

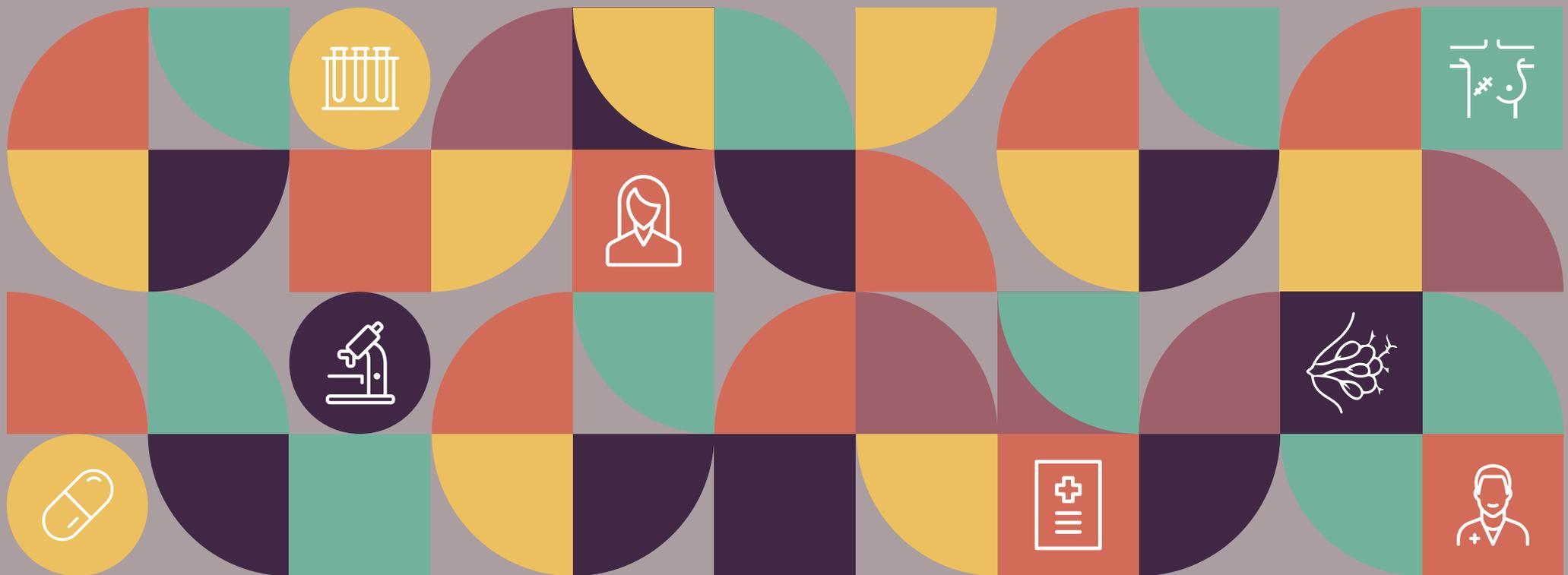
CLINICAL Interview

n.2 / 2023



Pensare “HER2” in modo diverso:

approcci diagnostici integrativi per il carcinoma mammario HER2-low



Caterina Marchiò¹, Cristian Scatena², Alfredo Santinelli³, Paolo Graziano⁴, Umberto Malapelle⁵, Carmine De Angelis⁵, Giuseppe Perrone⁶, Carmen Criscitiello⁷, Nicola Fusco⁷

1. Istituto di Candiolo - Fondazione del Piemonte per l'Oncologia – IRCCS; Università degli Studi di Torino; 2. Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana; Università di Pisa; 3. Azienda Sanitaria Territoriale di Pesaro-Urbino.

4. Fondazione IRCCS Ospedale 'Casa Sollievo della Sofferenza', San Giovanni Rotondo; 5. Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli; 6. Fondazione Policlinico Universitario Campus Bio-Medico; Università Campus Bio-Medico di Roma; 7. IEO Istituto Europeo di Oncologia IRCCS; Università degli Studi di Milano.

CLINICAL

Interview

n.2 / 2023



EDITORE

CLINICAL INTERVIEW

Numero registrazione Tribunale Ordinario di Milano: 8267/2023

Direttore responsabile:

Cristoforetti Carlo Massimo

Operatore di comunicazione:

MEDICA - EDITORIA E DIFFUSIONE SCIENTIFICA S.R.L.

Registro degli Operatori di Comunicazione:

numero 39798

Codice fiscale: 12389510152

Medica
EDITORIA E DIFFUSIONE SCIENTIFICA

CLINICAL

Interview

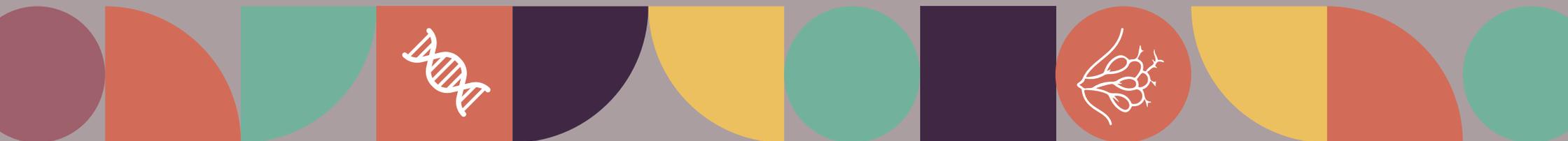
n.2 / 2023

Indice

Abstract	p.4
Introduzione	p.5
Razionale clinico per l'identificazione di HER2-low	p.6
Fattori critici della valutazione di HER2 nel carcinoma mammario	p.9
Cosa testare e quando (ri)valutare HER2	p.13
L'intelligenza artificiale può potenziare la predittività del test HER2?	p.15
Prospettive per il ruolo della patologia molecolare	p.17
Her2 nelle cellule tumorali circolanti	p.18
Conclusioni e prospettive future	p.19
Conflitti di interesse	p.21
Bibliografia	p.22

ABSTRACT

La patologia predittiva nell'ambito del **carcinoma della mammella** ha subito una sostanziale evoluzione da quando, per le pazienti affette da malattie cosiddette "HER2-low", si sono aperti **nuovi scenari terapeutici** con l'avvento del **trastuzumab-deruxtecan (T-DXd)**, un potente agente terapeutico che appartiene alla classe dei coniugati anticorpo-farmaco. **Lo spettro di carcinoma mammario HER2-low** comprende tutte quelle neoplasie (il 50% circa) con espressione di HER2 definita da uno score immunohistochimico (IHC) 1+ o 2+ senza amplificazione del gene ERBB2. **L'obiettivo di questo lavoro è quello di proporre posizioni chiare alle società scientifiche, alle istituzioni, agli anatomopatologi e agli oncologi per guidare e modellare le strategie diagnostiche appropriate per il test di HER2.** Il tema fondamentale è utilizzare strumenti idonei per tradurre efficacemente le nostre conoscenze su HER2 in schemi diagnostici pratici per lo spettro di espressione più basso. In particolare, è ora essenziale **distinguere tra uno score 0 e uno score 1+**, in quanto **le pazienti con carcinoma mammario HER2-low diventano eleggibili per il trattamento con T-DXd.** Inoltre, viene esaminata la definizione di HER2-low al di là dei suoi confini convenzionali, con una **disamina sulla reale affidabilità di procedure diagnostiche consolidate**, concepite in un periodo in cui le prospettive terapeutiche per queste pazienti erano inesistenti. A questo proposito, vengono discussi i dati scientifici riguardanti **potenziali tecnologie complementari**, come l'analisi dell'espressione genica e la biopsia liquida. Infine, si pone l'accento sul **potenziale ruolo dell'intelligenza artificiale (AI) nel campo della "digital pathology"** e la sua integrazione nel test HER2, con un'enfasi particolare sulla sua applicazione nel contesto del carcinoma mammario HER2-low.



