenti sottotipi biologici sono associati con variazioni nella risposta al trattamento e nella sopravvivenza.

Attualmente la refertazione del carcinoma della mammella prevede lo studio della espressione di Estrogeno, Progesterone e HER2. Viene inoltre valutata l'attività proliferativa (Ki-67).

Studi molecolari utilizzando tecniche di profilo di espressione genica hanno evidenziato ormai da tempo che il carcinoma della mammella può essere sub-classificato come *luminale* positivo per estrogeno (Luminal A e B), *HER2 arricchito* (HER2 Enriched) e di *tipo basale* (basal-like) [(8)].

Diversi gruppi internazionali hanno, negli anni, fornito linee guida e raccomandazioni a supporto dell'uso dell'analisi molecolare per la stratificazione del rischio e per il trattamento. Queste tecniche sono tuttavia difficili da applicare, non a disposizione di tutti i laboratori e, spesso, richiedono materiale fresco e non fissato in formalina ed incluso in paraffina. L'uso di tecniche immunoistochimiche rappresenta un compromesso accettato per creare sottotipi corrispondenti alla classificazione molecolare con prognosi e risposta alla terapia comparabili [(30)].

Nel 2011, la St Gallen International Breast Conference ha suggerito una definizione 'surrogata' dei sottotipi molecolari. La tabella riporta la classificazione originariamente proposta [(9)].

Tabella 4: definizione surrogata dei sottotipi molecolari intrinseci del carcinoma della mammella.

Intrinsic Subtype	**Clinico-pathologic definition**
Luminal A	***Luminal A*** ER and/or PgR positive HER2 negative Ki-67 low
Luminal B	- ***Luminal B (HER2 negative)*** ER and/or PgR positive HER2 negative Ki-67 high - ***Luminal B (HER2 positive)*** ER and/or PgR positive HER2 overexpressed or amplified Any Ki-67
Erb-B2 overexpression	***HER2 positive (non luminal)*** HER2 overexpressed or amplified ER and PgR absent
Basal-like	***Triple negative (ductal)*** ER and PgR absent HER2 negative

Le cellule epiteliali della mammella normale hanno recettori per gli estrogeni ed il progesterone. La maggior parte dei carcinomi della mammella conserva questi recettori e prolifera sotto la loro influenza. La rimozione degli ormoni endogeni, ottenuta attraverso la ooforectomia o il blocco farmacologico dell'azione degli ormoni, può rallentare o prevenire la crescita del tumore e prolungare la sopravvivenza.

Pertanto, la positività per i recettori è un importante fattore predittivo della risposta alla terapia ormonale [(1)]: si stima che la responsività sia maggiore quando la neoplasia è positiva per entrambi i recettori e che sia del 40% circa quando è presente solo un tipo di recettore.

Circa il 75-80% dei carcinomi della mammella è positivo al test immunoistochimico per estrogeni e progesterone. In particolare, i carcinomi ben differenziati o moderatamente differenziati NST e gran parte dei carcinomi lobulari e altri tipi speciali sono positivi nella quasi totalità dei casi.

Un sottogruppo di carcinomi della mammella (15-20%) mostra over-espressione immunoistochimica di HER2. La over-espressione è in genere dovuta alla amplificazione e solo in una piccola percentuale di casi ad altri meccanismi. La over-espressione rappresenta un fattore prognostico e predittivo. Da un punto di vista clinico lo stato di HER2 è valutato per determinare l'eligibilità della paziente alla terapia anti-HER2.

Nel 2019 il CAP [10] ha pubblicato il template per la refertazione dei biomarcatori nel carcinoma della mammella fornendo alcune indicazioni relative alle tecniche utilizzate. In particolare, viene richiesto di indicare il tempo di ischemia fredda (cioè il tempo intercorso fra la rimozione del campione e l'inizio della fissazione) ed il tempo di fissazione. Altre variabili importanti di cui il laboratorio deve tenere traccia sono eventuali trattamenti che possono alterare la immunoreattività (ad esempio la decalcificazione), lo stato dei controlli interni ed esterni, l'adeguatezza del campione per la valutazione, il clone anticorpale ed il metodo utilizzato dal laboratorio.

1.2.5 Linee guida ASCO/CAP per la refertazione dei biomarcatori

Le linee guida aggiornate per la refertazione sono state pubblicate dal College American Pathologists [10] e sono riportate di seguito.

- **Estrogeno e Progesterone**

Le linee guida raccomandano di classificare come postivi tutti i casi con almeno 1% di nuclei positivi.

Tabella 3: criteri per la classificazione dei nuclei positivi agli Estrogeni e Progesterone

Result	**Criteria**	**Notes**
Positive	Immunoreactive tumor cells present (≥1%)	The percentage of immunoreactive cells may be determined by visual estimation or quantitation. Quantification can be provided by reporting the percentage of positive cells or by a scoring system, such as the Alfred score or H score.

Negative	<1% immunoreactive tumor cells	

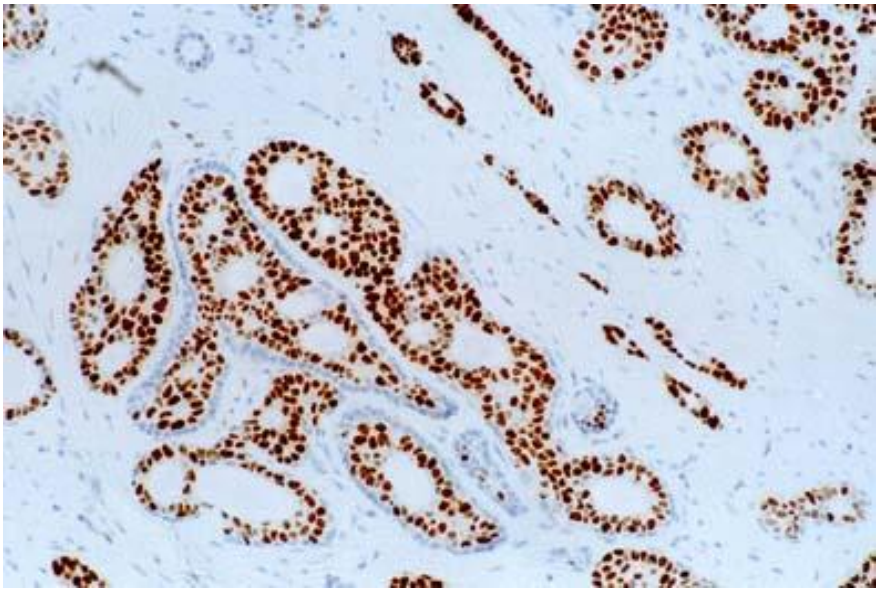


Immagine 3: positività per Estrogeno nella maggior parte dei nuclei

- **Ki-67**

È un *Antigene di proliferazione nucleare* che viene espresso dalle cellule neoplastiche quando si trovano in fase G1-S-G2-M e che viene ricercato con l'anticorpo Mib-1. Tumori positivi per i recettori per gli estrogeni ed il progesterone e con elevata attività proliferativa vengono classificati come Luminali B. Le linee guida AIOM 2015 consigliano di considerare ad alto o basso potere proliferativo, tumori che esprimono il recettore con una percentuale di 10-14% [(11)]. Le linee guida ASCO/CAP riconoscono che la percentuale di cellule Ki-67 è spesso usata per stratificare le pazienti in gruppi prognostici ma che vi è una mancanza di consenso sul sistema di valutazione, sulla definizione di 'bassa' e 'alta' espressione, sul valore di "cut-off", su quale parte del tumore dovrebbe essere valutata.

- **HER2/neu**

Con la sigla HER2/neu è identificato il protooncogene 2 per il fattore di crescita epidermico umano, che codifica per la proteina EGFR2, localizzato nel braccio lungo del cromosoma 17. L'oncogene neu se clonato da DNA genomico, viene riferito come c-erB-2 [(12)].

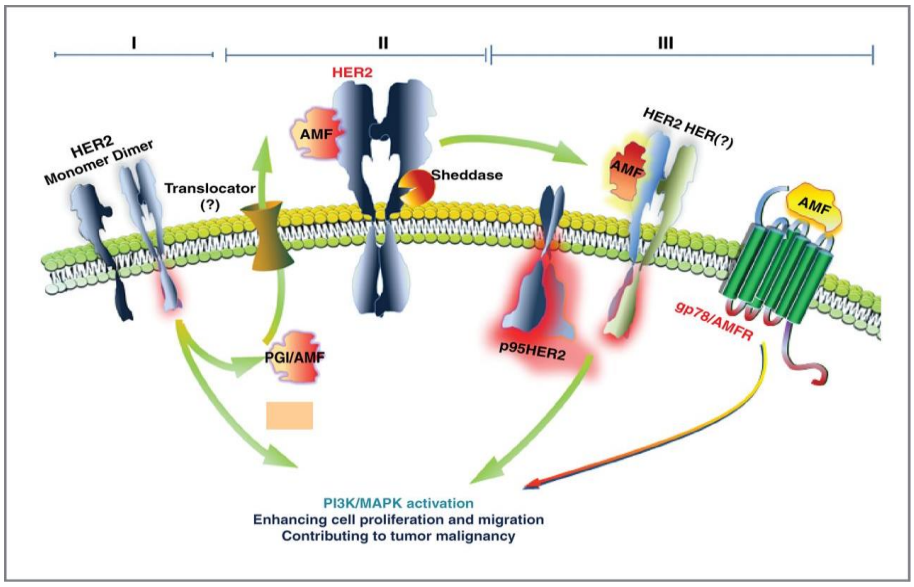
Correlato, anche se in forma diversa, all'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), l'HER2/neu si localizza esternamente la cellula (faccia esterna) in quanto fisiologicamente coinvolta nella trasduzione del segnale, necessario per garantire la differenziazione e la crescita delle cellule.

