



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E
CHIRURGIA**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE, ONCOLOGICHE E
GASTROENTEROLOGICHE

Direttore: Ch.mo Prof. Fabio Farinati

UOC ONCOLOGIA 2 – ISTITUTO ONCOLOGICO VENETO I.R.C.C.S.

Direttore: Prof.ssa Valentina Guarneri

TESI DI LAUREA

**ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DI
METASTASI CEREBRALI DA CARCINOMA
MAMMARIO**

RELATRICE: Dott.ssa Gaia Griguolo

LAUREANDA: Irene Zoggia

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Sommario

1. ABSTRACT	1
2. INTRODUZIONE	5
1.1 - Carcinoma mammario	5
1.1.1 – <i>Epidemiologia</i>	5
1.1.2 – <i>Fattori di rischio</i>	6
1.1.3 - <i>Classificazione clinica dei carcinomi mammari e implicazioni</i>	6
1.1.4 - <i>Sottotipi molecolari e significato genomico</i>	9
1.2 - Metastasi cerebrali	11
1.2.1 – <i>Incidenza e valutazione prognostica</i>	11
1.2.2 - <i>Segni e sintomi</i>	13
1.2.3 – <i>Diagnosi</i>	14
1.2.4 – <i>Trattamento delle metastasi cerebrali da carcinoma mammario</i>	15
1.2.5 – <i>Microambiente tumorale e specificità delle metastasi cerebrali</i>	20
3. SCOPO DELLO STUDIO	23
4. MATERIALI E METODI	25
3.1 – <i>Pazienti</i>	25
3.2 – <i>Analisi dei campioni</i>	26
3.3 – <i>Analisi statistica</i>	27
5. RISULTATI	29
4.1 – <i>Caratteristiche dei pazienti</i>	29
4.2 - <i>Sopravvivenza globale e fattori prognostici</i>	31
4.3 - <i>Sottotipi molecolari intrinseci delle metastasi cerebrali</i>	33
4.4 – <i>Associazione tra espressione di singoli geni e sopravvivenza globale</i>	36
4.5 – <i>Associazione tra sottotipi intrinseci del carcinoma mammario e sopravvivenza globale</i>	39
4.6 – <i>Associazione tra signature geniche dell’algoritmo PAM50 e sopravvivenza globale</i>	41
6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	43
7. BIBLIOGRAFIA	51

1. ABSTRACT

Background: The incidence of breast cancer (BC) brain metastases (BM) is increasing as a result of both improved diagnostic techniques and longer survival due to better treatment approaches in patients with advanced breast cancer. Breast cancer is a biologically heterogeneous disease and relevant differences have been described in gene expression between primary tumor and metastasis as well as between different organ-specific metastasis. Considering the potential clinical implications, a better understanding of breast cancer brain metastasis biology is needed.

Here we evaluate the transcriptomic profile of BCBMs and assess its prognostic implications in a multicentric cohort of patients with surgically removed BCBMs.

Methods: Clinical data and BM samples from BC patients undergoing neurosurgery (2003-2019) at three institutions were collected. Hormone receptor (HR) and HER2 status were evaluated on the BCBM. RNA was extracted from the BM samples and used to measure the expression of 758 BC-related genes and 18 housekeeping genes using the Breast Cancer 360 Panel on an nCounter platform (NanoString Technologies). Intrinsic molecular subtyping was determined using the previously reported PAM50 subtype predictor (Parker et al. JCO 2009). Overall survival from neurosurgery (OS) was calculated using the Kaplan-Meier method. The correlations between expression of each gene/PAM50 signature, BC subtype and OS were studied using univariate and multivariate Cox-models.

Results: Sixty-five BCBM samples were analyzed: 32% (N=21) were HR+/HER2-, 38% (N=25) HER2+ and 29% (N=19) HR-/HER2-. At a median follow-up of 32.5 months, no clinical variable was significantly associated with OS, despite a trend towards a shorter survival for patients diagnosed with HR-/HER2- BMs as compared to patients diagnosed with HR+/HER2- and HER2+ BM was observed (median OS 9.4 versus 22.1 and 20.0 months, respectively, log-rank $p=0.43$).

Intrinsic subtype distribution, as assessed by gene-expression profiling using

the PAM50 algorithm, was 46% HER2-enriched, 37% Basal-like, 15% Luminal B and 2% Normal-like. Non-luminal subtypes were extensively represented, both overall and in each BC subtype: 28% HER2-enriched and 24% basal-like in HR+/HER2- subgroup, 84% HER2-enriched and 12% basal-like in HER2+ subgroup, 84% basal-like and 16% HER2-enriched in HR-/HER2- subgroup.

The PAM50 basal-like signature was significantly associated with a worse OS from neurosurgery (HR 2.7, 95% CI 1.0-7.2, p=0.045), even after correcting for BC subtype (HR 5.2, 95% CI 1.1-23.4, p=0.032). In fact, even within the subgroup of HR+/HER2- BCBMs, the PAM50 basal-like signature was strongly associated with a worse OS (HR 92.6, 95% CI 5.0-1860.1, p=0.003) and patients with basal-like HR+/HER2- BCBMs presented a median OS similar to patients with HR-/HER2- BCBMs (mOS 9.0 vs 9.4 months).

Conclusions: Non-luminal intrinsic subtypes are highly prevalent in resected BCBMs. Our data suggest that basal-like genomic features might be enriched in BCBMs and might be associated with worse survival.

ABSTRACT

Razionale: Grazie al miglioramento delle tecniche diagnostiche e della disponibilità di strategie terapeutiche efficaci con conseguente aumento della sopravvivenza delle pazienti con malattia in stadio avanzato, il numero di pazienti con metastasi cerebrali da carcinoma mammario è in aumento. Il carcinoma mammario è una neoplasia biologicamente eterogenea e significative differenze nei pattern di espressione genica sono state descritte sia tra tumore primitivo e metastasi, sia tra diverse sedi metastatiche. Tenuto anche conto delle possibili implicazioni cliniche, è necessaria l'acquisizione di maggiori conoscenze relative alla biologia delle metastasi cerebrali da carcinoma mammario.

Il presente studio ha l'obiettivo di analizzare il profilo trascrittomico di metastasi cerebrali da carcinoma mammario e di valutare il relativo impatto prognostico in una coorte multicentrica di pazienti con carcinoma mammario con metastasi cerebrali asportate chirurgicamente.

Materiali e metodi: Sono stati raccolti i dati clinici e i campioni istologici di 65 metastasi cerebrali di pazienti sottoposti ad intervento neurochirurgico in tre Istituti tra il 2003 e il 2019. Sul campione istologico della metastasi cerebrale è stato valutato lo stato dei recettori ormonali (HR) e di HER2 mediante un'analisi immunohistochimica. Sull'RNA estratto dai campioni è stata valutata l'espressione di 758 geni relati al carcinoma mammario e 18 geni housekeeping utilizzando il pannello Breast Cancer 360 su una piattaforma nCounter (NanoString Technologies). La determinazione del sottotipo molecolare intrinseco è stata effettuata su ciascun campione tissutale secondo l'algoritmo PAM50 come già precedentemente riportato in letteratura (Parker et al. JCO 2009). La sopravvivenza globale dall'intervento neurochirurgico è stata calcolata utilizzando il metodo di Kaplan-Meier. La correlazione tra l'espressione dei singoli geni, sottotipo intrinseco secondo PAM50 e relative signatures genomiche, sottotipo clinico di carcinoma mammario e sopravvivenza globale è stata indagata attraverso un modello di Cox univariato e multivariato.

Risultati: Sono stati analizzati 65 campioni di metastasi cerebrali di carcinoma mammario così distribuiti: il 32% (N=21) era HR+/HER2-, il 38% (N=25) era HER2+ e il 29% (N=19) HR-/HER2-. Ad un follow up mediano di 32.5 mesi, non sono state identificate variabili cliniche significativamente associate alla sopravvivenza globale, seppure questa sia risultata numericamente minore nel sottogruppo di pazienti con metastasi cerebrali HR-/HER2- rispetto ai sottogruppi HR+/HER2- ed HER2+ (sopravvivenza mediana di 9.4 mesi vs 22.1 mesi e 20.0 mesi rispettivamente, log-rank $p=0.43$).

La distribuzione dei differenti sottotipi intrinseci era la seguente: 46% HER2-enriched, 37% basal-like, 15% luminal B e 2% normal-like. I sottotipi non-luminali (HER2-enriched e basal-like) si sono quindi confermati essere fortemente prevalenti sia nella popolazione globale che all'interno di ciascun sottotipo clinico: 28% HER2-enriched e 24% basal-like in metastasi HR+/HER2-, 84% HER2-enriched e 12% basal-like in metastasi HER2+, 84% basal-like e 16% HER2-enriched in metastasi HR-/HER2-.

La signature genomica basal-like dell'algoritmo PAM50 è risultata essere significativamente associata ad una minore sopravvivenza globale, sia all'analisi univariata (HR 2.7, 95% CI 1.0-7.2, $p=0.045$), che dopo correzione per il sottotipo clinico di carcinoma mammario (HR 5.2, 95% CI 1.1-23.4, $p=0.032$). In particolar modo, all'interno del sottogruppo di pazienti con metastasi cerebrali da carcinoma mammario HR+/HER2- la signature genomica basal-like è risultata essere fortemente associata ad una peggior prognosi (HR 92.6, 95% CI 5.0-1860.1, $p=0.003$) e pazienti con metastasi cerebrali da carcinoma mammario HR+/HER2- con sottotipo PAM50 basal-like presentavano una sopravvivenza mediana simile a quella di pazienti con metastasi cerebrali HR-/HER2- (mOS 9.0 vs 9.4 mesi).

Conclusioni: Questo studio ha evidenziato una netta prevalenza di sottotipi intrinseci non-luminali (HER2-enriched e basal-like) nelle metastasi cerebrali da carcinoma mammario resectate. Questi dati suggeriscono come le metastasi cerebrali da carcinoma mammario potrebbero essere arricchite per caratteristiche genomiche di non-luminalità e come la signature genomica basal-like si potrebbe associare ad una peggior prognosi.

2. INTRODUZIONE

1.1 - Carcinoma mammario

1.1.1 – Epidemiologia

Il carcinoma mammario rappresenta la neoplasia maligna più frequentemente diagnosticata nel sesso femminile a livello mondiale, con 2.26 milioni di nuovi casi nel 2020, e rappresenta a livello globale la prima causa di morte per neoplasia maligna nel sesso femminile.⁽¹⁾ Tuttavia, la mortalità per carcinoma mammario ha presentato un trend in progressivo calo nelle ultime decadi, principalmente grazie a diagnosi più precoci ed a miglioramenti terapeutici.⁽²⁾ Nonostante l'incidenza del carcinoma mammario sia maggiore nei Paesi industrializzati, stiamo assistendo nel corso degli ultimi decenni ad un progressivo aumento dei casi di carcinomi mammari diagnosticati nei Paesi a basso reddito.⁽¹⁾

Il tasso di sopravvivenza è correlato all'organizzazione dei servizi sanitari, pertanto, esso varia tra le diverse aree geografiche, risultando superiore all'80% nei Paesi sviluppati e inferiore al 50% se si considerano stati meno sviluppati dal punto di vista sanitario.⁽¹⁾ Il trend di incidenza della patologia è in lenta ma progressiva crescita a livello mondiale: si prevede entro il 2040 un aumento del 47% dei casi rispetto al 2020.⁽³⁾

In Italia, il carcinoma della mammella si conferma la prima neoplasia maligna per incidenza nel sesso femminile, con una stima di circa 55.000 nuove diagnosi nel 2020. Il tasso di sopravvivenza a 5 anni si mantiene fortunatamente molto elevato, attorno all'88%; questo sia grazie allo screening mammografico che permette la diagnosi della malattia in fasi più precoci, sia grazie alle sempre più numerose ed efficaci strategie terapeutiche a disposizione.⁽⁴⁾

1.1.2 – Fattori di rischio

Il carcinoma mammario è una patologia multifattoriale, la cui comparsa è determinata dall'interazione tra diversi fattori di rischio. Tra questi, il sesso femminile e l'età avanzata sono i più rilevanti: in circa la metà dei casi non sono, infatti, riconoscibili ulteriori condizioni di rischio. Gli altri fattori predisponenti ad oggi riconosciuti contribuiscono invece solo in minima parte all'aumento del rischio individuale. Questi sono in parte correlati allo stile di vita, come l'obesità, il consumo di alcol, il tabagismo, la sedentarietà e una dieta poco equilibrata, in particolare ad alto contenuto di grassi; in parte sono legati alla stimolazione ormonale della ghiandola mammaria, come il menarca precoce, la menopausa tardiva e l'utilizzo prolungato di terapia ormonale sostitutiva post-menopausa.⁽³⁾ Sebbene in circa un quarto dei casi si riscontri un'anamnesi familiare positiva, solo il 5-7% dei carcinomi mammari insorge all'interno di conclamate sindromi ereditarie, tra cui le più comuni sono le mutazioni a carico dei geni BRCA1 e BRCA2, responsabili del 20-25% delle forme ereditarie di carcinoma mammario.⁽⁵⁾

1.1.3 - Classificazione clinica dei carcinomi mammari e implicazioni

Il carcinoma mammario è caratterizzato da un'importante eterogeneità biologica che si riflette nelle diverse caratteristiche clinico-patologiche che permettono di stimare la prognosi e guidare la scelta del trattamento.