INTRODUZIONE

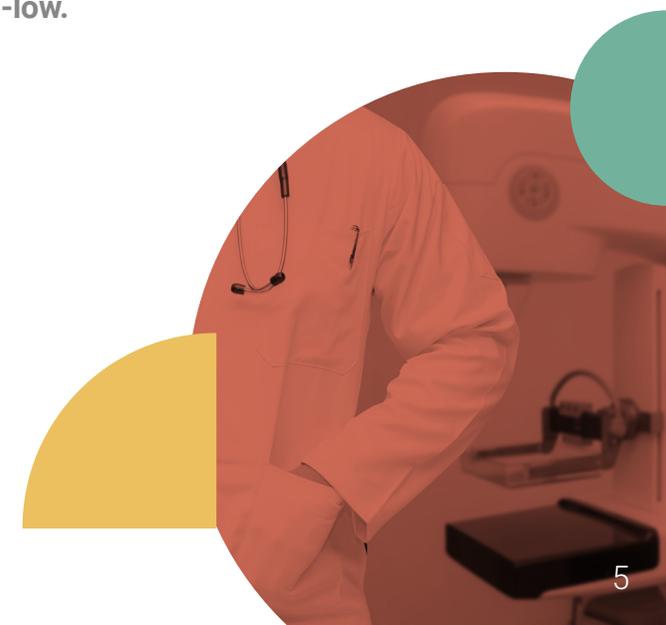
Il settore della patologia mammaria ha subito una profonda trasformazione nel 2022 con la presentazione dei risultati del rivoluzionario **trial clinico DESTINY Breast-04 (DB-04)**.¹ La sperimentazione, ulteriormente supportata dallo **studio DAISY**,² ha **rimesso in luce HER2 come biomarcatore predittivo nel carcinoma della mammella**.³ Le pazienti con carcinoma mammario metastatico classificato come “HER2-low” (cioè, HER2 immunohistochimica (IHC) score 1+ o score 2+ senza amplificazione genica mediante test di ibridazione in situ (*in situ hybridization*, ISH)) erano oggetto dello studio DB-04.⁴ **Il trattamento di queste pazienti con trastuzumab deruxtecan (T-DXd)**, un nuovo coniugato anticorpo-farmaco anti-HER2 (*antibody-drug conjugate*, ADC), confrontato con la chemioterapia convenzionale ha portato a **notevoli miglioramenti nella sopravvivenza**.^{1,5}

L'importanza di questo risultato clinico mette in discussione il consolidato sistema di classificazione binaria di HER2, che suddivide i carcinomi mammari in positivi (cioè HER2 IHC score 3+ o score 2+ ISH-positivo) o negativi (tutti gli altri casi), in linea con le linee guida ASCO/CAP 2018⁶ riconfermate dall'aggiornamento delle linee guida ASCO/CAP 2023 e dalle dichiarazioni di

consenso ESMO 2023 sul carcinoma mammario HER2-low.^{7,8} È importante considerare che la categoria HER2-low non delinea un sottotipo biologico specifico di carcinoma mammario, ma piuttosto comprende un gruppo eterogeneo di tumori, che rappresentano circa la metà di tutti i casi di carcinoma mammario.⁹⁻¹¹ Tuttavia, **HER2-low indica uno stato distintivo del biomarcatore che corrisponde a una prognosi favorevole dopo il trattamento con T-DXd**.¹²

A differenza del targeting terapeutico convenzionale di HER2 con trastuzumab, la differenziazione tra uno score IHC di HER2 pari a 0 e uno score 1+ ha ora un significato clinico, considerando che esiste una terapia specifica che ha dimostrato efficacia sulle pazienti con malattia HER2-low.¹³ **Per garantire un'identificazione precisa di questi tumori, è essenziale implementare procedure standardizzate, linee guida, e una formazione specifica per gli anatomopatologi nell'identificazione di HER2-low**.^{14,15} **L'integrazione prospettica dell'intelligenza artificiale (AI)** in questo contesto è promettente per supportare questi sforzi, anche se la sua implementazione nel presente appare ancora prematura.¹⁶ Oltre agli approcci sopra citati, l'utilizzo della biopsia li-

quida (**liquid biopsy, LB**) può rappresentare una possibile opportunità futura per la valutazione dello stato di HER2-low nelle cellule tumorali circolanti (*circulating tumor cells*, CTC).¹⁷ **In questo lavoro, viene esaminata sistematicamente la situazione attuale circa la valutazione dello stato HER2-low nel carcinoma mammario in anatomia patologica, affrontando le questioni irrisolte e fornendo raccomandazioni per condurre test di alta qualità in linea con gli aggiornamenti ASCO/CAP del 2023⁷ e con le dichiarazioni di consenso ESMO del 2023¹⁸ sul carcinoma mammario HER2-low.**



RAZIONALE CLINICO PER L'IDENTIFICAZIONE DI HER2-LOW



Nicola Fusco, Istituto Europeo di Oncologia, Milano
Carmen Criscitiello, Divisione Sviluppo di Nuovi Farmaci per Terapie Innovative, IEO Milano

RAZIONALE CLINICO PER L'IDENTIFICAZIONE DI HER2-LOW

Per definizione, il carcinoma mammario HER2-negativo comprende un sottogruppo di casi con bassi livelli di espressione di HER2 (cioè score 1+ o score 2+) che non sono caratterizzati da un'amplificazione del gene ERBB2, secondo la metodica ISH (Figura 1).⁹ Studi precedenti hanno mostrato un'efficacia limitata di trastuzumab e ado-trastuzumab emtansine (T-DM1) in questo sottogruppo, ragion per cui non sono stati approvati per l'uso in tumori diversi da quelli HER2-positivi.^{19,20} Tuttavia, i recenti progressi terapeutici, in particolare con gli ADC HER2 di seconda generazione come T-DXd, hanno portato in primo piano l'interesse per l'intero spettro di carcinomi della mammella che esprimono HER2.²¹ **Gli studi sugli ADC hanno dimostrato un'efficacia convincente, sfidando così gli approcci terapeutici convenzionali.**²² Circa il 50% delle pazienti affette da carcinoma mammario presenta una malattia HER2-low, di cui circa il 60% esprime i recettori ormonali (estrogeni e progesterone), mentre il 40% è costituito da carcinomi mammari tripli negativi (TNBC) con bassa espressione di HER2.^{5,11,23} **Lo studio DB-04 (NCT03734029) ha dimo-**

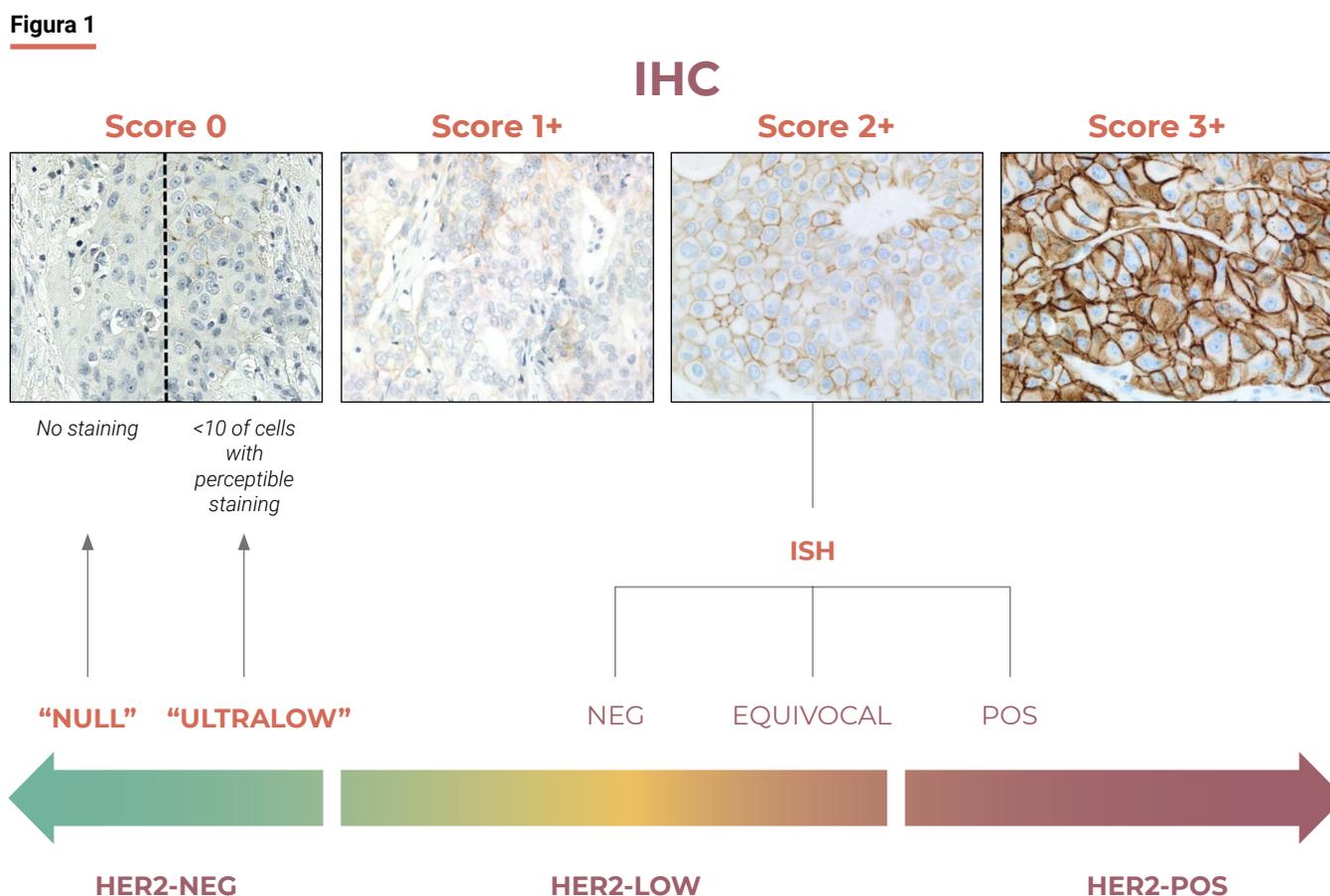


Figura 1. Rappresentazione schematica dello spettro di espressione di HER2, secondo le linee guida ASCO/CAP.