Sono recettori tirosin-chinasici che presentano una conformazione strutturale simile ad altri recettori, come l'HER3 el'HER4: un dominio extracellulare (ECD) per legare il ligando, una corta regione idrofobica transmembrana (TM) ed un dominio citoplasmatico con attività catalitica (ICD) [13].

Il recettore viene anche considerato "orfano", in quanto non può essere attivato da nessuna molecola facente parte dei ligandi EGF: non è quindi vincolato dalla relazione esistente tra ligando e recettore ed è costituzionalmente "attivo", cioè pronto a relazionarsi con altri recettori della famiglia HER. Questa sua proprietà è dovuta alla sua conformazione sterica, molto simile a quando si lega il ligando.

Una grande proprietà della molecola è quella di formare dei dimeri con altre strutture molecolari determinando la formazione di siti idonei ad accogliere i ligandi: la regione intracellulare viene transfosforilata, attivando quindi una serie di cascate intracellulari che portano alla proliferazione, trascrizione, diminuzione dell'apoptosi e la stimolazione dell'angiogenesi.

Immagine 4: rappresentazione schematica del recettore HER2/neu e dei legami con gli altri recettori della stessa famiglia.



La percentuale di neoplasie mammarie che iperesprimono questo recettore si aggira intorno al 20-25% e istologicamente si presentano come carcinomi poco differenziati, con elevato indice proliferativo, positività per i linfonodi ascellari e scarsa espressione dei recettori ormonali.

I cloni neoplastici che manifestano una iperespressione del recettore sono costantemente stimolati a proliferare anche in assenza del ligando.
Il partener di legame prediletto di HER2 sono i recettori della medesima famiglia (eterodimeri) però, quando c'è iperespressione di HER2, esso può creare anche degli omodimeri, che porteranno alla formazione di un recettore attivo.
Nel 90% delle volte, l'iper-espressione del recettore dipende proprio dall'amplificazione del gene HER2/neu. Nel restante 10% risponde ad un aumento della trascrizione. [13, 14, 15]

1.2.6 Refertazione immunoistochimica

Le linee guida ASCO/CAP raccomandano la valutazione di HER2 su tutti i carcinomi infiltranti e anche sulle eventuali metastasi sincrone o metacrone [16, 17].

La seguente tabella riporta le linee guida per la refertazione immunoistochimica.

Risultati	**Criteri**
Negativo (0)	Non si osserva colorazione o è tenue/a malapena percettibile in all'incirca ≤10% delle cellule tumorali.
Negativo (1+)	Colorazione della membrana incompleta che è a malapena percettibile in circa >10% delle cellule tumorali
Equivoco (2+)	Da debole a moderata colorazione completa della membrana in >10% delle cellule tumorali oppure colorazione circonferenziale della membrana intensa ma in ≤10% delle cellule tumorali
Positivo (3+)	Colorazione circonferenziale della membrana che è completa e in >10% delle cellule tumorali.

Per i casi equivoci (2+) è indicata la verifica della effettiva amplificazione con tecnica molecolare [18]. Presso l'Anatomia Patologica di Ancona viene utilizzata la tecnica FISH (*Fluorescence in Situ Hybridization*).

La corretta esecuzione del test immunoistochimico e la valutazione riproducibile dei risultati sono essenziali per la pianificazione della terapia, ma nella pratica quotidiana possono presentarsi diversi problemi che devono essere presi in carico dal laboratorio.

Un primo problema, che riguarda l'interpretazione dei risultati, è rappresentato dalla eterogeneità della neoplasia cioè dalla coesistenza di sottopopolazioni multiple di cellule neoplastiche con profili di amplificazione distinti.

Problemi più specificatamente tecnici possono causare falsi positivi o falsi negativi.

Fra le cause più comuni di *falsi positivi* vi sono: colorazione più intensa alla periferia del campione di solito evidenti nelle 'core biopsy'; colorazione aspecifica del citoplasma che oscura la positività di membrana, eccesso di colorazione che è evidente anche nelle cellule normali.

Fra le cause più comuni di *falsi negativi* vi sono: periodo troppo lungo della ischemia a freddo, eterogeneità del campione (particolarmente problematica quando si hanno piccole biopsie), malfunzionamento dell'anticorpo e/o della piattaforma.

Inoltre, problematiche relative alle modalità di fissazione possono causare difficoltà nell'interpretazione dei risultati per tutti i biomarcatori.

Nei paragrafi seguenti vengono riportati i principi della fissazione e le principali problematiche correlate a questo processo.

1.3 PRINCIPI DI FISSAZIONE E PROCESSAZIONE

Successivamente al prelievo, il campione biologico subisce delle alterazioni degenerative (e.g. *l'autolisi*) con conseguente trasformazione e distruzione. Questo è dovuto alla rottura delle membrane lisosomiali, fenomeno che si verifica successivamente la morte cellulare, cui segue la fuoriuscita di enzimi autolitici responsabili della "digestione" di alcune componenti cellulari [19].

Da qui l'importanza di procedere alla fissazione del tessuto nel giro di poco tempo dal momento in cui è avvenuta l'asportazione dello stesso: l'obiettivo è quello di preservare l'identità strutturale del campione, avvalendosi dell'impiego di sostanze chimiche, in grado

di denaturare le proteine in modo da escludere la lisi enzimatica. Ma il suo compito non finisce qui: infatti la fissazione previene l'attacco del tessuto da parte di muffe e batteri, rendendolo anche più duro, ideale per la successiva processazione e taglio [11].

Affinché si possa ottenere una buona fissazione è necessario che il prelievo venga posto all'interno di contenitori abbastanza grandi e in agitazione continua, oltre che il liquido fissativo penetri dall'esterno verso l'interno e che sia presente in rapporto 20:1.
Fra i fattori che influenzano la fissazione va ricordato lo spessore, che non dovrebbe mai superare 1-2 cm per ovviare a problemi di disomogeneità per scarsa penetrazione.
Ma bisogna considerare anche la temperatura, che deve essere attorno ai 4 °C e mai più bassa, poiché si formerebbero cristalli di ghiaccio creando artefatti.
Infine il pH e la pressione osmotica: i liquidi fissativi si caratterizzano per la capacità di abbassare il pH, pertanto è necessario avvalersi dell'impiego di soluzione tampone affinché la quantità di ioni idrogeno sia costante [19].

I fissativi ad oggi impiegati nei Laboratori di Anatomia Patologica, sono in grado di bloccare i legami idrofili, eludendo completamente l'acqua dal legame con le medesime proteine, per far sì che si verifichi il fenomeno della coagulazione proteica.
D'altro canto, altri liquidi fissativi sono in grado di originare una sorta di gelificazione, stabilizzando le proteine mediante dei ponti: è il caso della formalina che determina la formazione di legami crociati.

1.3.1 Formalina

La formalina è costituita chimicamente dalla aldeide formica, un gas, sciolta in acqua al 37-40%. Routinariamente si impiega formalina ulteriormente diluita al 10%, quindi la concentrazione del gas alla fine è del 4% [19].

È importante enfatizzare che l'azione fissativa della formalina si esplica mediante la formazione di *legami crociati* che si istaurano tra alcuni amminoacidi, come la lisina e la glutammina. Più dettagliatamente, la formalina reagisce con qualsiasi atomo di idrogeno libero, con successiva sintesi di una molecola di acqua.

La sua attività viene influenzata anche dal pH della soluzione.

Infatti a pH acido la formalina è in grado di formare complessi anche con la tirosina, nonché ponti metilenici con la cisteina, tramite reazione con i gruppi sulfidrilici.

Col tempo la formaldeide dà luogo a polimeri di paraformaldeide o triossimetilene che formano depositi di precipitato bianco che devono essere eliminati.

La formalina viene inoltre ossidata dall'ossigeno atmosferico ad acido formico, che acidifica fortemente la soluzione: occorre neutralizzarla con carbonato di calcio o con un sistema tampone per una buona riuscita dei preparati.

La formalina rappresenta un problema sia per la biologia molecolare, in quanto è in grado di legare le regioni ricche di Adenina e Timina (oltre che l'RNA), sia per l'immunoistochimica.

1.3.2 Fissazione chimica in Immunoistochimica

Un'appropriata fissazione dell'antigene è uno degli aspetti più critici dell'immunoistochimica: possono essere "localizzati" solamente quegli epitopi che sono riconoscibili dall'anticorpo.

Altro scopo della fissazione è garantire la preservazione della morfologia e dei tessuti evitando la degenerazione degli antigeni, così come la perdita della loro posizione originaria [(20)].

Si potrebbe dunque affermare che il fissativo ideale è quello in grado di rispettare le dimensioni, la struttura, la localizzazione e le proprietà chimico-fisiche dell'antigene da ricercare. In particolare, la formalina, agendo lentamente e formando legami crociati, è idonea per piccoli antigeni, come i recettori per gli ormoni [(21)].

Proprio per questa sua capacità di formare ponti metilenici, le sezioni, prima di essere sottoposte alla colorazione, devono subire un processo di smascheramento.

Spostando l'attenzione sulle problematiche derivanti da un'inadeguata fissazione, si deve porre enfasi circa la possibilità che l'antigene stesso diffonda dal sito di sintesi nel tessuto circostante o scompaia del tutto [(19)].

È, inoltre, necessario prendere in considerazione le problematiche derivanti da una ipofissazione o iperfissazione del tessuto in esame.

Nel primo caso l'antigene viene conservato, ma potrebbe essere intaccata la morfologia con difficoltà nell'interpretazione. Viceversa, uno degli effetti della iperfissazione è la sintesi di un eccesso di legami aldeidici che può mascherare l'antigene ed escludere il legame dell'anticorpo.

In accordo con le linee guida ASCO/CAP, i campioni di mammella devono essere immersi in formalina per un minimo di sei ore, affinché i recettori ormonali, nonché Ki-67 ed HER2/neu, vengano valutati correttamente [21, 22].