La classificazione clinica del carcinoma mammario si basa sulla valutazione dell'espressione, da parte delle cellule neoplastiche, del recettore per estrogeno (ER), recettore per progesterone (PgR) e del recettore HER2.⁽⁶⁾ La positività per i recettori ormonali, presente in circa il 70% dei casi, è indagata mediante immunohistochimica (IHC). Il carcinoma mammario è considerato positivo per i recettori ormonali (HR+) quando almeno l'1% delle cellule neoplastiche esprime ER e/o PgR⁽⁷⁾. Tuttavia, è stata recentemente distinta una nuova categoria, corrispondente ai carcinomi ER-low. Questi si caratterizzano per l'espressione di ER in non più del 10% delle cellule tumorali e per un incerto beneficio dalla terapia ormonale.⁽⁸⁾ La positività per recettori ormonali è un importante fattore prognostico, associandosi ad una

minore aggressività della patologia, e un fattore predittivo di risposta alla terapia ormonale⁽⁹⁾, sia nel setting precoce che nel setting avanzato. L'efficacia dell'ormonoterapia è correlata al livello di espressione dei recettori ormonali: tipicamente carcinomi mammari ER+/PgR+ si caratterizzano per una miglior prognosi rispetto a neoplasie ER+/PgR-.⁽¹⁰⁾

La terapia ormonale si avvale di diverse categorie di farmaci utilizzati in monoterapia o, talvolta, in associazione. Nel setting adiuvante, l'ormonoterapia è in grado di ridurre il rischio di recidiva e di morte. Per la paziente in età premenopausale, sono disponibili diverse opzioni terapeutiche (tamoxifene +/- soppressione ovarica oppure soppressione ovarica + inibitore dell'aromatasi) e la scelta dipende dal profilo di rischio individuale, valutato in relazione alle caratteristiche tumorali (dimensione del tumore primitivo, entità del coinvolgimento linfonodale, grado istologico, livello di espressione di ER/PgR, indice di proliferazione) e dell'età della paziente; per la paziente in postmenopausa, è generalmente raccomandato l'utilizzo degli inibitori dell'aromatasi (letrozolo, anastrozolo o exemestane), mentre tamoxifene è riservato a condizioni a basso rischio.

Anche nel setting metastatico, per i carcinomi HR+, la terapia ormonale dovrebbe essere utilizzata finché la malattia può essere considerata endocrino-responsiva. In assenza di crisi viscerale o di importante compromissione funzionale d'organo, la terapia ormonale in associazione ad un inibitore delle chinasi ciclina-dipendente (CDK) 4/6 rappresenta la prima opzione di trattamento⁽¹¹⁾. Per le linee successive, possibili opzioni di trattamento sono: i down-regolatori dei recettori estrogenici (SERD) come il Fulvestrant, l'associazione di Everolimus (inibitore di mTOR) con un inibitore dell'aromatasi non steroideo, terapie target in presenza di specifiche alterazioni genetiche (es. Alpelisib nei carcinomi con mutazione di PIK3-CA, riconosciuto meccanismo di resistenza alla terapia ormonale, e PARP-inibitori in pazienti con mutazione germinale di BRCA).⁽¹²⁾ Esaurita la responsività endocrina della neoplasia, anche pazienti con carcinoma mammario HR+/HER2- metastatico sono candidati a linee successive di chemioterapia.

HER2/neu è un recettore transmembrana con attività tirosin-chinasica che si compone di un dominio extracellulare deputato al binding del ligando, un dominio transmembrana e un dominio intracellulare responsabile dell'attivazione di specifiche vie di signaling intracellulari, coinvolte nella regolazione della sopravvivenza e della proliferazione cellulare.⁽¹³⁾ Anche l'espressione di HER2 viene indagata mediante IHC. Lo score 0 corrisponde all'assenza di colorazione nelle cellule esaminate o all'incompleta e lieve colorazione di membrana in $\leq 10\%$ delle cellule tumorali, mentre lo score 1+ corrisponde all'incompleta e lieve colorazione di membrana in $>10\%$ delle cellule tumorali: le neoplasie con score 0-1+ sono considerate HER2 negative. Lo score 2+ si caratterizza per una colorazione di membrana completa, di intensità debole/moderata, presente in $>10\%$ delle cellule neoplastiche; tale score è considerato equivoco e meritevole quindi di approfondimento mediante la ricerca dell'amplificazione del gene ERBB2 tramite ibridazione in situ (ISH) che, se presente, definirà il carcinoma HER2 positivo.⁽¹¹⁾ Infine, lo score 3+ corrisponde ad una colorazione circonferenziale di membrana completa e di elevata intensità in $>10\%$ delle cellule tumorali ed è considerato positivo.⁽¹¹⁾ Si definiscono HER2-low i carcinomi che presentano score IHC 1+ o 2+ in assenza di amplificazione indagata mediante ISH: alcuni nuovi agenti anti-HER2 come il Trastuzumab deruxtecan (T-DXd) si sono mostrati efficaci anche nel trattamento dei tumori HER2-low⁽¹⁴⁾, oltre che dei carcinomi mammari HER2+ e questo è responsabile del crescente interesse nei confronti di tale categoria.⁽¹⁵⁾ L'iperespressione/amplificazione di HER2 è presente in circa il 20% dei carcinomi mammari ed è un riconosciuto fattore prognostico negativo in quanto si associa ad una malattia generalmente più aggressiva, spesso diagnosticata in stadio più avanzato e associata ad un maggiore rischio di metastatizzazione a livello viscerale e cerebrale. La positività per HER2 è anche un fattore predittivo di risposta alle terapie anti-HER2: negli ultimi anni, lo sviluppo di nuove ed efficaci strategie terapeutiche ha determinato un miglioramento prognostico nel sottogruppo di pazienti con carcinomi mammari HER2+.⁽¹⁶⁾ Nell'ambito delle terapie anti-HER2 rientrano: l'anticorpo monoclonale Trastuzumab, utilizzato in monoterapia nel setting (neo)adiuvante e in associazione a Pertuzumab (doppio blocco anti-HER2)

nel trattamento adiuvante di pazienti ad elevato rischio di recidiva nonché nella terapia di prima linea della malattia inoperabile/metastatica; nelle linee successive, ci si avvale dei coniugati anticorpo-farmaco Trastuzumab emtansine (T-DM1) e T-DXd e di terapie di associazione tra chemioterapia e inibitori delle tirosin-chinasi (TKI), come Lapatinib e Tucatinib.⁽¹¹⁾

I carcinomi triplo negativi (TN, 10-15% dei carcinomi mammari), infine, sono caratterizzati dalla mancata espressione dei recettori ormonali e di HER2 e, pertanto, non sono candidabili né a trattamento endocrino né a terapie anti-HER2. Per queste neoplasie, il principale trattamento ad oggi disponibile resta una sequenza di trattamenti chemioterapici, sebbene negli ultimi anni si siano individuate anche nuove opzioni terapeutiche. Infatti, un anticorpo farmaco coniugato anti-Trop2, Sacituzumab govitecan, è stato da poco approvato e rimborsato in pazienti con carcinoma mammario triplo-negativo metastatico/non resecabile pretrattato (≥ 2 linee precedenti). Inoltre, alcuni sottogruppi di pazienti con carcinoma mammario triplo negativo metastatico possono beneficiare di inibitori dei checkpoint immunitari (Atezolizumab in associazione a Nab-Paclitaxel per tumori con espressione di PD-L1 $\geq 1\%$) o di inibitori di PARP (nei pazienti con mutazioni germinali patogenetiche di BRCA1/BRCA2).⁽¹⁷⁾ La combinazione di Pembrolizumab e chemioterapia è anche utilizzata nel setting precoce per il trattamento di pazienti con carcinoma mammario triplo-negativo ad alto rischio, mentre pazienti portatori di mutazioni BRCA1/2 ed ad alto rischio di recidiva possono anche essere candidati a trattamento adiuvante con olaparib (un PARP inibitore).

1.1.4 - Sottotipi molecolari intrinseci e significato clinico

L'analisi del profilo di espressione genica dei carcinomi mammari ha permesso l'individuazione di quattro sottotipi molecolari intrinseci distinti: Luminal A, Luminal B, HER2-enriched e basal-like.⁽¹⁸⁾ Un quinto sottotipo, il normal-like, dal significato clinico ancora indeterminato, identificato dall'alta espressione di marcatori di cellule epiteliali basali e adipociti, in assenza di marcatori tipici delle cellule epiteliali luminali⁽¹⁹⁾, è ritenuto da

alcuni ricercatori un artefatto da contaminazione del campione tumorale con tessuto mammario sano.⁽²⁰⁾

Il sottotipo molecolare intrinseco, inizialmente identificato mediante lo studio dell'espressione di un elevato numero di geni, può essere identificato attraverso la valutazione di 50 geni mediante l'algoritmo PAM50 (Prediction Analysis of Microarray). Questi 50 geni sono stati selezionati da un campione più esteso, inizialmente composto da 161 geni, valutati utilizzando tecniche di qReal Time-PCR su 279 campioni istologici di carcinoma mammario. Il sottotipo intrinseco definito da PAM50 si è dimostrato essere un indicatore prognostico più efficace delle variabili cliniche note quali dimensioni del tumore primario, grado istologico e stato dei recettori ormonali: il miglior modello prognostico si compone quindi del sottotipo intrinseco in aggiunta ai parametri già considerati, quali stadiazione patologica laddove disponibile o, nel setting neoadiuvante, stadio clinico, grado istologico e stato dei recettori ormonali e di HER2.⁽²⁰⁾

I sottotipi molecolari individuati si sovrappongono parzialmente a quelli definiti dalla classificazione clinica mediante IHC e FISH, con un tasso di discordanza tra le due classificazioni di circa il 33%.⁽²¹⁾ Il sottotipo Luminal A si caratterizza per una marcata espressione dei geni correlati al pathway dei recettori estrogenici e una bassa espressione di geni correlati alla proliferazione cellulare. Rispetto al sottotipo Luminal B, presenta più spesso mutazioni dei geni PIK3CA e MAP3K1 e un ridotto tasso di mutazioni di TP53.⁽²²⁾ È associato ad una buona prognosi, con scarsa tendenza a metastatizzare a livello viscerale e cerebrale (la più frequente sede di metastatizzazione a distanza è rappresentata dall'osso).

Il sottotipo Luminal B, rispetto al Luminal A, si caratterizza sempre per una marcata espressione dei geni correlati al pathway dei recettori estrogenici a cui si associa tuttavia una maggior espressione di geni correlati alla proliferazione, inclusi CCNB1, MKI67 e MYBL2. Queste neoplasie possono, più frequentemente delle neoplasie Luminal A, sovraesprimere HER2.⁽²³⁾ Complessivamente hanno un fenotipo più aggressivo e prognosi peggiore rispetto al sottotipo Luminal A.

Il sottotipo HER2-enriched (12-20%) è caratterizzato da una marcata espressione di HER2, dei geni correlati con il pathway di HER2 e di proliferazione cellulare, mentre presenta una più bassa espressione delle pathways legate ai recettori ormonali;⁽²⁴⁾ presenta, inoltre, il maggior numero di mutazioni genomiche, in particolare a carico di TP53 e PIK3CA.

Il sottotipo basal-like (15-20%) è caratterizzato da un'elevata espressione di geni proliferativi e di citocheratine normalmente espresse da cellule epiteliali basali, quali citocheratine 5, 14 e 17.⁽²⁵⁾

I sottotipi HER2-enriched e basal-like sono quelli più frequentemente associati a metastasi cerebrali e viscerali e presentano una prognosi peggiore rispetto ai sottotipi luminali.⁽²⁶⁾

1.2 - Metastasi cerebrali

1.2.1 – Incidenza e valutazione prognostica

Il carcinoma mammario è, dopo il carcinoma polmonare, il secondo tumore solido che più comunemente dà origine a metastasi cerebrali⁽²⁷⁾: si stima infatti che circa il 30% delle pazienti affette da carcinoma mammario metastatico svilupperà secondarismi a livello del sistema nervoso centrale (SNC) nel corso della malattia.⁽²⁸⁾ Generalmente, esse rappresentano un evento tardivo nella storia clinica dei pazienti.⁽²⁹⁾

I fattori di rischio riconosciuti per la comparsa di metastasi cerebrali in pazienti con carcinoma mammario sono: età alla diagnosi <40 anni, assenza di espressione dei recettori ormonali, sottotipo triplo-negativo o HER2+, elevato grading istologico e breve intervallo libero da malattia tra la diagnosi del tumore primitivo e la diffusione metastatica.⁽³⁰⁾

Esistono significative differenze in termini di incidenza, cinetica e prognosi delle metastasi cerebrali a seconda del sottotipo di carcinoma mammario: le metastasi cerebrali si verificano nel 35-50% dei pazienti con carcinoma

mammario metastatico HER2+, in circa il 30-40% dei pazienti con carcinoma mammario triplo-negativo metastatico, mentre sono presenti in una percentuale significativamente minore di pazienti con carcinoma mammario metastatico HR+/HER2- (fino ad un massimo di 15-20% a seconda delle casistiche)⁽²⁹⁾. Inoltre, l'assenza di espressione dei recettori ormonali si associa ad un ridotto intervallo tra prima diagnosi di carcinoma mammario e prima comparsa di metastasi cerebrali.⁽³¹⁾

Un'importante differenza tra il carcinoma mammario HER2+ ed il carcinoma mammario triplo-negativo riguarda il controllo della malattia extracranica al momento della diagnosi di metastasi cerebrali: generalmente, nei pazienti con carcinoma mammario triplo-negativo le metastasi cerebrali si sviluppano contestualmente ad una progressione di malattia anche in altre sedi metastatiche extracraniche, mentre nei pazienti con carcinoma mammario HER2+ si osservano spesso metastasi cerebrali in presenza di un controllo extracranico di malattia.⁽³⁰⁾ Alcuni studi hanno riportato come, nei pazienti con carcinoma mammario HER2+, l'incidenza di metastasi cerebrali sembra aumentare nelle pazienti trattate con trastuzumab nel setting adiuvante o metastatico: ciò potrebbe essere correlato ad un miglior controllo sistemico di malattia ottenuto con Trastuzumab che non è in grado, tuttavia, di intervenire efficacemente sulla malattia micrometastatica a livello cerebrale, dove la presenza della barriera emato-encefalica (BEE) limita la diffusione del farmaco.⁽²⁹⁾

La comparsa di metastasi cerebrali nel corso della malattia determina, ancora oggi, un drastico peggioramento della prognosi, rispetto ai pazienti che non presentano coinvolgimento cerebrale noto.⁽³²⁾ Nella casistica real-world francesce ESME, le pazienti con metastasi cerebrali da carcinoma mammario HR+/HER2+ raggiungono sopravvivenze mediane significativamente più lunghe (circa 19 mesi), mentre le pazienti con metastasi cerebrali da carcinoma mammario HR-/HER2- rappresentano il sottogruppo di pazienti a prognosi peggiore, con una mediana di sopravvivenza di 4.4 mesi.⁽²⁹⁾

Sono stati identificati diversi fattori che permettono di identificare sottogruppi di pazienti con metastasi cerebrali da carcinoma mammario a diversa prognosi: il sottotipo biologico del carcinoma mammario, il

performance status secondo la scala di Karnofsky (KPS), il numero di metastasi cerebrali, il controllo della malattia extracranica, la presenza di metastasi meninee.⁽³²⁾

I fattori prognostici possono essere tra loro combinati in score prognostici, tra cui i più utilizzati sono RPA (Recursive Partitioning Analysis) e Breast-GPA (Graded Prognostic Assessment), poi evolutosi in Modified Breast-GPA (MB-GPA).⁽³³⁾ Rispetto al Breast-GPA che considera età, KPS e sottotipo biologico del carcinoma mammario, nella versione modificata si tiene conto anche del numero di metastasi cerebrali. Tutti i fattori considerati nel MB-GPA sono associati alla sopravvivenza globale⁽³⁴⁾, motivo per il quale rappresenta uno strumento molto utile sia per stratificare il rischio del paziente, sia per supportare il clinico nel processo di scelta terapeutica.