RAZIONALE CLINICO PER L'IDENTIFICAZIONE DI HER2-LOW

to la superiorità di T-DXd rispetto alla chemioterapia nel trattamento di pazienti con carcinoma mammario HER2-low.²¹ In questo trial clinico, le pazienti con carcinoma mammario metastatico HER2-low erano state precedentemente trattate con una o due linee di chemioterapia ed erano refrattarie alle terapie endocrine in caso di malattia positiva ai recettori ormonali. La sopravvivenza libera da progressione (*progression-free survival*, PFS) mediana è stata di 10,1 mesi per le pazienti trattate con T-DXd rispetto a 5,4 mesi per quelle trattate con chemioterapia standard. In aggiunta, la sopravvivenza globale (*overall survival*, OS) mediana nella popolazione totale dello studio è stata di 23,4 mesi per i soggetti che hanno ricevuto T-DXd rispetto a 16,8 mesi per i soggetti che hanno ricevuto chemioterapia standard. Inoltre, un'analisi esplorativa di 58 pazienti con malattia ormono-negativa ha dimostrato che T-DXd è efficace anche in queste pazienti.²¹ Le sotto-analisi hanno mostrato un'attività consistente di T-DXd sia nelle pazienti con score IHC 1+ che in quelle con score 2+/ISH-negativi, senza differenze significative tra di loro.^{3, 21} L'efficacia di T-DXd nel carcinoma

mammario HER2-low è stata ulteriormente confermata dallo **studio DAISY**, uno studio di fase II "open-label" che ha valutato T-DXd in tre coorti di pazienti con carcinoma mammario avanzato HER2-positivo (score 3+ o score 2+/ISH-positivo; Coorte 1), HER2-low (score 1+ o score 2+/ISH-negativo; Coorte 2) e HER2-nul (score 0; Coorte 3). Le pazienti della Coorte 2 hanno ottenuto una risposta obiettiva del 33,5%, con una durata mediana della risposta di 7,6 mesi e una PFS mediana di 6,7 mesi. In particolare, T-DXd ha mostrato un'attività anti-tumorale anche nelle pazienti appartenenti alla Coorte 3, anche se l'entità dell'effetto del trattamento è stata minore rispetto alle Coorti 1 e 2.²



FATTORI CRITICI DELLA VALUTAZIONE DI HER2 NEL CARCINOMA MAMMARIO



Nicola Fusco, Istituto Europeo di Oncologia, Milano
Alfredo Santinelli, Anatomia Patologica, Azienda Sanitaria Territoriale Pesaro e Urbino



Nicola Fusco, Istituto Europeo di Oncologia, Milano
Caterina Marchiò, Dipartimento di Scienze Mediche Anatomia Patologica, FPO-IRCCS Candiolo (TO)

FATTORI CRITICI DELLA VALUTAZIONE DI HER2 NEL CARCINOMA MAMMARIO

Le basi di una diagnosi di malattia HER2-low derivano dal tradizionale sistema di score storicamente adottato per identificare i carcinomi mammari "HER2-addicted". Ciò significa che **IHC e ISH rimangono le tecniche approvate da utilizzare per identificare la malattia HER2-low**, senza cioè la necessità di integrarle con ulteriori test né tanto meno la possibilità di sostituirle. Tuttavia, anche se le tecniche sono le stesse, occorre prestare una cura nell'esecuzione dei passaggi sui test al fine di poter individuare correttamente i gradi di espressione più bassi. Per prima cosa è opportuno che gli anatomopatologi curino la **fase pre-analitica** in stretta collaborazione con radiologi e chirurghi, come sottolineato anche dalle linee guida nazionali e internazionali nel corso degli anni.^{24,25} Questo concetto è stato rafforzato dalle dichiarazioni di consenso degli esperti ESMO¹⁸ e da diverse raccomandazioni della Società Italiana di Anatomia Patologica (SIAPeC).²⁶ Un ulteriore passaggio critico è rappresentato dall'**assay utilizzato per l'analisi di HER2**, poiché differenti assay IHC, anche se clinicamente validati e/o certificati CE-IVD, possono dare risultati leggermente diversi in assenza di un'adeguata armonizzazione (Figura 2).²⁷

Figura 2

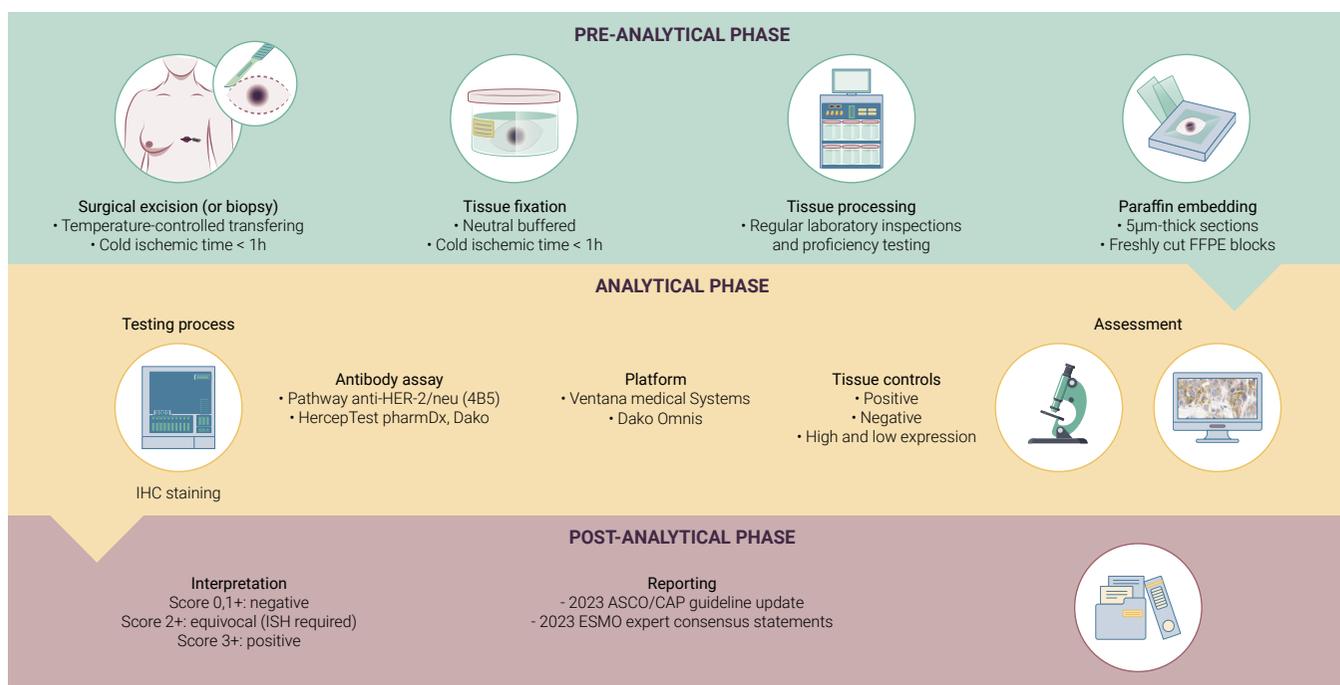


Figura 2. Procedure di laboratorio per valutare accuratamente la bassa espressione di HER2. Dopo l'escissione (biopsia o intervento chirurgico), il campione deve essere trasferito al laboratorio di patologia utilizzando un sistema a temperatura controllata. Il tempo di ischemia a freddo non deve superare 1 ora. La conservazione del campione durante il trasporto può essere ottenuta mediante sigillatura sottovuoto o immersione in formalina neutra tamponata al 4%. L'intervallo di tempo prima del campionamento deve essere compreso tra 6 e 72 ore. Al momento della lavorazione del tessuto, il patologo deve selezionare il campione più rappresentativo, sottoponendolo ad analisi immunohistochemica, con l'eventuale possibilità di utilizzare strumenti di patologia digitale validati. Il referto HER2 deve includere dettagli sulla percentuale di cellule neoplastiche positive, sull'intensità della colorazione e sul pattern di colorazione della membrana.