Infatti, la sensibilità e l'accuratezza, così come la riproducibilità e l'affidabilità della determinazione degli antigeni sopracitati, dipendono fortemente da fattori pre-analitici, come testimoniato dalla fissazione, e da fattori analitici, come la scelta dell'anticorpo: un'inadeguata fissazione è correlata a falsi negativi dei recettori ormonali e una carenza di riproducibilità di HER2.

Apple et al, hanno studiato l'espressione di HER-2/neu quando il tessuto viene fissato solo per un'ora: il risultato è stato che nelle sezioni vi era una ridotta espressione del recettore. Gli altri campioni che invece avevano subito una fissazione superiore alle sei ore, non mostravano una differenza sostanziale rispetto al controllo [23].
Per contro*, Leung Chu Tong et al* hanno osservato che tempi di fissazione prolungati potrebbero causare la degradazione proteolitica degli antigeni, determinando così una riduzione dell'immunoreattività [24].

Concludendo è possibile affermare che la mancanza di una standardizzazione e di una normativa che possa regolamentare la fissazione, è causa di variabilità interlaboratorio nei vari test immunoistochimici che vengono condotti.

Si suggerisce di non superare 10 giorni a seguito dell'accettazione del campione in quanto, in questo arco di tempo, le variazioni non sono significative [11].

1.4 PRINCIPI GENERALI DI IMMUNOISTOCHIMICA

Con il termine immunoistochimica si fa riferimento ad una tecnica di laboratorio, altamente complessa e specifica, che si basa sul legame tra l'antigene e l'anticorpo e che viene applicata sia alla microscopia ottica, elettronica, che fluorescente [25, 26].

Più nel dettaglio, è una colorazione ad unico modello di reazione che si sviluppa schematicamente in due momenti:

- il primo in cui avviene il *riconoscimento*, nonché il legame, tra l'epitopo antigenico e l'anticorpo specifico consentendo non solo di verificare la presenza della molecola di interesse, ma anche di poterla localizzare; tra le due molecole vi deve essere estrema affinità ed avidità.
- il secondo riguarda la *visualizzazione* dell'avvenuto legame mediante opportune molecole visualizzatrici (e.g. fluorocromi, enzimi, oro colloidale).

Ad oggi, i campi di applicazione delle tecniche immunoistochimiche sono molto vasti: essa viene impiegata come mezzo diagnostico (per lesioni di difficile interpretazione diagnostica, per differenziare un tumore primitivo da uno metastatico, per verificare se è un cancro epiteliale, connettivale, germinale, infine per determinare l'immunofenotipo in oncoematologia), come mezzo prognostico (attraverso cui comprendere la risposta del tumore alla terapia, specialmente nelle lesioni ormono-dipendenti), infine come mezzo terapeutico (se viene verificata l'espressione di particolari proteine, il paziente può accedere o meno a talune terapie; è il caso dell'amplificazione del proto-oncogene HER2/neu) [19].

I protocolli di colorazione in immunoistochimica sono simili, indipendentemente dal sistema di visualizzazione che si impiega.

Per il fine di questo tratto, si è deciso di valutare esclusivamente i vari passaggi che caratterizzano ***l'immunoenzimatica indiretta***.

Anzitutto si procede a bloccare i siti che potrebbero legarsi aspecificatamente all'anticorpo primario: per ovviare a questo problema, si aggiunge siero non immune prodotto a partire dal medesimo animale da cui è stato sintetizzato l'anticorpo secondario, affinché possano essere limitati i casi di falsa positività. In alternativa, si possono impiegare anche: BSA, gelatina, polvere di latte non grasso od ovoalbumina [27].

Devono essere inibite anche le perossidasi endogene (presenti solo su alcuni tessuti) mediante l'aggiunta di un eccesso di perossido d'idrogeno al 3% (una quantità cento volte superiore rispetto a quella impiegata per la reazione): infatti esso modifica irreversibilmente la struttura terziaria degli enzimi [19].

La fissazione e la successiva fase di inclusione in paraffina possono mascherare gli antigeni dei tessuti, rendendo impossibile la sua localizzazione da parte dell'anticorpo primario. Molti consigliano di impiegare sezioni criostatiche, a discapito però di un buon dettaglio cellulare e buone possibilità interpretative.

Per tale ragione, si procede ad uno smascheramento antigenico ("antigen retrieval") che avviene a temperature di 90/95°C e in tampone ad alto o basso pH.

A questo punto, viene dispensato l'anticorpo primario monoclonale (in grado cioè di riconoscere un solo ed unico epitopo), il quale funge da ponte.

Di per sé, l'immunocomplesso formatosi non può essere rivelato. Risulta quindi indispensabile aggiungere un anticorpo secondario, prodotto immunizzando un animale diverso rispetto a quello in cui è stato sintetizzato l'anticorpo primario, il quale è poi marcato con una HRP (perossidasi di rafano). È proprio l'enzima che interagisce direttamente con il substrato, rappresentato dall'acqua ossigenata, e la DAB (cromogeno): a contatto con l'HRP, il perossido di idrogeno si riduce ad acqua e ossigeno, il quale reagisce con la Diaminobenzidina determinandone l'ossidazione.

Il risultato finale sarà la formazione di un preparato insolubile, colorato in bruno, che precipita nel sito dove è presente l'antigene di interesse, secondo la reazione di seguito riportata:

POD + H_2O_2 + Cromogeno → reazione enzimatica → **precipitato colorato** + POD + H_2O

Possono essere impiegati anche l'AEC (marrone-rosso) e il cloro naftolo (blu-nero).

Il preparato viene poi sottoposto a controcolorazione con ematossilina e successiva disidratazione in alcol crescenti e chiarificazione in xilolo, infine montato [19].

Di seguito, una serie di foto dei diversi macchinari che si impiegano di routine nel laboratorio di Anatomia Patologica di Ancona che si avvalgono della metodica sopra descritta:

Immagine 5: immunocolatore della ditta DAKO OMNIS, completamente automatizzato.

Nella routine immunoistochimica nel Laboratorio di Anatomia Patologica di Ancona, in questo strumento vengono ricercati la maggior parte degli antigeni. Esso è in grado di poter smascherare sia ad alto che a basso pH, oltre che poter lavorare in completa autonomia e continuare la colorazione quando si caricano nuovi campioni.

Immagine 6: immunocolatore Autostainer Link 48. Esso è in grado di portare a termine solo le ultime fasi della colorazione immunoistochimica, quindi di bloccare le perossidasi endogene, dispensare l'anticorpo e la DAB. Lo smascheramento antigenico e la sparaffinatura avvengono nei PT LINK di cui è dotato, o nel bagnetto termostatato nel caso di HER-2/neu.

Immagine 7: piattaforma immunoistochimica Ventana della ditta Roche.

2. MATERIALI E METODI

2.1 SELEZIONE DEI CASI

Sono stati utilizzati 30 campioni, scelti casualmente tra quelli giunti in laboratorio, di carcinoma infiltrante della mammella asportati da pazienti di età compresa tra 36 e 91 anni, nel periodo compreso fra dicembre 2019 e gennaio 2020. I casi provenivano in parte dalla Chirurgia Senologica di Ancona ed in parte da altre Chirurgie esterne all'Azienda Ospedali Riuniti.

La tabella 5 riporta la tipologia dei campioni, la diagnosi ed il grado istologico.

Tabella 5

N Caso	Età	Campione	Diagnosi	Grado
1	36	Mastectomia	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	3
2	36	Mastectomia	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	3
3	56	Quadrantectomia	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	2
4	59	Quadrantectomia	Lobulare	2
5	60	Quadrantectomia	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	1
6	65	Quadrantectomia	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	2
7	74	Nodulectomia	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	2
8	77	Quadrantectomia	Mucinoso	1
9	49	Quadrantectomia	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	2
10	43	Quadrantectomia	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	3
11	64	Quadrantectomia	Metaplastico con componente NST	2
12	46	Quadrantectomia	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	1
13	58	Quadrantectomia	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	1
14	55	Vacuum assisted biopsy	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	2
15	86	Quadrantectomia	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	2
16	51	Quadrantectomia	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	2
17	74	Quadrantectomia	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	3
18	65	Quadrantectomia	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	3
19	76	Core biopsy	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	3
20	50	Core biopsy	Lobulare	2
21	74	Quadrantectomia	Lobulare	2
22	48	Quadrantectomia	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	2
23	46	Core biopsy	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	1
24	50	Core biopsy	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	2
25	63	Quadrantectomia	Lobulare	2
26	84	Quadrantectomia	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	1
27	91	Quadrantectomia	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	1
28	51	Quadrantectomia	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	1
29	80	Mastectomia	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	2
30	61	Core biopsy	Carcinoma duttale infiltrante (NST)	3

La diagnosi ed il grado sono stati assegnati utilizzando i preparati istologici colorati con Ematossilina-Eosina.

Nell'80% dei casi (24) si trattava di carcinoma duttale infiltrante (NST), nel 13% (4) di carcinoma lobulare infiltrante, nel 3% (1) di carcinoma mucinoso e nel restante 3% (1) di carcinoma metaplastico con componente NST.

Nell'analisi sono stati compresi sia frammenti ridotti a partire da pezzi operatori ottenuti a seguito di mastectomie, quadrantectomie e nodulectomie, sia biopsie (VAB, Core Biopsy).

I campioni sono stati fissati in formalina per 24-48 ore e successivamente processati, sezionati e colorati secondo i protocolli standard del laboratorio per la diagnosi istologica.

Il Patologo ha provveduto a selezionare i blocchi da sottoporre alla colorazione immunoistochimica per HER2.

Da ciascun blocco sono state ottenute due sezioni che sono state processate indipendentemente utilizzando due piattaforme commercialmente disponibili e approvate per la valutazione dell'espressione di HER2/neu: **l'*Autostainer Link 48*** della ditta Agilent-DAKO e ***Ventana Benchmark*** della ditta ROCHE.

Sono state inoltre tagliate sezioni aggiuntive da utilizzare per esame FISH nel caso il risultato fosse dubbio.