1.2.2 - Segni e sintomi

Le metastasi cerebrali da carcinoma mammario presentano una tipica distribuzione a livello cerebrale: circa l'80% si localizza a livello degli emisferi cerebrali, il 15% coinvolge il cervelletto ed il restante 5% circa si localizza a livello del tronco encefalico.⁽³⁵⁾

Le principali manifestazioni cliniche derivano dalla compressione del tessuto cerebrale circostante, con lo sviluppo di sintomatologia focale che varia a seconda del sito coinvolto, e dell'aumento conseguente della pressione intracranica. I sintomi più frequenti sono: cefalea, nausea, vomito, crisi comiziali, vertigini, paralisi periferiche, convulsioni, alterazioni della vista e compromissioni del linguaggio. Quando particolarmente severi, i sintomi possono impattare drasticamente sulla qualità di vita e, talvolta, ostacolare la prosecuzione della terapia antitumorale⁽²⁸⁾, oltre a dare importanti deficit cognitivi, sensoriali e neurologici.⁽³⁶⁾

La condizione più frequente è il riscontro di multiple metastasi sincrone, mentre solo una paziente su tre ha una singola metastasi; in circa il 10-20% dei casi, si riscontra un concomitante coinvolgimento leptomeningeo.⁽³⁶⁾ Un altro possibile sito di metastatizzazione a livello del SNC, seppur molto più

raro dei precedenti, è rappresentato dalla formazione di metastasi durali intracraniche e di metastasi intramidollari.

1.2.3 – Diagnosi

L'iter diagnostico in pazienti con sospetto di metastasi cerebrali da carcinoma mammario si fonda principalmente sui dati clinici e sull'imaging.⁽³⁷⁾ Nel 70% dei casi la diagnosi sopraggiunge in seguito al sospetto clinico derivante dalla comparsa di sintomatologia suggestiva, mentre nel 30% dei casi il riscontro è incidentale in corso di imaging cerebrale effettuato a scopo di screening nelle pazienti considerate a maggior rischio, ma asintomatiche.⁽³⁰⁾ Ad oggi, le linee guida internazionali non raccomandano univocamente l'esecuzione periodica di esami di imaging cerebrale in tutte le pazienti, in quanto con i dati disponibili non è dimostrato un chiaro beneficio; tuttavia, lo screening per metastasi cerebrali mediante imaging in pazienti asintomatici può essere preso in considerazione in pazienti con carcinoma mammario metastatico HER2+ e triplo negativo.⁽³⁸⁾

La risonanza magnetica (RM) con mezzo di contrasto è attualmente il gold standard diagnostico per pazienti con sospette metastasi cerebrali, in quanto più sensibile nella rilevazione delle metastasi cerebrali e superiore nella distinzione tra lesioni secondarie e tumori primitivi rispetto alle altre tecniche di imaging. La tomografia computerizzata (TC) è utilizzata principalmente in presenza di sintomatologia cerebrale acuta o in caso di controindicazioni alla risonanza.

L'utilizzo della tomografia a emissione di positroni (PET) e della PET/TC è limitato dal fatto che, fisiologicamente, il glucosio è la principale fonte energetica del SNC; inoltre, l'infiammazione indotta dal trattamento e altri stati flogistici determinano la captazione del tracciante fluorodeossiglucosio (FDG), limitando ulteriormente la specificità dell'esame in questione.⁽³⁷⁾

1.2.4 – Trattamento delle metastasi cerebrali da carcinoma mammario

Il trattamento delle metastasi cerebrali da carcinoma mammario necessita di un approccio multidisciplinare generalmente basato sull'integrazione di trattamenti locali (chirurgia e/o radioterapia) e trattamenti sistemici (terapia ormonale, chemioterapia e/o terapia a bersaglio molecolare).

1.2.4.1 – Chirurgia

La chirurgia è la terapia di prima scelta per pazienti in condizioni ottimali (PS conservato) che presentino lesioni singole in assenza di malattia extracranica o con malattia extracranica ben controllata, lesioni >3 cm e/o fortemente sintomatiche, metastasi della fossa cranica posteriore (in relazione al rischio di idrocefalo ostruttivo), lesioni cistiche o necrotiche (caratteristiche che generalmente si associano ad una minore responsività alla radioterapia).⁽³⁸⁾ L'intervento chirurgico è generalmente seguito dalla radioterapia stereotassica su cavo chirurgico, che riduce il rischio di recidiva locale.⁽³⁰⁾ Gli obiettivi principali del trattamento chirurgico sono: l'ottenimento di tessuto ai fini di una corretta diagnosi istologica, la rapida riduzione dell'effetto massa ed il miglioramento dell'edema perilesionale al fine di migliorare rapidamente la sintomatologia del paziente.⁽³⁵⁾

1.2.4.2 – Radioterapia

La radioterapia (RT) è il trattamento locale di scelta delle metastasi cerebrali laddove non sussistano le indicazioni per la resezione chirurgica, ad esempio in caso di lesioni piccole e asintomatiche o chirurgicamente non accessibili. Essa può essere svolta secondo diverse modalità a seconda dell'estensione dell'area trattata: la radioterapia stereotassica (SRS), a differenza della RT panencefalica o whole-brain (WBRT), concentra l'irradiazione ad aree cerebrali circoscritte, in modo da aumentare le radiazioni dirette al tessuto tumorale minimizzando il danno al parenchima sano circostante. Sebbene le

due modalità siano equivalenti in termini di sopravvivenza globale, è preferibile, laddove possibile, l'utilizzo di SRS per limitare gli effetti collaterali neurocognitivi della WBRT.⁽³⁸⁾ In generale, l'impiego di SRS è indicato in pazienti con un numero di metastasi cerebrali inferiore a 10 ed un volume tumorale complessivo non superiore a 15 ml.⁽³⁸⁾

La WBRT è indicata in pazienti con multiple lesioni cerebrali (>10) o pazienti che, già sottoposti a SRS, sviluppano nuove lesioni su cui il trattamento stereotassico non può più essere applicato. L'hippocampal avoidance WBRT (HA-WBRT) è una moderna tecnica di WBRT che, escludendo dal campo di irradiazione i neuroni ippocampali deputati alla formazione di nuovi ricordi, limita il deterioramento delle funzioni cognitive radio-indotto.⁽³⁰⁾ L'aggiunta di WBRT a pazienti trattate con SRS o sottoposte a resezione chirurgica non è raccomandata in quanto non influenza la sopravvivenza a fronte di maggiori effetti collaterali. In pazienti con multiple metastasi cerebrali, scarso PS e prognosi scadente è indicata la sola terapia di supporto.⁽³⁸⁾

1.2.4.3 – Terapia sistemica e ruolo della barriera ematoencefalica

L'efficacia di una qualsiasi terapia sistemica nel trattamento delle metastasi cerebrali è influenzata dalla presenza della barriera emato-encefalica (BEE) che, così come può opporsi al passaggio di sostanze tossiche verso il sistema nervoso centrale, può anche limitare la diffusione dei farmaci. Tuttavia, è recentemente emerso come, a seguito del processo di metastatizzazione e del processo neo-angiogenetico che accompagna la crescita neoplastica con formazione di vasi aberranti, la normale BEE venga indebolita divenendo più permeabile anche ai farmaci (concetto di barriera emato-tumorale, BET).⁽³⁹⁾ Questo potrebbe spiegare il risultato di alcuni studi che mostrano come la concentrazione del farmaco raggiunta a livello cerebrale possa in alcuni casi essere simile a quella ottenibile negli altri siti di malattia⁽⁴⁰⁾ e giustificare il fatto che la barriera emato-tumorale sia maggiormente permeabile ai chemioterapici in presenza di macrometastasi con intensa neovascolarizzazione rispetto alle micrometastasi o lesioni meno vascolarizzate.⁽³⁰⁾

Nell'ambito del trattamento sistemico, diversi agenti chemioterapici come capecitabina, ciclofosfamide, gemcitabina, vinorelbina, 5-fluorouracile e cisplatino, si sono dimostrati attivi nella terapia delle metastasi cerebrali con tassi di risposta superiori al 30%.⁽³⁰⁾ Nei pazienti con carcinoma mammario HR+/HER2- può essere utilizzata l'ormonoterapia, a fronte tuttavia di un'efficacia limitata. Per quanto riguarda i CDK 4/6 inibitori, l'attività intracranica di Abemaciclib è stata dimostrata in uno studio di fase II che ha tuttavia evidenziato tassi di risposta intracranica piuttosto limitati di circa 5.2% ed un beneficio clinico nel 25% dei pazienti.⁽⁴¹⁾ Un'analisi di sottogruppo di uno studio di fase IIIb ha inoltre dimostrato la sicurezza e l'efficacia di Ribociclib in combinazione con Letrozolo in pazienti con metastasi cerebrali.⁽⁴²⁾

Per i pazienti con carcinomi mammari HER2+ sono disponibili più opzioni terapeutiche con dimostrata attività intracranica, e la scelta tra queste si basa principalmente sul quadro clinico e sullo stato della malattia extracranica alla comparsa e alla progressione delle metastasi cerebrali. Laddove il sistema nervoso centrale risulti la prima e unica localizzazione di malattia metastatica, la terapia sistemica può essere utilizzata in aggiunta al trattamento locale, tipicamente con la combinazione di trastuzumab ± pertuzumab, sebbene i dati a sostegno di tale opzione siano molto limitati.⁽⁴³⁾ Nel caso di malattia metastatica extracranica stabile in cui si verifichi una limitata progressione delle sole lesioni cerebrali, non sussiste attualmente indicazione alla modifica della terapia sistemica dopo trattamento locale della sede di progressione; tuttavia, in caso di ulteriore progressione cerebrale, soprattutto se dopo un breve intervallo di tempo dal precedente trattamento locale, è possibile modificare il trattamento sistemico al fine di contenere la malattia anche a livello cerebrale. Le opzioni terapeutiche dimostrate efficaci in tale contesto sono diverse, in quanto risultati promettenti sono stati raggiunti con l'impiego di TKI anti-HER2 quali lapatinib, neratinib e tucatinib e di coniugati anticorpo-farmaco quali trastuzumab emtansine e trastuzumab deruxtecan.

Tra i diversi TKI, lapatinib è stato il primo a trovare riscontro nel trattamento di metastasi cerebrali da carcinoma mammario metastatico HER2+: tra le

varie strategie terapeutiche, anche di combinazione, un ruolo preponderante è stato infatti in passato rivestito dall'associazione di lapatinib e capecitabina. Tale regime terapeutico, indagato sia in pazienti con metastasi cerebrali precedentemente trattate con radioterapia che in pazienti con metastasi cerebrali non precedentemente trattate con terapia locale ha dimostrato un significativo tasso di risposta a livello intracranico.⁽⁴⁴⁾

In seguito sono andati accumulandosi dati relativamente all'attività cerebrale anche di altre strategie terapeutiche anti-HER2 basate sull'impiego di coniugati anticorpo-farmaco come trastuzumab emtansine. In particolare, nello studio EMILIA, l'impiego di trastuzumab emtansine rispetto a lapatinib e capecitabina in pazienti con carcinoma metastatico HER2+ in precedenza trattate con l'associazione di trastuzumab e un taxano si è associato ad una maggior sopravvivenza globale mediana anche nel sottogruppo di pazienti che presentavano metastasi cerebrali all'inizio del trattamento.⁽⁴⁶⁾ Una analisi di sottogruppo dello studio di fase IIIb KAMILLA ha inoltre dimostrato che trastuzumab emtansine è in grado di indurre un tasso elevato di risposte intracraniche anche in pazienti con metastasi cerebrali non precedentemente trattate con radioterapia.⁽⁴⁷⁾

Più recentemente sono stati sviluppati TKI di nuova generazione. Tra questi neratinib, in associazione a capecitabina, ha dimostrato essere in grado di determinare una riduzione volumetrica della malattia in sede cerebrale nel 49% dei pazienti non precedentemente trattati con lapatinib e nel 33% dei pazienti pre-trattati con lapatinib.⁽⁴⁹⁾ L'utilizzo di tale farmaco è ad oggi limitato da un profilo di tossicità non completamente maneggevole tanto che non è stato registrato da EMA per pazienti con carcinoma mammario HER2+ metastatico.