FATTORI CRITICI DELLA VALUTAZIONE DI HER2 NEL CARCINOMA MAMMARIO

In un recente lavoro di confronto delle performance dei due test più utilizzati nella pratica clinica, il monoclonale **Dako HercepTest™ GE001** e il **VENTANA anti-HER2/neu (4B5)**, è stata osservata un'elevata concordanza (98,2%) nell'assegnazione di un risultato positivo rispetto a quello negativo.²⁸ Tuttavia, nello spettro di espressione più basso, è stata dimostrata una **maggiore sensibilità per il test GE001 rispetto al 4B5**. Mentre tutti i casi classificati come 0 con il GE001 sono rimasti coerenti con lo score di 0 quando sono stati valutati con il 4B5, è da notare che il 37,5% dei casi inizialmente classificati come 0 dal 4B5 sono stati successivamente riclassificati come 1+ o 2+ quando gli stessi vetrini sono stati colorati con il GE001.²⁸ Da notare che il test utilizzato nel DB-04 e in tutti gli altri studi DB è il 4B5. Attualmente, mancano dati specifici sulle prestazioni di test CE-IVD alternativi (ad esempio, CB11 Leica) nel distinguere lo spettro inferiore di espressione di HER2, in particolare nella differenziazione tra i punteggi 0 e 1+. In assenza di alternative validate per l'esecuzione del test, è imperativo ricorrere a validazioni locali (in-house), utilizzando

controlli interni ed esterni che comprendano l'intera gamma di intensità e modelli di punteggio di HER2.¹⁴ Durante la **fase post-analitica del test** (cioè l'interpretazione della colorazione), occorre prestare **attenzione a possibili colorazioni artefattuali** causate da problemi preanalitici e/o analitici, che risultano, ad esempio, in **colorazioni non lineari o citoplasmatiche dot-like (Figura 2)**.²⁹ Si raccomanda di eseguire controlli interni ed esterni in ogni corsa di vetrini.³⁰ La **fase finale** del test HER2 è rappresentata dal **referto anatomopatologico del biomarcatore**, che dovrebbe essere ottimizzato per il carcinoma mammario HER2-low in conformità con gli aggiornamenti ASCO/CAP e le dichiarazioni di consenso ESMO del 2023.²⁹ **I risultati dell'IHC devono essere riportati in base al sistema di punteggio: punteggio 0** (nessuna colorazione o colorazione della membrana incompleta e debole/appena percettibile in $\leq 10\%$ delle cellule tumorali), **punteggio 1+** (colorazione della membrana incompleta e debole/appena percettibile in $> 10\%$ di cellule tumorali), **punteggio 2+** (colorazione completa della mem-

brana debole/moderata in $> 10\%$ delle cellule tumorali o colorazione completa e intensa della membrana in $\leq 10\%$ delle cellule tumorali) e **punteggio 3+** (colorazione completa e intensa della membrana in $> 10\%$ di cellule tumorali). **Combinando sinergicamente le tecniche IHC e ISH**, è essenziale fornire un referto chiaro, preciso e completo dello stato di HER2 per consentire decisioni terapeutiche migliori e una gestione personalizzata delle pazienti, come mostrato nella **Figura 3**.



FATTORI CRITICI DELLA VALUTAZIONE DI HER2 NEL CARCINOMA MAMMARIO

Figura 3

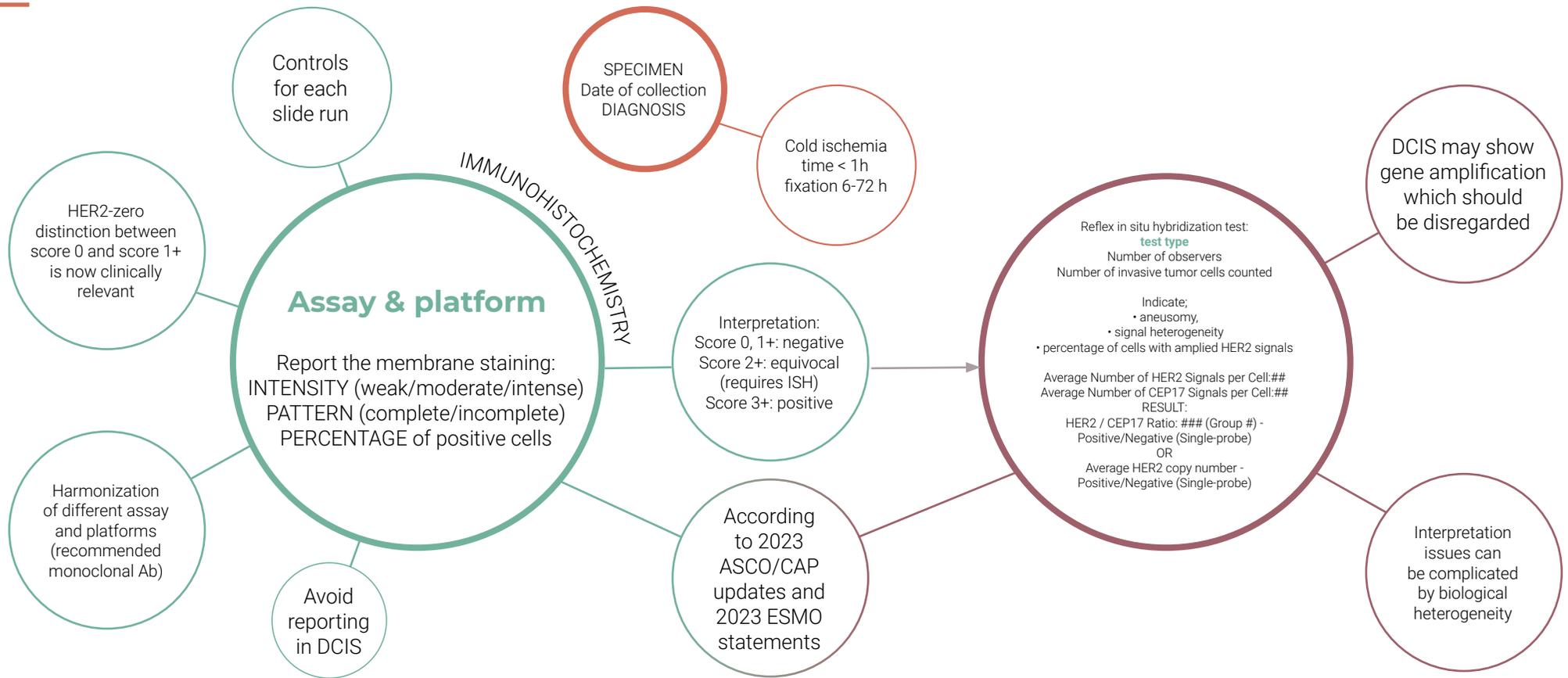


Figura 3. Panoramica delle barriere esistenti che possono ostacolare l'identificazione di HER2-low nel carcinoma mammario e delle soluzioni pratiche che potrebbero migliorare il test.

COSA TESTARE E QUANDO (RI)VALUTARE HER2



Nicola Fusco, Istituto Europeo di Oncologia, Milano

Paolo Graziano, Anatomia Patologica, Fondazione Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)

COSA TESTARE E QUANDO (RI)VALUTARE HER2

La variabilità spaziale e l'evoluzione temporale dell'espressione di HER2 sono fenomeni ben noti, definiti complessivamente dal termine "eterogeneità".³¹ Valutando tumori primari e corrispondenti metastatici, studi recenti hanno dimostrato che **lo stato HER2-low può variare lungo l'evoluzione della malattia.**^{32,33} È tuttavia probabile che questa variazione non sia attribuibile esclusivamente a fattori biologici, ma sia invece intrinseca alla definizione di bassa espressione di HER2. A questo proposito, **preziose informazioni provengono da un recente lavoro in cui sono stati campionati e valutati depositi metastatici multipli nel contesto di un programma di autopsia rapida.**³⁴ Su 10 pazienti analizzate per un totale di 306 campioni, solo 2 casi presentavano una mancanza di espressione di HER2 omogenea. I restanti 8 casi hanno mostrato un'elevata variabilità

dell'espressione di HER2 da score 0 a score 2+ (ISH-negativo), anche analizzando un singolo organo (fegato) con depositi metastatici multipli. Questi risultati indicano la necessità di non limitarsi all'analisi dello stato HER2 su un singolo campione metastatico in presunte popolazioni HER2-zero. È degno di nota il fatto che l'efficacia di T-DXd rispetto al TPC sia rimasta consistente in vari tipi di campioni tumorali.³⁵ Questi risultati suggeriscono un'ipotesi o una speculazione: una volta che si osserva un "profilo HER2-low" in qualsiasi momento della storia della malattia, i pazienti dovrebbero essere considerati candidati HER2-low.³⁶ Inoltre, è importante notare che una percentuale significativa di risultati storici con score 0, dopo una nuova valutazione nel contesto di HER2-basso, sono ora riclassificati come score 1.³⁷ **Ciò evidenzia l'importanza di prendere in considerazione un**

nuovo test, soprattutto per i casi con uno score storico IHC di HER2 pari a 0. Questa nozione è stata confermata da uno studio retrospettivo (NCT04807595), multicentrico, non interventistico, condotto a livello mondiale su campioni di tessuto e cartelle cliniche di 789 pazienti con carcinoma mammario non resecabile/metastatico HER2-negativo, precedentemente HER2-negativo (score 0, 1+, 2+/ISH-negativo).³⁸ Il disegno dello studio prevedeva la rivalutazione dei vetrini HER2 IHC (4B5 o altro) da parte degli anatomopatologi esperti e ha rivelato che più del 30% dei risultati storici IHC score 0 sono stati riclassificati come HER2-low. **La formazione e l'addestramento sono fondamentali in questo contesto per richiamare l'attenzione sulle sfumature del carcinoma mammario HER2-low e sulle complessità legate alla re-fertazione degli score 1+ o 0.**^{18, 39, 40}



L'INTELLIGENZA ARTIFICIALE PUÒ POTENZIARE LA PREDITTIVITÀ DEL TEST HER2?