Lo strumento *Autostainer Link 48* è stato utilizzato routinariamente dal Laboratorio per più di 10 anni mentre lo strumento *Ventana Benchmark* è stato introdotto nel dicembre 2019. Per lo strumento Autostainer le sezioni sono state raccolte in vetrini usati per la normale routine immunoistochimica, mentre per lo strumento Ventana è stato necessario impiegarne altri forniti dalla ditta TOMO: questi ultimi, a differenza dei primi citati, non sono trattati con adesivi chimici o con rivestimenti. Posseggono una carica positiva permanente a capacità legante con sezioni di tessuto fresco ed hanno bordi smerigliati a 90°. Inoltre, sono state tagliate sezioni per la FISH, da impiegare qualora il risultato fosse incerto.

I dettagli dei protocolli adoperati dai due immuno-coloratori sono decritti nei paragrafi seguenti.

2.2 PROTOCOLLO DI COLORAZIONE HER2/neu DAKO AUTOSTAINER

Sezioni dello spessore di 4 micron sono state tagliate e fatte asciugare in stufa a 57°C. La piattaforma utilizza il kit HERCEPTEST ® (DAKO Corporation, Glostrup, Denmark, and Carpinteria, California, USA) che prevede diversi passaggi, realizzati in parte manualmente dal tecnico di laboratorio [28].

Per prima cosa si deve procedere alla 'sparaffinatura' utilizzando Xilolo e alcool a concentrazioni decrescenti.

Segue lo smascheramento, che avviene in un bagno termostatato contenente *l'ENVISION™ EPITOPE RETRIEVAL SOLUTION*, composto da tampone citrato 0.1 mol/litro e un detergente (pH 6,0). Per garantire un corretto smascheramento dell'epitopo, ci si avvale anche delle alte temperature (95°C per 40'). Successivamente le sezioni vengono lasciate

raffreddare a temperatura ambiente per 20' e lavate in tampone Tris-buffer Saline/Tween (pH 7,6).

Vengono successivamente spostate nell'Autostainer, dove avviene la colorazione.

Lo strumento distribuisce su tutto il vetrino *l'ENVISION™ PEROXIDASE-BLOCKING REAGENT*, ovvero perossido d'idrogeno 3% addizionato di sodio azide 15 mmol/L. Una quantità così elevata di acqua ossigenata è in grado di inibire le perossidasi endogene del tessuto che altrimenti interferirebbero con la reazione. L'incubazione dura 5'. Viene poi dispensato l'anticorpo policlonale (primario) di coniglio, specifico per la proteina HER2/neu (Clone A0485), ed è incubato per 30'.

Si impiega il tampone *ENVISION™ FLEX WASH BUFFER 20X* per eliminare l'eccesso di anticorpo che non si è legato.

Affinché l'immunocomplesso formatosi possa essere rivelato, viene fatto incubare un anticorpo secondario di capra (*ENVISION™ VISUALIZATION REAGENT)* specifico per le immunoglobuline di coniglio a cui è coniugata una catena di destrano (polimero), a sua volta legato ad altrettante molecole di perossidasi di rafano (HRP). Il tutto viene lasciato reagire per 30' a temperatura ambiente.

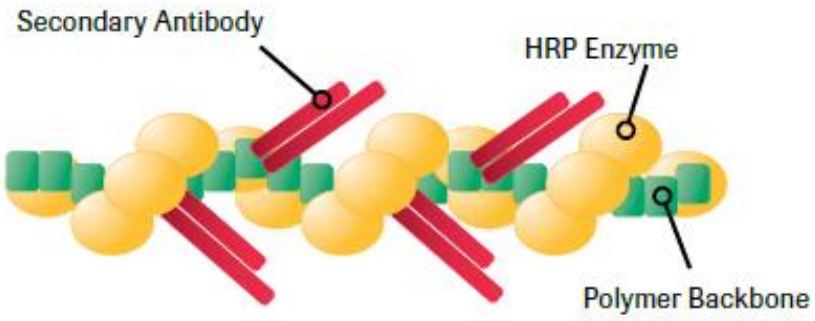


Immagine 8: ultraWiev DAB Brochure. Rappresentazione del polimero di destrano, a cui sono legati tendenzialmente venti anticorpi secondari e cento molecole di perossidasi di rafano.

Terminata l'incubazione dell'anticorpo secondario, si procede alla dispensazione in tutto il vetrino di *ENVISION™ DAB BUFFERED SUBSTRATE*, ovvero un tampone a pH 7.5 contenente perossido di idrogeno ed uno stabilizzante-enhacer, e di *ENVISION™ DAB CHROMOGEN*, ossia una soluzione cromogena contenente 3,3-diaminobenzidina tetraidrocloruro (5%), la quale viene dapprima diluita nel tampone.

I campioni vengono estratti dallo strumento e colorati con Ematossilina di Mayer (colorante nucleare) per 10'' e poi immersi in acqua acidulata (per l'azzurramento). Successivamente, vengono risciacquati delicatamente in acqua corrente. Questa contro-colorazione consente di identificare facilmente le cellule e, di conseguenza, la localizzazione della positività.

Infine, come per la routine istologica, le sezioni vengono disidratate in alcol a concentrazione progressivamente crescente, chiarificati con Xilene e montati con Balsamo del Canada.

2.2.1 Ulteriori informazioni tecniche su DAKO AUTOSTAINER

La piattaforma DAKO si avvale, per l'amplificazione della reazione, di un sistema polimerico indiretto, detto anche EPTS (Enhaced Polymer Two-step Staining). Questo sistema ha notevoli vantaggi, tra cui si annovera una sensibilità nettamente superiore rispetto ad altri metodi, quali il sistema biotina-streptoavidina, assenza di legami aspecifici dovuti alla biotina e possibilità di coniugare il polimero con anticorpi a specificità diversa. Inoltre, è una reazione che si sviluppa in due passaggi garantendo una maggiore standardizzazione con riduzione dei tempi totali di indagine.

In ogni seduta di colorazione viene inserito un controllo di corsa che viene fornito direttamente dalla ditta. Si tratta di tre spot cellulari corrispondenti ad un'intensità di colorazione 0 (negativo), 1+ (negativo), 3+ (positivo) e che sono stati fissati, processati, inclusi in paraffina con la medesima procedura dei campioni che giungono in laboratorio.

Punto negativo del sistema di amplificazione è che i polimeri hanno la tendenza a legarsi tra di loro creando dei grossi complessi che potrebbero inficiare la sensibilità della reazione.

2.3 PROTOCOLLO DI COLORAZIONE HER-2/neu ROCHE VENTANA

Con la piattaforma **ROCHE VENTANA** tutti i passaggi previsti dal kit Pathway® sono completamente automatizzati. L'intervento del tecnico si limita al caricamento nella piattaforma del vetrino contenente la sezione ed il controllo. I protocolli sono nascosti. La sparaffinatura avviene mediante *EZ Prep*™ a 72°C per 8' e lo smascheramento dell'antigene avviene mediante calore ad una temperatura di 95°C per 44' in Tris-EDTA a pH 7.8. Il tampone viene anche chiamato con la sigla *CC1*™.

Le perossidasi vengono bloccate con un *inibitore CM*™ a 37°C per 4'. Si procede poi con ulteriori passaggi in *Ultra CC1*™.

Vengono dispensati su tutto il vetrino 100 µl di anticorpo monoclonale di coniglio (Clone 4B5) per 4' a 36°C. Affinché questa quantità esigua possa essere mantenuta, la piattaforma dispensa un reagente oleoso, *Liquid Coverslip*™, in grado di ricreare una camera di incubazione idonea per l'anticorpo su tutto il vetrino, eludendo evaporazione di reagente e disidratazione del tessuto. Il sistema di rivelazione dell'immunocomplesso (UltraWiev) è un anticorpo secondario, specifico per l'immunoglobulina di coniglio, in cui l'enzima (HRP) è coniugato direttamente con le sue braccia lunghe mediante dei Linkers.

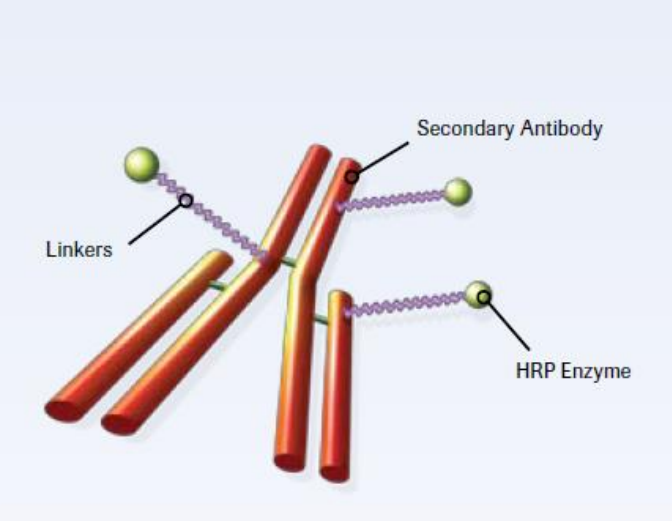


Immagine 9: ultraWiev DAB Brochure. Rappresentazione del multimero: un anticorpo secondario coniugato ad alcune molecole di HRP.

C'è poi l'aggiunta del substrato e della DAB.

Per controcolorare viene dispensata un'aliquota di ematossilina di Meyer per 8'. Viene aggiunto il *BLUING REAGENT*™ per 4', infine come per il precedente protocollo la sezione viene disidratata e poi aggiunto il vetrino coprioggetto con balsamo del Canada.

2.3.1 Ulteriori informazioni tecniche su ROCHE VENTANA

Il multimero è estremamente piccolo, minimizzando l'ingombro sterico ed incrementando la sensibilità della reazione. Esso è in grado, per via delle sue dimensioni, di poter penetrare all'interno delle cellule in modo da visualizzare basse quantità di antigene.