Tucatinib invece è un TKI selettivo nei confronti di HER2, caratteristica che lo rende meglio tollerato rispetto a lapatinib e neratinib. Il suo utilizzo è stato valutato dallo studio di fase III HER2CLIMB, in cui la combinazione di tucatinib con capecitabina e trastuzumab è stata confrontata con i trattamenti con soli capecitabina e trastuzumab. La popolazione si componeva di pazienti con carcinoma mammario metastatico HER2+ precedentemente trattati con trastuzumab-pertuzumab e T-DM1, tra i quali si individuava anche un

sottogruppo di pazienti con metastasi cerebrali attive (non precedentemente trattate con terapia locale o in progressione dopo la terapia locale) asintomatiche al momento del reclutamento nello studio.⁽⁴⁹⁾ L'aggiunta di tucatinib a trastuzumab e capecitabina si associava ad un miglioramento nella sopravvivenza libera da progressione e nella sopravvivenza globale, anche nel sottogruppo di pazienti con metastasi cerebrali attive.⁽⁵⁰⁾

Sebbene non sia stato testato nel contesto di uno studio randomizzato in pazienti con metastasi cerebrali attive, anche il coniugato anticorpo-farmaco trastuzumab deruxtecan ha dimostrato in studi di fase II di piccole dimensioni di essere attivo in pazienti con metastasi cerebrali attive, riuscendo ad ottenere tassi di risposta a livello intracranico superiori al 70%⁽⁵¹⁾.

Limitatamente ai pazienti con mutazioni patogenetiche di BRCA, un'opzione terapeutica è rappresentata dagli inibitori di PARP, Talazoparib ed Olaparib; infatti, dalle analisi di sottogruppo di pazienti con metastasi cerebrali stabili incluse nei rispettivi studi registrativi (EMBRACA e OLYMPIAD), entrambe le molecole hanno dimostrato di migliorare la sopravvivenza libera da progressione.⁽⁵²⁾⁽⁵³⁾ E' rilevante inoltre sottolineare come, in pazienti portatrici di mutazione di BRCA1, il rischio di metastasi cerebrali sembra essere comparabile (anche in presenza di una neoplasia non triplo-negativa) a quello delle pazienti con carcinoma triplo negativo in assenza di mutazioni patogenetiche gBRCA (incidenza cumulativa a 5 anni rispettivamente pari rispettivamente a circa il 39% e 33%).⁽⁵⁴⁾

L'immunoterapia ha, ad oggi, un ruolo limitato nel trattamento delle metastasi cerebrali da carcinoma mammario. Il sistema nervoso centrale potrebbe potenzialmente rappresentare un microambiente "immunologicamente privilegiato". Tuttavia, abbiamo ad oggi dei dati a sostegno dell'utilizzo dell'immunoterapia anche in pazienti con metastasi cerebrali da altre patologie oncologiche. In particolare, sia in pazienti con melanoma che in pazienti con carcinoma polmonare sono state descritte risposte a livello di metastasi cerebrali al trattamento immunoterapico. E' stato ipotizzato inoltre che la SRS, danneggiando le cellule tumorali con conseguente esposizione di antigeni tumorali, potrebbe rendere le metastasi cerebrali più immunogene e, pertanto, più vulnerabili all'attacco da parte del

sistema immunitario, generando l'ipotesi di una possibile sinergia tra radioterapia e immunoterapia, ancora in fase di studio nell'ambito del carcinoma mammario.⁽⁵⁵⁾

1.2.5 – Microambiente tumorale e specificità biologiche delle metastasi cerebrali

Nello sviluppo delle metastasi cerebrali è coinvolta una serie di complesse interazioni tra le cellule neoplastiche e il microambiente tumorale, comprendente cellule gliali, cellule immunitarie e matrice extracellulare.⁽⁵⁶⁾ Una funzione centrale in tale contesto è svolta dagli astrociti i quali influenzano la metastatizzazione contribuendo alla costituzione della BEE, producendo fattori neurotrofici (in particolare gli astrociti A2) che possono stimolare l'apoptosi o, al contrario, la proliferazione cellulare.⁽⁵⁷⁾

Nell'ambito delle metastasi cerebrali da carcinoma mammario, è stata descritta l'iperattivazione di alcune vie di segnalazione cellulare tra cui la via di PI3K-Akt e la via HER2/HER3. In particolare, la pathway PI3K-Akt è stata descritta essere up-regolata in fino al 77% delle metastasi cerebrali da carcinoma mammario⁽⁵⁸⁾ ed esercita un ruolo immunosoppressivo e di promozione della metastatizzazione, inducendo l'espressione di PD-L1, CTLA4, CSF1 (Colony Stimulating Factor) e il suo recettore CSF1R.⁽⁵⁸⁾ L'espressione di PTEN, inibitore di tale via di segnalazione, è persa nel 25% delle metastasi cerebrali da carcinoma mammario, soprattutto di sottotipo triplo negativo⁽⁵⁹⁾; tale downregolazione di PTEN sembra essere selettivamente presente nelle metastasi cerebrali, mentre non è stata riscontrata in uguale misura nelle metastasi extracraniche e potrebbe essere il risultato della regolazione epigenetica secondaria alla produzione di miRNA da parte degli astrociti.⁽⁶⁰⁾ Anche l'espressione di HER3 è stata riportata in alcune casistiche essere aumentata nelle metastasi cerebrali.⁽⁶¹⁾

Il confronto tra le caratteristiche biologiche di campioni di metastasi cerebrali e dei rispettivi tumori primitivi ha evidenziato come frequentemente vi possa

non essere una completa concordanza nell'espressione dei marker immunohistochimici quali ER, PgR e HER2. Ciò è quanto si è osservato in una metanalisi condotta su 1373 pazienti, per 540 dei quali è stata osservata una discordanza in almeno uno dei tre marker indagati (ER, PgR e HER2); le tre condizioni riscontrate più frequentemente nelle metastasi cerebrali sono risultate la perdita dell'espressione di ER (11%), la perdita dell'espressione di PgR (15%) e l'acquisizione dell'espressione di HER2 (9%).

Per quanto riguarda la perdita dell'espressione dei recettori ormonali a livello della metastasi cerebrale, questo potrebbe essere il risultato della selezione cellulare operata dalla terapia ormonale che potrebbe favorire un aumento della prevalenza di cloni metastatici che non esprimono tali recettori; inoltre, la perdita dell'espressione di ER/PgR potrebbe potenzialmente favorire l'*homing* di tali cellule metastatiche a livello cerebrale.

L'acquisizione della positività per HER2 si osserva, invece, in circa il 10% dei casi di metastasi cerebrali (soprattutto nei casi in cui il tumore primitivo presenti score intermedio all'analisi immunohistochimica) con trend opposto rispetto alle sedi metastatiche extracraniche, dove si verifica più spesso la perdita dell'espressione di HER2.⁽⁶²⁾

Sebbene lo studio delle caratteristiche biologiche della malattia metastatica a livello cerebrale sia resa particolarmente complessa dal numero relativamente limitato di casi per i quali vi è disponibilità di materiale biologico, gli studi ad oggi condotti sembrano suggerire che tale sede metastatica possa presentare delle caratteristiche biologiche specifiche rispetto ad altre sedi di malattia metastatica, perlopiù in termini di espressione genica e microambiente immunitario. Più specificatamente, alcuni studi hanno descritto in questa sede metastatica un aumento dell'espressione delle pathway ad attività GTPasica. Uno studio che è andato a valutare l'espressione genica di 184 metastasi di carcinoma mammario da 11 diverse sedi metastatiche ha identificato come l'espressione di 12 geni (CRYAB, NRCAM, FGF1, GDF15, SOX2, GRIN1, RASGRF1, SOX10, CHI3L1, ZIC2, NRXN1, LEFTY2) risultasse significativamente aumentata nelle metastasi cerebrali rispetto ad altre sedi metastatiche, indipendentemente dal sottotipo di carcinoma mammario. Inoltre, rispetto ad altre sedi di

localizzazioni del carcinoma mammario metastatico, le metastasi encefaliche presentavano un minor livello di espressione di geni correlati all'attività del sistema immunitario.⁽⁶³⁾

Tali dati suggeriscono pertanto come il profilo biologico del tumore primitivo e delle metastasi extracraniche potrebbe non sempre rappresentare un valido surrogato per comprendere la biologia delle metastasi cerebrali da carcinoma mammario.⁽⁶²⁾

3. SCOPO DELLO STUDIO

Il significativo impatto prognostico negativo determinato, ancora ad oggi, dalla comparsa di metastasi cerebrali da carcinoma mammario ci spinge alla ricerca di nuove strategie terapeutiche.

Considerata la nota eterogeneità biologica del carcinoma mammario e la possibilità che alcuni aspetti biologici della neoplasia possano dipendere anche dallo specifico sito di metastasi oltre che dalla biologia del tumore primitivo, una conoscenza approfondita della biologia delle metastasi cerebrali potrebbe permettere l'identificazione di caratteristiche biologiche specifiche che potrebbero rappresentare potenziali target terapeutici.

L'obiettivo di questo studio è pertanto quello di descrivere il profilo trascrittomico, mediante analisi di espressione genica, di metastasi cerebrali da carcinoma mammario ed il potenziale impatto prognostico dei diversi profili di espressione genica in una coorte multicentrica di pazienti affetti da metastasi cerebrali da carcinoma mammario sottoposti a intervento neurochirurgico secondo pratica clinica.

4. MATERIALIE METODI

3.1 – Pazienti

Nello studio in esame sono stati retrospettivamente inclusi pazienti con metastasi cerebrali da carcinoma mammario trattati presso tre diversi Istituti; Istituto Oncologico Veneto IRCCS (IOV) di Padova (Italia), Centre Hospitalier Universitaire/Institut du Cancer de Montpellier (CHU/ICM, Francia), Montefiore Medical Center (MMC) di New York (USA) tra il 2003 e il 2019 e sottoposti ad intervento neurochirurgico secondo pratica clinica.

I pazienti arruolati nello studio presentano i seguenti criteri di inclusione:

- età \geq 18 anni
- diagnosi istologica di carcinoma mammario metastatico a livello cerebrale
- disponibilità di campione istologico da archivio di metastasi cerebrali da carcinoma mammario
- disponibilità di dati clinici e dati relativi al follow-up oncologico
- consenso informato ottenuto in forma scritta

Per ciascun paziente sono state analizzate le cartelle cliniche, raccogliendo i seguenti parametri clinici e anatomo-patologici:

- età alla diagnosi di carcinoma mammario e di metastasi cerebrali
- caratteristiche della neoplasia primitiva (istotipo, stadio alla diagnosi, stato dei recettori ormonali e di HER2)
- trattamenti eseguiti per la neoplasia primitiva (tipo di chirurgia mammaria, trattamenti neoadiuvanti/adiuvanti, radioterapia)
- sito della prima recidiva di malattia, presenza di metastasi cerebrali alla prima diagnosi di carcinoma metastatico, durata dell'intervallo di tempo intercorso tra la diagnosi di tumore primitivo e la comparsa di metastasi cerebrali
- numero di lesioni cerebrali, Karnofsky Performance Status, stato della malattia sistemica al momento della diagnosi di metastasi cerebrali
- stato dei recettori ormonali e di HER2 sulla metastasi cerebrale, ottenuto mediante analisi immunoistochimica e ISH laddove necessario secondo linee guida ASCO-CAP
- trattamenti locali e sistemici ricevuti dopo la diagnosi di metastasi cerebrali (sia prima che dopo l'intervento neurochirurgico)
- sopravvivenza dalla diagnosi di carcinoma mammario, dalla diagnosi di metastasi cerebrale e dall'intervento neurochirurgico.

Questo studio è stato approvato dai Comitati Etici (o dall'organismo deputato) di ciascuno dei tre Istituti coinvolti ed è stato condotto in accordo ai principi stabiliti dalla Dichiarazione di Helsinki.

3.2 – Analisi dei campioni

I campioni istologici, disponibili come Formalin-Fixed Paraffin Embedded (FFPE), sono stati inizialmente valutati da un anatomo patologo al fine di confermarne la qualità. Da ogni FFPE ritenuto idoneo, un adeguato numero, calibrato sulla base di cellularità tumorale ed area tumorale, di sezioni di dimensioni pari a 5 µm ciascuna è stato utilizzato per l'estrazione dell'RNA,

effettuata impiegando l'RNeasy FFPE Kit (Qiagen), utilizzato secondo le indicazioni fornite dal produttore.

Sono state poi valutate la concentrazione e la qualità del materiale ottenuto, mediante analisi con Nanodrop 100 Spettrofotometer, QubitTM RNA HS Assay Kit on Qubit fluorometer 1.0 e TapeStation 4200. L'analisi è stata volta ad assicurare la sussistenza dei requisiti necessari in termini di purezza e concentrazione del materiale genetico estratto al fine di poter procedere alla successiva analisi dei profili di espressione genica mediante nCounter.

Nei campioni rispettanti tali requisiti si è successivamente proceduto all'analisi dell'espressione genica, condotta utilizzando il pannello Breast Cancer 360 su una piattaforma nCounter (NanoString Technologies), secondo manuale del produttore. Tale pannello include 758 geni identificati come rilevanti per la biologia del carcinoma mammario, 18 geni costitutivi (o *housekeeping*) necessari alla normalizzazione dei dati, 6 controlli positivi e 8 controlli negativi. Come da manuale del produttore, dopo la verifica dei parametri di qualità, l'RNA è stato ibridizzato con le sonde per i geni target per un intervallo di tempo di 17 ore a temperatura pari a 65°C, ed in seguito processato utilizzando il sistema di analisi nCounter. I dati ottenuti sono stati quindi normalizzati e Log (2) trasformati.

Il sottotipo molecolare intrinseco di ciascun campione è stato identificato mediante applicazione dell'algoritmo PAM50 precedentemente pubblicato.⁽²⁰⁾

3.3 – Analisi statistica

Le caratteristiche demografiche e clinico-patologiche dei pazienti sono state analizzate mediante statistiche descrittive; per le variabili continue, come l'età, sono stati calcolati mediana e intervallo di valori (massimo e minimo).

Ai fini dell'analisi statistica, è stato utilizzato come sottotipo di carcinoma mammario di riferimento per ciascun paziente quello determinato sulla metastasi cerebrale.

La sopravvivenza globale dall'intervento neurochirurgico è stata definita come l'intervallo di tempo intercorso tra l'intervento neurochirurgico e il decesso o l'ultima visita di follow up. Tale parametro è stato stimato utilizzando il metodo di Kaplan Meier, riportandone la mediana e l'intervallo di confidenza fissato al 95% (95% CI). Per tale analisi, il dato delle pazienti ancora in vita al momento della valutazione è stato censorizzato alla data dell'ultimo followup.