Nicola Fusco, Istituto Europeo di Oncologia, Milano
Giuseppe Perrone, Anatomia Patologica Università Campus Bio-Medico di Roma

L'INTELLIGENZA ARTIFICIALE PUÒ POTENZIARE LA PREDITTIVITÀ DEL TEST HER2?

L'interesse per la patologia digitale è in crescita esponenziale, in particolare nel campo dell'intelligenza artificiale (AI) e delle applicazioni di "machine learning" per la patologia oncologica predittiva.^{16,41,42} Dati recenti sulla valutazione di HER2-low, utilizzando metodi di AI, hanno rivelato che la patologia digitale e computazionale potrebbe fornire indicazioni preziose **sul numero e sulla distribuzione delle diverse cellule che esprimono HER2 nel carcinoma mammario.**⁴³ Lo studio ha dimostrato che è possibile ottenere risultati affidabili utilizzando algoritmi di machine learning con o senza supervisione. Ad oggi, esistono **diverse piattaforme** che offrono questo tipo di analisi, anche se per lo più in ambito accademico. Tra queste, Visiopharm HER2-CONNECT™ e Ibx Galen™ Breast HER2 sono solo per uso di ricerca, mentre Paige HER2Complete e Ventana uPath HER2 (4B5) sono CE-IVD.^{44,45} Tuttavia, questi algoritmi sono ancora soggetti a una serie di sfide significative.⁴⁶⁻⁴⁸ In primo luogo, è essenziale riconoscere che anche piccole variazioni nei **processi preanalitici** (ad esempio, la preparazione dei vetrini,

le procedure di colorazione, la manipolazione dei campioni di tessuto) **possono introdurre discrepanze** sottili ma critiche nella qualità dei colori e delle immagini. Queste discrepanze, a loro volta, possono esercitare una notevole influenza sulla qualità complessiva dei vetrini digitalizzati e, di conseguenza, sull'accuratezza dell'analisi che ne consegue.⁴⁹ Ciò sottolinea la **necessità di una meticolosa attenzione ai dettagli nella fase preanalitica** per garantire coerenza e affidabilità nella patologia digitale. Inoltre, la **mancanza di standardizzazione tra i vari algoritmi** di machine learning rappresenta un notevole ostacolo. Il campo della patologia digitale è caratterizzato da una proliferazione di algoritmi diversi, ciascuno con un approccio e un'architettura distinti. L'assenza di un quadro unificato o di pratiche standardizzate può causare problemi di interoperabilità e ostacolare la completa integrazione di questi algoritmi nei flussi di lavoro clinici. Di conseguenza, **il raggiungimento di un consenso su pratiche standardizzate e soluzioni interoperabili è fondamentale per migliorare l'efficacia e l'efficienza delle applicazioni della patologia**

digitale. Infine, una questione critica è rappresentata dall'**assenza di studi clinici prospettici che valutino le performance di queste soluzioni software** in scenari realistici per il cancro al seno HER2-low. Sebbene il potenziale degli algoritmi di machine learning in patologia sia promettente, la loro reale utilità e affidabilità clinica può essere comprovata solo attraverso rigorosi studi clinici randomizzati.



PROSPETTIVE PER IL RUOLO DELLA PATOLOGIA MOLECOLARE

Sono stati proposti test basati sull'espressione genica dell'mRNA di HER2 per una misurazione più diretta dell'espressione di HER2, fornendo una valutazione quantitativa dell'amplificazione del gene HER2.⁵⁰⁻⁵³ Sono **disponibili diversi kit e piattaforme commerciali** per condurre test HER2 basati su RT-PCR, che offrono risultati standardizzati e riproducibili, sebbene non siano stati convalidati in studi clinici.^{54,55} Un altro test basato sull'mRNA è il sistema NanoString nCounter®, che utilizza la tecnologia dei barcode digitali.⁵⁶ In questo metodo, sonde

specifiche sono progettate per catturare e contare singole molecole di mRNA. Il sistema nCounter® fornisce una quantificazione altamente sensibile e accurata dei livelli di espressione di HER2 e offre il vantaggio del multiplexing, consentendo la valutazione simultanea di altri geni rilevanti. Anche le tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS) sono emerse come potenti strumenti per la valutazione dello stato di HER2.⁵⁷ L'NGS consente il sequenziamento simultaneo di migliaia di molecole di DNA e RNA, fornendo informazioni complete sull'amplificazione e lo stato mutazionale di HER2 e di altri geni rilevanti. Questo approccio consente di identificare nuove alterazioni di HER2 e può aiutare a sottoclassificare i tumori HER2-positivi in base ai loro profili genomici.⁵⁸ I test basati sull'espressione genica/mRNA hanno il vantaggio di superare alcune limitazioni dell'IHC e della FISH, come la variabilità inter-osservatore e l'eterogeneità dei tessuti,⁵⁹ pertanto questi test possono avere il potenziale per migliorare la valutazione dello stato di HER2 nei pazienti

con BC. **Offrendo misurazioni quantitative e complete dell'espressione di HER2, si potrebbe sostenere che queste tecniche potrebbero aiutare nella scelta del trattamento e migliorare gli outcomes dei pazienti; tuttavia, studi specifici applicati a coorti clinicamente rilevanti devono ancora essere eseguiti.** Il punto critico di questa letteratura piuttosto vasta è che non mostra in misura consistente un livello sufficiente di concordanza tra i test molecolari e quelli basati sui tessuti nel definire lo stato di HER2, quando giudicato secondo i criteri ASCO/CAP. Di conseguenza, l'uso di test molecolari al posto dei metodi convenzionali in situ non è ancora raccomandato.⁶⁰ Dal punto di vista dei carcinomi HER2, è stato dimostrato che i livelli di HER2 mRNA^{10,11,61} e il numero di copie di HER2¹¹ correlano con l'espressione della proteina mediante IHC. Tuttavia, i test molecolari necessitano di ulteriori validazioni necessarie prima che il loro utilizzo venga adottato nella routine diagnostica.⁶²⁻⁶⁵



HER2 NELLE CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI

Le cellule tumorali circolanti (CTC) comprendono un gruppo eterogeneo di cellule derivate dal tumore primario o metastatico nel flusso sanguigno.⁶⁶⁻⁶⁸ L'individuazione, la conta e l'analisi delle CTC hanno implicazioni cliniche significative in diversi tipi di tumori solidi, compreso il carcinoma mammario. Finora, **diversi gruppi all'interno della Società Internazionale di Biopsia Liquida (ISLB) hanno proposto applicazioni cliniche per le cellule tumorali circolanti (CTC), con particolare attenzione al conteggio delle CTC nelle pazienti con carcinoma mammario.**⁶⁹ Ad oggi, CellSearch® (Menarini, Italia) è considerato l'approccio gold standard per isolare e contare le CTC dal sangue periferico. **La procedura di enumerazione delle CTC viene eseguita classificando i pazienti con BC sulla base di 5 cellule come valore di cutoff positivo.**⁷⁰ D'altra parte, una strategia di

isolamento delle CTC più complessa e tecnicamente valida comprende piattaforme basate su anticorpi, che sono in grado di combinare parametri fisici (dimensioni) e selezione immunitaria specifica (anticorpi) per l'identificazione degli antigeni sulla superficie delle CTC. La caratterizzazione degli antigeni di superficie delle CTC consente un'analisi tridimensionale completa dei componenti biologici rilasciati nel flusso sanguigno dal tessuto tumorale.⁷¹ Questo approccio amplia il panorama dei biomarcatori predittivi al di là del DNA e dell'RNA, includendo proteine specifiche trasportate dalle CTC. **L'espressione di HER2 nelle CTC può rappresentare un'arma fondamentale per la stratificazione delle pazienti in base al livello di espressione di HER2.** È interessante notare che è stata osservata una OS minore [9,7 (7,1-12,3)] nelle pazienti con carcinoma mammario

con forte colorazione di HER2 che presentano ≥ 1 CTC rispetto alle pazienti con carcinoma mammario con colorazione di HER2 da negativa a moderata senza alcun segnale per la rilevazione di CTC.⁷² La valutazione dell'espressione di HER2 sulle CTC ha lo scopo di integrare la valutazione dei tessuti, fornendo una prospettiva dinamica in aggiunta alle informazioni statiche ottenute dall'analisi dei tessuti. Tenendo conto di questi principi, risulta evidente che i livelli di espressione di HER2 sulle CTC di pazienti affette da carcinoma mammario potrebbero potenzialmente servire come preziosa fonte di informazioni, anche nei casi in cui la malattia presenta una bassa espressione di HER2. Tuttavia, è importante notare che, ad oggi, mancano dati sostanziali a riguardo.



CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

La comparsa di HER2-low come “termine ombrello” per un sottogruppo di pazienti affette da carcinoma mammario che possono essere trattate con T-DXd sta spingendo la comunità degli anatomopatologi a ripensare alle modalità di test. Pertanto, **gli anatomopatologi si trovano ora ad affrontare il compito di identificare le sottili sfumature delle dinamiche di espressione di HER2 in un intervallo più ampio, che in precedenza era considerato clinicamente irrilevante.** Per affrontare questa sfida, sono essenziali un rigoroso controllo qualità e chiare linee guida di valutazione. Sebbene le metodiche alla base di questi test (IHC/ISH) siano ben consolidate e ampiamente disponibili nei laboratori di anatomia patologica di tutto il mondo, la comparsa di HER2-low richiede una formazione dei patologi per analizzare al meglio l'espressione di questo marcatore. I nuovi metodi di analisi molecolare HER2, le tecnologie di digital pathology e le biopsie liquide sembrano strategie promettenti per questo snodo diagnostico, sebbene ancora premature e non supportate da studi clinici randomizzati specifici per HER2 nel carcinoma mammario. In conclusione, si possono definire **cinque criteri** per la valutazione della malattia HER2-low e della possibile risposta agli ADC che hanno dimostrato una attività nel contesto di questa malattia:

1

È importante introdurre **il concetto di bassi livelli di espressione di HER2** nel carcinoma mammario e riconoscere la rilevanza di nuovi possibili trattamenti per le nostre pazienti.

2

È importante **rivalutare inizialmente la malattia avanzata**, per confermare la diagnosi e testare il tessuto metastatico; tuttavia, **anche i tumori primitivi possono essere fonte di informazione preziosa** sullo stato di HER2-low nel caso in cui il tessuto metastatico non sia abbastanza informativo.

3

Si raccomanda di **fornire categorie di score esatte nel referto** (parametro essenziale), includendo eventualmente anche la percentuale di cellule che mostrano l'espressione di HER2 anche a bassi livelli (parametro auspicabile da discutere con le società scientifiche).

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

4

Gli **anatomopatologi**, che storicamente sono i curatori delle caratteristiche preanalitiche, dei saggi analitici e dell'interpretazione del test, dovrebbero prestare ulteriore attenzione a tutte queste fasi per effettuare le analisi più precise possibili.

5

Il limite inferiore dei livelli di HER2 clinicamente rilevanti non è ancora stato chiarito: gli attuali test IHC sono stati sviluppati per identificare la over-espressione di HER2 nella misura in cui lo score 0 di HER2 non corrisponde alla mancanza di recettori HER2 sulla membrana cellulare delle cellule tumorali. Di conseguenza, **è evidente la necessità di sviluppare dei test che siano in grado di rilevare le espressioni più basse di HER2.** Attualmente, lo studio DESTINY Breast-06 (DB-06) sta esaminando T-DXd in pazienti con score HER2 pari a 0, secondo ASCO/CAP, o HER2-ultralow, compresi valori IHC > 0 e $\leq 10\%$. L'obiettivo è quello di comprovare la validità e l'utilità clinica del biomarcatore "HER2-zero > 0 ", valutando livelli IHC di HER2 progressivamente più bassi. A differenza del precedente studio DB-04, il DB-06 include pazienti con score IHC che vanno da più di "nullo" a meno di 1+. I risultati sono attesi nel 2024 e potrebbero stabilire che T-DXd è un'opzione terapeutica efficace per due gruppi distinti: quelli con attivazione/dipendenza del pathway HER2 (HER2 over-espresso o amplificato) e quelli con presenza della proteina HER2 (HER2 non over-espresso o amplificato). In più, potenziali risultati positivi dello studio DB-06 andrebbero ad abbassare significativamente la soglia dell'HER2 in modo da poter rispondere al trastuzumab.

Infine, è corretto affermare che **gli anatomopatologi debbano essere pronti ad accogliere ulteriori sviluppi, derivanti sia da semplici score IHC (livelli di HER2 ultra-low), sia da soluzioni basate su AI o altre tecniche.**

Conflitti di interesse

CM reports personal fees from Bayer, Roche, Daiichi Sankyo, Astrazeneca, Illumina, Veracyte. CC reports personal fees for consulting, advisory role, and speakers' bureau from Lilly, Roche, Novartis, MSD, Seagen, Gilead, Daiichi Sankyo, AstraZeneca, and Pfizer. CS reports personal fees for consulting, advisory role, and speakers' bureau from Astra Zeneca, Bristol Myers Squibb, Daiichi-sankyo, Gilead, Novartis, Veracyte. AS Roche-Ventana, Novartis, Astrazeneca, Amgen, Gilead PG Consulting/Honoraria from Eli-Lilly, Pfizer, Novartis, AstraZeneca, Boehringer-Ingelheim, Roche, MSD, Amgen. UM has received personal fees (as consultant and/or speaker bureau) from Boehringer Ingelheim, Roche, MSD, Amgen, Thermo Fisher Scientific, Eli Lilly, Diaceutics, GSK, Merck and AstraZeneca, Janssen, Diatech, Novartis and Hedera unrelated to the current work. GNF reports personal fees for advisory role from Astra Zeneca. CDA reports advisory role for Roche, Lilly, Novartis, Astrazeneca, Pfizer, Seagen, Daicii-Sankyo, Gilead, and GSK and speaker honoraria from Roche, Lilly, Novartis, Pfizer, Seagen, GSK, GILEAD, and Daiichi-Sankyo. Travel Grants from Gilead and research support (to the Institution) from Novartis, GILEAD, and Daiichi-Sankyo outside the submitted work. GP reports research funding (to Institution) from Astrazeneca, Exact Sciences, Diapath; personal honoraria as invited speaker from Amgen, AstraZeneca, Bio-Optica, Boehringer-Ingelheim; Diatech Pharmacogenetics, Exact Sciences, GlaxoSmithKline, Incyte, Janssen-Cilag; Lilly, Novartis, Roche, Merck Serono, Veracyte; participation in advisory board for Amgen, Astrazeneca, Novartis, Exact Sciences, Roche. GC reports funding from AstraZeneca, Daiichi Sankyo, and Merck; consulting fees from BMS, Roche, Pfizer, Novartis, Lilly, Astra Zeneca, Daiichi Sankyo, Merck, Seagen, and Ellipsis; honoraria from Pfizer, Lilly; support for attending meetings from Roche, Pfizer. NF has received honoraria for consulting, advisory role, speaker bureau, travel, and/or research grants from Merck Sharp & Dohme (MSD), Merck, Novartis, AstraZeneca, Roche, Menarini, Daiichi Sankyo, GlaxoSmithKline (GSK), Gilead, Adicet Bio, Sermonix, Reply, Veracyte Inc., Leica Biosystems, Lilly. These companies had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and/or in the decision to publish the results. All other authors declare no potential conflicts of interest.