Inoltre, essendo privo di biotina, viene esclusa una possibile interferenza durante la colorazione.

Il tempo di incubazione dell'anticorpo primario viene ridotto.

Per ogni singolo caso deve essere aggiunto un controllo interno che esprime una positività per il recettore pari a 3+ (Immagine 10). I controlli sono selezionati da carcinomi infiltranti con positività 3+ precedentemente refertati. L'area di interesse viene segnata con un pennarello sul vetrino.

Il tecnico verifica al microscopio dov'è l'area che iperesprime HER2 e, con un ago per le biopsie osteomidollari, procede all'estrazione del frustolo dal blocchetto iniziale. Il frustolo viene nuovamente incluso in paraffina e successivamente tagliato.

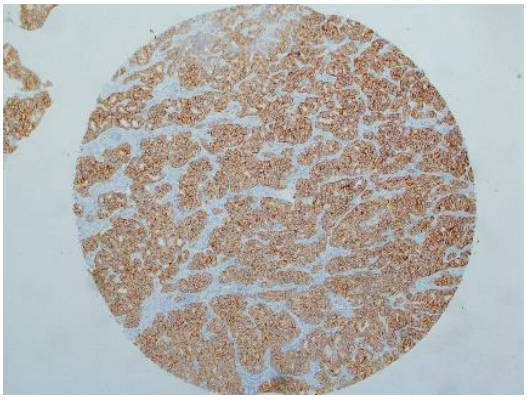


Immagine 10: Controllo interno colorazione 3+ della membrana.

L' immunocoloratore è dotato di trenta alloggiamenti per vetrini consentendo, non solo di poter inserire all'interno della piattaforma nuovi campioni senza interrompere il workflow degli altri, ma anche di generare differenti temperature a seconda della colorazione da effettuare. Questo viene garantito grazie al sistema Ultimate Reagent Access (URA), il quale permette di gestire anche le richieste urgenti, pervenute all'ultimo momento in laboratorio.

Ventana Benchmark si caratterizza anche per un sistema di Air Vortex Mixer, o meglio una sorta di ambiente in costante movimento che assicura una colorazione uniforme in tutta la superficie del tessuto.

2.3.2 Differenze tecniche tra i due immunocoloratori

Come precedentemente esposto le due piattaforme utilizzano procedure e reagenti diversi.

La tabella 6 rappresenta un confronto fra le due piattaforme che evidenzia le principali differenze.

Tabella 6

AUTOSTAINER DAKO		VENTANA ROCHE
Generate dal sistema informatico	**Generazione etichette**	Generate dal tecnico di laboratorio
Si fa a mano sotto cappa	**Contro-colorazione**	Eseguita direttamente dallo strumento
Non è possibile caricare campioni durante la corsa degli altri vetrini	**Caricamento campioni**	È possibile caricare campioni durante la corsa
Polimero di destrano a cui sono legate 100 HRP e 20 anticorpi secondari	**Sistema di amplificazione**	Multimero a cui sono legate le HRP mediante Linkers
Bagnetto termostatato esterno lo strumento e tampone	**Smascheramento**	Mediante EZ prep e temperature elevate all'interno dello strumento
Clone A0485 e policlonale da coniglio	**Anticorpo primario**	Clone 4B5 e monoclonale da coniglio
Si devono usare solo quelli della ditta Dako	**Anticorpi disponibili**	Piattaforma aperta: si possono impiegare anticorpi pre-diluiti o di altre aziende caricati in dispenser, sia in modalità automatica che mediante pipette

2.4 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI.

La lettura è stata effettuata dal Patologo al microscopio multiplo durante sedute alle quali hanno preso parte i tecnici coinvolti nella sperimentazione.

Sono stati valutati:

- Colorazione 3+ del controllo interno (per i vetrini colorati con Ventana Benchmark)
- Intensità di colorazione della membrana citoplasmatica (debole, moderata, forte completa, incompleta)
- Percentuale di cellule tumorali esprimenti HER-2/neu

A seguito di quanto esposto a ciascun caso è stato assegnato un valore: **0** (negativo), **1+** (negativo), **2+** (incerto) e **3+** (positivo).

In accordo con le linee guida ASCO/CAP 2018 un risultato 2+ è sinonimo di equivoco, per cui è necessario valutare l'effettiva amplificazione del gene mediante la FISH.

3. RISULTATI

Tutti 30 i campioni sono risultati adeguati alla valutazione dello stato recettoriale di HER2/neu con entrambe le piattaforme.

Come previsto dalle linee guida ASCO/CAP 2018, è stato valutato anche lo stato dei recettori per gli Estrogeni, il Progesterone e l'indice di proliferazione Ki-67 effettuati con la piattaforma OMNIS-AGILENT. Nella maggior parte dei casi il recettore per gli Estrogeni è risultato positivo tra 70% ed il 100% delle cellule, il recettore per il Progesterone tra lo 0% e l'80% e l'indice di proliferazione cellulare tra il 5% e l'80%. In cinque casi entrambi i recettori per gli ormoni, nonché il recettore HER2/neu, sono risultati negativi.

I risultati della colorazione immunoistochimica per HER2 con le due piattaforme sono riassunti nelle Tabelle 7 e 8.

Come si può osservare, in 19 casi i risultati delle due piattaforme sono risultati concordanti (In 6 campioni 0, in 11 campioni 1+ e in due campioni 3+) mentre per i restanti undici casi sono discordanti. In particolare di sette casi risultati 2+ con Autostainer, sei sono risultati 1+ e uno è risultato 3+ con Ventana. Altri quattro casi risultati 1+ con Autostainer sono risultati 0 con Ventana.

I casi risultati 2+ con Autostainer sono risultati non amplificati all'esame FISH.

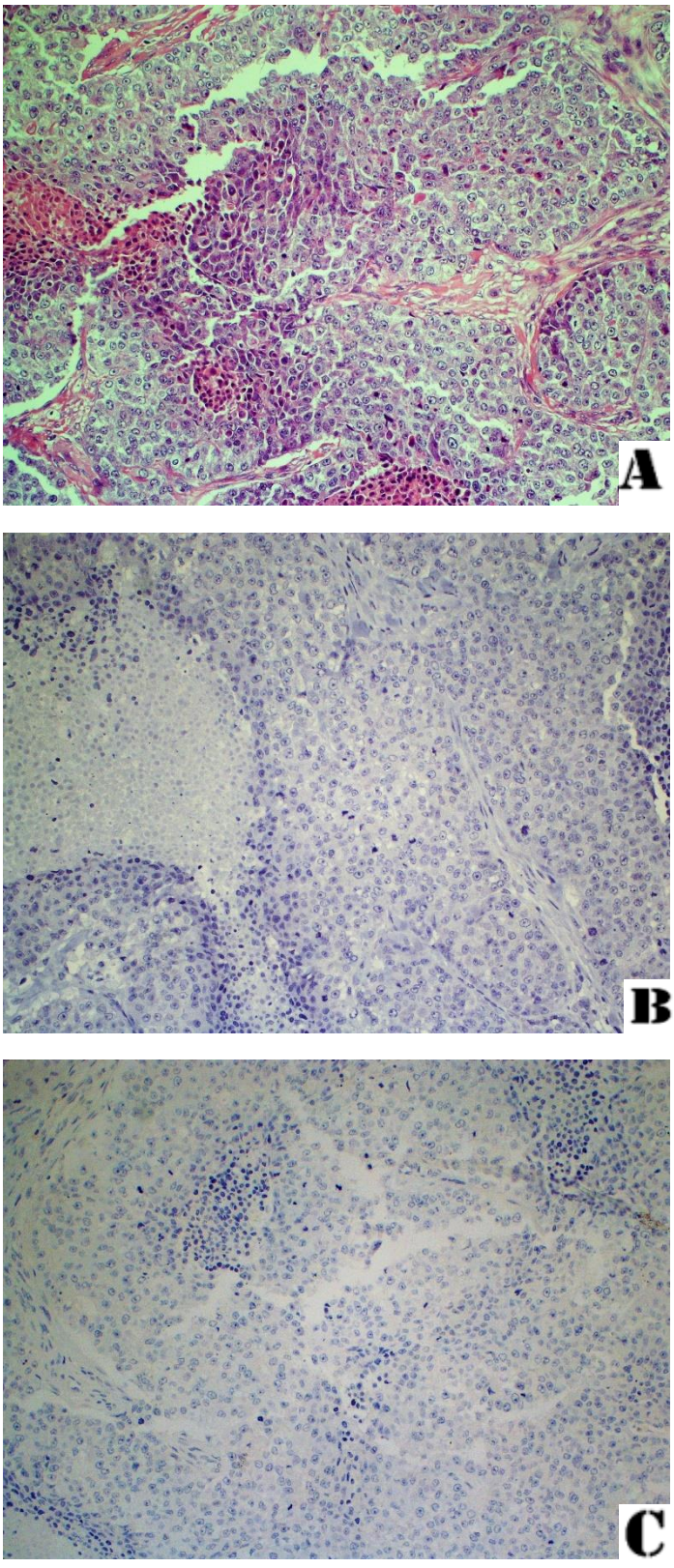
Tabella 7: risultati dell'espressione del recettore HER2/neu, percentuale di cellule positive, intensità della colorazione ottenuti mediante la piattaforma Autostainer Link 48.