Per la valutazione dei fattori prognostici, si è utilizzato un modello di regressione Cox univariato e multivariato, calcolando per ciascun fattore Hazard ratio (HR) ed il rispettivo intervallo di confidenza al 95%. Per tutti i test condotti, il valore di probabilità p (p-value) è stato inteso a due code ed il livello di significatività è stato posto al 5% ($p < 0.05$).

5. RISULTATI

4.1 – Caratteristiche dei pazienti

Lo studio ha reclutato complessivamente 65 pazienti affetti da metastasi cerebrali da carcinoma mammario e sottoposti a intervento neurochirurgico tra il 2003 e il 2019. I soggetti arruolati erano così suddivisi tra i tre Istituti partecipanti: 33 erano stati trattati presso l'Istituto Oncologico Veneto - IRCCS, 16 presso il Montefiore Medical Center di New York e i restanti 16 presso il Centre Hospitalier Universitaire/Institut du Cancer de Montpellier. Tutti i pazienti inclusi nel presente studio erano di sesso femminile.

L'età mediana alla diagnosi di carcinoma mammario è risultata di 44 anni (range 30-77 anni), mentre l'età mediana alla diagnosi di metastasi cerebrali era di 49 anni (range 33-77 anni).

La localizzazione cerebrale di malattia era presente alla diagnosi iniziale di malattia metastatica in 41 pazienti (63%); inoltre, al momento della diagnosi di lesioni cerebrali, 33 pazienti (50.8%) presentavano anche malattia extracranica.

Al momento della diagnosi di metastasi cerebrale, la maggior parte dei pazienti (N= 52, 80.0%) presentava una singola lesione cerebrale, 6 pazienti (9.2%) presentavano due lesioni, mentre i restanti 7 casi (10.8%) presentavano 3 o più metastasi cerebrali. Il Karnofsky Performance Status al momento della diagnosi di metastasi cerebrali era compreso tra 90 e 100 in 20 pazienti (30.8%), tra 70 e 80 in 27 pazienti (41.5%) ed era ≤ 60 in 6 pazienti (9.2%).

L'analisi immunohistochimica dello stato recettoriale delle metastasi cerebrali ha permesso di classificare le metastasi cerebrali in: 19 campioni (29.0%) classificati come HR-/HER2-, 21 (32.0%) classificati come HR+/HER2- ed i restanti 25 (38.0%) categorizzati come HER2+ (**Figura 2A**).

Le principali caratteristiche clinico-patologiche della popolazione oggetto di studio sono mostrate nella **Tabella I**.

Tabella I: Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti alla diagnosi di metastasi cerebrali da carcinoma mammario e trattamenti ricevuti.

		n	%
Sottotipo della metastasi cerebrale	HR-/HER2	19	29.0%
	HR+/HER2-	21	32.0%
	HER2+	25	38.0%
Numero di metastasi cerebrali	1	52	80.0%
	2	6	9.2%
	3 o più	7	10.8%
Karnofsky Performance Status	100-90	20	30.8%
	80-70	27	41.5%
	≤ 60	6	9.2%
Presenza di malattia extracranica alla diagnosi di metastasi cerebrali	Si	33	50.8%
	No	22	33.8%
	NA	10	15.4%
Presenza di metastasi cerebrali al momento della prima diagnosi di carcinoma mammario metastatico	Si	41	63.0%
	No	24	37.0%
Terapia sistemica dopo intervento neurochirurgico	Si	48	73.8%
	No	17	26.2%
Radioterapia dopo intervento neurochirurgico	Si	47	72.3%
	No	18	27.7%

Per quanto riguarda i trattamenti ricevuti dopo la resezione neurochirurgica, 48 pazienti (73.8%) hanno ricevuto una terapia sistemica, mentre 47 (72.3%) un trattamento radiante a livello cerebrale.

4.2 - Sopravvivenza globale e fattori prognostici

Ad un follow up mediano dall'intervento neurochirurgico di 32.5 mesi, 42 pazienti (64.6%) erano deceduti e la sopravvivenza globale mediana dall'intervento chirurgico era di 19.3 mesi (95% CI 14.0-24.6).

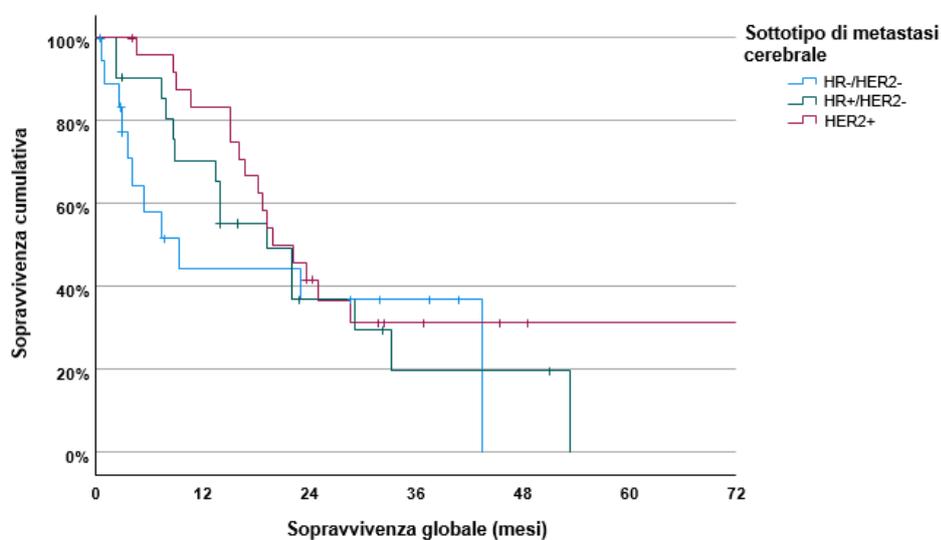
Abbiamo osservato una differenza numerica nella sopravvivenza globale dall'intervento sulla base del sottotipo di carcinoma mammario valutato mediante immunisto chimica sulle metastasi cerebrali: la sopravvivenza globale mediana è stata di 9.4 mesi per pazienti con metastasi cerebrali HR-/HER2-, 19.3 mesi per pazienti con metastasi cerebrali HR+/HER2- e di 20.0 mesi per pazienti con metastasi cerebrali HER2+ (**Figura 1**). Tuttavia, tale differenza non è risultata statisticamente significativa ($p=0.43$).

Siamo quindi andati a valutare nella nostra casistica, mediante un modello di Cox univariato, l'impatto prognostico di altri fattori prognostici noti in pazienti affetti da metastasi cerebrali da carcinoma mammario, quali numero di metastasi cerebrali (p globale del modello=0.371), Karnofsky Performance Status alla diagnosi di metastasi cerebrali (p globale del modello=0.053) e la presenza di malattia extracranica alla diagnosi di metastasi cerebrali (p globale del modello=0.611) (**Tabella II**). Tuttavia, nessuno di questi fattori ha dimostrato un impatto prognostico significativo nella nostra coorte di pazienti, sebbene per il Karnofsky Performance Status si sia osservato globalmente un impatto borderline ($p=0.053$) e, come atteso, pazienti con scadente Performance Status (60 o meno) presentavano una sopravvivenza inferiore rispetto a pazienti con Performance Status conservato (90-100; $p=0.030$).

Tabella II: Modello di Cox univariato di associazione tra fattori prognostici noti e sopravvivenza globale.

	OS mediana (95%CI)	HR (95% CI)	p-value
Sottotipo immunoistochimico sulla metastasi cerebrale			
HR-/HER2-	9.4 (2.2-16.6)	ref	ref
HR+/HER2-	19.3 (9.4-29.2)	0.863 (0.393 – 1.896)	0.714
HER2+	20.0 (14.1-25.9)	0.619 (0.285 – 1.344)	0.226
Numero di metastasi cerebrali alla diagnosi			
1	18.8 (12.6-25.0)	ref	ref
2	25.0 (14.1-35.9)	0.985 (0.381 – 2.551)	0.976
3	8.7 (3.4-14.0)	1.559 (0.369 – 6.582)	0.545
4 o più	9.0 (0-20.0)	2.509 (0.865 – 7.276)	0.090
Karnofsky Performance Status alla diagnosi			
100 – 90	22.2 (13.2-31.2)	ref	ref
80 – 70	20.0 (5.7-34.3)	0.947 (0.447 – 2.008)	0.888
≤60	8.0 (0.1-15.9)	3.298 (1.126 – 9.660)	0.030
Presenza di malattia extracranica alla diagnosi			
No	25.0 (6.5-43.5)	ref	ref
Si	19.3 (15.3-23.3)	1.199 (0.596-2.414)	0.611

Figura 1: Sopravvivenza globale dall'intervento neurochirurgico, stratificata per sottotipi immunoistochimico valutato sulle metastasi cerebrali.



4.3 - Sottotipi molecolari intrinseci delle metastasi cerebrali

L'analisi del sottotipo molecolare intrinseco secondo l'algoritmo PAM50 ha evidenziato un'alta prevalenza di sottotipi intrinseci non luminali, con il 46% delle metastasi categorizzata come HER2-enriched ed il 37% categorizzata come basal-like. Solo il 15% delle metastasi è stato categorizzato come luminal B e solo il 2% come normal-like. (**Figura 2B**)

Figura 2A: Distribuzione dei sottotipi secondo immunostochimica nella casistica globale.

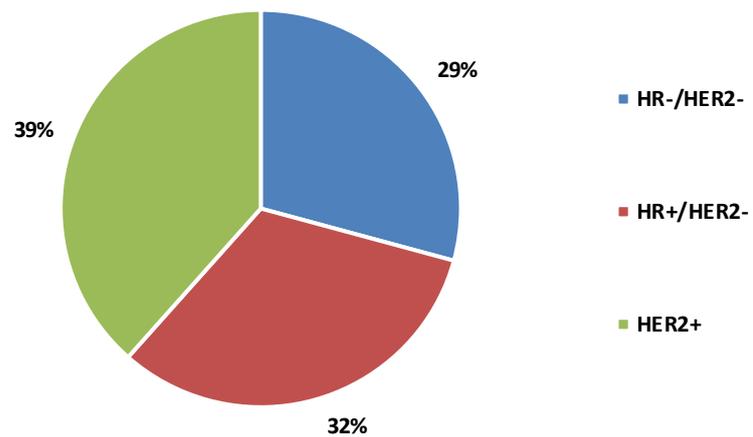
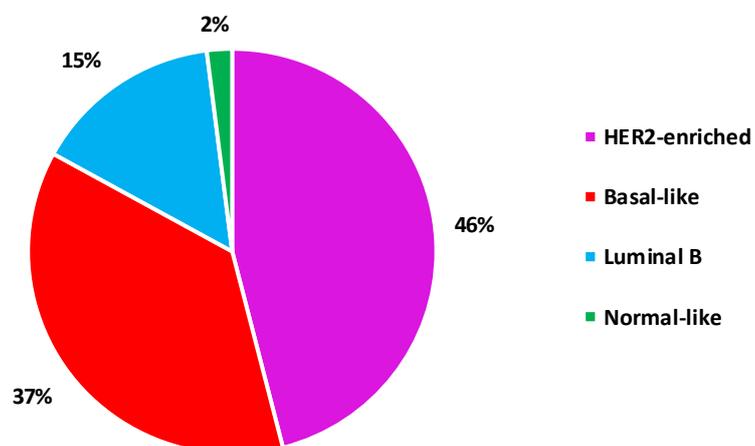


Figura 2B: Distribuzione dei sottotipi molecolari intrinseci nella casistica globale.



Abbiamo quindi valutato separatamente la distribuzione dei sottotipi intrinseci secondo PAM50 in ciascuno dei sottotipi biologici di carcinoma mammario determinati utilizzando l'immunoistochimica e l'arricchimento in sottotipi non-luminali si è evidenziato anche in ciascuno dei diversi sottogruppi di carcinoma mammario separatamente.

In particolare, l'analisi delle metastasi cerebrali HER2+ ha mostrato una predominanza quasi assoluta del sottotipo HER2-enriched, presente nell'84% delle lesioni, seguito dal sottotipo basal-like nel 12% dei casi, ed infine dal sottotipo luminal B in solo il 4% dei casi, mentre non sono stati osservati casi di neoplasie Luminal A. (**Figura 3A**)

Contrariamente a quanto atteso, anche tra le metastasi cerebrali categorizzate come HR+HER2- all'immunoistochimica i sottotipi intrinseci non-luminali sono risultati essere altamente rappresentati (complessivamente più di metà dei casi valutati). Infatti, sebbene il luminal B sia risultato il sottotipo più frequente non superava la metà dei casi (43%), mentre i restanti casi sono stati tipizzati come HER2-enriched (28%), basal-like (24%) e normal-like (5%) sulla base dei profili di espressione genica. (**Figura 3B**)

Infine, per quanto riguarda il sottogruppo HR-/HER2-, il sottotipo molecolare è risultato concorde con il profilo immunoistochimico nella maggior parte dei casi, con l'84% dei casi categorizzati come basal-like e solo il 16% dei casi categorizzati come HER2-enriched. Come atteso, non sono stati osservati campioni categorizzati come luminali sulla base dei profili di espressione genica. (**Figura 3C**)

Figura 3A: Distribuzione dei sottotipi molecolari intrinseci in metastasi cerebrali HER2+.

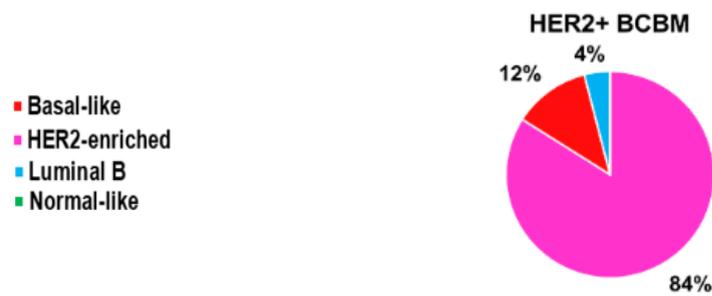


Figura 3B: Distribuzione dei sottotipi molecolari intrinseci in metastasi cerebrali HR+/HER2-.