Bibliografia

1. Modi S, Jacot W, Yamashita T, Sohn J, Vidal M, Tokunaga E, et al. Trastuzumab deruxtecan (T-DXd) versus treatment of physician's choice (TPC) in patients (pts) with HER2-low unresectable and/or metastatic breast cancer (mBC): Results of DESTINY-Breast04, a randomized, phase 3 study. *Journal of Clinical Oncology*. 2022;40(17_suppl):LBA3-LBA.
2. Mosele F, Deluche E, Lusque A, Le Bescond L, Filleron T, Pradat Y, et al. Trastuzumab deruxtecan in metastatic breast cancer with variable HER2 expression: the phase 2 DAISY trial. *Nat Med*. 2023;29(8):2110-20.
3. Nicolò E, Boscolo Bielo L, Curigliano G, Tarantino P. The HER2-low revolution in breast oncology: steps forward and emerging challenges. *Ther Adv Med Oncol*. 2023;15:17588359231152842.
4. Venetis K, Crimini E, Sajjadi E, Corti C, Guerini-Rocco E, Viale G, et al. HER2 low, ultra-low, and novel complementary biomarkers: expanding the spectrum of HER2 positivity in breast cancer. *Front Mol Biosci*. 2022;fmolb.2022.834651.
5. Schlam I, Tolaney SM, Tarantino P. How I treat HER2-low advanced breast cancer. *Breast*. 2023;67:116-23.
6. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol*. 2018;36(20):2105-22.
7. Wolff AC, Somerfield MR, Dowsett M, Hammond MEH, Hayes DF, McShane LM, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: ASCO–College of American Pathologists Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*. 2023;41(22):3867-72.
8. Tarantino P, Viale G, Press MF, Hu X, Penault-Llorca F, Bardia A, et al. ESMO expert consensus statements (ECS) on the definition, diagnosis, and management of HER2-low breast cancer. *Annals of Oncology*. 2023;34(8):645-59.
9. Venetis K, Crimini E, Sajjadi E, Corti C, Guerini-Rocco E, Viale G, et al. HER2 Low, Ultra-low, and Novel Complementary Biomarkers: Expanding the Spectrum of HER2 Positivity in Breast Cancer. *Front Mol Biosci*. 2022;9:834651.
10. Berrino E, Annaratone L, Bellomo SE, Ferrero G, Gagliardi A, Bragioni A, et al. Integrative genomic and transcriptomic analyses illuminate the ontology of HER2-low breast carcinomas. *Genome Med*. 2022;14(1):98.
11. Schettini F, Chic N, Brasó-Maristany F, Paré L, Pascual T, Conte B, et al. Clinical, pathological, and PAM50 gene expression features of HER2-low breast cancer. *NPJ breast cancer*. 2021;7(1):1.
12. Tarantino P, Tolaney SM, Curigliano G. Trastuzumab deruxtecan (T-DXd) in HER2-low metastatic breast cancer treatment. *Ann Oncol*. 2023.
13. Sajjadi E, Venetis K, Ivanova M, Fusco N. Improving HER2 testing reproducibility in HER2-low breast cancer. *Cancer Drug Resistance*. 2022;5(4):882-8.
14. Sajjadi E, Guerini-Rocco E, De Camilli E, Pala O, Mazzarol G, Venetis K, et al. Pathological identification of HER2-low breast cancer: Tips, tricks, and troubleshooting for the optimal test. *Front Mol Biosci*. 2023;10:1176309.
15. Rüschoff J, Friedrich M, Nagelmeier I, Kirchner M, Andresen LM, Salomon K, et al. Comparison of HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis, GE001) with Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) in breast cancer: correlation with HER2 amplification and HER2 low status. *Virchows Archiv*. 2022.
16. Sajjadi E, Frascarelli C, Venetis K, Bonizzi G, Ivanova M, Vago G, et al. Computational pathology to improve biomarker testing in breast cancer: how close are we? *Eur J Cancer Prev*. 2023.
17. Ju S, Chen C, Zhang J, Xu L, Zhang X, Li Z, et al. Detection of circulating tumor cells: opportunities and challenges. *Biomark Res*. 2022;10(1):58.
18. Tarantino P, Viale G, Press MF, Hu X, Penault-Llorca F, Bardia A, et al. ESMO expert consensus statements (ECS) on the definition, diagnosis, and management of HER2-low breast cancer. *Ann Oncol*. 2023;34(8):645-59.
19. Fehrenbacher L, Cecchini RS, Geyer CE, Jr., Rastogi P, Costantino JP, Atkins JN, et al. NSABP B-47/NRG Oncology Phase III Randomized Trial Comparing Adjuvant Chemotherapy With or Without Trastuzumab in High-Risk Invasive Breast Cancer Negative for HER2 by FISH and With IHC 1+ or 2. *J Clin Oncol*. 2020;38(5):444-53.
20. Burris HA, 3rd, Rugo HS, Vukelja SJ, Vogel CL, Borson RA, Limentani S, et al. Phase II study of the antibody drug conjugate trastuzumab-DM1 for the treatment of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive breast cancer after prior HER2-directed therapy. *J Clin Oncol*. 2011;29(4):398-405.
21. Modi S, Jacot W, Yamashita T, Sohn J, Vidal M, Tokunaga E, et al. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2022;387(1):9-20.
22. Drago JZ, Modi S, Chandrapatya S. Unlocking the potential of antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18(6):327-44.
23. Gampenrieder SP, Rinnerthaler G, Tinchon C, Petzer A, Balic M, Heibl S, et al. Landscape of HER2-low metastatic breast cancer (MBC): results from the Austrian AGMT_MBC-Registry. *Breast cancer research : BCR*. 2021;23(1):112.
24. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013;31(31):3997-4013.
25. Fusco N, Ragazzi M, Sajjadi E, Venetis K, Piciotti R, Morganti S, et al. Assessment of estrogen receptor low positive status in breast cancer: Implications for pathologists and oncologists. *Histol Histopathol*. 2021;18376.
26. Fusco N, Rizzo A, Costarelli L, Santinelli A, Cerbelli B, Scatena C, et al. Pathological examination of breast cancer samples before and after neoadjuvant therapy: recommendations from the Italian Group for the Study of Breast Pathology - Italian Society of Pathology (GIPaM-SIA-PeC). *Pathologica*. 2022;114(2):104-10.
27. Fusco N, Ivanova M, Frascarelli C, Criscitiello C, Cerbelli B, Pignataro MG, et al. Advancing the PD-L1 CPS test in metastatic TNBC: Insights from pathologists and findings from a nationwide survey. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2023;190:104103.
28. Rüschoff J, Friedrich M, Nagelmeier I, Kirchner M, Andresen LM, Salomon K, et al. Comparison of HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis, GE001) with Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) in breast cancer: correlation with HER2 amplification and HER2 low status. *Virchows Arch*. 2022;481(5):685-94.
29. Ivanova M, Porta FM, D'Ercole M, Pescia C, Sajjadi E, Cursano G, et al. Standardized pathology report for HER2 testing in compliance with 2023 ASCO/CAP updates and 2023 ESMO consensus statements on HER2-low breast cancer. *Virchows Arch*. 2023.
30. Marchiò C, Dowsett M, Reis-Filho JS. Revisiting the technical validation of tumour biomarker assays: how to open a Pandora's box. *BMC Med*. 2011;9:41.
31. Hu X, Chen W, Li F, Ren P, Wu H, Zhang C, et al. Expression changes of ER, PR, HER2, and Ki-67 in primary and metastatic breast cancer and its clinical significance. *Front Oncol*. 2023;13:1053125.
32. Miglietta F, Griguolo G, Bottosso M, Giarratano T, Lo Mele M, Fassan M, et al. Evolution of HER2-low expression from primary to recurrent breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 2021;7(1):137.
33. Bergeron A, Bertaut A, Beltjens F, Charon-Barra C, Amet A, Jankowski C, et al. Anticipating changes in the HER2 status of breast tumours with disease progression-towards better treatment decisions in the new era of HER2-low breast cancers. *Br J Cancer*. 2023;129(1):122-34.
34. Geukens T, De Schepper M, Richard F, Maetens M, Van Baelen K, Mahdami A, et al. Intra-patient and inter-metastasis heterogeneity of HER2-low status in metastatic breast cancer. *Eur J Cancer*. 2023;188:152-60.
35. Prat A, Modi S, Tsurutani J, Cameron D, Harbeck N, Garrido C, et al. Abstract HER2-18: HER2-18 Determination of HER2-low status in tumors of patients with unresectable and/or metastatic breast cancer in DESTINY-Breast04. *Cancer Research*. 2023;83(5_Supplement):HER2-18-HER2-.