AUTOSTAINER LINK 48 (DAKO)			
N. Caso	**Risultato**	**% cellule**	**Intensità**
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	1+	30%	debole, incompleta
5	1+	60%	debole, incompleta
6	2+	10%	debolissima, completa
7	3+	95%	intensa, completa
8	0	0	0
9	1+	20%	debolissima, incompleta
10	0	0	0
11	0	0	0
12	1+	30%	debole, incompleta
13	1+	50%	debole, incompleta
14	0	5%	debolissima, incompleta
15	1+	40%	lieve, incompleta
16	1+	25%	moderata, incompleta
17	1+	15%	debole, incompleta
18	1+	30%	moderata, incompleta
19	1+	40%	debole, incompleta
20	1+	20%	moderata, incompleta
21	1+	60%	debole, incompleta
22	2+	15%	debole, completa
23	2+	20%	completa, moderata, sparsa
24	2+	30%	moderata, completa
25	1+	80%	moderata, incompleta
26	1+	20%	debole, incompleta
27	2+	70%	intensa, completa
28	2+	15%	debole, incompleta
29	1+	20%	debole, completa
30	3+	90%	intensa, completa

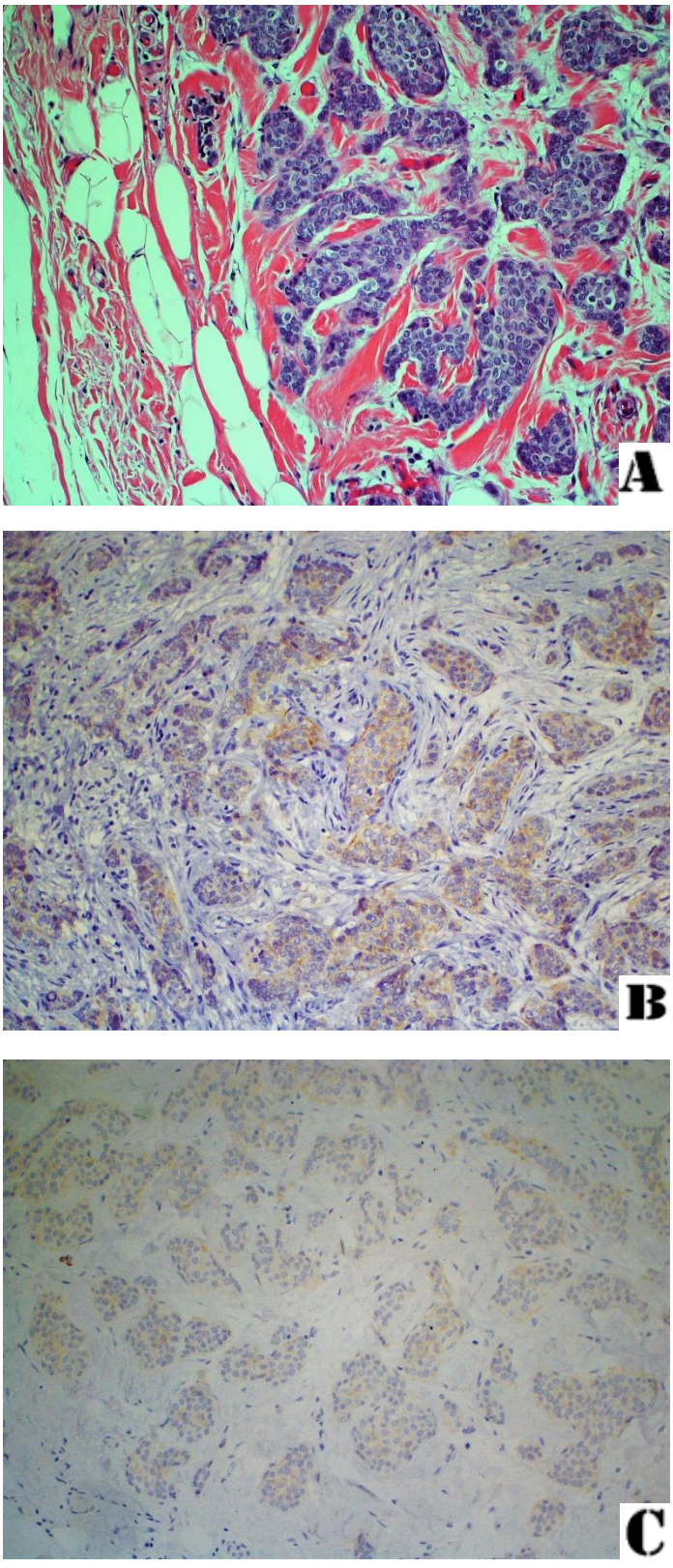
Tabella 8: risultati dell'espressione del recettore HER2/neu, percentuale di cellule positive, intensità della colorazione ottenuti mediante la piattaforma Ventana Benchmark.

VENTANA BENCHMARK (ROCHE)			
N. Caso	**Risultato**	**% cellule**	**Intensità**
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	1+	30%	debolissima, incompleta
5	1+	10%	debolissima, incompleta
6	1+	10%	debole, incompleta
7	3+	95%	intensa, completa
8	0	0	0
9	1+	20%	debolissima, incompleta
10	0	0	0
11	0	0	0
12	1+	30%	debolissima, incompleta
13	1+	10%	debolissima, incompleta
14	0	2%	debolissima, incompleta
15	1+	10%	debolissima, incompleta
16	1+	30%	moderata, incompleta
17	0	15%	debole, incompleta
18	1+	30%	moderata, incompleta
19	1+	40%	debole, incompleta
20	1+	20%	debolissima incompleta
21	0	60%	debole, incompleta
22	1+	15%	debolissima, completa
23	1+	70%	moderata, incompleta
24	1+	30%	debole, incompleta
25	0	5%	debole, incompleta
26	0	0	0
27	3+	40%	intensa, completa
28	1+	20%	debolissima, incompleta
29	1+	20%	moderata, completa
30	3+	90%	intensa, completa

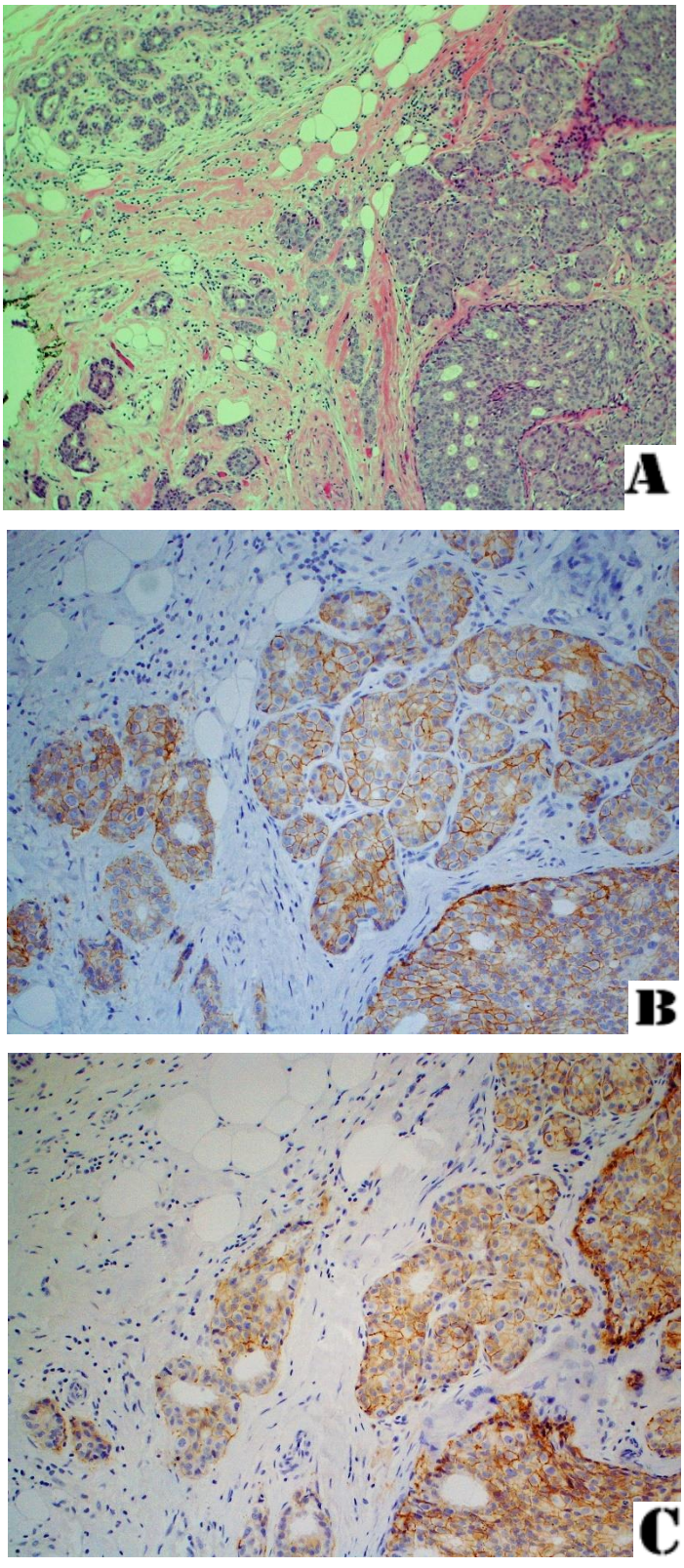
Caso n° 2: A, Ematossilina-Eosina; B, immunoistochimica con Herceptest (0 negatività della colorazione); C, immunoistochimica con Pathway (0, negatività della colorazione). Ingrandimento 10X.