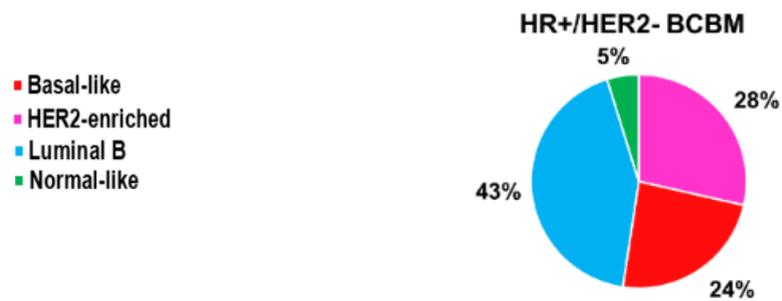


Figura 3C: Distribuzione dei sottotipi molecolari intrinseci in metastasi cerebrali HR-/HER2-.



4.4 – Associazione tra espressione di singoli geni e sopravvivenza globale

Al fine di valutare l'associazione tra l'espressione di singoli geni e la sopravvivenza globale dall'intervento neurochirurgico, è stato applicato un modello di Cox univariato.

Si è osservato come, dei 776 geni valutati, l'espressione di 37 di questi risultava significativamente associata alla sopravvivenza globale ($p < 0.05$) (**Tabella III**). Tra questi, solo l'elevata espressione di LINC02381 è risultata associarsi ad una miglior prognosi, mentre l'elevata espressione dei restanti 36 è risultato associarsi ad una peggior prognosi.

Considerata la possibile associazione tra sottotipo di neoplasia mammaria, differente profilo di espressione genica e prognosi, abbiamo anche generato un modello di Cox multivariato includendo l'espressione di ciascun gene e il sottotipo clinico (HR-/HER2-; HR+/HER2-; HER2+) valutato sulla metastasi cerebrale, al fine di correggere il potenziale impatto prognostico dei geni per il sottotipo di neoplasia mammaria. In tale modello di Cox multivariato, si è confermata una correlazione statisticamente significativa ($p < 0.05$) per 33 dei 36 geni precedentemente identificati (**Tabella IV**).

Tabella III: Analisi univariata dell'associazione tra l'espressione di singoli geni e la sopravvivenza globale dall'intervento neurochirurgico (riportati solo i geni per i quali è stata riscontrata una associazione significativa tra espressione del gene e sopravvivenza globale con $p < 0.05$).

	HR (95% CI)	p-value
ANLN	1.25 (1.01 – 1.54)	0.035
BCL11A	1.16 (1.00 – 1.34)	0.041
BMP2	1.25 (1.02 – 1.55)	0.031
BNIP3	1.42 (1.03 – 1.96)	0.029
CAV1	1.47 (1.13 – 1.92)	0.003
CDH3	1.15 (1.00 – 1.33)	0.044
CDK6	1.38 (1.12 – 1.69)	0.002
CKB	1.27 (1.08 – 1.49)	0.003
CRYAB	1.18 (1.01 – 1.39)	0.032
CXCL12	1.52 (1.06 – 2.17)	0.020
EGFR	1.20 (1.01 – 1.44)	0.038
EYA4	1.23 (1.03 – 1.46)	0.020
FOXC1	1.25 (1.04 – 1.50)	0.016
FZD8	1.26 (1.03 – 1.55)	0.024
FZD9	1.22 (1.03 – 1.43)	0.015
GABRP	1.10 (1.01 – 1.20)	0.026
GAS1	1.37 (1.13 – 1.66)	0.001
GDF5	1.28 (1.05 – 1.55)	0.012
GPC4	1.21 (1.02 – 1.45)	0.027
IL6	1.25 (1.00 – 1.56)	0.043
KRT17	1.10 (1.01 – 1.21)	0.025
KRT5	1.11 (1.01 – 1.23)	0.018
KRT6B	1.17 (1.04 – 1.31)	0.008
KRT7	1.17 (1.02 – 1.33)	0.019
LAMB3	1.22 (1.04 – 1.42)	0.012
LINC02381	0.80 (0.67 – 0.97)	0.026
MYC	1.21 (1.02 – 1.43)	0.025
NOTCH1	1.38 (1.08 – 1.76)	0.009
PCNA	1.33 (1.02 – 1.75)	0.032
POLD1	1.42 (1.02 – 1.96)	0.034
PRKX	1.52 (1.13 – 2.06)	0.005
PSAT1	1.20 (1.02 – 1.41)	0.025
RUNX3	1.38 (1.08 – 1.77)	0.008
SFRP1	1.12 (1.00 – 1.26)	0.035
SNAI1	1.39 (1.04 – 1.84)	0.023
SPRY2	1.28 (1.00 – 1.63)	0.044
TTYH1	1.21 (1.05 – 1.40)	0.007

Tabella IV: Analisi multivariata dell'associazione tra l'espressione di singoli geni e la sopravvivenza globale dall'intervento neurochirurgico, corretta per sottotipo immunohistochimico della metastasi cerebrale (riportati i geni per i quali è stata riscontrata all'analisi univariata una associazione significativa tra espressione del gene e sopravvivenza globale con $p < 0.05$).

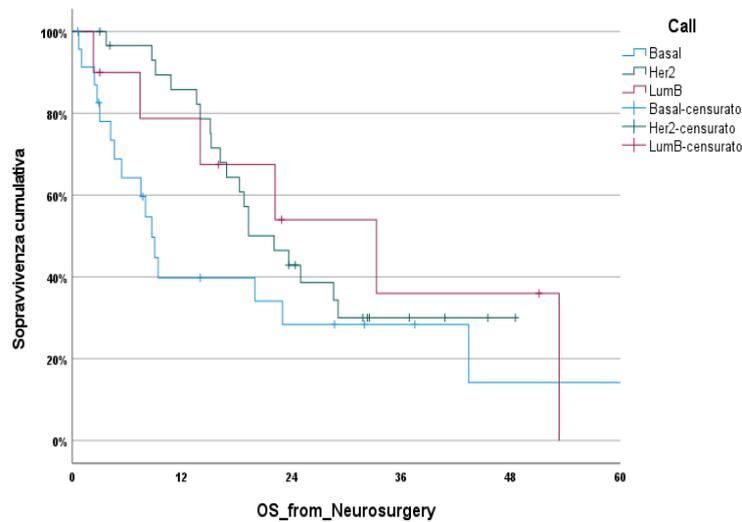
	HR (95% CI)	p-value
ANLN	1.23 (0.96 – 1.57)	0.094
BCL11A	1.20 (1.01 – 1.42)	0.033
BMP2	1.24 (1.01 – 1.54)	0.039
BNIP3	1.45 (1.05 – 2.01)	0.021
CAV1	1.54 (1.16 – 2.06)	0.002
CDH3	1.17 (1.00 – 1.36)	0.042
CDK6	1.45 (1.15 – 1.84)	0.001
CKB	1.28 (1.08 – 1.50)	0.002
CRYAB	1.19 (1.01 – 1.40)	0.036
CXCL12	1.52 (1.06 – 2.18)	0.021
EGFR	1.26 (1.03 – 1.54)	0.023
EYA4	1.26 (1.04 – 1.51)	0.013
FOXC1	1.25 (1.00 – 1.55)	0.044
FZD8	1.26 (1.02 – 1.56)	0.030
FZD9	1.21 (1.02 – 1.44)	0.026
GABRP	1.12 (1.00 – 1.25)	0.046
GAS1	1.38 (1.11 – 1.70)	0.002
GDF5	1.27 (1.05 – 1.55)	0.013
GPC4	1.27 (1.06 – 1.53)	0.007
IL6	1.26 (1.00 – 1.58)	0.040
KRT17	1.13 (1.01 – 1.27)	0.030
KRT5	1.14 (1.01 – 1.27)	0.021
KRT6B	1.20 (1.04 – 1.38)	0.009
KRT7	1.24 (1.08 – 1.43)	0.002
LAMB3	1.23 (1.03 – 1.47)	0.019
LINC02381	0.79 (0.65 – 0.96)	0.023
MYC	1.19 (1.00 – 1.41)	0.040
NOTCH1	1.35 (1.04 – 1.75)	0.021
PCNA	1.28 (0.98 – 1.67)	0.061
POLD1	1.35 (0.98 – 1.85)	0.063
PRKX	1.48 (1.08 – 2.03)	0.012
PSAT1	1.24 (1.04 – 1.48)	0.013
RUNX3	1.41 (1.09 – 1.81)	0.007
SFRP1	1.13 (0.98 – 1.29)	0.074
SNAI1	1.42 (1.05 – 1.90)	0.020
SPRY2	1.35 (1.05 – 1.74)	0.017
TTYH1	1.22 (1.06 – 1.41)	0.005

4.5 – Associazione tra sottotipi intrinseci del carcinoma mammario e sopravvivenza globale

Si è quindi andati a valutare l'associazione tra il sottotipo intrinseco valutato mediante espressione genica e la sopravvivenza globale dall'intervento neurochirurgico.

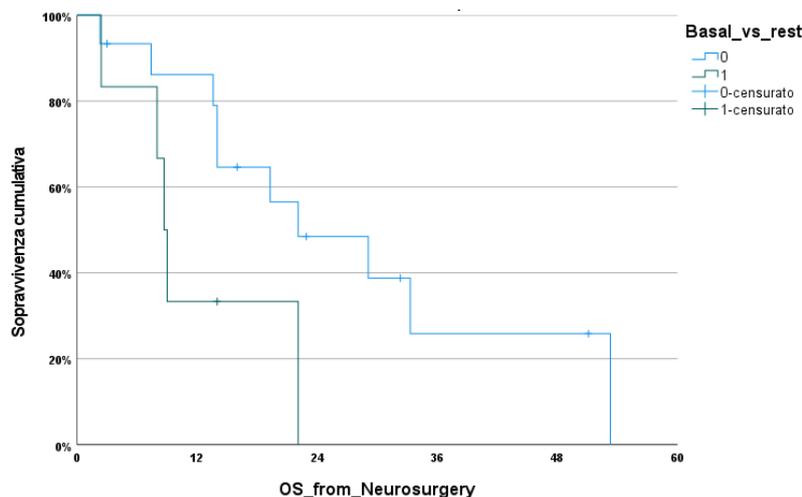
Considerando l'intera coorte dello studio, la sopravvivenza globale mediana dall'intervento neurochirurgico è stata di 19.3 mesi (95% CI 13.20 – 25.40). Abbiamo osservato una differenza numerica nella sopravvivenza globale dall'intervento sulla base del sottotipo intrinseco di carcinoma mammario valutato mediante gene-expression analysis: la sopravvivenza globale mediana è stata di 8.7 mesi (95% CI 6.57 – 10.83) per pazienti con metastasi cerebrali basal-like, pari a 22.10 mesi (95% CI 15.77 – 28.43) per pazienti con metastasi HER2-enriched ed infine di 33.30 (95% CI 10.86 – 55.74) per pazienti con metastasi luminal B (**Figura 4**). Tale differenza non è risultata statisticamente significativa ($p=0.236$), tuttavia è stato osservato un trend verso una peggior prognosi per i pazienti le cui metastasi cerebrali presentavano un sottotipo basal-like rispetto agli altri sottotipi ($p=0.089$).

Figura 4: Sopravvivenza globale dall'intervento neurochirurgico, stratificata per sottotipo intrinseco valutato sulle metastasi cerebrali (il sottotipo normal-like non è stato riportato in quanto presente in solo un caso).



L'impatto prognostico negativo del sottotipo basal-like si è osservato in particolar modo nel sottogruppo di pazienti con metastasi HR+/HER2-. In tale sottogruppo di pazienti, i pazienti con metastasi cerebrali basal-like presentavano una mediana di sopravvivenza globale pari di 8.7 mesi (95% CI 7.5-9.9), simile a quanto riscontrato in pazienti con metastasi cerebrali HR-/HER2-, mentre pazienti con altro sottotipo presentavano una mediana di sopravvivenza globale pari di 22.1 mesi (95% CI 7.2-37.0) (log-rank $p=0.056$). (**Figura 5**)

Figura 5: Sopravvivenza globale dall'intervento neurochirurgico nelle metastasi basal-like rispetto a metastasi HER2-enriched e luminal B, nel sottogruppo di pazienti con metastasi HR+/HER2-.



4.6 – Associazione tra signature geniche dell’algoritmo PAM50 e sopravvivenza globale

Tenuto conto che il dato precedentemente osservato potrebbe almeno in parte essere impattato al numero relativamente basso di casi di metastasi cerebrali basal-like incluse nella nostra coorte di studio (N=24, 37%), siamo quindi andati a valutare in maniera più approfondita l’associazione tra l’espressione delle signature del PAM50 (variabili continue) e la sopravvivenza globale dall’intervento neurochirurgico mediante un modello di Cox univariato.

Tale analisi ha permesso di individuare come una maggior espressione della signature basal-like del PAM50 sia significativamente associata ad una peggior prognosi (HR 2.70, 95% CI 1.01 – 7.17; p=0.046), mentre non è stata osservata una associazione statisticamente significativa tra sopravvivenza globale e le altre signature geniche del PAM50 (**Tabella V**).

Tabella V: Analisi univariata dell'associazione tra le singole signature geniche del PAM50 e la sopravvivenza globale dall'intervento neurochirurgico (HR per incremento unitario di espressione della signature).

	HR (95% CI)	p-value
Basal-like	2.70 (1.01 – 7.17)	0.046
HER2-enriched	0.60 (0.16 – 2.23)	0.452
Luminal A	0.26 (0.05 – 1.21)	0.086
Luminal B	0.36 (0.08 – 1.51)	0.164
Normal-like	2.45 (0.44 – 13.63)	0.306

La peggior prognosi associata ad una elevata espressione della signature basal-like è stata inoltre confermata all’analisi multivariata, dopo correzione per il sottotipo immunoistochimico di carcinoma mammario (**Tabella VI**).

Tabella VI: Analisi multivariata dell'associazione tra le singole signature del PAM50 e la sopravvivenza globale dall'intervento neurochirurgico, corretta per sottotipo immunohistochimico di metastasi cerebrale.