Bibliografia

36. Fernandez AI, Liu M, Bellizzi A, Brock J, Fadare O, Hanley K, et al. Examination of Low ERBB2 Protein Expression in Breast Cancer Tissue. *JAMA Oncol.* 2022;8(4):1-4.
37. Bardia A, Viale G. HER2-Low Breast Cancer-Diagnostic Challenges and Opportunities for Insights from Ongoing Studies: A Podcast. *Target Oncol.* 2023;18(3):313-9.
38. Viale G, Basik M, Niikura N, Tokunaga E, Brucker S, Penault-Llorca F, et al. Retrospective study to estimate the prevalence and describe the clinicopathological characteristics, treatments received, and outcomes of HER2-low breast cancer. *ESMO Open.* 2023;8(4).
39. Rüschoff J, Penner A, Ellis IO, Hammond MEH, Lebeau A, Osamura RY, et al. Abstract HER2-13: HER2-13 Proficiency assessment of HER2-low breast cancer scoring with the Ventana PATHWAY 4B5 and Dako HercepTest HER2 assays and the impact of pathologist training. *Cancer Research.* 2023;83(5_Supplement):HER2-13-HER2-.
40. Wolff AC, Somerfield MR, Dowsett M, Hammond MEH, Hayes DF, McShane LM, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: ASCO-College of American Pathologists Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2023;Jco2202864.
41. Caldonazzi N, Rizzo PC, Eccher A, Girolami I, Fanelli GN, Naccarato AG, et al. Value of Artificial Intelligence in Evaluating Lymph Node Metastases. *Cancers (Basel).* 2023;15(9).
42. Frascarelli C, Bonizzi G, Musico CR, Mane E, Cassi C, Guerini Rocco E, et al. Revolutionizing Cancer Research: The Impact of Artificial Intelligence in Digital Biobanking. *J Pers Med.* 2023;13(9).
43. Wu S, Yue M, Zhang J, Li X, Li Z, Zhang H, et al. The Role of Artificial Intelligence in Accurate Interpretation of HER2 Immunohistochemical Scores 0 and 1+ in Breast Cancer. *Mod Pathol.* 2023;36(3):100054.
44. Sode M, Thagaard J, Eriksen JO, Laenkholm AV. Digital image analysis and assisted reading of the HER2 score display reduced concordance: pitfalls in the categorisation of HER2-low breast cancer. *Histopathology.* 2023;82(6):912-24.
45. Yoder A, Inge LJ, Chen C-C, Marati VR, Nguyen TK, Zuiderveld K, et al. Computer-aided scoring of erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 (HER2) gene amplification status in breast cancer. *Journal of Pathology Informatics.* 2022;13:100116.
46. Chlipala EA, Butters M, Brous M, Fortin JS, Archuleta R, Copeland K, et al. Impact of Preanalytical Factors During Histology Processing on Section Suitability for Digital Image Analysis. *Toxicol Pathol.* 2021;49(4):755-72.
47. Jones AD, Graff JP, Darrow M, Borowsky A, Olson KA, Gandour-Edwards R, et al. Impact of pre-analytical variables on deep learning accuracy in histopathology. *Histopathology.* 2019;75(1):39-53.
48. Palm C, Connolly CE, Masser R, Padberg Sgier B, Karamitopoulou E, Simon Q, et al. Determining HER2 Status by Artificial Intelligence: An Investigation of Primary, Metastatic, and HER2 Low Breast Tumors. *Diagnostics (Basel).* 2023;13(1).
49. Jahn SW, Plass M, Moinfar F. Digital Pathology: Advantages, Limitations and Emerging Perspectives. *J Clin Med.* 2020;9(11).
50. Benöhr P, Henkel V, Speer R, Vogel U, Sotlar K, Aydeniz B, et al. Her-2/neu expression in breast cancer—A comparison of different diagnostic methods. *Anticancer Res.* 2005;25(3b):1895-900.
51. Marchiò C, Annaratone L, Marques A, Casorzo L, Berrino E, Sapino A. Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond. *Seminars in Cancer Biology.* 2021;72:123-35.
52. Gjerdrum LM, Sorensen BS, Kjeldsen E, Sorensen FB, Nexø E, Hamilton-Dutoit S. Real-time quantitative PCR of microdissected paraffin-embedded breast carcinoma: an alternative method for HER-2/neu analysis. *J Mol Diagn.* 2004;6(1):42-51.
53. Zoppoli G, Garuti A, Cirmena G, di Cantogno LV, Botta C, Gallo M, et al. Her2 assessment using quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction reliably identifies Her2 overexpression without amplification in breast cancer cases. *J Transl Med.* 2017;15(1):91.
54. Wasserman BE, Carvajal-Hausdorf DE, Ho K, Wong W, Wu N, Chu VC, et al. High concordance of a closed-system, RT-qPCR breast cancer assay for HER2 mRNA, compared to clinically determined immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, and quantitative immunofluorescence. *Laboratory Investigation.* 2017;97(12):1521-6.
55. El Hadi H, Abdellaoui-Maane I, Kottwitz D, El Amrani M, Bouchoutrouch N, Qmichou Z, et al. Development and evaluation of a novel RT-qPCR based test for the quantification of HER2 gene expression in breast cancer. *Gene.* 2017;605:114-22.
56. Hyeon J, Cho SY, Hong ME, Kang SY, Do I, Im YH, et al. NanoString nCounter® Approach in Breast Cancer: A Comparative Analysis with Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction, In Situ Hybridization, and Immunohistochemistry. *J Breast Cancer.* 2017;20(3):286-96.
57. Wojtaszewska M, Stępień R, Woźna A, Piernik M, Sztromwasser P, Dąbrowski M, et al. Validation of HER2 Status in Whole Genome Sequencing Data of Breast Cancers with the Ploidy-Corrected Copy Number Approach. *Mol Diagn Ther.* 2022;26(1):105-16.
58. Zhang G-C, Liao N, Chen B, Lin J, Lai J, Xiao W, et al. Next-generation sequencing (NGS) identifies a new breast cancer subtype with HER2 low-amplification status as a candidate for targeted therapy. *Journal of Clinical Oncology.* 2020;38(15_suppl):553-.
59. Furrer D, Sanschagrin F, Jacob S, Diorio C. Advantages and Disadvantages of Technologies for HER2 Testing in Breast Cancer Specimens. *American Journal of Clinical Pathology.* 2015;144(5):686-703.
60. Bartlett JMS, Starczynski J. Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction and the Oncotype DX Test for Assessment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Status: Time to Reflect Again? *Journal of Clinical Oncology.* 2011;29(32):4219-21.
61. Marchiò C, Dell'Orto P, Annaratone L, Geyer FC, Venesio T, Berrino E, et al. The Dilemma of HER2 Double-equivocal Breast Carcinomas: Genomic Profiling and Implications for Treatment. *Am J Surg Pathol.* 2018;42(9):1190-200.
62. Prat A, Pascual T, De Angelis C, Gutierrez C, Llombart-Cussac A, Wang T, et al. HER2-Enriched Subtype and ERBB2 Expression in HER2-Positive Breast Cancer Treated with Dual HER2 Blockade. *J Natl Cancer Inst.* 2020;112(1):46-54.
63. Atallah NM, Alsaleem M, Toss MS, Mongan NP, Rakha E. Differential response of HER2-positive breast cancer to anti-HER2 therapy based on HER2 protein expression level. *Br J Cancer.* 2023.
64. Schettini F, Pascual T, Conte B, Chic N, Brasó-Maristany F, Galván P, et al. HER2-enriched subtype and pathological complete response in HER2-positive breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev.* 2020;84:101965.
65. Dieci MV, Prat A, Tagliafico E, Paré L, Ficarra G, Bisagni G, et al. Integrated evaluation of PAM50 subtypes and immune modulation of pCR in HER2-positive breast cancer patients treated with chemotherapy and HER2-targeted agents in the CherLOB trial. *Ann Oncol.* 2016;27(10):1867-73.
66. Oshi M, Murthy V, Takahashi H, Huyser M, Okano M, Tokumaru Y, et al. Urine as a Source of Liquid Biopsy for Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(11).
67. Li W, Liu JB, Hou LK, Yu F, Zhang J, Wu W, et al. Liquid biopsy in lung cancer: significance in diagnostics, prediction, and treatment monitoring. *Mol Cancer.* 2022;21(1):25.
68. Kong SL, Liu X, Tan SJ, Tai JA, Phua LY, Poh HM, et al. Complementary Sequential Circulating Tumor Cell (CTC) and Cell-Free Tumor DNA (ctDNA) Profiling Reveals Metastatic Heterogeneity and Genomic Changes in Lung Cancer and Breast Cancer. *Front Oncol.* 2021;11:698551.
69. Munoz-Arcos LS, Nicolò E, Serafini MS, Gerratana L, Reduzzi C, Cristofanilli M. Latest advances in clinical studies of circulating tumor cells in early and metastatic breast cancer. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2023;381:1-21.
70. Lone SN, Nisar S, Masoodi T, Singh M, Rizwan A, Hashem S, et al. Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Molecular Cancer.* 2022;21(1):79.
71. Di Cosimo S, De Marco C, Silvestri M, Busico A, Vingiani A, Pruner G, et al. Can we define breast cancer HER2 status by liquid biopsy? *Int Rev Cell Mol Biol.* 2023;381:23-56.
72. Müller V, Banys-Paluchowski M, Friedl TWP, Fasching PA, Schneeweiss A, Hartkopf A, et al. Prognostic relevance of the HER2 status of circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients screened for participation in the DETECT study program. *ESMO Open.* 2021;6(6):100299.

CLINICAL Interview



Progetto realizzato con il contributo non condizionante di