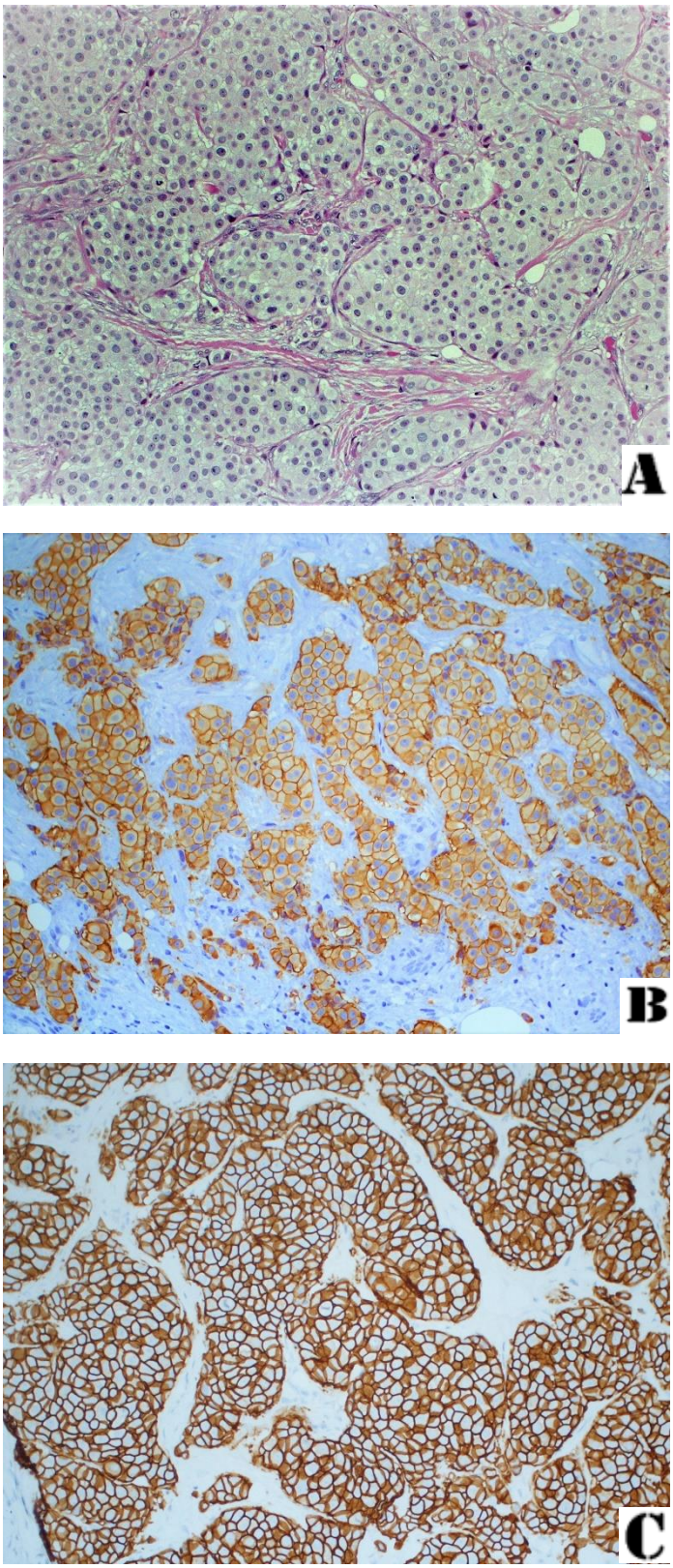
Caso n°9: A, Ematossilina-Eosina. Ingrandimento 20X; B, immunoistochimica con Herceptest (1+ positività di membrana); C, immunoistochimica con Pathway (1+ positività di membrana). Ingrandimento 10X.



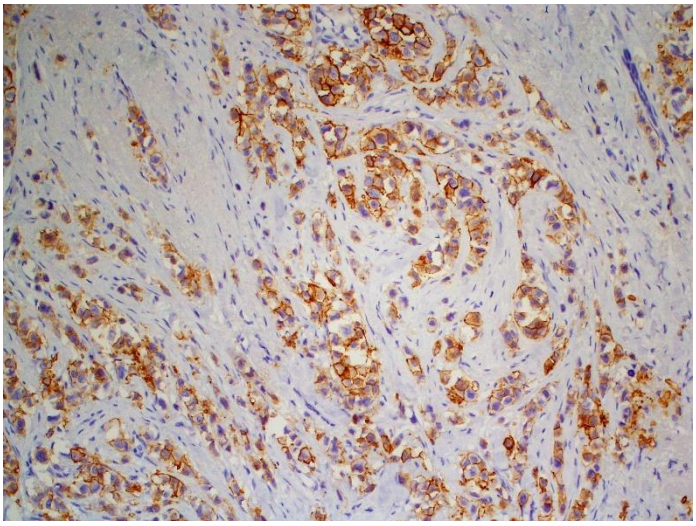
Caso n° 23: A, Ematossilina-Eosina 10X; B, immunoistochimica con Herceptest (2+ colorazione di membrana); C, immunoistochimica con Pathway (1+ colorazione di membrana). Ingrandimento 20X.

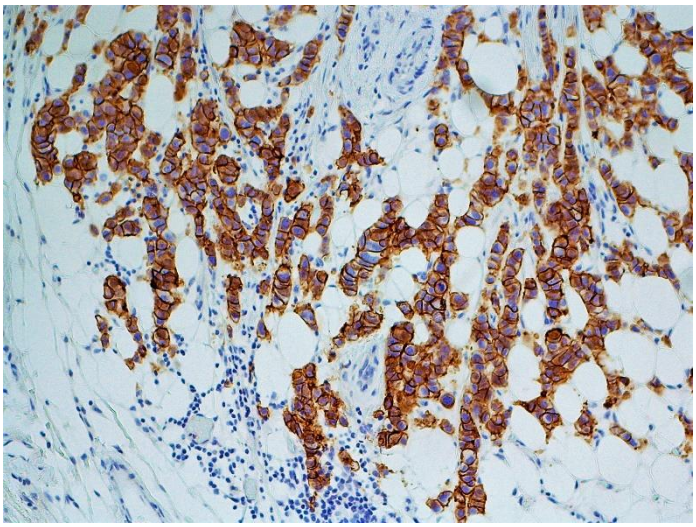


Caso n° 7: A, Ematossilina-Eosina; B, immunoistochimica con Herceptest (3+ colorazione di membrana); C, immunoistochimica con Pathway (3+ colorazione di membrana). Ingrandimento 20X.



Caso n° 27: Colorazione immunoistochimica con Herceptest (2+); colorazione immunoistochimica con Pathway (3+). Ingrandimento 10X.





4. DISCUSSIONE

Il carcinoma della mammella è una neoplasia molto frequente che viene abitualmente trattata in un contesto multidisciplinare di specialisti volto ad ottimizzare l'approccio diagnostico e terapeutico. Il laboratorio di Anatomia patologica al quale pervengono i campioni ha un ruolo fondamentale nella refertazione che deve comprendere: la classificazione secondo WHO [32], il 'grading' e la stadiazione patologica TNM. [7] In aggiunta, le linee guida internazionali, prevedono lo studio e la refertazione di una serie di biomarcatori che sono indispensabili per la prognosi e per la scelta terapeutica appropriata [10, 18].

Fra questi, la valutazione dello stato di HER2 permette di identificare una percentuale variabile fra il 15 ed il 20% di carcinomi con iper-espressione che sono potenziali candidati alla terapia con Trastuzumab (Herceptin).

La valutazione viene effettuata in prima istanza con tecnica immunoistochimica e, in caso di risultato 'equivoco', l'amplificazione deve essere dimostrata con tecnica molecolare. Quella più comunemente utilizzata è la FISH.

Le linee guida ASCO/CAP pubblicate dal College of American Pathologists forniscono i criteri per la refertazione ed indicano le possibili cause di falsi positivi e falsi negativi.

Esistono in commercio diversi anticorpi e diverse piattaforme, una parte delle quali approvate dalla FDA, che possono essere utilizzate per la valutazione immunoistochimica dello stato di HER2 [18].

L'Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona ha utilizzato e standardizzato, attraverso controlli di qualità, per circa 20 anni la piattaforma Agilent-Dako.

Alla fine del 2019 si è reso necessario passare ad una piattaforma Roche-Ventana.

Questo ha richiesto che si procedesse, in prima istanza, ad una valutazione di riproducibilità e di confronto dei risultati.

A tal fine, sezioni ottenute dai blocchi dei 30 casi selezionati sono stati testate indipendentemente con le due piattaforme. Questo approccio ha permesso di escludere, a priori, che una eventuale discrepanza nei risultati potesse essere legata a fattori preanalitici ed in particolare alla fissazione, la quale, come è noto, può influenzare pesantemente i risultati dei test immunoistochimici [21, 22, 23, 24].

I risultati ottenuti non hanno evidenziato discrepanze significative da un punto di vista clinico, ma la piattaforma Roche-Ventana ha mostrato una performance migliore per quanto riguarda alcune caratteristiche tecniche.

In particolare, la piattaforma Roche-Ventana ha alcune caratteristiche uniche particolarmente apprezzate dal personale del laboratorio che sono: la contro-colorazione nucleare con Ematossilina realizzata direttamente nella macchina rispettando i tempi e le temperature previste dai protocolli ed il caricamento dei campioni, che può avvenire durante la corsa di tutti gli altri casi e in continuo.

Esistono anche differenze negli anticorpi usati dai due sistemi. Infatti, l'anticorpo Roche-Ventana è un monoclonale da coniglio (Clone 4B5) in grado di riconoscere un unico epitopo, mentre l'anticorpo DAKO (Clone A0485) è un policlonale che reagisce con l'intero antigene. Questo rende l'anticorpo Ventana più specifico riducendo il numero di casi con positività 'equivoca'. Infatti 5 casi oggetto dello studio (6, 22, 23, 24, 28) che presentavano una positività di membrana 2+ con il sistema Autostainer sono risultati 1+ con il sistema Ventana e nessuno dei casi è risultato amplificato all'esame FISH. Questo risultato è particolarmente importante perché permette di ridurre il numero di casi da mandare ad esame FISH con notevole risparmio di risorse economiche ed umane.

Inoltre, tutti i campioni 1+ con Autostainer sono risultati completamente negativi con Ventana.

I risultati ottenuti sono in accordo con quanto riportato da *Lucas e coll.* [14] che hanno messo a confronto le due piattaforme impiegando 180 campioni di carcinoma della mammella infiltrante. Dalla loro analisi emerge che il grado di concordanza esistente tra le due piattaforme è molto basso (K=0.018), a testimonianza del fatto che entrambi forniscono risultati discordanti, principalmente per quanto riguarda i casi equivoci, di gran lunga ridotti se ci si avvale del kit Pathway anti-HER2/neu.