	HR (95% CI)	p-value
Basal-like	5.14 (1.14 – 23.21)	0.032
HER2-enriched	1.04 (0.21 – 5.02)	0.958
Luminal A	0.14 (0.01 – 1.20)	0.074
Luminal B	0.25 (0.03 – 1.66)	0.152
Normal-like	1.98 (0.27 – 14.28)	0.495

6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il carcinoma mammario è una patologia estremamente diffusa dal punto di vista epidemiologico ed è ben noto come rappresenti una patologia estremamente eterogenea dal punto di vista biologico. La valutazione dei profili di espressione genica è una delle tecniche più utilizzate ad oggi per studiare l'eterogeneità biologica del carcinoma mammario, essendo già utilizzato in pratica clinica al fine di migliorare la definizione prognostica e guidare quindi le scelte terapeutiche nell'ambito del carcinoma mammario in stadio precoce ed essendo attualmente utilizzato per la selezione dei pazienti in alcuni studi clinici ora in corso nell'ambito del carcinoma mammario metastatico. Alla luce della nota potenziale eterogeneità biologica tra neoplasia primitiva e metastasi, oltre che tra lesioni a distanza in differenti sedi metastatiche, una caratterizzazione molecolare di questo tipo diventa pertanto particolarmente rilevante nelle lesioni metastatiche.

In tale contesto, l'oggetto del presente studio è l'analisi del profilo di espressione genica di metastasi cerebrali da neoplasia mammaria provenienti da una coorte multicentrica di 65 pazienti sottoposte a neurochirurgia nell'ambito della pratica clinica.

Nell'ambito della nostra coorte di studio, l'analisi delle caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti non ha permesso di identificare i fattori prognostici ad oggi consolidati in tale setting, contrariamente a quanto riportato in letteratura.⁽³²⁾ Tale osservazione può essere spiegata dalla ridotta numerosità della casistica e dal fatto che si tratti di una popolazione altamente selezionata di pazienti, in quanto tutti i pazienti inclusi sono stati sottoposti a neurochirurgia (un trattamento con indicazioni molto stringenti nell'ambito di questa patologia). In linea con tale criterio di inclusione, infatti, è stata osservata un'alta prevalenza (80%) di metastasi cerebrali isolate, che rappresenta lo scenario in cui più facilmente viene proposto un intervento neurochirurgico. Allo stesso modo, la presenza di malattia extracranica alla diagnosi di metastasi cerebrali è stata riscontrata in non più della metà dei pazienti, mentre un Karnofsky Performance Status di almeno 70 è stato osservato in più del 90% dei pazienti. Questi dati suggeriscono ulteriormente come si tratti di una coorte selezionata con caratteristiche prognostiche favorevoli.

L'algoritmo PAM50 si basa sulla valutazione quantitativa dell'espressione di 50 geni selezionati ed è lo strumento che consente di giungere alla definizione più precisa del sottotipo molecolare intrinseco, rappresentando ad oggi una tecnica consolidata di classificazione dell'eterogeneità biologica nell'ambito del carcinoma mammario ed un noto indicatore prognostico. La determinazione del sottotipo molecolare intrinseco delle metastasi cerebrali mediante PAM50 ha permesso di osservare una maggior prevalenza dei sottotipi non luminali, in particolare del sottotipo HER2-enriched, rispetto a quanto potrebbe essere atteso sulla base della letteratura, tenuto conto della distribuzione della nostra coorte di pazienti in termini di sottogruppi immunohistochimici. Tale risultato è in linea con quanto osservato in altri studi che hanno riportato un aumento dell'espressione del gene ERBB2 nelle metastasi cerebrali rispetto alla neoplasia primitiva, segno di un mutamento della biologia delle cellule neoplastiche al momento della loro localizzazione in sede cerebrale.⁽⁶²⁾

Infatti, in base ai dati di letteratura, considerando una coorte di 87 neoplasie in stadio precoce categorizzate come HR+/HER2- all'immunoistochimica, solo una quota minoritaria viene classificata in sottotipi non-luminali dal PAM50: il sottotipo basal-like è riportato nel 7% dei casi, mentre l'HER2-enriched nel 2%. La grande maggioranza delle neoplasie primitive è infatti categorizzata come sottotipo luminale, in particolare il 71% dei campioni viene descritto come luminal A ed infine il 20% come luminal B⁽⁶⁴⁾. Nella nostra casistica invece i sottotipi non-luminali rappresentano complessivamente la maggioranza delle metastasi cerebrali HR+/HER2- (basal-like 24% e HER2-enriched 28%, rispettivamente).

Da ampi studi già condotti su tumori primari classificati come HER2+ all'immunoistochimica, emerge come il sottotipo HER2-enriched rappresenti abitualmente meno della metà dei casi (45-50%), seguito da una quota significativa di neoplasie luminali e basal-like: il luminal B è descritto nel 18-28% dei casi, seguito dal luminal A nell'11-23% delle neoplasie e infine dal sottotipo basal-like nel 7-14%⁽⁶⁵⁾. Tale distribuzione risulta chiaramente diversa da quanto riscontrato nelle metastasi cerebrali oggetto del nostro studio, in cui il sottotipo HER2-enriched si ritrova nell'84% dei casi.

Questi risultati suggeriscono un potenziale interesse clinico nel ricaratterizzare la malattia cerebrale anche da un punto di vista molecolare. L'individuazione di neoplasie HER2-enriched non individuabili come HER2+ all'IHC potrebbe potenzialmente suggerire la possibilità di ampliare le possibilità terapeutiche mediante l'impiego di trattamenti target anti-HER2, che spesso hanno dimostrato rilevanti dati di attività a livello cerebrale. Infatti, recentemente lo studio HER2CLIMB ha dimostrato come l'utilizzo di tucatinib in combinazione con trastuzumab e capecitabina sia in grado di migliorare la sopravvivenza di pazienti con metastasi cerebrali da carcinoma mammario HER2+ asintomatiche anche in assenza di terapia locale e sia anche in grado di rallentare la comparsa di ulteriori lesioni in sede cerebrale⁽⁶⁶⁾. Alti tassi di risposta a livello cerebrale sono stati descritti anche con trastuzumab deruxtecan, sia nel contesto di metastasi cerebrali da carcinoma mammario HER2+ che nel contesto del carcinoma mammario HER2-low⁽⁶⁷⁾.

Ad oggi non ci sono chiari dati relativi alla possibilità di utilizzare trattamenti target anti-HER2 in pazienti con neoplasie HER2-negative/HER2-enriched. Tuttavia, in tale contesto è interessante considerare i risultati di un'analisi traslazionale retrospettiva dello studio EGF30008: tale studio ha valutato l'aggiunta di lapatinib a letrozolo in pazienti con carcinoma mammario metastatico HR+, includendo nella coorte anche un nutrito sottogruppo di pazienti con malattia HER2-. L'analisi retrospettiva è stata condotta su 821 campioni di neoplasie (86% provenienti da tumori primari, 14% da metastasi) e ha rilevato un significativo miglioramento della sopravvivenza libera da progressione legato alla aggiunta di lapatinib alla terapia ormonale selettivamente nel sottogruppo di pazienti con carcinoma mammario HR+/HER2-/HER2-enriched. Tali risultati, uniti ai risultati del nostro studio, potrebbero potenzialmente suggerire la potenzialità di indagare all'interno di studi clinici il potenziale utilizzo di TKI di nuova generazione in combinazione con chemioterapia anche nel contesto di pazienti con metastasi cerebrali HR+/HER2- identificate come HER2-enriched secondo PAM50⁽⁶⁸⁾.

Anche al di fuori del possibile utilizzo di trattamenti anti-HER2, vi sono alcuni dati che indicano come, nel setting metastatico, il sottotipo molecolare intrinseco possa avere un potenziale impatto sul beneficio tratto dal trattamento che, se confermato, potrebbe essere utilizzato come un fattore predittivo di risposta alla terapia. Tale possibilità è stata esplorata in una analisi traslazionale combinata degli studi MONALEESA⁽⁶⁹⁾ che si proponeva di studiare il valore predittivo e prognostico del sottotipo molecolare intrinseco in carcinomi mammari avanzati HR+/HER2- trattati con ormonoterapia e ribociclib. Questa analisi ha evidenziato come i pazienti con carcinomi mammari HR+/HER2- categorizzati come basal-like secondo PAM50 non solo presentassero la peggior prognosi, ma non sembrassero trarre beneficio dall'aggiunta di ribociclib al trattamento. Se confermato tale dato potrebbe rappresentare un fattore predittivo negativo di risposta alla suddetta terapia e la possibilità di trattare i pazienti con tali caratteristiche con chemioterapia e immunoterapia (analogamente a quanto avviene per il carcinoma mammario triplo-negativo) invece che con terapia ormonale+Cdk4/6 inibitori è attualmente al vaglio nell'ambito dello studio

HARMONIA.

Infine, per quanto riguarda le metastasi HR-/HER2-, i risultati ottenuti concordano sostanzialmente con quanto già osservato nei tumori primitivi TNBC⁽⁷⁰⁾ e coincidono con quanto atteso sulla base del profilo immunohistochimico: il sottotipo basal-like è risultato nettamente prevalente (84%) e l'HER2-enriched si ritrova nel 16% dei casi. Si riscontra quindi la presenza dei sottotipi non luminali nella totalità dei casi.

Infine, è stata indagata l'associazione tra i sottotipi molecolari riscontrati e la sopravvivenza globale. La signature basal-like è risultata associata ad una peggior prognosi, tanto che pazienti con metastasi HR+/HER2- aventi sottotipo intrinseco basal-like raggiungono una sopravvivenza globale pari a 9.0 mesi, che è quanto si riscontra anche in pazienti con metastasi HR-/HER2. Tale risultato conferma precedenti osservazioni di letteratura che hanno riportato come la determinazione del sottotipo molecolare mediante PAM50 possa aggiungere informazioni prognostiche alla sola valutazione immunohistochimica. Questa osservazione risulta particolarmente rilevante nel contesto delle metastasi cerebrali da carcinoma mammario alla luce delle significative discordanze già descritte tra la classificazione secondo i sottotipi intrinseci secondo PAM50 e la classificazione del carcinoma mammario secondo immunohistochimica.

L'analisi del profilo di espressione genica delle metastasi cerebrali ha inoltre permesso di individuare un impatto prognostico di 37 geni. La significatività di tale associazione è stata confermata dopo correzione per sottotipo per 33 geni.

La valutazione prognostica di pazienti con metastasi cerebrali da carcinoma mammario è estremamente rilevante al fine di determinare le migliori strategie terapeutiche per queste pazienti. A tale fine sono disponibili score prognostici già attualmente in uso in pratica clinica, come il Graded Prognostic Assessment. Tale score si compone di diversi fattori prognostici clinici già noti in letteratura; l'aggiunta di dati biologici, quali l'espressione di specifici geni o il sottotipo intrinseco valutato mediante l'analisi dell'espressione genica potrebbe potenzialmente permettere una migliore valutazione prognostica in pazienti con metastasi cerebrali e tale dato

potrebbe supportare il clinico nella scelta della più adeguata strategia terapeutica. Tale possibilità è ad oggi limitata dall'invasività delle tecniche che permettono di acquisire dati biologici sulle metastasi cerebrali. Al fine di poter ipotizzare l'implementazione di tali conoscenze anche nella pratica clinica è indispensabile indagare la possibilità di ottenere tali informazioni biologiche in maniera non invasiva, mediante tecniche quali la biopsia liquida o radiomica.

Questo studio presenta alcune limitazioni.

In primis, sono stati reclutati solo pazienti sottoposti ad asportazione neurochirurgica delle lesioni encefaliche, opzione generalmente riservata a soggetti in buono stato di salute ($KPS \geq 70$) e con un numero di lesioni cerebrali limitato, generalmente non superiore a 3. Questo ha inevitabilmente generato una popolazione di pazienti altamente selezionati ed a buona prognosi. Trattandosi quindi di uno studio condotto in una popolazione fortemente selezionata di pazienti non è quindi chiaro quanto i risultati ottenuti possano essere effettivamente generalizzabili a tutti i pazienti con metastasi cerebrali da carcinoma mammario.

Inoltre, va precisato che la numerosità della coorte studiata era limitata, a causa della rarità clinica della disponibilità di materiale istologico da metastasi cerebrali. Questo da un lato potrebbe aver limitato la potenza statistica dello studio nella valutazione dell'impatto prognostico del sottotipo intrinseco, dall'altro, data la natura esplorativa e generatrice di ipotesi delle analisi condotte, non abbiamo adottato in questo studio strategie di correzione per confronti multipli. Tale approccio, volto a massimizzare la generazione di ipotesi di lavoro per studi futuri, può tuttavia aumentare il rischio di osservare risultati falsamente positivi.

Tuttavia, va anche sottolineato come lo studio presenti dei rilevanti punti di forza. La coorte analizzata rappresenta infatti una delle casistiche più ampie fino ad ora analizzate e pubblicate per quanto concerne le metastasi cerebrali da carcinoma mammario.

Concludendo, il presente studio suggerisce come le metastasi cerebrali da carcinoma mammario possano presentare specifiche caratteristiche biologiche con una elevata prevalenza di sottotipi intrinseci non-luminali.

Tali informazioni biologiche potrebbero avere un potenziale ruolo nella determinazione della prognosi dei pazienti affetti da metastasi cerebrali e potenzialmente, se adeguatamente esplorate in studi futuri, potrebbero potenzialmente presentare anche un impatto sulle strategie terapeutiche utilizzate.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Wilkinson L, Gathani T. Understanding breast cancer as a global health concern. *Br J Radiol.* 1 febbraio 2022;95(1130):20211033.
2. Wojtyla C, Bertuccio P, Wojtyla A, Vecchia CL. European trends in breast cancer mortality, 1980–2017 and predictions to 2025. *European Journal of Cancer.* 1 luglio 2021;152:4–17.
3. Kashyap D, Pal D, Sharma R, Garg VK, Goel N, Koundal D, et al. Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. *Biomed Res Int.* 18 aprile 2022;2022:9605439.
4. 2021_NumeriCancro_web.pdf [Internet]. [citato 2 marzo 2023]. Disponibile su: https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2021/10/2021_NumeriCancro_web.pdf
5. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci.* 1 novembre 2017;13(11):1387–97.
6. Yeo SK, Guan JL. Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? *Trends Cancer.* novembre 2017;3(11):753–60.
7. Hammond MEH. ASCO-CAP Guidelines for Breast Predictive Factor Testing: An Update. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology.* dicembre 2011;19(6):499.
8. Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, et al. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *JCO.* 20 aprile 2020;38(12):1346–66.