5. CONCLUSIONI

Dal confronto fra le due piattaforme è emerso che la piattaforma Roche Ventana poteva essere inserita agevolmente nella routine del laboratorio di immunoistochimica avendo caratteristiche di completa automazione ed essendo dotata di un sistema di rivelazione superiore a quello della piattaforma precedente.

Il Pathway anti-HER2/neu (4B5) ha ridotto drasticamente il numero di risultati equivoci, evitando di dover ricorrere a test aggiuntivi quali l'esame FISH che comporta aumento dei costi e allungamento dei tempi di refertazione nonché dispendio di risorse umane.

6. BIBLIOGRAFIA e SITOGRAFIA

1. Robbins e Cotran, Kumar V, Abbas A.K., Fausto N. e Aster J.C. **Le basi patologiche delle malattie, Malattie degli organi e degli apparati**. Volume 2, 8° edizione, 2011, Elsevier.
2. Cellule mioepiteliali https://it.wikipedia.org/wiki/Cellule_mioepiteliali
3. I numeri del cancro in Italia https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2019/09/2019_Numeri_Cancro-operatori-web.pdf
4. I fattori di rischio cancro della mammella https://europadonna.it/wp-content/uploads/2018/07/fattoridirischio.pdf
5. Singhai R, Patil VW, Jaiswal SR, Patil SD, Tayade MB, Patil AV. **E-Cadherin as a diagnostic biomarker in breast cancer**. *N Am J Med Sci*. 2011;3: 227-233.
6. Ellis IO, Elston CW. Histologic grade. In: O'Malley FP, Pinder SE, eds. **Breast Pathology**. Elsevier; 2006:225-233.
7. Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al, eds. **AJCC Cancer Staging Manual**. 8th ed. New York, NY: *Springer*; 2017.
8. Simona Maria Fragomeni, MD1, Andrew Sciallis, MD2, and Jacqueline S. Jeruss, MD. **Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer.** *Surg Oncol Clin N Am*. 2018; 27: 95–120
9. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al. **Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011**. *Ann Oncol*. 2011; 22:1736-1747.
10. Patrick L. Fitzgibbons, MD*; Angela N. Bartley, MD, PhD*; James L. Connolly. **Breast Biomarker Reporting Template.** 2018
11. Romiti S., Scarpelli M. **Metodi immunoistochimici e molecolari di caratterizzazione biologica del carcinoma mammario.** 2018
12. *AIOM.* **Linee guida Neoplasie della mammella, 2018**
13. Pisa E., Santinelli A. **Carcinoma mammario metastatico HER2/neu positivo: parametri biologici e resistenza al trastuzumab**. 2006

14. Lucas E, Jabbar SB, Molberg K, Fang Y, Xie XJ, Blacketer S, Sahoo S. **Comparison of Dako HercepTest and Ventana PATHWAY Anti-HER2 (4B5) Tests and Their Correlation with Fluorescent in Situ Hybridization in Breast Carcinoma**. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2019; 27:403-409.
15. Naber SP, Tsutsumi Y, Yin S, Zolnay SA, Mobtaker H, Marks PJ, McKenzie SJ, DeLellis RA, Wolfe HJ. **Strategies for the analysis of oncogene overexpression. Studies of the neu oncogene in breast carcinoma**. *Am J Clin Pathol.* 1990; 94: 125-136.
16. Vincenzo Adamo, Oscar Bertetto, Generoso Bevilacqua, Roberto Bordonaro, Antonino Carbone, Emanuele D'Amore, Marco Danova, Sabino De Placido, Angelo Paolo Dei Tos, Lucia Del Mastro, Nicola Gebbia, Annunziata Gloghini, Stefania Gori, Stefano Iacobelli, Michele De Laurentis, Vito Lorusso, Eugenio Maiorano, Annamaria Molin, Filippo Montemurro, Oscar Nappi, Cecilia Nisticò, Carmine Pinto, Anna Sapino, Gianluigi Taddei, Mauro Truini, Giovanni Tuccari, Marco Venturini, Giuseppe Viale. **Raccomandazioni sui requisiti minimi e gli standard di refertazione e sull'utilizzo di metodiche per la determinazione dello stato di HER2 nel carcinoma mammario.**
17. Vang R, Cooley LD, Harrison WR, Reese T, Abrams J. **Immunohistochemical determination of HER-2/neu expression in invasive breast carcinoma.** *Am J Clin Pathol*. 2000; 113: 669-674.
18. Antonio C. Wolff, M. Elizabeth Hale Hammond, Kimberly H. Allison, Brittany E. Harvey, Pamela B. Mangu, John M.S. Bartlett, Michael Bilous, Ian O. Ellis, Patrick Fitzgibbons, Wedad Hanna, Robert B. Jenkins, Michael F. Press, Patricia A. Spears, Gail H. Vance, Giuseppe Viale, Lisa M. McShane, Mitchell Dowsett. **Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer,** American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update.
19. Maria Rosa Cardillo. **Nozioni di tecniche diagnostiche di Anatomia Patologica**. 2° edizione, 2017, Antonio Delfino editore.
20. Park S, Wang HY, Kim S, Ahn S, Lee D, Cho Y, Park KH, Jung D, Kim SI, Lee H. **Quantitative RT-PCR assay of HER2 mRNA expression in formalin-fixed and paraffin-embedded breast cancer tissues.** *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7: 6752-6759.

21. Kalkman S, Barentsz MW, van Diest PJ. **The effects of under 6 hours of formalin fixation on hormone receptor and HER2 expression in invasive breast cancer: a systematic review.** *Am J Clin Pathol.* 2014; 142: 16-22.
22. Bohn OL, Sanchez-Sosa S, Ibarra JA, Rogers LW. **Fixation time and HER2/neu assessment**. *Am J Clin Pathol*. 2011; 135: 979-980.
23. Apple S, Pucci R, Lowe AC, Shintaku I, Shapourifar-Tehrani S, Moatamed N. **The effect of delay in fixation, different fixatives, and duration of fixation in estrogen and progesterone receptor results in breast carcinoma.** *Am J Clin Pathol*. 2011; 135: 592-598.
24. Tong LC, Nelson N, Tsourigiannis J, Mulligan AM. **The effect of prolonged fixation on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast cancer: a prospective study**. *Am J Surg Pathol*. 2011; 35: 545-552.
25. Quénel N, Wafflart J, Bonichon F, de Mascarel I, Trojani M, Durand M, Avril A, Coindre JM. **The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases.** *Breast Cancer Res Treat*. 1995; 35: 283-91.
26. Gancberg D, Lespagnard L, Rouas G, Paesmans M, Piccart M, Di Leo A, Nogaret JM, Hertens D, Verhest A, Larsimont D. **Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples of invasive breast carcinomas. Correlation with oncogene amplification in 160 cases.** *Am J Clin Pathol*. 2000; 113: 675-682.
27. Dott.ssa Valeria Berton. **Slides "Visualizzare i campioni biologici".**
28. Manuale Agilent https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/129272001.PD
29. UltraView Universal DAB detection Kit Brochure.
30. Zaha DC. **Significance of immunohistochemistry in breast cancer**. *World J Clin Oncol*. 2014; 5: 382-392.
31. Tan M, Yu D. **Molecular mechanisms of erbB2-mediated breast cancer chemoresistance**. *Adv Exp Med Biol*. 2007; 608:119-29.
32. WHO Classification of Tumors, 5th Edition, Breast Tumors, Volume 2

RINGRAZIAMENTI

Dopo tre anni finalmente quelle adorate ed attese parole: “La proclamo dottore in Tecni…”. No, fermi tutti: prima i ringraziamenti! Oggi, in una calda giornata di novembre, si conclude questo mio percorso: iniziato da Biologo e terminato come Tecnico di Laboratorio Biomedico. Come è strana la vita: sembra abbia certi piani per il tuo futuro e poi si stravolgono completamente.

Però è proprio questo il bello: l’imprevedibilità.

Ah! Per non considerare che poi in mezzo, a “spianare la strada”, ci si è messo pure il virus che ci ha obbligato a vederci e frequentarci attraverso uno schermo per tre lunghissimi mesi!

Nonostante tutto siamo qui, nuovi, diversi, noi stessi..., ma siamo qui.

Un ringraziamento va alla mia relatrice, la Professoressa Marina Scarpelli, che mi ha guidato in questo percorso e per le enormi conoscenze che ha messo a mia disposizione. Grazie per la fiducia in me riposta.

Ringrazio la mia correlatrice, la Dottoressa Donatella Diotallevi, che con il suo “Marco, se sei disoccupato ti trovo qualcosa da fare” mi ha accompagnato in questi tre mesi di tirocinio, facendomi crescere, insegnandomi l’importanza e la bellezza della nostra professione. Grazie a tutto il personale dell’Anatomia Patologica di Ancona che mi ha accolto come fossi un loro collega: Emanuela, Peppe, Anna, la professoressa Morichetti e la dottoressa Giorgini.

Un ringraziamento speciale a mia madre, la Stella Polare della mia Vita, che mi ha supportato nei giorni antecedenti gli esami (“piangendo” alcune volte con me), a mio padre, mia sorella, il mio “timone”, Zia, la mia seconda madre, Zio, Matteo, Ilenia, Francesco, Martina e il piccolo Levante, Fiorenza ed Alessandro.

Grazie ad Alessandro, detto “Congo”, entrato da poco nella mia vita ma che mi ha accompagnato e dato sostegno sin dalla stesura della prima parola di questo progetto, nonché “l’architetto” del mio power point.

Ai miei amici Sara, Maria Laura, Angela, Sara B., Sara S., Marco: un immenso grazie a tutti voi.

Infine a tutte le mie amiche di Università, soprattutto coloro con cui ho instaurato un profondo rapporto di amicizia: Francesca la “Bones di Morro D’Alba”, Alessia e Rachele.