9. Tumore al seno - Istituto Oncologico Veneto [Internet]. 2023 [citato 2 marzo 2023]. Disponibile su: <https://www.ioveneto.it/pathology/tumore-al-seno/>
10. Drăgănescu M, Carmocan C. Hormone Therapy in Breast Cancer. *Chirurgia (Bucur)*. 2017;112(4):413–7.
11. Guida L. NEOPLASIE DELLA MAMMELLA. 2021;
12. Andrahennadi S, Sami A, Manna M, Pauls M, Ahmed S. Current Landscape of Targeted Therapy in Hormone Receptor-Positive and HER2-Negative Breast Cancer. *Curr Oncol*. 11 maggio 2021;28(3):1803–22.
13. Moasser MM. The oncogene HER2; Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 4 ottobre 2007;26(45):6469–87.
14. T-DXd: New Standard for HER2-Low Breast Cancer. *Cancer Discovery*. 5 agosto 2022;12(8):1828.
15. Eiger D, Agostinetti E, Saúde-Conde R, de Azambuja E. The Exciting New Field of HER2-Low Breast Cancer Treatment. *Cancers (Basel)*. 1 marzo 2021;13(5):1015.
16. Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int*. 2014;2014:852748.
17. Won KA, Spruck C. Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). *Int J Oncol*. dicembre 2020;57(6):1245–61.
18. Fragomeni SM, Sciallis A, Jeruss JS. Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. gennaio 2018;27(1):95–120.

19. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. agosto 2000;406(6797):747–52.
20. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 10 marzo 2009;27(8):1160–7.
21. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*. novembre 2015;24 Suppl 2:S26-35.
22. Gluz O, Hofmann D, Würstlein R, Liedtke C, Nitz U, Harbeck N. Genomic Profiling in Luminal Breast Cancer. *Breast Care (Basel)*. dicembre 2013;8(6):414–22.
23. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 20 maggio 2009;101(10):736–50.
24. Bergamino MA, López-Knowles E, Morani G, Tovey H, Kilburn L, Schuster EF, et al. HER2-enriched subtype and novel molecular subgroups drive aromatase inhibitor resistance and an increased risk of relapse in early ER+/HER2+ breast cancer. *EBioMedicine*. settembre 2022;83:104205.
25. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*. novembre 2015;24 Suppl 2:S26-35.

26. Wu Q, Li J, Zhu S, Wu J, Chen C, Liu Q, et al. Breast cancer subtypes predict the preferential site of distant metastases: a SEER based study. *Oncotarget*. 2 marzo 2017;8(17):27990–6.
27. He DJ, Yu DQ, Wang QM, Yu ZY, Qi YH, Shao QJ, et al. Breast Cancer Subtypes and Mortality of Breast Cancer Patients With Brain Metastasis at Diagnosis: A Population-Based Study. *Inquiry*. 18 novembre 2021;58:004695802111055636.
28. Hosonaga M, Saya H, Arima Y. Molecular and cellular mechanisms underlying brain metastasis of breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2020;39(3):711–20.
29. Darlix A, Louvel G, Fraisse J, Jacot W, Brain E, Debled M, et al. Impact of breast cancer molecular subtypes on the incidence, kinetics and prognosis of central nervous system metastases in a large multicentre real-life cohort. *Br J Cancer*. dicembre 2019;121(12):991–1000.
30. Bailleux C, Eberst L, Bachelot T. Treatment strategies for breast cancer brain metastases. *Br J Cancer*. 5 gennaio 2021;124(1):142–55.
31. Darlix A, Griguolo G, Thezenas S, Kantelhardt E, Thomssen C, Dieci MV, et al. Hormone receptors status: a strong determinant of the kinetics of brain metastases occurrence compared with HER2 status in breast cancer. *J Neurooncol*. giugno 2018;138(2):369–82.
32. Huang Z, Sun B, Wu S, Meng X, Cong Y, Shen G, et al. A nomogram for predicting survival in patients with breast cancer brain metastasis. *Oncol Lett*. maggio 2018;15(5):7090–6.

33. Pellerino A, Internò V, Mo F, Franchino F, Soffietti R, Rudà R. Management of Brain and Leptomeningeal Metastases from Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 12 novembre 2020;21(22):8534.
34. Zhuang Q, Wong RX, Lian WX, Li YQ, Wong FY. Validation of Modified Breast Graded Prognostic Assessment for breast cancer patients with brain metastases: extra-cranial disease progression is an independent risk factor. *Annals of Palliative Medicine.* settembre 2019;8(4):39000–400.
35. Nabors LB, Portnow J, Ahluwalia M, Baehring J, Brem H, Brem S, et al. Central Nervous System Cancers, Version 3.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network.* 2 novembre 2020;18(11):1537–70.
36. Simsek M, Aliyev A, Baydas T, Besiroglu M, Demir T, Shbair AT, et al. Breast Cancer Patients with Brain Metastases: A Cross-Sectional Study. *Breast J.* 19 agosto 2022;2022:5763810.
37. Fares J, Kanojia D, Rashidi A, Ahmed AU, Balyasnikova IV, Lesniak MS. Diagnostic Clinical Trials in Breast Cancer Brain Metastases: Barriers and Innovations. *Clin Breast Cancer.* dicembre 2019;19(6):383–91.
38. Le Rhun E, Guckenberger M, Smits M, Dummer R, Bachelot T, Sahm F, et al. EANO–ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up of patients with brain metastasis from solid tumours. *Annals of Oncology.* novembre 2021;32(11):1332–47.
39. Arvanitis CD, Ferraro GB, Jain RK. The blood–brain barrier and blood–tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nature reviews Cancer.* gennaio 2020;20(1):26.

40. Lewis Phillips GD, Nishimura MC, Lacap JA, Kharbanda S, Mai E, Tien J, et al. Trastuzumab uptake and its relation to efficacy in an animal model of HER2-positive breast cancer brain metastasis. *Breast Cancer Res Treat.* agosto 2017;164(3):581–91.
41. Tolaney SM, Sahebjam S, Le Rhun E, Bachelot T, Kabos P, Awada A, et al. A Phase II Study of Abemaciclib in Patients with Brain Metastases Secondary to Hormone Receptor–Positive Breast Cancer. *Clinical Cancer Research.* 15 ottobre 2020;26(20):5310–9.
42. Cottu PH, Laurentiis MD, Marchetti P, Coltelli L, Califaretti N, Debled M, et al. Ribociclib (RIB) + letrozole (LET) in patients (pts) with hormone receptor-positive (HR+), human epidermal growth factor receptor-2–negative (HER2–) advanced breast cancer (ABC) and central nervous system (CNS) metastases: Subgroup analysis from the phase IIIb CompleEment-1 trial. *Annals of Oncology.* 1 ottobre 2019;30:v118.
43. Stavrou E, Winer EP, Lin NU. How we treat HER2-positive brain metastases. *ESMO Open.* 2 settembre 2021;6(5):100256.
44. Petrelli F, Ghidini M, Lonati V, Tomasello G, Borgonovo K, Ghilardi M, et al. The efficacy of lapatinib and capecitabine in HER-2 positive breast cancer with brain metastases: A systematic review and pooled analysis. *European Journal of Cancer.* 1 ottobre 2017;84:141–8.
45. Dijkers EC, Oude Munnink TH, Kosterink JG, Brouwers AH, Jager PL, de Jong JR, et al. Biodistribution of ⁸⁹Zr-trastuzumab and PET Imaging of HER2-Positive Lesions in Patients With Metastatic Breast Cancer. *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* 2010;87(5):586–92.

46. Diéras V, Miles D, Verma S, Pegram M, Welslau M, Baselga J, et al.
Trastuzumab emtansine versus capecitabine plus lapatinib in patients with previously treated HER2-positive advanced breast cancer (EMILIA): a descriptive analysis of final overall survival results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* giugno 2017;18(6):732–42.
47. Montemurro F, Delaloge S, Barrios CH, Wuerstlein R, Anton A, Brain E, et al.
Trastuzumab emtansine (T-DM1) in patients with HER2-positive metastatic breast cancer and brain metastases: exploratory final analysis of cohort 1 from KAMILLA, a single-arm phase IIIb clinical trial☆. *Annals of Oncology.* 1 ottobre 2020;31(10):1350–8.
48. Ramakrishna N, Temin S, Chandarlapaty S, Crews JR, Davidson NE, Esteva FJ, et al.
Recommendations on Disease Management for Patients With Advanced Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Breast Cancer and Brain Metastases: ASCO Clinical Practice Guideline Update. *JCO.* 20 settembre 2018;36(27):2804–7.
49. Soffietti R, Ahluwalia M, Lin N, Rudà R.
Management of brain metastases according to molecular subtypes. *Nat Rev Neurol.* ottobre 2020;16(10):557–74.
50. Murthy RK, Loi S, Okines A, Paplomata E, Hamilton E, Hurvitz SA, et al.
Tucatinib, Trastuzumab, and Capecitabine for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med.* 13 febbraio 2020;382(7):597–609.
51. Bartsch R, Berghoff AS, Furtner J, Marhold M, Bergen ES, Roeder-Schur S, et al.
Trastuzumab deruxtecan in HER2-positive breast cancer with brain metastases: a single-arm, phase 2 trial. *Nat Med.* 2022;28(9):1840–7.

52. Litton JK, Rugo HS, Ettl J, Hurvitz SA, Gonçalves A, Lee KH, et al. Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med*. 23 agosto 2018;379(8):753–63.
53. Robson ME, Tung N, Conte P, Im SA, Senkus E, Xu B, et al. OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 1 aprile 2019;30(4):558–66.
54. Garber HR, Raghavendra AS, Lehner M, Qiao W, Gutierrez-Barrera AM, Tripathy D, et al. Incidence and impact of brain metastasis in patients with hereditary BRCA1 or BRCA2 mutated invasive breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 7 aprile 2022;8:46.
55. Ren D, Cheng H, Wang X, Vishnoi M, Teh BS, Rostomily R, et al. Emerging treatment strategies for breast cancer brain metastasis: from translational therapeutics to real-world experience. *Ther Adv Med Oncol*. 30 giugno 2020;12:1758835920936151.
56. Achrol AS, Rennert RC, Anders C, Soffiatti R, Ahluwalia MS, Nayak L, et al. Brain metastases. *Nat Rev Dis Primers*. 17 gennaio 2019;5(1):1–26.
57. Liddel SA, Barres BA. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*. 20 giugno 2017;46(6):957–67.
58. Blazquez R, Wlochowitz D, Wolff A, Seitz S, Wachter A, Perera-Bel J, et al. PI3K: A master regulator of brain metastasis-promoting macrophages/microglia. *Glia*. 2018;66(11):2438–55.

59. Adamo B, Deal AM, Burrows E, Geradts J, Hamilton E, Blackwell KL, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in breast cancer brain metastases. *Breast Cancer Res.* 2011;13(6):R125.
60. Zhang L, Zhang S, Yao J, Lowery FJ, Zhang Q, Huang WC, et al. Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. *Nature.* 5 novembre 2015;527(7576):100–4.
61. Silva LD, Simpson PT, Smart CE, Cocciardi S, Waddell N, Lane A, et al. HER3 and downstream pathways are involved in colonization of brain metastases from breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR.* 2010;12(4):R46.
62. Kotecha R, Tonse R, Rubens M, McDermott MW, Odia Y, Appel H, et al. Systematic review and meta-analysis of breast cancer brain metastasis and primary tumor receptor expression discordance. *Neurooncol Adv.* 2021;3(1):vdab010.
63. Gene expression profiles of breast cancer metastasis according to organ site - PMC [Internet]. [citato 3 giugno 2023]. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8732356/>
64. Ren X, Song Y, Zhang Y, Wu H, Chen L, Pang J, et al. Prognostic significance of different molecular typing methods and immune status based on RNA sequencing in HR-positive and HER2-negative early-stage breast cancer. *BMC Cancer.* 14 maggio 2022;22(1):548.
65. Schettini F, Prat A. Dissecting the biological heterogeneity of HER2-positive breast cancer. *The Breast.* 1 ottobre 2021;59:339–50.

66. Lin NU, Murthy RK, Abramson V, Anders C, Bachelot T, Bedard PL, et al. Tucatinib vs Placebo, Both in Combination With Trastuzumab and Capecitabine, for Previously Treated ERBB2 (HER2)-Positive Metastatic Breast Cancer in Patients With Brain Metastases. *JAMA Oncol.* febbraio 2023;9(2):197–205.
67. Bartsch R, Berghoff AS, Furtner J, Marhold M, Bergen ES, Roeder-Schur S, et al. Trastuzumab deruxtecan in HER2-positive breast cancer with brain metastases: a single-arm, phase 2 trial. *Nat Med.* 2022;28(9):1840–7.
68. Prat A, Cheang MCU, Galván P, Nuciforo P, Paré L, Adamo B, et al. Prognostic Value of Intrinsic Subtypes in Hormone Receptor–Positive Metastatic Breast Cancer Treated With Letrozole With or Without Lapatinib. *JAMA Oncology.* 1 ottobre 2016;2(10):1287–94.
69. Prat A, Chaudhury A, Solovieff N, Paré L, Martinez D, Chic N, et al. Correlative Biomarker Analysis of Intrinsic Subtypes and Efficacy Across the MONALEESA Phase III Studies. *J Clin Oncol.* 1 maggio 2021;39(13):1458–67.
70. Kim HK, Park KH, Kim Y, Park SE, Lee HS, Lim SW, et al. Discordance of the PAM50 Intrinsic Subtypes Compared with Immunohistochemistry-Based Surrogate in Breast Cancer Patients: Potential Implication of Genomic Alterations of Discordance. *Cancer Res Treat.* aprile 2019;51(2):737–47.